

Departament de Farmacologia
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

***Influencia del nivel de IgE sobre la actividad
secretora del mastocito cutáneo en los
procesos alérgicos en el perro***

Pilar Brazís Caubet



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Farmacologia i de Terapèutica

Unitat de Farmacologia Veterinària

La **Dra. Anna Puigdemont Rodríguez**, Profesora Titular del Departament de Farmacologia i Terapèutica de la Universitat Autònoma de Barcelona y el **Dr. Lluís Ferrer Caubet**, Catedrático de Patología Animal del Departament de Cirurgia i Medicina Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICAN: Que el trabajo titulado: "*Influencia del nivel de IgE sobre la actividad secretora del mastocito cutáneo en los procesos alérgicos en el perro*", cuya autora es PILAR BRAZIS CAUBET, ha sido realizado bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctora por la Universidad Autònoma de Barcelona.

Dra. Anna Puigdemont Rodríguez

Dr. Lluís Ferrer Caubet

Bellaterra, 15 de marzo de 2001

ITACA

Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.
No temas a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al colérico Posidón,
seres tales jamás hallarás en tu camino,
si tu pensar es elevado, si selecta
es la emoción que toca tu espíritu y tu cuerpo.
Ni a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al salvaje Posidón encontrarás,
si no los llevas dentro de tu alma,
si no los yergue tu alma ante ti.

Pide que el camino sea largo.
Que sean muchas las mañanas de verano
en que llegues-¡con qué placer y alegría!
a puertos antes nunca vistos.
Deténte en los emporios de Fenicia
y hazte con hermosas mercancías,
nácar y coral, ámbar y ébano
y toda suerte de perfumes sensuales,
cuantos más abundantes perfumes sensuales puedas.
Ve a muchas ciudades egipcias
a aprender, a aprender de sus sabios.

Ten siempre a Ítaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Mas no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguardar a que Ítaca te enriquezca.

Ítaca te brindó tan hermoso viaje.
Sin ella no habrías emprendido el camino.
Pero no tiene ya nada que darte.

Aunque la halles pobre, Ítaca no te ha engañado.
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,
Entenderás ya qué significan las Ítacas.

C.P. Cavafis, 1911

El viaje a Ítaca: así es como resumo estos años de trabajo. Uno siempre sueña con obtener resultados fantásticos, publicaciones incontables, y éxitos rotundos. Uno siempre persigue la llegada, porque en ella ve la compensación al esfuerzo invertido...

... Y por fin llegamos. Todo se ve más pequeño y queda una ligera decepción, un querer volver a empezar, sin reconocer que la llegada siempre nos dejará ese sabor amargo.

Porque lo verdaderamente importante, la esencia del viaje, es el viaje en sí. Son aquellas personas que he conocido y que sigo admirando, esa forma de plantear y resolver los problemas que he adoptado poco a poco sin darme cuenta, los días en el laboratorio... en definitiva, cada uno de los momentos que he vivido durante estos años y que, sin llegar a hacerme sabía como dice el poema, me han hecho un poco más científica, y un poco más persona.

Agradecimientos

A Anna, que ha dirigido esta tesis con un optimismo y un empuje inagotables. Gracias por tu dedicación, tus consejos y sobretodo por tus ánimos siempre que los he necesitado.

A Luis, por sus sugerencias siempre acertadas y constructivas. De quien, entre otras muchas cosas, he aprendido que es posible compaginar la ciencia con la literatura, el deporte, el cine, la familia y los amigos... sin perder nunca el sentido del humor.

A Mireia, mi cómplice de éxitos y fracasos, mi compañera incondicional y mi amiga ante todo. Gracias por demostrarme que siempre podré contar contigo.

A Fernando, quien a pesar de ser el primero en revelarme que la ciencia es ...difícil, ha sido una de las personas que más me ha animado a seguir en ella. Gracias por tu ayuda.

A todos los miembros del departamento de Farmacología y Toxicología, con quienes he compartido neveras, centrifugas, pipetas, desayunos y conversaciones. Y muy especialmente a Rosa y a Laia, por sus consejos, sus aportaciones y su amistad.

Al personal del "Centre d'Acollida d'Animals" del Ayuntamiento de Barcelona, por su ayuda en la obtención de muestras.

A los Profesores Jean S. Marshall y Martin K. Church, por acogerme en sus laboratorios respectivos y por el interés que han demostrado en mi trabajo.

A mi familia, que ha puesto tanta ilusión e interés en esta tesis como en todo lo que he hecho siempre en la vida. Y en especial a mi hermano Enrique, gracias a quien descubrí el poema "Ítaca" y, lo que es más importante, su significado.

A Manolo, que ha impregnado esta tesis con sus cafés, sus pinturas, sus músicas extrañas y esas pequeñas cosas tan suyas, sin las cuales el viaje no tendría ningún sentido. Y a Lucía, quien, sin ni siquiera saberlo, me ha dado el empujón que me hacía falta para acabar esta tesis.

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

AMPc : adenosin-3',5'-monofosfato cíclico

ASC S 1: antígeno purificado de *Ascaris suum*

DAG : diacilglicerol

Fc ϵ RI : receptor de elevada afinidad para las IgE

Fc γ RIII: receptor de baja afinidad para las IgG

GM-CSF: granulocyte/macrophage colony stimulating factor

ICAM-1: molécula de adhesión intra celular

IFN γ : interferón γ

IgE : inmunoglobulina E

IL : interleucina

IP $_3$: inositol 1,4,5-trifosfato

LTC $_4$: leucotrieno C $_4$

MAP-K : mitogen activated protein kinase

MCP-1: proteína quimiotáctica de los monocitos

MIP-1 α : proteína inflamatoria de los macrófagos

NF-AT: factor nuclear de los linfocitos T activados

PGD $_2$: prostaglandina D $_2$

PAF: factor activador de las plaquetas

PIP $_2$: fosfatidil inositol difosfato

PKA: proteína cinasa A

PKC: proteína cinasa C

PLA $_2$: fosfolipasa A $_2$

PLC: fosfolipasa C

PMA: 13-acetato 12-miristato de forbol

SCF: stem cell factor

SCFR: receptor para el stem cell factor

Th2: linfocito del subtipo *helper 2*

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

VCAM-1: molécula de adhesión vascular

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. La dermatitis atópica: introducción	1
1.1.1. La piel como órgano inmunitario.....	2
1.1.2. Patogenia de la dermatitis atópica.....	4
1.2. El mastocito	7
1.2.1. Los mastocitos aislados de la piel.....	7
1.2.2. Líneas celulares de mastocitos	8
1.3. Estimulación del mastocito cutáneo	9
1.3.1. Mecanismos de estimulación dependientes del FcεRI.....	9
1.3.1.1. <i>El receptor de elevada afinidad para las IgE (FcεRI)</i>	10
1.3.1.2. <i>La inmunoglobulina E (IgE)</i>	11
1.3.1.3. <i>Interacción IgE / FcεRI: reacciones bioquímicas intracelulares</i> ..	12
1.3.2. Mecanismos de estimulación independientes del FcεRI.....	15
1.3.2.1. <i>Estimulación dependiente del SCF y de su receptor (SCFR)</i>	16
1.3.2.2. <i>Co-estimulación a través del SCFR y del FcεRI</i>	17
1.4. Mediadores liberados por los mastocitos	18
1.4.1. Mediadores preformados.....	18
1.4.1.1. <i>Histamina</i>	18
1.4.1.2. <i>Proteoglicanos</i>	19
1.4.1.3. <i>Proteasas neutras</i>	20
1.4.2. Mediadores de nueva síntesis.....	20
1.4.2.1. <i>Eicosanoides</i>	21
1.4.2.2. <i>Citocinas</i>	21
<i>El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)</i>	23
1.5. Papel de las IgE en las reacciones alérgicas	24
1.5.1. Influencia de las IgE sobre la biología del mastocito.....	26
1.5.1.1. <i>Sobre-expresión del FcεRI inducida por las IgE</i>	26
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	28

3. EXPERIMENTOS

3.1. Liberación de histamina a partir de mastocitos aislados de la piel de perros atópicos, sensibles a <i>Ascaris suum</i> y sanos.....	29
3.2. Estudio de la activación inmunológica de la línea celular C2 mantenida en cultivo.....	43
3.3. Efecto del stem cell factor sobre la capacidad secretora y el cultivo de los mastocitos cutáneos caninos.....	56
3.4. Influencia de la concentración de IgE sobre la expresión de los receptores FcεRI y la liberación de TNF-α en los mastocitos cutáneos caninos.....	71

4. DISCUSIÓN

4.1. Sensibilización pasiva y estimulación de los mastocitos cutáneos caninos.....	86
4.2. Mediadores liberados por los mastocitos caninos aislados de la piel: la histamina y el TNF-α.....	88
4.2.1. La histamina.....	88
4.2.2. El factor de necrosis tumoral (TNF-α).....	90
4.3. Liberación de histamina a partir de mastocitos aislados de la piel de perros alérgicos y de perros sanos.....	95
4.4. Caracterización funcional de la línea celular C2 mantenida en cultivo.....	98
4.5. Cultivo y mantenimiento de los mastocitos cutáneos in vitro..	101
4.6. Influencia de las IgE sobre la expresión de los receptores FcεRI y la producción de TNF-α en los mastocitos cutáneos caninos.....	104

5. CONCLUSIONES.....	110
-----------------------------	------------

6. BIBLIOGRAFÍA	112
------------------------------	------------

1.1. La dermatitis atópica: introducción

El término “atopia” fue definido en 1923 por Coca y Cooke como una reacción de hipersensibilidad hereditaria que se manifestaba clínicamente en el hombre como asma, rinitis o dermatitis (Coca y Cooke, 1923). Actualmente, la atopia se define como una predisposición genética de ciertos individuos a sintetizar, de manera exagerada, IgE específicas contra componentes proteicos de algunos alérgenos ambientales, inocuos para el resto de la población (Leung, 1999).

- En el hombre la atopia puede manifestarse como una disfunción respiratoria que da lugar al asma o a la rinitis alérgica, o bien como un problema cutáneo, que da lugar a la dermatitis atópica.
- En el perro, sin embargo, la atopia se manifiesta únicamente en la piel como una dermatitis atópica. Entre las reacciones de hipersensibilidad observadas en el perro, la **dermatitis atópica** (DA) es la segunda enfermedad más frecuente (Scott y cols. 2001).

La DA canina es una enfermedad inflamatoria crónica que cursa con prurito y que presenta remisiones y exacerbaciones sucesivas (Scott y cols., 2001). Esta enfermedad, en el perro, presenta múltiples similitudes con la DA humana (Butler y cols., 1983) (Nimmo Wilkie y cols., 1990) (Sinke y cols., 1998) (Olivry y cols., 1999); en ambas especies existen factores genéticos y ambientales involucrados en su presentación, la sintomatología clínica es similar y existe un incremento en la concentración sérica de IgE alérgeno-específicas. Por ello, el perro constituye un modelo válido para estudiar la patogenia de esta enfermedad en el hombre (Hanifin, 2000). Sin embargo, a pesar de la elevada incidencia de esta enfermedad (aproximadamente un 10% en el hombre (Herz y cols., 1998) (Leung, 1999) y un 10-15% en el perro (Scott y cols., 2001), su patogenia es todavía muy controvertida, lo cual dificulta el desarrollo de abordajes terapéuticos efectivos en estos pacientes.

Este trabajo pretende analizar algunos de los factores que pueden estar involucrados en el desarrollo de esta enfermedad como son, el papel que

juegan los mastocitos cutáneos en su patogenia y la influencia que ejerce la concentración de IgE en la funcionalidad de estas células. Para ello, revisaremos la estructura y funciones de la piel, y en especial las funciones relacionadas con la respuesta inmunitaria.

1.1.1. La piel como órgano inmunitario

La piel está constituida por una gran variedad de células que participan en la inducción y en el mantenimiento de la respuesta inmunitaria y que, por tanto, confieren a este órgano la función, entre otras, de defensa frente a agentes o moléculas extraños al organismo (*Bos y Kapsenberg, 1986*) (*Suter, 1995*) (*Beck y Leung, 2000*). Así, se ha acuñado el término sistema inmunitario asociado a la piel (SIS) que engloba el complejo de células y factores humorales relacionados con la respuesta inmunitaria presentes en la piel (*Bos y Kapsenberg, 1993*).

La capa más externa de la piel, la **epidermis**, está constituida por células, entre las que destacan dos poblaciones particularmente importantes por la función inmunológica que ejercen: las células de Langerhans y los queratinocitos, siendo ésta última, la población más abundante (90-95% de las células epidérmicas en el hombre) (*Barker y cols., 1991*)

Los queratinocitos clásicamente se han considerado células pasivas, que ejercían una función protectora; sin embargo, desde la pasada década, se ha demostrado su participación activa en los procesos inflamatorios cutáneos, mediante la producción de una amplia gama de citocinas (interleucinas, interferones, factores de necrosis tumoral, factores de crecimiento y factores quimiotácticos) y la expresión de moléculas de adhesión en su membrana tras ser activados de forma inespecífica (*Barker y cols., 1991*) (*Cumberbatch y cols., 1998*) (*Cadiot y cols., 2000*).

Las células de Langerhans, de morfología dendrítica, son células presentadoras del antígeno derivadas de la médula ósea y constituyen aproximadamente el 3-4% de la población de células de la epidermis (*Bos y*

Kapsenberg, 1993). Su importancia reside en los siguientes aspectos: **1)** poseen la capacidad de captar, procesar y presentar los antígenos exógenos a los linfocitos T cooperadores mediante la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II en su membrana (*Cruz y Bergstresser, 1990*) (*Kimber y cols., 2000*); **2)** son células capaces de expresar receptores de alta afinidad (FcεRI) para las IgE alérgeno-específicas, que hacen más eficiente la presentación del antígeno (*Bruijnzeel-Koomen y cols., 1986*) (*Bieber y cols., 1992*) (*Olivry y cols., 1996*); **3)** son células productoras de diversas citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18...) que inician y modulan la respuesta inmunitaria cutánea (*Wang y cols., 1999*).

Bajo la epidermis, se encuentra la **dermis**, constituida principalmente por fibroblastos, aunque existen también otros grupos celulares minoritarios como los mastocitos, los macrófagos, los monocitos o los linfocitos que se localizan en las zonas perivasculares y que intervienen activamente en las reacciones inflamatorias cutáneas.

Los macrófagos dérmicos fagocitan aquellas sustancias o restos celulares que se producen de forma continuada en la dermis y actúan a su vez como células presentadoras del antígeno (*Scott y cols., 2001*).

A pesar de ser una población celular minoritaria en la piel, los mastocitos ejercen una función clave en la defensa frente a agentes extraños e infecciones (*Galli, 1997*). Los mastocitos dérmicos almacenan numerosos mediadores inflamatorios (histamina, proteasas...) en sus gránulos citoplasmáticos, que liberan tras su activación. Además, son capaces de sintetizar eicosanoides, citocinas y factores quimiotácticos para los leucocitos, permitiendo de esta forma la migración e infiltración de nuevas células en los procesos inflamatorios (*Thorlacius y cols., 1994*) (*Doré y cols., 1995*) (*Mekori y Metcalfe, 1999*).

Los linfocitos que se observan en la dermis en condiciones normales son predominantemente linfocitos T involucrados en la respuesta celular que migran desde los nódulos linfáticos (*Cruz y Bergstresser, 1990*).

Finalmente, los neutrófilos, los eosinófilos y las células plasmáticas se pueden observar ocasionalmente en la dermis normal, ya que se trata de células circulantes.

1.1.2. Patogenia de la dermatitis atópica

Debido a la complejidad de los múltiples mecanismos patogénicos involucrados en la DA, es difícil ordenar cronológicamente los procesos celulares y moleculares que se suceden, sin embargo podemos resumirlos de forma general:

- Los alergenios penetran en la piel mayoritariamente por vía percutánea y son inmediatamente captados por las células de Langerhans presentes en la epidermis (*Wollemberg y Bieber, 2000*). Estas células migran hacia los nódulos linfáticos regionales, donde presentan el antígeno a los linfocitos T.
- Tras este primer contacto con el alergenio, los linfocitos B del individuo atópico inician la síntesis de IgE dirigidas específicamente contra el alergenio. Posteriormente, las IgE alergenio-específicas se unirán a la superficie de los mastocitos presentes en la dermis (fase de sensibilización).
- En siguientes contactos con el alergenio, éste interaccionará con las IgE alergenio-específicas unidas a los mastocitos dérmicos, provocando el entrecruzamiento de los receptores Fc ϵ RI presentes en la membrana de estas células y su consiguiente activación (*Holgate y Church, 1995*). Los mastocitos activados liberan de forma inmediata (minutos) numerosos mediadores preformados (histamina, heparina, proteasas etc...) almacenados en su citoplasma celular, los cuales inducen un rápido aumento de la permeabilidad vascular (*Church y cols., 1989*).

- Tras esta fase aguda, el mastocito inicia la síntesis de nuevos mediadores inflamatorios, tales como las prostaglandinas y los leucotrienos, que además de aumentar la permeabilidad vascular ejercen su función como vasodilatadores e inhibidores de la agregación plaquetaria (*Metcalfe y cols., 1997*). De forma simultánea, los mastocitos sintetizan citocinas (TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-13...) que se liberan al espacio extracelular entre 2 y 3 horas después de la desgranulación (*Zweiman, 1993*) (*McNeil, 1996*). Entre ellas, el **TNF- α** induce la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, selectina E y selectina P) por parte de las células de los endotelios vasculares (*Walsh y cols., 1991*) (*Compton y cols., 1998*), que permitirán la migración de las células inflamatorias, principalmente linfocitos T, eosinófilos y neutrófilos, desde el torrente sanguíneo hacia la dermis. La **IL-4**, otra de las citocinas liberadas por el mastocito, tiene un papel crucial en la activación de la síntesis de las IgE por parte de los linfocitos B (*Renz y cols., 1992*) (*Bradding y cols., 1992*). Esta citocina puede actuar o bien directamente sobre los linfocitos B (*Gauchat y cols., 1993*) o bien sobre los linfocitos Th2 reclutados, que secretarán a su vez citocinas (IL-4, IL-5, TNF- α ...) necesarias para inducir la producción de IgE alergenoespecíficas por parte de los linfocitos B (*Mekori y Metcalfe, 1999*).

El resultado de esta cascada de reacciones es la instauración de una respuesta inmunológica de tipo Th2 que se caracteriza por una elevada producción de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, y una producción moderada de IFN- γ e IL-2 por parte de los linfocitos Th1 (*Grewe y cols., 1998*). Este desequilibrio en las citocinas liberadas culminará en un incremento en la síntesis de IgE alergenoespecíficas por parte de los linfocitos B, contribuyendo así a la perpetuación de la reacción inflamatoria.

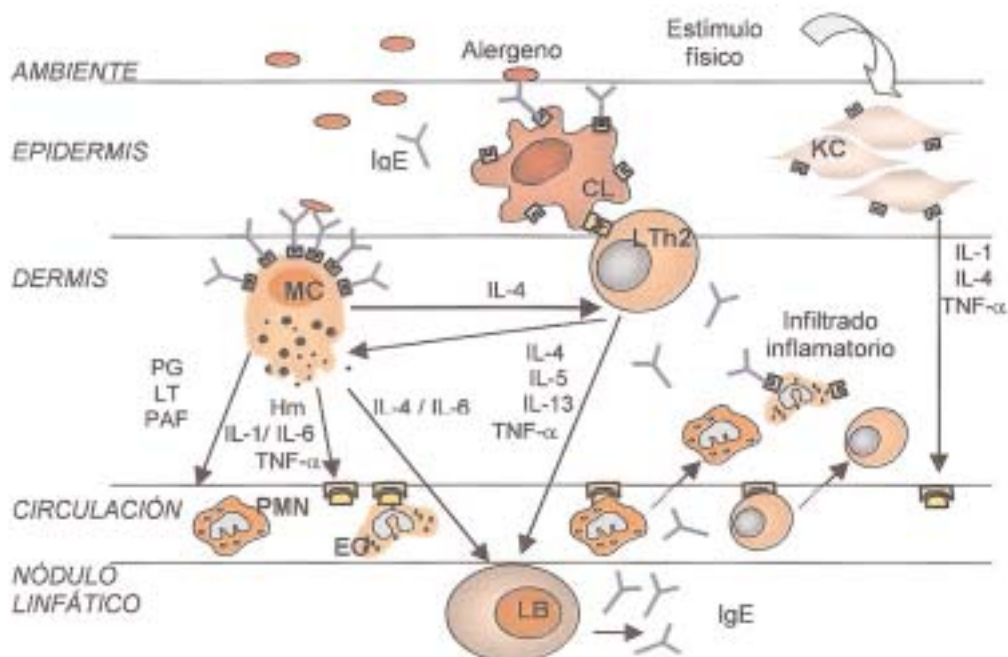
- En esta fase crónica de la respuesta alérgica las células de Langerhans expresan receptores específicos para las IgE, de forma que incrementan su eficiencia en la captación de los alérgenos que penetran por vía cutánea (*Mudde y cols., 1990*) (*Klupal y cols., 1997*).

1. Introducción

- Finalmente, la elevada concentración de mediadores pro-inflamatorios como la histamina presentes en el espacio extracelular cutáneo, provoca la aparición de prurito intenso en el paciente. El prurito constituirá un estímulo para la producción de nuevas citocinas y factores de crecimiento por parte los queratinocitos epidérmicos (*Barker y cols., 1991*).

Si bien todas las células mencionadas contribuyen, en mayor o menor medida, al desarrollo de la reacción alérgica, es importante destacar que los **mastocitos** presentan un interés especial en el desarrollo de la DA canina por ser las células iniciadoras de esta respuesta. Por ello, el conocimiento de la biología de estas células y el estudio de los mecanismos que modulan su activación parece crucial para controlar el desarrollo de las reacciones alérgicas en su fase más inicial.

Figura 1: En este esquema se resumen las reacciones e interacciones celulares que tienen lugar en el desarrollo de la patogenia de la dermatitis atópica. KC: queratinocito; CL: célula de Langerhans; MC: mastocito; LTh2: linfocito cooperador de tipo 2; LB: linfocito B; PMN: células polimorfonucleadas; EO: eosinófilo.



1.2. El mastocito

Los mastocitos fueron descritos por primera vez gracias a la observación microscópica de sus numerosos gránulos citoplasmáticos, visibles mediante tinciones básicas (*Ehrlich, 1877*). Posteriormente, tras el conocimiento de los mecanismos que provocan su activación y la liberación de mediadores celulares, fueron consideradas células críticas en la patogenia de los procesos de hipersensibilidad (*Galli, 1993*).

Actualmente se cree que los mastocitos participan no sólo en el inicio sino también en la amplificación de la respuesta inflamatoria (*Zweiman, 1993*). Además, se ha demostrado su participación en una gran variedad de procesos que abarcan desde la defensa frente a infecciones bacterianas e infestaciones parasitarias (*Galli, 1997*) hasta los mecanismos de reparación tisular (*Metcalfe y cols., 1997*).

La mayor parte de conocimientos sobre los mastocitos se han obtenido mediante la valoración de su respuesta frente a un estímulo y a través del estudio de las señales intracelulares que siguen a la estimulación (*Amon y cols., 1994*). El estudio morfofuncional *in vitro* de los mastocitos cutáneos puede abordarse a partir de dos fuentes celulares: los mastocitos maduros aislados de la piel, o bien los mastocitos procedentes de líneas celulares de mastocitomas cutáneos.

1.2.1. Los mastocitos aislados de la piel

Los mastocitos se encuentran ampliamente distribuidos por todos los tejidos del organismo de los mamíferos (*Holgate y Church, 1995*). En la piel se localizan en la dermis superficial próximos a los vasos sanguíneos y a las terminaciones neuronales (*McNeil, 1996*) (*Kube y cols., 1998*), lo cual sugiere su participación en los mecanismos de control neuronal de regulación del flujo sanguíneo cutáneo (*Benyon, 1989*).

La obtención de los mastocitos cutáneos caninos mediante la técnica de disgregación y digestión enzimática (*de Mora y cols., 1993*), modificada a partir de una técnica puesta a punto en piel humana (*Benyon y cols., 1986*) ha

permitido caracterizar la morfología y la función de estas células (*Amon y cols., 1994*). Del total de células aisladas de la piel del perro (aproximadamente 20×10^6 células/ gramo de piel) , la población mastocitaria representa un 1-2% (*de Mora y cols., 1993*). Los mastocitos que se obtienen tras la disgregación enzimática son una población heterogénea en cuanto a su contenido en mediadores (triptasa y quimasa) (*Kube y cols., 1998*). Utilizando técnicas de microscopía electrónica, se ha observado que el diámetro de los mastocitos cutáneos caninos varía entre 7 y 12 μm (*García y cols., 1998*). Su membrana plasmática presenta pliegues y proyecciones y destaca el contenido en gránulos electrodensos en su citoplasma. Gracias a la afinidad basófila del contenido granular, es posible distinguir los mastocitos del resto de células dérmicas mediante su tinción con azul de toluidina (*Kimura y cols., 1973*).

1.2.2. Líneas celulares de mastocitos

Los métodos de aislamiento celular a partir de la piel constituyen una herramienta muy útil para el estudio funcional de los mastocitos. Sin embargo, la heterogeneidad de las células presentes tras la digestión del tejido y el escaso número de mastocitos obtenidos, son algunas de las principales limitaciones de estas técnicas.

Por ello, las líneas celulares de mastocitos neoplásicos suponen una alternativa interesante ya que permiten trabajar con una población pura y abundante de células homogéneas que pueden ser mantenidas en cultivo de forma permanente (*Calonico y cols., 1985*). Hasta el momento han sido obtenidas y caracterizadas diversas líneas celulares de mastocitos humanos (HMC-1), murinos (MC9, RBL-2H3, P815) y caninos (C₂, C₁, G, BR). Entre ellas, la **línea C₂** constituye un modelo celular muy útil para estudiar la funcionalidad de los mastocitos caninos, ya que es la única línea celular que expresa receptores para las IgE en su membrana y puede ser activada, por tanto, mediante estímulos inmunológicos (*DeVinney y Gold, 1990*).

1.3. Estimulación del mastocito cutáneo

La desgranulación de los mastocitos constituye el fenómeno inicial en una reacción alérgica. Este proceso comporta en el mastocito toda una serie de cambios bioquímicos y morfológicos:

- En el citoplasma se observa un incremento en la concentración de calcio, debido principalmente a dos procesos: 1) la liberación del calcio intracelular almacenado en el retículo endoplasmático o en calciosomas (*Pierce, 1982*) y 2) la entrada de calcio extracelular a través de canales de membrana (*Holgate y Church, 1995*). Además, se percibe un aumento en la actividad de enzimas como la adenilato ciclasa, que cataliza la síntesis del AMP cíclico, o la proteína cinasa C, involucrada en la activación de diversos factores de transcripción del RNAm. (*Benyon, 1989*) (*Razin y cols., 1995*) (*Reischl y cols., 1999*).
- De forma simultánea, los gránulos citoplasmáticos se deforman y se fusionan entre ellos, formando vacuolas que provocarán la creación de canales en la membrana celular a través de los cuales se liberarán los mediadores al espacio extracelular (*Kurosawa y cols., 1998*).

A pesar de que existen numerosas vías mediante las cuales es posible inducir la desgranulación de los mastocitos, los mecanismos de activación que involucran a los receptores de elevada afinidad para las IgE (FcεRI) presentes en su membrana, tienen un interés especial, dado que ésta es la vía que utilizan los alérgenos para estimular los mastocitos dérmicos en una reacción alérgica *in vivo* (*Dombrowicz y cols., 1993*). Por ello, los mecanismos de estimulación de los mastocitos suelen dividirse en dos grandes grupos en función de la implicación, o no, del FcεRI en el proceso de activación:

1.3.1. Mecanismos de estimulación dependientes del FcεRI

Uno de los primeros estudios que evidenciaron el mecanismo de activación de los mastocitos mediante la participación de las IgE en el hombre fue llevado a

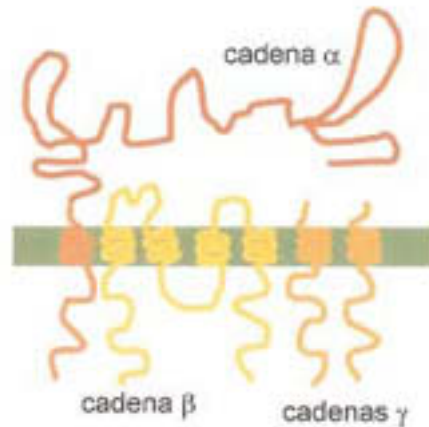
cabo por Ishizaka y colaboradores en 1967. En este estudio se demostró que la inyección intradérmica de complejos alérgeno-IgE en pacientes sanos provocaba la desgranulación de los mastocitos y la consiguiente formación de eritema y edema únicamente cuando se combinaban dos o más moléculas de IgE por cada antígeno (*Ishizaka y Ishizaka, 1967*). Posteriormente se han caracterizado los dos elementos claves en esta reacción: el Fc ϵ RI y su ligando, la IgE.

1.3.1.1. El receptor de elevada afinidad para las IgE (Fc ϵ RI)

El Fc ϵ RI se encuentra expresado de forma constitutiva en la membrana de los mastocitos y de los basófilos (*Osterhoff y cols., 1994*); sin embargo las células de Langerhans, los eosinófilos y los monocitos pueden presentarlo en determinadas condiciones (*Bieber y cols., 1992*) (*Klupal y cols., 1997*) (*Sihra y cols., 1997*). Su **estructura** tetramérica transmembranal está compuesta por una cadena α , una cadena β y dos cadenas γ unidas por puentes disulfuro (*Bonnefoy y cols., 1993*). La cadena α , el único componente del Fc ϵ RI que presenta una porción extracelular, es la responsable de la unión de la IgE al receptor (*Reischl y cols., 1999*). Las cadenas β y γ son necesarias para el inicio de la transducción de las señales intracelulares que se sucederán durante la activación de los mastocitos a través del Fc ϵ RI (*Ravetch y Kinet, 1991*).

Los mastocitos cutáneos humanos expresan aproximadamente entre 10^4 - 10^5 Fc ϵ RI por célula (*Benyon, 1989*); sin embargo, esta densidad puede variar en función de factores como la concentración de IgE (*Yamaguchi y cols., 1997*) o de IL-4 presente en el medio (*Xia y cols., 1997*) (*Yamaguchi y cols., 1999*). A pesar de que la regulación de la expresión del Fc ϵ RI no se conoce en profundidad, estudios recientes han demostrado que ésta se debe principalmente a dos mecanismos: 1) reacciones de catabolismo o de síntesis de nuevos receptores y 2) procesos de endocitosis y exocitosis del receptor en la membrana celular (*MacGlashan y cols., 1998*).

Figura 2: Esquema del receptor de alta afinidad para las IgE.



1.3.1.2. La inmunoglobulina E (IgE)

La IgE es un anticuerpo perteneciente a la familia de proteínas de las inmunoglobulinas, que fue identificado en 1967 por Ishizaka y colaboradores como el anticuerpo responsable del desarrollo de las reacciones alérgicas (*Ishizaka y Ishizaka, 1967*).

Su **estructura** básica (Figura 3), similar a la de otras inmunoglobulinas, está constituida por dos cadenas pesadas (ϵ), compuestas a su vez por cuatro dominios constantes ($C_{\epsilon 1}$ - $C_{\epsilon 4}$) y un dominio variable (V_{ϵ}), y dos cadenas ligeras (κ o γ) compuestas por una región variable, y una región constante (*Holgate y Church, 1995*).

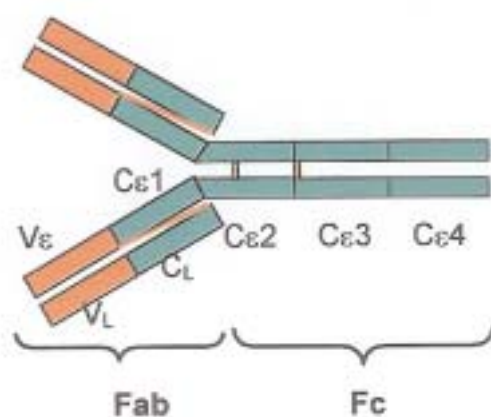
Cada molécula de IgE puede ser dividida, por la acción de la papaína, en las fracciones Fab y Fc. La unión del antígeno a la IgE tiene lugar en las dos fracciones Fab; por tanto, cada molécula de IgE es capaz de unir dos antígenos. La fracción Fc, es la porción que se unirá a la cadena α del $Fc_{\epsilon}RI$. Estudios recientes demuestran que la IgE humana se une a su receptor por la región comprendida entre los dominios $C_{\epsilon 2}$ y $C_{\epsilon 3}$ (*Sechi y cols., 1996*). Estos dominios son termolábiles, y se desnaturalizan tras someter la IgE a $56^{\circ}C$ durante 4 horas (*Ishizaka y Ishizaka, 1970*).

La unión de la IgE a su receptor en la superficie celular es reversible, sin embargo, la alta constante de afinidad de esta unión hace que la vida media de

las IgE en el hombre sea más elevada en los tejidos como la piel (8-14 días) que en el suero (2,7 días) (Reedy y cols., 1997).

A pesar de que se estima que los mastocitos humanos pueden presentar hasta 500.000 moléculas de IgE unidas a su membrana, la unión de un mínimo de 2.500 moléculas es suficiente para provocar su estimulación (Reischly cols., 1999). En el perro, sin embargo, no existen datos al respecto.

Figura 3: Esquema de la Inmunoglobulina E



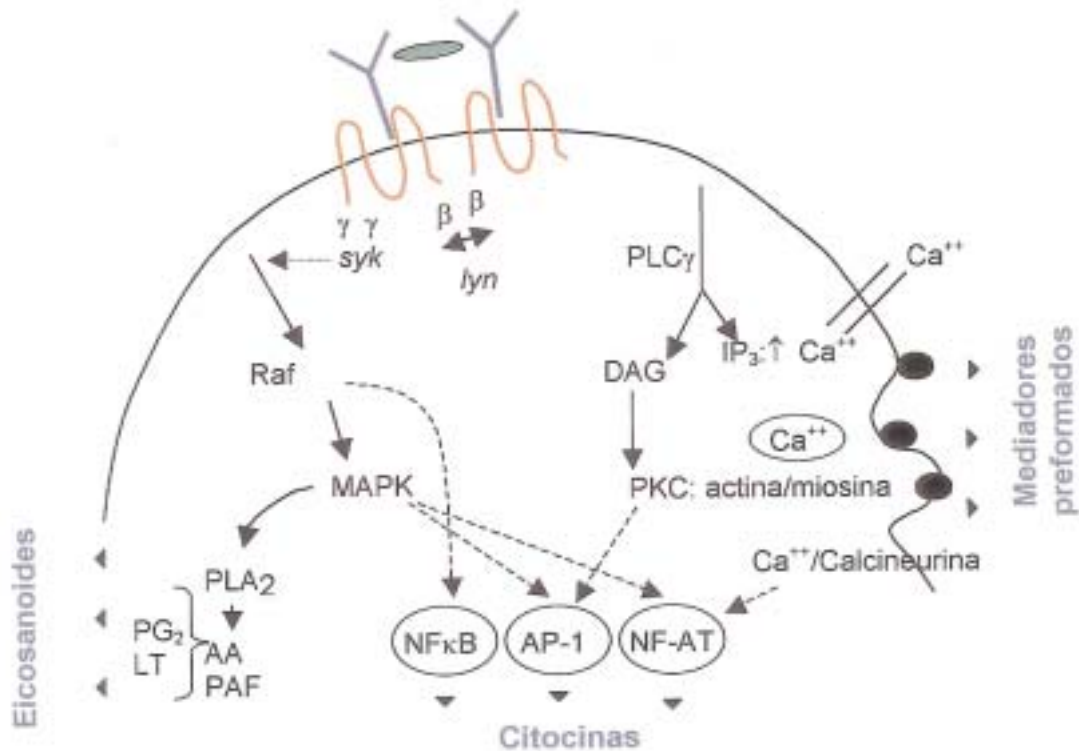
1.3.1.3. Interacción IgE / FcεRI: reacciones bioquímicas intracelulares

La unión de la IgE a su receptor de elevada afinidad produce un cambio en la conformación de la inmunoglobulina (Sechi y cols., 1996). Este cambio conformacional, sin embargo, no es capaz, por él mismo, de desencadenar la desgranulación del mastocito. Para que la activación inmunológica del mastocito tenga lugar, es preciso que un antígeno multivalente interactúe con dos o más IgE unidas al mastocito y produzca el entrecruzamiento de dos receptores FcεRI adyacentes (Plaut y cols., 1989) (Metcalf y cols., 1997). A este fenómeno le seguirá una cascada de señales intracelulares que serán amplificadas y culminarán en la desgranulación, la síntesis y la liberación de los mediadores celulares. Las reacciones bioquímicas que se suceden, estudiadas principalmente en líneas celulares (RBL) de basófilos de rata, pueden

sintetizarse en cuatro fases (*Reischl y cols., 1999*), que han sido esquematizadas en la Figura 4:

1. Fosforilación del receptor: Las cadenas β y γ del Fc ϵ RI son fosforiladas por varias proteínas (*lyn, syk*) de la familia de las tirosina cinasas. Esta fase lleva a un cambio en la conformación del receptor.
2. Activación de la Fosfolipasa C (PLC γ 1): Posteriormente, el enzima PLC γ 1, activado por las tirosina cinasa *syk* o por las proteínas G, produce la hidrólisis, en la membrana del mastocito, del fosfatidil inositol bisfosfato (PIP₂). Esta hidrólisis genera dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol trisfosfato (IP₃). El IP₃ inicia la movilización de las reservas del calcio intracelular y la entrada del calcio extracelular, que se unirá a su receptor, la calmodulina. El DAG activa un enzima clave en la activación del mastocito, la proteína cinasa C (PKC), que promueve la polimerización de la actina y la activación de la miosina. Así, estas dos reacciones son las responsables de la desgranulación y la formación de pliegues en la membrana del mastocito.
3. Activación de la MAP-K: La activación de la proteína G *Ras* y la consiguiente activación de la proteína cinasa *Raf* activan finalmente la proteína cinasa MAP-K (*mitogen activated protein kinase*) que es la responsable de la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). La PLA₂ catalizará la liberación del factor de activación plaquetario y del ácido araquidónico, que al ser metabolizado mediante la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa dará lugar a dos mediadores celulares importantes: las prostaglandinas (PGD₂) y los leucotrienos (LTC₄).
4. Activación de los factores de transcripción: Finalmente, algunas de las reacciones bioquímicas mencionadas, como la activación de la MAP-K, culminan en la activación de diversos factores de transcripción (NF κ B, AP-1, NF-AT) necesarios para iniciar la transcripción del RNA en el núcleo del mastocito. Esta última fase promueve la síntesis de las citocinas por parte del mastocito.

Figura 4: Esquema de las reacciones bioquímicas que tienen lugar tras el entrecruzamiento de dos o más receptores FcεRI adyacentes en la membrana del mastocito. *syk* y *lyn*: tirosina cinasas; PIP2: fosfoinositol bifosfato; PLCγ: fosfolipasa C; DAG: diacilglicerol; IP3: inositol trifosfato, PKC: proteína cinasa C; MAPK: mitogen activated protein quinase; PLA2: fosfolipasa A2; AA: ácido araquidónico; PAF: factor activador de las plaquetas; PG2: prostaglandinas; LT: leucotrienos.



Los alergenos, mediante su unión a las IgE, son los principales **estímulos inmunológicos** (dependientes del FcεRI) en la desgranulación de los mastocitos cutáneos *in vivo*. Sin embargo, existen auto-anticuerpos dirigidos contra el receptor FcεRI que también pueden actuar como estímulos en determinadas patologías como la urticaria (*Bonnefoy y cols., 1993*). En condiciones *in vitro*, existen diversos compuestos capaces de inducir el entrecruzamiento de los FcεRI tales como los antígenos purificados, las lectinas bacterianas y los anticuerpos dirigidos contra el FcεRI (cadena α) o contra las IgE (fracción Fc)(*Roitt y cols., 1998*).

Además de la activación mediada por los receptores para las IgE, los mastocitos pueden ser estimulados mediante el entrecruzamiento de sus

receptores de baja afinidad para las IgG (Fc γ RIII) (McNeil, 1996), que a su vez actúan como receptores de baja afinidad para las IgE (Bonney y cols., 1993). Sin embargo, el número de Fc γ RIII expresado en la membrana de los mastocitos es notablemente menor al número de Fc ϵ RI, y la constante de afinidad para la unión de las IgG es también más baja en comparación a la correspondiente a la unión de las IgE (Reedy y cols., 1997). Finalmente, existen además los receptores Mac-2, presentes en mastocitos y macrófagos, cuya expresión puede ser regulada tras la activación de los mastocitos vía el Fc ϵ RI (Bonney y cols., 1993)

1.3.2. Mecanismos de estimulación independientes del Fc ϵ RI

El mastocito puede ser también activado mediante diversos estímulos que *no* ejercen su función a través del Fc ϵ RI. La estimulación no inmunológica (independiente del Fc ϵ RI), en comparación a la activación inmunológica, produce la desgranulación del mastocito de una forma más rápida, y menos dependiente del calcio extracelular (Benyon, 1989). Entre los **estímulos no inmunológicos** se encuentran neuropéptidos como la substancia P, compuestos como el ionóforo de calcio, el PMA, el compuesto 48/80 o factores del complemento C3a, C5a (Church y cols., 1989) (Costa y cols., 1997) (Metcalf y cols., 1997). Estos estímulos utilizan diversos mecanismos para provocar la desgranulación del mastocito: actúan a través de proteínas G de membrana, activan receptores de membrana específicos, movilizan el calcio intracelular o bien abren canales iónicos en la membrana celular (Amon y cols., 1994).

Recientemente se ha observado que ciertas citocinas (IL-1, IL-3, MIP-1 α , MCP-1, SCF) pueden actuar también como estímulos de la función secretora de mastocitos y basófilos en el ratón y en el hombre (Subramanian y Bray, 1987) (White, 1993) (Alam y cols., 1994) (Taylor y cols., 1995). Entre ellas, el factor de crecimiento para los mastocitos (**SCF**), principalmente secretado por los fibroblastos dérmicos, tiene un especial interés por estar involucrado en los procesos de diferenciación y maduración de los mastocitos tanto humanos

(Galli y cols., 1994) (Bischoff y cols., 1999) como murinos (Tsai y cols., 1991) (Karimi y cols., 1999) y caninos (Frangogiannis y cols., 1998).

1.3.2.1. Estimulación dependiente del SCF y de su receptor (SCFR)

El fenotipo de los mastocitos murinos está determinado por la concentración de SCF, además de otras citocinas (IL-3, IL-4, IL-9...) en el microambiente celular. Sin embargo, en el hombre, el SCF es la única citocina conocida capaz de regular el desarrollo de los mastocitos a partir de sus células precursoras (Bischoff y Dahinden, 1992) (Mitsui y cols., 1993) (Bischoff y cols., 1999), y de promover su supervivencia ejerciendo un efecto supresor de la apoptosis (Karimi y cols., 1999).

Además de actuar sobre los mastocitos inmaduros, el SCF ejerce una acción directa sobre los mastocitos maduros mediante su unión a su receptor específico, el SCFR, presente en la membrana de estas células. La unión del SCF (en su forma soluble) al SCFR, presente en la membrana de los mastocitos, puede inducir la activación de los mastocitos humanos y murinos tanto *in vivo* (Wershil y cols., 1992) (Dvorak y cols., 1998) como *in vitro* (Columbo y cols., 1992) (Bischoff y Dahinden, 1992) (Coleman y cols., 1995). Así, se ha observado que el SCF es capaz de provocar, *in vitro*, la secreción de histamina o prostaglandinas D₂ (PGD₂) en mastocitos humanos cutáneos (Columbo y cols., 1992), la síntesis de citocinas como la IL-4 en mastocitos humanos pulmonares (Gibbs y cols., 1997) y de IL-6 y TNF- α en mastocitos murinos (Gagari, 1997).

La expresión del SCFR se ha observado en mastocitos de cualquier localización anatómica (Galli y cols., 1994). Además, en la piel existen también otras células como los melanocitos capaces de expresar este receptor. El SCFR es una proteína transmembranal codificada por el proto-oncogen *c-kit* (Valent, 1994) (London y cols., 1996) que comprende una porción intracelular que presenta actividad tirosina cinasa y un fragmento extracelular responsable de la unión a su ligando, el SCF (Flanagan y Leder, 1990).

Las señales intracelulares que desencadenan la desgranulación de los mastocitos a través del SCFR, se inician con la fosforilación de este receptor y su unión a los enzimas fosfolipasa C (PLC γ 1), y fosfatidil inositol 3 cinasa (Rottapel y cols., 1991).

1.3.2.2. Co-estimulación a través del SCFR y del Fc ϵ RI

Además de ejercer una función como **estímulo** de la desgranulación, el SCF ha demostrado la capacidad de actuar *in vitro* como **potenciador** de la estimulación del mastocito mediada por el Fc ϵ RI. Así, diversos estudios muestran que la co-estimulación de los mastocitos mediante estos dos receptores (SCFR y Fc ϵ RI) aumenta de forma importante la secreción de mediadores por parte de los mastocitos humanos, cutáneos y pulmonares, (Columbo y cols., 1992) (Bischoff y Dahinden, 1992) y murinos (Kawasaki y cols., 1995).

Los mecanismos bioquímicos implicados en la potenciación de la estimulación inmunológica por parte del SCF se conocen de forma parcial:

- Se ha demostrado que la activación de los mastocitos murinos a través del SCFR o bien del Fc ϵ RI induce cambios similares en el RNAm codificador de ciertas proteínas nucleares (*c-fos*, *c-jun*, *jun-B*) (Tsai y cols., 1993) responsables de la síntesis de mediadores inflamatorios.
- Estudios posteriores llevados a cabo en la misma población celular, han revelado que la estimulación de ambos receptores (SCFR, Fc ϵ RI) individualmente, induce mecanismos muy similares de fosforilación y activación de las MAP cinasas (Tsai y cols., 1993). Además, esta estimulación induce la activación de los mismos miembros de la familia de las MAP cinasas (Ishizuka y cols., 1998), pudiendo ser éste uno de los mecanismos responsables del efecto sinérgico observado.

- Por último, los mastocitos cutáneos humanos estimulados vía el SCFR o el FcεRI provocan cambios similares en los niveles de calcio intracelular (*Columbo y cols., 1992*).

1.4. Mediadores liberados por los mastocitos

Los mecanismos inmunológicos y no inmunológicos mencionados, a través de los cuales se induce la estimulación de los mastocitos, culminan en un acontecimiento común, aunque no siempre de idénticas características: la liberación de una amplia gama de mediadores celulares. Estudios llevados a cabo en mastocitos cutáneos humanos han revelado que, dependiendo del mecanismo de estimulación (inmunológico o no inmunológico), existen diferencias en el perfil de los mediadores liberados (*Church y cols., 1991*). Éstos pueden clasificarse en dos grandes grupos: 1) los **mediadores preformados** se encuentran presentes de forma constitutiva en forma activa en el interior de los gránulos citoplasmáticos del mastocito; 2) los **mediadores de nueva síntesis** son producidos tras la desgranulación del mastocito y van siendo liberados a medida que son sintetizados.

1.4.1. Mediadores preformados

Los mediadores preformados son, por su rápida liberación tras la estimulación del mastocito, los responsables de los síntomas iniciales de las reacciones alérgicas.

1.4.1.1. Histamina

La histamina es una amina que se encuentra distribuida por todo el organismo y que es almacenada fundamentalmente por los mastocitos y los basófilos.

En el interior de los gránulos citoplasmáticos la histamina mantiene uniones iónicas con los grupos carboxilo de los proteoglicanos. El contenido en histamina de un mastocito cutáneo canino es aproximadamente de 5 pg por célula (*de Mora y cols., 1993*). Tras la desgranulación del mastocito, parte de la histamina se libera al espacio extracelular y se disocia rápidamente de la matriz

granular mediante un intercambio con los iones de Na extracelular (*Church y cols., 1989*). Una vez libre, ejerce su función a través de su unión a receptores específicos (H₁, H₂ y H₃) presentes en la superficie de las células de los diferentes tejidos.

En el hombre, la inyección intradérmica de la histamina induce, a nivel local, la “triple respuesta” descrita por Lewis en 1927: en primer lugar provoca la aparición de **eritema local** debido a la rápida vasodilatación producida por su acción directa sobre las células vasculares. En segundo lugar estimula el reflejo axonal mediante su unión a los receptores presentes en las terminaciones nerviosas, induciendo así la formación del **eritema periférico**. Finalmente, mediante su acción sobre las células endoteliales de los capilares, provoca un incremento en la permeabilidad vascular que origina la extravasación de plasma y la formación del **edema** (*Lewis, 1927*). Además, en los procesos inflamatorios cutáneos, la histamina contribuye al reclutamiento de células inflamatorias (neutrófilos, eosinófilos y linfocitos) mediante la inducción de la expresión de moléculas de adhesión (P-selectina) en las células endoteliales. (*Thorlacius y cols., 1994*) (*Doré y cols., 1995*) (*Mekori y Metcalfe, 1999*). También se ha demostrado *in vitro* su participación en los procesos de reparación tisular mediante su acción mitógena sobre fibroblastos y queratinocitos (*Metcalfe y cols., 1997*).

Una vez liberada, la histamina se metaboliza en pocos minutos por metilación u oxidación (*Church y cols., 1989*), por lo que su efecto es generalmente local.

1.4.1.2. *Proteoglicanos*

El aspecto metacromático característico de los mastocitos cutáneos, tanto humanos como caninos, tras ser teñidos mediante tinciones básicas se debe a su alto contenido en proteoglicanos (*Yong, 1997*), mayoritariamente del tipo heparina (*Benyon, 1989*) (*Scott y cols., 2001*). Los proteoglicanos almacenados en los gránulos mastocitarios actúan como una matriz de soporte de los mediadores preformados y estabilizan a su vez las proteasas y otros enzimas (*Metcalfe y cols., 1997*). Sin embargo al ser liberados, actúan como

potentes anticoagulantes potenciando la acción inhibitoria de la anti-trombina III (Benyon, 1989).

1.4.1.3. *Proteasas neutras*

El contenido en proteasas (quimasa o triptasa) ha sido el principal criterio utilizado para establecer los subtipos de mastocitos humanos (Irani y cols., 1986) y caninos (Schechter y cols., 1988). En la piel canina se observan mastocitos que contienen únicamente triptasa, únicamente quimasa, o bien las dos proteasas, siendo este último subtipo el predominante (Kube y cols., 1998). Estos enzimas, cuya función fisiológica no se conoce en profundidad, se encuentran estabilizados por las cadenas de proteoglicanos en el interior del mastocito. Tras la desgranulación, se disocian de ellas para ejercer diversas acciones proteolíticas. Así, la proteasa predominante, la triptasa, es capaz de hidrolizar algunas proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, y de inducir la proliferación de fibroblastos y células epiteliales (Ruoss y cols., 1991) (Cairns y Walls, 1997). Además, es la responsable de la activación de otro enzima catabólico, la colagenasa. La inyección intradérmica de triptasa en modelos animales provoca la formación de edema y la acumulación de eosinófilos y neutrófilos en la zona de la inyección (Compton y cols., 1998). La quimasa, a su vez es la responsable de la degradación de algunos neuropéptidos, y de la secreción mucosa provocada mediante la estimulación de células serosas pulmonares (Welle, 1997).

1.4.2. **Mediadores de nueva síntesis**

De forma simultánea a la desgranulación del mastocito, los diversos mecanismos intracelulares activados por el estímulo inician la síntesis de mediadores que se irán liberando de forma más tardía y que contribuirán a la perpetuación de la respuesta inflamatoria.

1.4.2.1. *Eicosanoides*

Tras la activación de los mastocitos, los fosfolípidos de la membrana son hidrolizados dando lugar al ácido araquidónico. Éste es metabolizado por dos tipos de enzimas diferentes (ciclooxigenasas y lipooxigenasas) que darán lugar respectivamente a la síntesis de dos familias de potentes mediadores proinflamatorios: las prostaglandinas y los leucotrienos. Las prostaglandinas liberadas, principalmente del tipo PGD₂, constituyen potentes vasodilatadores que pueden actuar de forma sinérgica con otros mediadores como la histamina (*Leal-Berumen y cols., 1994*). Por otra parte, los leucotrienos LTB₄ y LTC₄ y sus derivados (LTD₄ y LTE₄) contribuyen al mantenimiento del eritema y el edema mediante el aumento de la permeabilidad venular (*Metcalfe y cols., 1997*). En el hombre, el LTB₄ es quimiotáctico para los neutrófilos y los eosinófilos, ya que induce la adherencia de estas células al endotelio y su migración hacia el foco inflamatorio (*McNeil, 1996*).

1.4.2.2. *Citocinas*

Las citocinas son proteínas generalmente glicosiladas, que tienen la capacidad de mediar y regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Estas proteínas ejercen su función actuando de forma paracrina (sobre receptores específicos presentes en la membrana de células adyacentes), o bien autocrina (sobre la propia membrana de las células productoras) (*Abbas y Pober, 1997*).

A pesar de que los leucocitos constituyen la principal fuente de citocinas en el organismo, los mastocitos han mostrado la capacidad de sintetizar y liberar una extensa gama de citocinas tras ser estimulados de forma dependiente o independiente del FcεRI (*Gordon y cols., 1990*). Este reciente descubrimiento ha permitido sugerir la participación de los mastocitos en el desarrollo y la perpetuación de la fase tardía de la respuesta alérgica (*Zweiman, 1993*).

Debido a que una misma citocina puede ejercer diversas funciones y actuar sobre múltiples poblaciones celulares simultáneamente, resulta difícil definir los efectos específicos de cada una de ellas. En función de su principal acción una

vez liberadas, las citocinas producidas por los mastocitos pueden clasificarse en cuatro grupos (*McNeil, 1996*):

- 1) Citocinas con acción proinflamatoria: El **TNF- α** , la **IL-1**, y la **IL-6** constituyen algunas de las citocinas que inducen la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, participando así en el reclutamiento de leucocitos hacia el foco inflamatorio. Entre ellas, el **TNF- α** puede potenciar este fenómeno, estimulando directamente la secreción de citocinas quimiotácticas por parte de los macrófagos. La **IL-6**, además, es capaz de activar los hepatocitos que secretarán proteínas plasmáticas como el fibrinógeno, que participan en la fase aguda de la respuesta inflamatoria.
- 2) Factores de crecimiento para los leucocitos: Una vez reclutados los leucocitos que constituirán el infiltrado inflamatorio, la **IL-2**, **IL-3**, **IL-4**, **IL-5** y el **GM-CSF** liberados por los mastocitos actúan prolongando su supervivencia y estimulando su actividad.
- 3) Citocinas con acción inmunomoduladora: El **IFN- γ** , el **TGF- β** , la **IL-1**, **IL-4**, **IL-6**, **IL-10** y la **IL-13** regulan la interacción entre el mastocito y los linfocitos B y T. El papel de la **IL-4** es crucial en el desarrollo de las reacciones alérgicas, dado que es la citocina responsable de la maduración de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgE (*Bischoff y cols., 1999*). La **IL-10** en cambio, actúa inhibiendo la reacción inflamatoria mediada por las células T.
- 4) Citocinas con acción quimiotáctica para los leucocitos: La **MIP-1 α** y la **IL-8** forman parte de la familia de las quimiocinas, involucradas en la quimiotaxis de los leucocitos. La **IL-8** ejerce su función provocando la atracción de neutrófilos al foco inflamatorio (*Kunkel y cols., 1991*).

De forma general, todas las citocinas citadas son sintetizadas por el mastocito a partir de su estimulación, y liberadas al medio extracelular tras algunas horas. Sin embargo, el **TNF- α** se encuentra preformado, asociado a los gránulos del mastocito de forma constitutiva y puede ser liberado, por tanto, de una manera inmediata (*Benyon y cols., 1991*). Su importancia, además, radica en el hecho

de ser la principal citocina involucrada en la infiltración leucocitaria en el foco inflamatorio. El estudio de Klein y colaboradores (1989) permitió demostrar que la expresión de una molécula de adhesión (ELAM-1) en las células endoteliales procedentes de fragmentos de piel humana activados *in vitro*, podía ser bloqueada mediante anticuerpos anti-TNF- α (Klein y cols., 1989). Más tarde, Wershil y colaboradores (1991) demostraron en un estudio *in vivo* en el ratón, que el reclutamiento de neutrófilos durante la fase tardía de una respuesta alérgica estaba mediado en más de un 50% por el TNF- α liberado por los mastocitos (Wershil y cols., 1991). Todos estos datos muestran la importancia de esta citocina en el desarrollo de las reacciones alérgicas.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es una proteína que puede presentarse en el organismo en dos formas distintas: asociado a la membrana celular con un tamaño aproximado de 26 kDa, o bien libre en el espacio extracelular en forma hidrolizada y con 17 kDa de tamaño (Abbas y cols., 1997). Una vez secretados, los monómeros de 17 kDa de TNF- α , se asocian formando trímeros que constituyen la molécula activa. La forma activa del TNF- α ejerce su función a través de su unión a dos tipos de receptores específicos presentes en la superficie de las células diana: el receptor p-55 de tipo 1 (TNFR1) y el receptor p-75 de tipo 2 (TNFR2) de 55 kDa y 75 kDa de tamaño respectivamente (Kondo y Sauder, 1997).

En las reacciones inflamatorias cutáneas existen, además de los mastocitos, diferentes grupos celulares (macrófagos, monocitos, basófilos, células de Langerhans y queratinocitos) capaces de sintetizar el TNF- α (Celada, 1994). Sin embargo, los mastocitos son las únicas células que presentan de forma constitutiva esta citocina almacenada en su citoplasma, siendo por tanto la principal fuente celular de TNF- α en la piel en condiciones normales (Walsh y cols., 1991). Tras su estimulación, el mastocito libera de forma rápida (5-10 minutos) el TNF- α asociado a sus gránulos citoplasmáticos, y al mismo tiempo, inicia de nuevo su síntesis para que pueda estar disponible en una fase más

tardía (2-8 horas). Tras ser liberado, el TNF- α ejerce diversas acciones: estimula la proliferación de los fibroblastos (Kovacs, 1991) (Gordon y Galli, 1994), induce la liberación de otras citocinas (Galli y Costa, 1995) y, de forma importante, induce la síntesis y expresión de diversas moléculas de adhesión en las células endoteliales (Yan y cols., 1994) (Costa y cols., 1997).

1.5. Papel de las IgE en las reacciones alérgicas

Hasta el momento, hemos visto que la interacción alérgeno-IgE-mastocito constituye uno de los pasos iniciales en una reacción alérgica. Las IgE, parecen por tanto, necesarias para el desarrollo de un proceso alérgico, sin embargo, existe una notable controversia en cuanto a su papel en estos procesos:

- En el hombre, no todos los individuos atópicos presentan niveles elevados de IgE séricas. Así, existen pacientes que sufren el llamado tipo intrínseco de dermatitis atópica, que se diferencia del tipo extrínseco por la presencia de niveles normales de IgE séricas (Oppel y cols., 2000). De forma paralela, se han definido dos clases de pacientes asmáticos: los individuos asmáticos alérgicos, que se caracterizan, entre otros factores, por presentar un nivel elevado de IgE en sangre, mientras que los individuos asmáticos no alérgicos presentan niveles fisiológicos de este anticuerpo en el suero (Walker y cols., 1992). Entre los individuos que padecen dermatitis atópica, el porcentaje de pacientes que presentan concentraciones de IgE séricas elevadas (aproximadamente un 80%) es mayor (Leung, 1999).
- En el perro, de forma paralela, múltiples estudios demuestran que no existe una correlación directa entre el nivel de IgE séricas caninas y la severidad de la enfermedad (Hill y cols., 1995) (Jackson y cols., 1996). La existencia de auto-anticuerpos anti-IgE capaces de enmascarar la determinación de IgE en el suero de los perros atópicos ha sido apuntada como una posibilidad para explicar este fenómeno (Hammerberg y cols., 1997). Otro de los argumentos propuestos indicaba la posibilidad de que, en pacientes atópicos, un incremento en

el nivel de IgE debido a parasitismo intestinal encubriera el aumento de IgE específicas contra los alérgenos ambientales (*Reedy y cols., 1997*). Sin embargo, existen estudios llevados a cabo en perros alérgicos (sensibilizados de forma experimental), que han demostrado que la producción de IgE alérgeno-específicas está regulada genéticamente. Así, se ha sugerido la existencia de dos grupos de pacientes genéticamente diferentes, en función de su alta o baja reactividad a la producción de IgE (*de Weck y cols., 1997*).

- Otra prueba de la controvertida participación de las IgE en los procesos alérgicos la aportaron los estudios de Mehlhop y colaboradores en 1997, que revelaban que ratones genéticamente deficientes en IgE son capaces de desarrollar una respuesta alérgica (*Mehlhop y cols., 1997*).

Todos estos datos parecen indicar que las IgE no son siempre imprescindibles ni suficientes para explicar los procesos alérgicos, y que por tanto, se deben considerar otros mecanismos paralelos a las IgE, capaces de desencadenar la enfermedad. Así, es probable que las lesiones cutáneas observadas en la dermatitis atópica, reflejen una combinación de dos tipos de mecanismos: respuestas dependientes de la desgranulación de los mastocitos y su interacción con las IgE y respuestas mediadas por los linfocitos Th₂ (*Sawada y cols., 1996*).

En los individuos en los que las IgE juegan un papel importante, se han llevado a cabo investigaciones orientadas hacia el estudio de las repercusiones que puede ocasionar, a nivel celular, un incremento en la concentración de IgE. Así, en los individuos con dermatitis atópica crónica, en los cuales el nivel de IgE está incrementado, se ha observado que las células de Langerhans son capaces de expresar receptores específicos para las IgE, y que las IgE unidas a estas células favorecen significativamente la captación y el procesamiento del antígeno (*Mudde y cols., 1990*). Recientemente, en el perro, también ha sido demostrado que el número de células de Langerhans que presentan IgE unidas a su membrana (IgE⁺) es significativamente mayor en la piel atópica en comparación a la piel normal. Además, el mismo estudio demostraba que

existe una correlación entre el número de células IgE⁺ y el nivel de IgE en el suero de estos pacientes (*Olivry y cols., 1996*).

Las repercusiones que tiene una elevada concentración de IgE también han sido estudiadas sobre basófilos y mastocitos tanto en el hombre como en el ratón. Sin embargo, en el perro no existe ningún estudio hasta el momento.

1.5.1. Influencia de las IgE sobre la biología del mastocito

1.5.1.1. Sobreexpresión del FcεRI inducida por las IgE

En los años 70, dos estudios diferentes llevados a cabo en el hombre (*Conroy y cols., 1977*) (*Malveaux y cols., 1978*) demostraron la existencia de una elevada correlación entre el nivel de IgE séricas y la densidad de los receptores FcεRI en la superficie de los basófilos circulantes. Se propusieron dos hipótesis para explicar estos resultados: o bien la expresión de las IgE y de sus receptores estaba controlada por un gen común, o bien, de forma más probable, las IgE, por sí solas, poseían la capacidad de regular la expresión de los receptores FcεRI. Mediante la utilización de anticuerpos anti-IgE capaces de disminuir el nivel de IgE séricas, y de prevenir la unión de las IgE séricas a los basófilos, se confirmó que la densidad de los receptores FcεRI disminuía paralelamente a la concentración de IgE séricas (*MacGlashan y cols., 1997*). Este estudio confirmaba el papel de las IgE como reguladoras de la expresión del FcεRI en los basófilos.

Posteriormente, se llevaron a cabo nuevos estudios cuyo objetivo era analizar si un fenómeno similar ocurría en los mastocitos, y lo que es más importante; si un incremento en la expresión del FcεRI en estas células podía tener consecuencias en la liberación de mediadores por parte de los mastocitos. Así, en 1997, el grupo de Galli y colaboradores confirmaron el papel de las IgE como reguladoras de la expresión del FcεRI en los mastocitos murinos. Mastocitos expuestos a concentraciones elevadas de IgE durante 5 días, presentaban un incremento de hasta 5 veces en la densidad de los receptores

Fc ϵ RI y, tras ser estimulados a través del Fc ϵ RI, liberaban una cantidad significativamente mayor de mediadores preformados (serotonina) y de nueva síntesis (IL-4, IL-6) (Yamaguchi y cols., 1997).

Recientemente, estas observaciones se han extendido también a los mastocitos humanos (desarrollados *in vitro* a partir de células de la médula ósea) (Yamaguchi y cols., 1999). Estas células, de forma similar a los mastocitos murinos, presentan un aumento en la expresión de Fc ϵ RI inducido por el nivel de IgE, y liberan concentraciones elevadas de histamina, PGD₂ y LTC₄ tras ser sensibilizadas y estimuladas mediante anticuerpos anti-IgE.

La modulación que pueden ejercer las IgE sobre la funcionalidad de mastocitos y basófilos ha abierto una nueva línea de investigación en las terapias específicas para controlar los procesos alérgicos. Así, recientemente se han desarrollado tratamientos basados en el bloqueo o la eliminación de las IgE circulantes capaces de sensibilizar a los mastocitos y los basófilos. En el hombre, se han realizado ensayos clínicos utilizando anticuerpos monoclonales anti-IgE para prevenir la unión de las IgE a estas células (Saini y cols., 1999) (MacGlashan y cols., 1997) (MacGlashan y cols., 1998). Posteriormente, se ha llevado a cabo un estudio similar en perros sensibles al polen de la ambrosía, utilizando un anticuerpo monoclonal quimérico anti-IgE canina (Aiyappa y cols., 2000). Los resultados de este estudio revelan que en los perros tratados durante 35 días con el anticuerpo anti-IgE, la respuesta frente al antígeno de ambrosía, valorada mediante un test intradérmico, desaparece completamente.

Finalmente, todos estos datos parecen indicar que el estudio de la influencia que pueden tener las IgE en la patogenia de la dermatitis atópica canina podría ser un elemento clave para abordar nuevas terapias para el control de esta enfermedad.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Existen datos en el hombre y en el ratón que indican que las IgE tienen la capacidad de regular la expresión de los receptores Fc ϵ RI en la superficie de los basófilos y los mastocitos. La sobreexpresión del Fc ϵ RI en la membrana de los mastocitos humanos y murinos conlleva un incremento en la producción de mediadores celulares tras su estimulación inmunológica. No existen datos al respecto en el perro, a pesar de ser una especie que sufre procesos alérgicos espontáneamente y con una alta incidencia.

El **objetivo** de este estudio será: Evaluar el efecto de la concentración de las IgE presentes en el microambiente de los mastocitos cutáneos caninos, sobre la función secretora de estas células.

Para llevar a cabo este estudio, se plantearán las siguientes fases:

- Se pondrán a punto las técnicas de sensibilización *in vitro* y de activación inmunológica de los mastocitos cutáneos caninos, así como los métodos para medir algunos de los mediadores liberados tras su activación.
- Se investigarán nuevos métodos para mantener viables los mastocitos caninos aislados en cultivo mediante la utilización del SCF como factor de crecimiento de los mastocitos. Paralelamente, se evaluará la utilidad de la línea celular de mastocitos neoplásicos C₂ como fuente celular alternativa en estos estudios.
- Se analizarán las consecuencias que presenta la exposición de los mastocitos a una concentración elevada de IgE sobre la liberación de mediadores preformados (histamina) o de nueva síntesis (TNF- α), así como sobre la expresión de los receptores Fc ϵ RI en su membrana.

3.1. LIBERACIÓN DE HISTAMINA A PARTIR DE MASTOCITOS AISLADOS DE LA PIEL DE PERROS ATÓPICOS, SENSIBLES A *Ascaris suum* Y SANOS.

3.1.1. Introducción

La dermatitis atópica canina ha sido clásicamente englobada dentro de las reacciones alérgicas mediadas por las IgE. Debido a su alta incidencia y a su importancia clínica (*Scott y cols., 2001*), se han llevado a cabo numerosos estudios con la finalidad de profundizar en el conocimiento de su patogenia.

Tras un primer contacto con el alérgeno, los individuos sensibles sintetizan IgE específicas que, una vez liberadas a la circulación, se unen a los basófilos y a los mastocitos tisulares. Posteriores contactos con el alérgeno inducen la desgranulación de los mastocitos sensibilizados y la consiguiente liberación de mediadores de la inflamación, tanto preformados como de nueva síntesis. Estos fenómenos iniciales contribuyen al desarrollo de la fase temprana de la reacción alérgica y pueden evolucionar, dando lugar así a una reacción inflamatoria cutánea más compleja (reacción de fase tardía) tanto en el perro como en otras especies (*Olivry y cols., 1996*).

Estudios recientes sugieren que las IgE, además de participar en la sensibilización de los mastocitos, son capaces de inducir una sobreexpresión de los receptores de alta afinidad para las IgE (Fc ϵ RI) en la membrana de los basófilos y los mastocitos, en determinadas condiciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Los grupos de Lantz y colaboradores (1997) y Yamaguchi y colaboradores (1997) han demostrado que la incubación durante 4 días de los mastocitos y basófilos murinos en un medio rico en IgE induce un incremento de hasta 20 veces en la expresión de los receptores Fc ϵ RI en la membrana de estas células. Este mismo fenómeno podría explicar la correlación observada entre los elevados niveles plasmáticos de IgE y la densidad de los Fc ϵ RI en los basófilos de pacientes atópicos (*Conroy y cols., 1977*) (*Stallman y cols., 1977*) (*Sihra y cols., 1997*), así como en los mastocitos de ratones infectados por

Nippostrongylus brasiliensis (Shaikh y cols., 1997) o la correlación positiva observada en el hombre entre la respuesta contráctil bronquial y la concentración de IgE utilizada para sensibilizar los anillos bronquiales aislados (Tuñón de Lara y cols., 1995).

La sobreexpresión de los receptores Fc ϵ RI inducida por las IgE podría provocar una mayor sensibilización de los mastocitos, lo cual tendría importantes consecuencias funcionales y clínicas; por ello, recientemente se desarrollado cabo nuevas terapias con el objetivo de disminuir la concentración de las IgE funcionales (MacGlashan y cols., 1997) (Rudolf y cols., 1997).

Los estudios realizados en el perro, una especie que desarrolla frecuentemente reacciones alérgicas espontáneas, permiten por tanto investigar las consecuencias derivadas de los cambios en la concentración de IgE séricas sobre la actividad de los mastocitos caninos. En particular, el estudio de los perros sensibilizados de forma espontánea a alergenitos, como son los perros atópicos o sensibles a *Ascaris suum*, puede contribuir a esclarecer el papel de las IgE en las reacciones alérgicas.

La disponibilidad de biopsias cutáneas de perros atópicos y sensibles a *Ascaris suum*, y el método de aislamiento y activación de los mastocitos cutáneos caninos desarrollado en nuestro laboratorio (de Mora y cols., 1993), nos ha permitido analizar la capacidad que presentan los mastocitos cutáneos aislados de perros alérgicos (atópicos y sensibles a *Ascaris suum*) para liberar histamina tras ser sensibilizados y activados inmunológicamente.

3.1.2. Material y Métodos

3.1.2.1. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma (Madrid): o-ftaldialdehído (OPT), difosfato de histamina, colagenasa (tipo I), hialuronidasa (tipo I-S), proteasa (tipo XIV) y albúmina bovina (fracción V). La penicilina-estreptomicina, el medio mínimo esencial modificado Dulbecco's Eagle's (DMEM), el medio mínimo esencial (MEM), la solución de Hanks (HBSS) con N-2-hidroxietil-

piperacina-N'-2-ácido etanosulfónico (HEPES), el suero bovino fetal (FCS), la glutamina, la histidina, la fungizona y la tripsina-EDTA fueron obtenidos de Gibco (Life technologies, Barcelona). El anticuerpo policlonal anti-IgE canina nos fue amablemente cedido por el Dr. DeBoer (Universidad de Wisconsin, Madison, USA); el antígeno de *Ascaris suum* (Asc S 1) y los antígenos usados en el test intradérmico fueron obtenidos de Laboratorios Greer (Lenoir, NC, USA).

3.1.2.2. Animales

Perros control

Para este estudio se utilizaron biopsias de piel procedentes de doce perros sanos, de diferentes razas y de ambos sexos, que fueron eutanasiados en el Centro de Zoonosis del Ayuntamiento de Barcelona. Los perros habían sido observados por veterinarios del servicio, y aquellos que mostraban algún signo de enfermedad, fueron excluidos del estudio. Todos los experimentos fueron aprobados por la Comisión Ética de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Perros sensibles a *Ascaris suum*

Se utilizaron seis perros machos de raza Beagle que habían sido espontáneamente sensibilizados a *Ascaris suum*. Estos perros se seleccionaron en función de la reacción positiva demostrada mediante el test intradérmico para el antígeno (10 µL) de *Ascaris suum* (Asc S 1), que se realizó en la región dorsal de cada animal. Previamente a la realización del test intradérmico, y con el fin de valorar la reacción positiva, se inyectó en los perros una solución de azul de Evans al 2% por vía intravenosa.

Perros atópicos

Se tomaron biopsias cutáneas de seis perros atópicos, de edades comprendidas entre 1 y 5 años y de diferentes razas, seleccionados en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona. El diagnóstico de dermatitis atópica fue llevado a cabo de acuerdo a los criterios

clínicos enunciados por el Dr. Willemse (*Willemse, 1986*). Además, el diagnóstico fue confirmado mediante un test intradérmico en el que fueron testados 18 antígenos: Fleo, Dactilo, Poa común, Ballico, Acedera, Plantaina, Ortiga, Cenizo, Roble, Abedul, Olivo, Sauce, Grama común, Parietaria, Saliva de pulga, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Tyrophagus putrescentiae*.

3.1.2.3. Protocolo Experimental

Aislamiento de los mastocitos cutáneos

Las biopsias cutáneas se obtuvieron de la región cráneo-lateral del abdomen de los perros seleccionados para el estudio. Para la dispersión de los mastocitos se llevó a cabo una técnica puesta a punto en nuestro laboratorio por de Mora y colaboradores (1993) descrita brevemente a continuación. Las biopsias cutáneas fueron troceadas en fragmentos de hasta 1 mm³ de tamaño tras separar el tejido graso. Los fragmentos cutáneos se lavaron y se centrifugaron dos veces consecutivas (400 rcf, 10 min) y posteriormente fueron digeridos enzimáticamente durante 180 min a 37°C en MEM (15 mL / gr. de piel) suplementado con colagenasa, hialuronidasa, proteasa, desoxiribonucleasa y albúmina bovina. Tras la digestión, se obtuvo una población heterogénea de células que contenía alrededor de un 2% de mastocitos. Las células fueron filtradas, y después de lavarlas en MEM fueron resuspendidas en DMEM suplementado con glutamina 2 mM, histidina 1,6 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y un 10% de FCS, e incubadas durante una noche en placas de cultivo de 75 cm².

Sensibilización de los mastocitos cutáneos

Tras las 16 horas de incubación, las células adheridas a la placa fueron despegadas mediante una solución de tripsina-EDTA. El recuento de los mastocitos se realizó mediante la tinción de las células con el colorante metacromático de azul de Kimura (*Kimura y cols., 1973*). La viabilidad celular, que resultó ser siempre superior al 95%, se determinó con la tinción de azul

3. Experimentos

tripano. Posteriormente, los mastocitos fueron sensibilizados mediante su incubación en MEM (37°C/ 2 h) al que se añadió un 15% de suero rico en IgE procedente de perros atópicos o sensibles a *Ascaris suum*. De esta forma, se pretendía alcanzar la máxima ocupación de los receptores de IgE presentes en la membrana de los mastocitos.

Activación de los mastocitos a través de sus receptores FcεRI

Tras el periodo de sensibilización, las células se lavaron dos veces en HBSS sin Ca⁺² y Mg⁺², se resuspendieron en HBSS completo y se distribuyeron en alícuotas de 2x10⁴ mastocitos. Las células fueron activadas durante 30 min a 37°C y en constante agitación en presencia del estímulo. Las células procedentes de los perros atópicos se activaron con un anticuerpo policlonal anti-IgE canina a 5 diluciones diferentes comprendidas entre 1/10⁴ y 1/10². En las células aisladas de los perros sensibles a *Ascaris suum* se utilizó como estímulo el antígeno Asc S 1 a 4 concentraciones diferentes (0,1, 0,3, 1 y 3 mg/mL). Paralelamente se activaron las células aisladas de los perros sanos (control) en idénticas condiciones que las células procedentes de los perros alérgicos. La activación se detuvo a 0°C y las muestras se centrifugaron a 2.630 rcf, durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes (500 µL) fueron transferidos a tubos que contenían 0,5 mL de ácido perclórico 0,8 N y se mantuvieron a 4°C para favorecer la precipitación de las proteínas. Previamente a la determinación de la histamina liberada por los mastocitos cutáneos, las muestras fueron centrifugadas a 10.900 rcf durante 4 min para eliminar las proteínas precipitadas, y evitar así una posible interferencia de éstas en el proceso de extracción de la histamina de los sobrenadantes.

Determinación de la histamina liberada

Para la determinación de la histamina liberada por los mastocitos se utilizó un método espectrofluorimétrico descrito por Shore y colaboradores (1959) y modificado por Sullivan y colaboradores (1975). Brevemente, las muestras (1mL) fueron transferidas a tubos que contenían 0,6 g de NaCl, a los cuales se añadieron 1 mL de PCA (0,4N), 0,25 mL de NaOH (5N) y 2 mL de butanol. Tras

3. Experimentos

la agitación de las muestras, se centrifugaron a 600 rcf durante 10 min a 20°C y se recuperó la fase superior orgánica, que fue transferida a tubos que contenían 1,5 mL de NaOH (1N) saturado con NaCl. Tras agitarlas de nuevo, 1,3 mL de HCl (0,1N) y 1,9 mL de n-heptano fueron añadidos a la fase orgánica. Después de agitar las muestras, 1mL de la fase acuosa se alcalinizó con 200 µL de NaOH (1N). La histamina presente se derivatizó mediante la incubación de las muestras a temperatura ambiente con 50 µL de OPT (10mg/mL metanol) durante 4 min. La reacción histamina-OPT se detuvo al acidificar la muestra con 50 µL de H₂PO₄ (2,5N) y su fluorescencia se midió mediante un espectrofluorímetro a las longitudes de onda de excitación y emisión de 350 nm y 450 nm respectivamente.

3.1.2.4. Análisis estadístico

Los resultados se han expresado como la media aritmética ± error estándar de un total de 8 a 10 experimentos. Las comparaciones entre las diferentes medias se han llevado a cabo mediante el test de la *t* de Student con un nivel de significación de 0,05.

La liberación de histamina se expresó en forma de porcentaje respecto al contenido total de histamina del mastocito y fue calculada según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ histamina liberada} = \frac{\text{Hm (sobrenadante)}}{\text{Hm (sobrenadante) + Hm (pellet)}} \times 100$$

El porcentaje neto de histamina liberado por el mastocito, se obtuvo tras restar el porcentaje de histamina liberada de forma espontánea por el mastocito (sin estimulación celular), de la histamina liberada tras la estimulación celular con anti-IgE o el antígeno Asc S 1. El porcentaje de histamina liberado de forma espontánea fue en todos los experimentos inferior al 5%.

3.1.3. Resultados

3.1.3.1. Liberación de histamina de los mastocitos cutáneos activados mediante anti-IgE.

En primer lugar, se determinó la capacidad para liberar histamina de los mastocitos caninos cutáneos procedentes de perros sanos, en respuesta a su estimulación con concentraciones crecientes de anti-IgE canina.

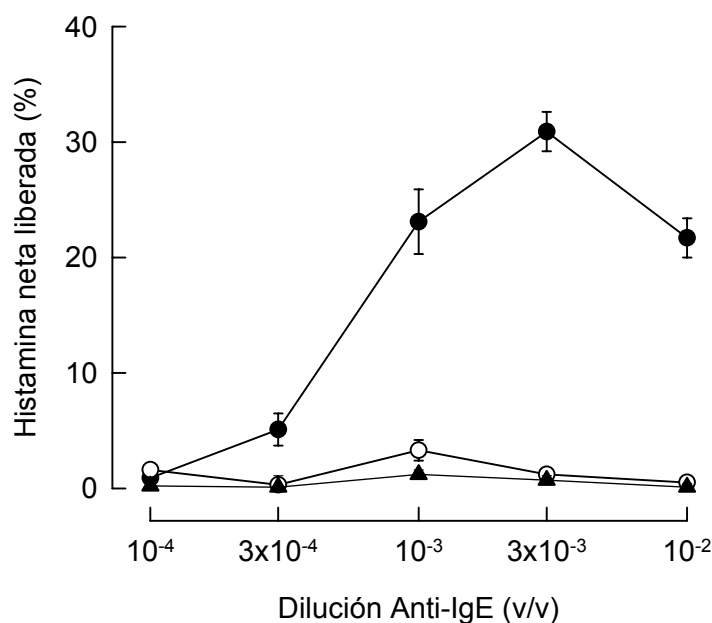


Figura. 1. Liberación neta de histamina de los mastocitos cutáneos no sensibilizados (O), sensibilizados mediante su incubación con suero procedente de perros atópicos (●) o incubados con suero canino inactivado por calor ($56^{\circ}\text{C}/4\text{h}$) (▲), tras ser estimulados mediante concentraciones crecientes de anti-IgE canina.

3. Experimentos

Tal y como se observa en la Figura 1, tras activar las células que no habían sido sensibilizadas (no incubadas previamente con suero rico en IgE), no se detectó liberación de histamina a ninguna de las concentraciones del estímulo utilizadas. Sin embargo, los mastocitos cutáneos que habían sido sensibilizados con el suero rico en IgE procedente de perros atópicos liberaron un porcentaje neto de histamina proporcional a la concentración de anti-IgE utilizada. Cuando los mastocitos fueron sensibilizados con suero rico en IgE previamente tratado a 56°C durante 4 h (en el que la porción Fc de las IgE había sido desnaturalizada) y activados mediante anti-IgE, no se observó ninguna respuesta.

La Tabla 1 muestra la capacidad de liberación de histamina de los mastocitos aislados de la piel de perros atópicos y de perros sanos. Los mastocitos procedentes de los perros atópicos alcanzaron una liberación máxima de histamina de $26,3 \pm 2,8\%$ tras ser estimulados con anti-IgE a la concentración de $3/10^3$ (v/v). Este resultado no fue significativamente diferente al obtenido tras estimular los mastocitos procedentes de los perros sanos (control) con la misma concentración de anti-IgE ($30,9 \pm 1,7\%$).

Tabla 1. Liberación de histamina de mastocitos previamente sensibilizados aislados de la piel de perros atópicos y no atópicos, activados mediante anti-IgE.

Fuente de mastocitos cutáneos	Histamina Total (pg/MC)	% Histamina liberada (estímulo: Anti-IgE canina)				
		$1/10^4$ (v/v)	$3/10^4$ (v/v)	$1/10^3$ (v/v)	$3/10^3$ (v/v)	$1/10^2$ (v/v)
Perros Atópicos	$4,0 \pm 1,5$	$0,3 \pm 0,2$	$11,5 \pm 3,1$	$23,4 \pm 4,6$	$26,3 \pm 2,8$	$26,9 \pm 5,3$
Perros Control	$3,8 \pm 1,1$	$1,0 \pm 0,4$	$5,1 \pm 1,4$	$23,1 \pm 2,8$	$30,9 \pm 1,7$	$21,7 \pm 1,7$

n=6; Liberación espontánea de histamina < 5%

3. Experimentos

3.1.3.2. Liberación de histamina en los mastocitos cutáneos activados mediante Asc S 1.

La Figura 2 muestra la liberación de histamina de los mastocitos obtenidos a partir de piel de perros sensibles a *Ascaris suum* y de perros sanos, estimulados con el antígeno Asc S 1. Después de incubar ambas poblaciones celulares en presencia de un 15% de suero rico en IgE específicas para el alérgeno de *Ascaris suum*, las células fueron estimuladas con el antígeno Asc S 1 a concentraciones crecientes. Los mastocitos que no habían sido previamente sensibilizados, no liberaron concentraciones detectables de histamina al ser activados mediante el antígeno. Sin embargo, en los mastocitos que habían sido incubados en presencia de las IgE alérgeno-específicas, y estimulados con diferentes concentraciones de antígeno, la liberación de histamina fue proporcional a la concentración de estímulo utilizada.

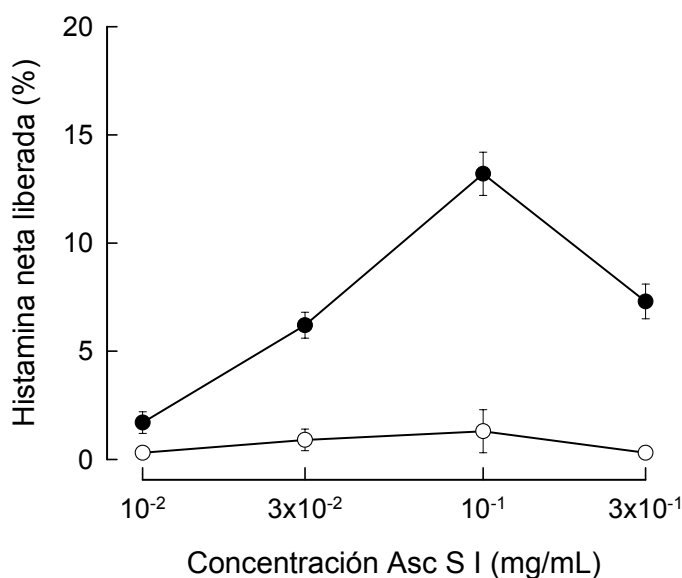


Fig. 2. Liberación neta de histamina de los mastocitos cutáneos no sensibilizados (O) y sensibilizados mediante incubación con suero de perros sensibles a ascaris (●), tras ser estimulados mediante concentraciones crecientes de antígeno Asc S 1.

3. Experimentos

Tal y como muestra la Tabla 2, no se observaron diferencias en el porcentaje de histamina liberado por los mastocitos procedentes de la piel de los perros sensibles a *ascaris* y de los perros control. La máxima liberación de histamina ($12,8 \pm 1,7\%$ y $13,2 \pm 1,7\%$ en mastocitos de perros hipersensibles y de perros sanos respectivamente) fue alcanzada en ambas poblaciones celulares a la concentración de antígeno de 0,1 mg/mL.

Tabla 2. Liberación de histamina a partir de mastocitos aislados de la piel de perros sensibles a *Ascaris suum* y perros control, previamente sensibilizados y activados mediante el antígeno de *Ascaris suum* (Asc S 1).

Fuente de mastocitos	Histamina Total (pg/MC)	% Histamina liberada (estímulo: Asc S 1)			
		0,01mg/mL	0,03mg/mL	0,1 mg/mL	0,3 mg/mL
Perros sensibles	$3,8 \pm 1,1$	$0,7 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,9$	$12,8 \pm 1,7$	$8,5 \pm 1,8$
Perros Control	$4,0 \pm 1,1$	$0,7 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,3$	$13,2 \pm 1,7$	$5,7 \pm 0,7$

n=6; Liberación espontánea de histamina < 5%

3.1.4. Discusión

Este estudio fue llevado a cabo con la finalidad de comparar la capacidad de liberación de histamina de los mastocitos maduros aislados de la piel de perros alérgicos y no alérgicos, estimulados *in vitro* a través del receptor de alta afinidad para las IgE. Tras analizar los resultados obtenidos, no se observaron diferencias en el porcentaje de histamina liberada por ambas poblaciones de mastocitos, estimulados con anti-IgE y Asc S 1.

Los estudios llevados a cabo por Yamaguchi y colaboradores (1997) habían demostrado que tanto los mastocitos peritoneales como los mastocitos derivados de la médula ósea del ratón, que habían sido incubados en presencia de altas concentraciones de IgE, mostraban un claro aumento en la

liberación de algunos mediadores preformados, como la serotonina, tras ser activados a través del receptor FcεRI. Estos estudios concluían que las IgE son capaces de regular la expresión de los receptores FcεRI en la membrana de los mastocitos, y como consecuencia de esta sobreexpresión, la actividad secretora de estas células se ve aumentada cuando son activados a través de los receptores FcεRI. Trabajos similares a los citados (*MacGlashan y cols., 1997*), revelaban una correlación directa entre la concentración de IgE séricas y la densidad de los receptores FcεRI en los basófilos humanos.

Hasta el momento se han realizado pocos estudios centrados en la estimulación a través del FcεRI de los mastocitos cutáneos caninos. En este trabajo hemos analizado la actividad secretora de los mastocitos maduros aislados de la piel de perros alérgicos, ya que esta población celular está directamente implicada en la patogenia de la dermatitis atópica. El análisis de la actividad secretora de los mastocitos se ha realizado tras inducir el entrecruzamiento de los receptores FcεRI de los mastocitos, mediante el uso de dos estímulos diferentes: el anticuerpo anti-IgE canina, que reconoce de forma inespecífica las IgE unidas a los mastocitos; y el antígeno Asc S 1, que se une únicamente a las IgE específicas para el antígeno de *Ascaris suum*.

Tal y como muestran los resultados, en los mastocitos aislados de la piel de los perros atópicos y los perros sensibles a *Ascaris suum* que fueron estimulados sin ser previamente sensibilizados con suero rico en IgE, no se observó desgranulación. Así, se determinó que el proceso de sensibilización era indispensable para la actuación del anticuerpo anti-IgE y del antígeno Asc S 1, lo cual confirmaba que ambos estímulos actúan sobre las IgE unidas a los receptores membranales de los mastocitos.

Con el fin de comprobar que el FcεRI era el único receptor implicado en la activación de los mastocitos en este estudio, inactivamos el suero utilizado para sensibilizar las células, sometándolo a 56°C durante 4h. Mediante este tratamiento se desnaturaliza, de forma selectiva, la porción Fc de las IgE presentes en el suero, que es la responsable de la unión de las IgE a los

receptores FcεRI. En los mastocitos sensibilizados con el suero inactivado y activados mediante un estímulo inmunológico, la desgranulación no tuvo lugar.

El principal objetivo de este estudio no era tanto visualizar los cambios en el número de receptores FcεRI, sino más bien evaluar las consecuencias funcionales de un potencial incremento en la densidad de los receptores FcεRI en los mastocitos de los perros alérgicos (expuestos a altas concentraciones de IgE) en comparación a los mastocitos aislados de perros sanos. Sin embargo, en función de los resultados obtenidos, creemos que sería interesante realizar un análisis de los receptores expresados en la superficie de ambas poblaciones de mastocitos (alérgicos y no alérgicos).

La falta de estimulación de los mastocitos no sensibilizados, activados mediante el antígeno o el anticuerpo sugiere que los mastocitos cutáneos caninos presentan muy pocas moléculas de IgE unidas a su membrana (*Olivry y cols., 1996*), debido probablemente a que el proceso de digestión enzimática utilizado para dispersar las células de la piel altera la unión IgE-FcεRI en estas células. Por ello, concluimos que la incubación *in vitro* de las células en presencia de IgE es un paso indispensable para que la desgranulación tenga lugar.

Cuando los mastocitos fueron estimulados mediante anti-IgE, liberaron aproximadamente el 30% de su contenido total de histamina, el doble del porcentaje obtenido tras estimular las mismas células con Asc S 1 (13%). La explicación a esta diferencia puede hallarse en la naturaleza de los estímulos: el anticuerpo anti-IgE actúa a través de su unión inespecífica al total de las IgE unidas al mastocito, mientras que el antígeno Asc S 1 interacciona de manera selectiva con las IgE específicas para *Ascaris suum*, induciendo así una respuesta menor.

Los mastocitos aislados de la piel de los perros atópicos y de los perros sanos, sensibilizados y activados con la concentración óptima de anti-IgE, liberaron cantidades similares de histamina. De forma paralela, los mastocitos aislados

de la piel de los perros sensibles a *Ascaris suum*, activados a través del Fc ϵ RI, liberaron el mismo porcentaje de histamina que los mastocitos procedentes de la piel de los perros sanos tratados bajo idénticas condiciones.

Los perros sensibles a *Ascaris suum* utilizados en este estudio mostraron una clara reacción inflamatoria tras la administración intradérmica del antígeno de *Ascaris suum*. Además, los perros atópicos seleccionados, mostraban síntomas clínicos y respondieron también de forma positiva al test intradérmico realizado. A pesar de que el test intradérmico evidencia la presencia de IgE específicas en los perros alérgicos, y de que los perros control fueron cuidadosamente seleccionados, la posibilidad de que ambas poblaciones de perros (sanos y alérgicos) presentaran concentraciones de IgE séricas similares no puede ser completamente descartada. Ello explicaría la falta de diferencias en la liberación de histamina en ambas poblaciones celulares (mastocitos de perros alérgicos y de perros sanos).

Tras analizar los resultados obtenidos, podríamos sugerir que el incremento en la concentración de IgE no conlleva un aumento en la expresión de los Fc ϵ RI en el perro, o bien que la sobreexpresión de los receptores Fc ϵ RI no presenta consecuencias funcionales en los mastocitos. Sin embargo, existen otras explicaciones que podrían justificar estos resultados, como la posibilidad de que los mastocitos requieran la expresión de un número mínimo de receptores para ser activados, o bien que la sobreexpresión de tales receptores tenga consecuencias funcionales sobre la liberación de mediadores de nueva síntesis, y no sobre la liberación de mediadores preformados (*Schroeder y cols., 1997*).

Finalmente, podemos concluir que los mastocitos maduros aislados de perros alérgicos no liberan un porcentaje superior de histamina al obtenido con los mastocitos procedentes de perros sanos. A pesar de que este resultado podría sugerir que la desgranulación de los mastocitos no se encuentra alterada en un estado atópico, parece más probable pensar que los cambios en la densidad de los receptores Fc ϵ RI inducidos por las IgE, puedan afectar de

3. Experimentos

forma más importante a la liberación de citocinas u otros mediadores de nueva síntesis asociados con la fase tardía de la reacción alérgica.

3.2. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN INMUNOLÓGICA DE LA LÍNEA CELULAR C₂ MANTENIDA EN CULTIVO.

3.2.1. Introducción

Los mastocitos están involucrados de forma importante en la patogenia de las reacciones alérgicas y en procesos fisiológicos como la fibrosis y la defensa frente a infecciones bacterianas (*Galli, 1997*). La activación de estas células a través del receptor de alta afinidad para las IgE (Fc ϵ RI), provoca la liberación de diversos mediadores inflamatorios, como la histamina, exclusivos de los mastocitos y los basófilos y la síntesis de citocinas y quimiocinas, también producidas por otras poblaciones celulares (*Galli y cols., 1993*).

El estudio de la función y la actividad de los mastocitos ha estado siempre limitado por la dificultad que comporta la obtención de una cantidad abundante y homogénea de mastocitos maduros. Las técnicas de aislamiento celular a partir de los tejidos permiten obtener mastocitos en una pureza generalmente muy baja. Y, por otra parte, la purificación de los mastocitos es un proceso complicado que implica la pérdida de muchas células. Así, las líneas celulares de mastocitos constituyen una fuente celular alternativa sumamente útil para el estudio de estas células.

En 1986, Lazarus y colaboradores desarrollaron 4 líneas celulares (C₂, C₁, G y BR) a partir de mastocitomas caninos cutáneos, que presentaban características morfológicas y funcionales similares a los mastocitos maduros. Entre ellas, la línea celular C₂ era la única que expresaba receptores específicos para las IgE, y que podía ser, por tanto, activada a través de ellos.

Se realizaron estudios de funcionalidad en esta línea celular en los que se determinó la liberación de histamina a partir de las células previamente sensibilizadas con suero rico en IgE, y estimuladas mediante un antígeno (*Lazarus y cols., 1986*). Los resultados obtenidos demostraban que las células C₂ constituían una fuente celular válida para el estudio de la respuesta secretora de los mastocitos en los procesos mediados por las IgE.

Estudios posteriores llevados a cabo en células C₂ recién disgregadas del mastocitoma cutáneo, y estimuladas mediante estímulos inmunológicos (antígeno) y no inmunológicos (ionóforo de calcio A23187) revelaban que estas células eran capaces de liberar mediadores de la inflamación tales como la histamina, las proteasas, el TNF- α y las prostaglandinas (*Lazarus y cols., 1986*) (*Caughey y cols., 1988*) (*Thomas y cols., 1996*).

En 1990, el Dr. Gold y colaboradores consiguieron establecer la línea celular C₂ en cultivo continuo, y demostraron que, tras varios pases celulares consecutivos, las células C₂ preservaban su capacidad de liberación de histamina tras estimularlas de forma inmunológica. Este hallazgo fue especialmente importante, ya que hasta el momento no existía ninguna línea de mastocitos caninos que pudiera ser mantenida en cultivo continuo y que respondiera a la estimulación mediada por las IgE. A pesar del interés de estos resultados, no se han realizado estudios posteriores centrados en la investigación de los mecanismos y las consecuencias que comporta la activación de las células C₂ a través de sus receptores Fc ϵ RI.

El objetivo de este estudio era, por tanto, aportar nuevos datos sobre la caracterización de la actividad secretora de los mastocitos de la línea celular C₂ mantenidos en cultivo continuo y estimulados de forma inmunológica. Para ello, hemos evaluado la liberación de β -hexosaminidasa y la producción de TNF- α tras la activación de las células mediante estímulos inmunológicos (antígeno y anti-IgE) y no inmunológicos.

3.2.2. Material y Métodos

3.2.2.1. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Gibco (Life Technologies, Barcelona): el medio mínimo esencial modificado Dulbecco's Eagle's (DMEM), la solución salina fosfatada (PBS), la penicilina-estreptomicina, la glutamina, el

suero bovino fetal (FCS), la tripsina-EDTA, y el sodio dodecil sulfato (SDS). El antígeno de *Ascaris suum* (Asc S 1) fue obtenido de Laboratorios Greer (Lenoir, NC, USA). El anticuerpo monoclonal anti-IgE canina nos fue amablemente cedido por el Dr. Hammerberg (Universidad de North Caroline, NC, USA). El anticuerpo policlonal anti-IgE canina fue obtenido de Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA). El TNF- α recombinante murino fue suministrado por Genzyme (Cambridge, MA, USA). El ionóforo de calcio, el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (PMA), el 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosaminida, la solución tris, el *soybean trypsin inhibitor* (STI), el 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), y la cicloheximida fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Madrid). La línea C₂ procedente de un mastocitoma canino nos fue amablemente cedida por el Dr. G.H. Caughey (Universidad de California, San Francisco, CA, USA).

3.2.2.2. Protocolo Experimental

Cultivo celular de la línea C₂

Las células C₂ fueron congeladas en N₂ líquido, y mantenidas así hasta su utilización. Para llevar a cabo los experimentos, las células C₂ fueron descongeladas y, tras mantenerlas en cultivo durante 3 semanas, se procedió a su activación. El cultivo de las células se realizó en placas de 75 cm² a una densidad inicial de 5x10⁵ células / mL de medio DMEM suplementado con 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina, glutamina 2mM y un 5% de FCS. Se añadió medio fresco cada 48 horas, y las células fueron divididas en placas (a una relación de 1:4) semanalmente. El cultivo se realizó a 37°C en una atmósfera que contenía un 5% de CO₂.

Sensibilización y activación celular

Las células C₂ fueron incubadas durante 7 días en presencia de suero canino rico en IgE. Con el fin de conseguir la máxima ocupación de sus receptores Fc ϵ RI, previamente a su activación, las células fueron sensibilizadas (2h/37°C)

3. Experimentos

mediante su incubación en medio suplementado con un 5% de suero rico en IgE procedente de perros sensibilizados espontáneamente a *Ascaris suum*. Tras la sensibilización celular, las células fueron lavadas y se determinó su viabilidad, que fue siempre superior al 95%, mediante la tinción de azul tripano.

Para la determinación de la β -hexosaminidasa liberada, las células fueron lavadas en PBS en ausencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} y fueron resuspendidas en PBS completo a una concentración de 5×10^5 células/mL. La activación se realizó mediante la incubación de las células en presencia de diferentes estímulos tanto inmunológicos (Asc S 1 a concentraciones comprendidas entre 0,01 y 0,3 mg/mL; anti-IgE canina a concentraciones comprendidas entre 0,1 y 3 $\mu\text{g/mL}$) como no inmunológicos (ionóforo de calcio A23187 a concentraciones comprendidas entre 0,1 y 3 μM , y PMA 50 ng/mL) durante 30 min a 37°C y en constante agitación. La reacción se detuvo a 0°C y las células fueron centrifugadas a 500 g durante 10 min para separar el sobrenadante del sedimento celular. Para medir el contenido en β -hexosaminidasa presente en el interior de las células, éstas fueron sometidas a 3 congelaciones y descongelaciones sucesivas con el fin de romper su membrana plasmática y permitir la liberación de la β -hexosaminidasa intracelular. Inmediatamente después, se analizó el contenido de β -hexosaminidasa presente tanto en los sobrenadantes celulares como en el sedimento celular.

Para la determinación del TNF- α las células fueron centrifugadas (500 g/ 10 min) y resuspendidas (5×10^5 células/mL) en DMEM suplementado con STI (200 $\mu\text{L/mL}$) en ausencia de FCS. Posteriormente, fueron activadas en una placa de 96 pocillos, en alícuotas de 100 μL mediante la adición del antígeno Asc S 1 (concentración final de 0,1 mg/mL), el anticuerpo anti-IgE policlonal (1 $\mu\text{g/mL}$) o la combinación de PMA (50 ng/mL) e ionóforo de calcio A23187 (0,3 μM). La concentración óptima de cada estímulo fue seleccionada en función de experimentos preliminares realizados en las células C_2 o en mastocitos maduros caninos. Los sobrenadantes celulares se recogieron a diferentes tiempos tras la estimulación (30 min, 2, 4, 6, 8 y 24 horas) para determinar la

concentración de TNF- α liberado. Todos los experimentos (activación inmunológica y no inmunológica) fueron realizados de forma paralela.

3.2.2.4. Detección de β -hexosaminidasa

Las muestras (200 μ L) fueron añadidas a tubos que contenían 200 μ L de sustrato 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosaminida e incubadas durante 3 horas a 37°C en agitación continua. Tras la incubación, se añadieron 600 μ L de solución de tris, y la fluorescencia de las muestras fue detectada mediante un fluorímetro a las longitudes de onda de 356nm de excitación y 465nm de emisión.

Bioensayo para la detección del TNF- α

La actividad y la concentración del TNF- α fueron determinadas en los sobrenadantes celulares mediante la técnica de bioensayo modificada a partir de la descrita por Gordon y Galli (1990), basada en la sensibilidad al TNF- α que presenta la línea de fibroblastos murinos L929 .

Brevemente, las células L929 (10^6 cel /mL) fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI suplementado con un 5% FCS, 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y un 1% de Hepes 1M y fueron distribuidas en placas de 96 pocillos, en alícuotas de 50 μ L / pocillo. Tras una noche de incubación, el medio fue aspirado y reemplazado por medio RPMI fresco al que se añadieron 5 μ g/mL de cicloheximida y 100 μ g/ mL de STI. Después, se añadieron las muestras de los sobrenadantes celulares (50 μ L/pocillo) y los patrones de TNF- α recombinante murino (a 4 concentraciones diferentes comprendidas entre 2 y 2.000 pg/mL).

Tras un periodo de incubación de 18 horas a 37°C se añadieron 10 μ L de MTT (5mg/mL) por pocillo. El MTT penetra en las células y, únicamente en las mitocondrias de las células vivas, se transforma en una sal azul de formazan. Tras 4h de incubación se añadió una solución de de N, N-dimetilformamida al 50% y 20% de SDS, a pH 7,4 para disolver los cristales de MTT. La placa fue

3. Experimentos

incubada de nuevo durante una noche, y las densidades ópticas se determinaron mediante un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados finales fueron extrapolados a partir de la curva construida con los patrones de TNF- α recombinante murino.

Con el fin de verificar la sensibilidad de esta técnica de bioensayo, se realizó un experimento control. Para ello, incubamos durante 30 min a 37°C los sobrenadantes celulares (99 μ L) junto con un anticuerpo policlonal anti-TNF- α humano (1 μ L), que reconoce también el TNF- α canino. La adición del anticuerpo neutralizó por completo la actividad del TNF- α canino presente en las muestras de los sobrenadantes celulares. Sin embargo, la adición de 1 μ L de suero normal de conejo a 99 μ L de sobrenadante no tuvo ningún efecto en la actividad del TNF- α determinada mediante la técnica de bioensayo.

Expresión de los receptores para las IgE

Para detectar la expresión de los receptores específicos para las IgE en la membrana de las células C₂, se utilizó una técnica de citometría de flujo. Las células fueron sensibilizadas durante 1 hora en un medio que contenía un 5% de suero rico en IgE o bien IgE canina monoclonal (10 μ g/mL). Para obtener los controles negativos de la tinción, las células C₂ fueron incubadas en un medio que contenía un 5% de suero canino inactivado por calor (56°C/4h) o bien en ausencia de IgE canina monoclonal. Tras dos lavados en PBS, las células fueron incubadas durante 30 min a 4°C con 100 μ L del anticuerpo primario (anti-IgE canina monoclonal a una concentración de 10 μ g/mL PBS). Además, y como control negativo, se realizaron duplicados que se incubaron con 100 μ L de un anticuerpo de especificidad irrelevante (IgG de ratón a una concentración de 10 μ g/mL) del mismo isotipo que el anticuerpo primario. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizó un lavado en PBS, y las células fueron incubadas durante otros 30 min a 4°C en la oscuridad con 100 μ L del anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína (FITC). Después de dos lavados, las células se fijaron en 200 μ L de PBS que

contenía un 1% de formaldehído. Una vez fijadas, las células fueron analizadas mediante el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.2.2.3. *Análisis estadístico de los datos*

Los resultados se han expresado como la media aritmética \pm error estándar de un total de 8-10 experimentos. Las comparaciones entre las diferentes medias se han llevado a cabo mediante el test de la t de Student con un nivel de significación de 0,05.

La liberación de β -hexosaminidasa se expresó en forma de porcentaje respecto al contenido total de β -hexosaminidasa del mastocito. El porcentaje neto de β -hexosaminidasa liberado por el mastocito, se obtuvo tras restar el porcentaje de β -hexosaminidasa liberada de forma espontánea por el mastocito (sin estimulación celular), de la β -hexosaminidasa liberada tras la estimulación celular. El porcentaje de β -hexosaminidasa liberado de forma espontánea fue en todos los experimentos inferior al 5%.

3.2.3. Resultados

3.2.3.1. *Liberación de β -hexosaminidasa*

Como muestra la Figura 1, la estimulación de las células mediante el antígeno Asc S 1 o el anticuerpo policlonal anti-IgE canina, no indujo la liberación de β -hexosaminidasa a ninguna de las concentraciones probadas. Por ello, intentamos potenciar el efecto de la anti-IgE mediante la preincubación de las células con stem cell factor (SCF) canino (50 ng/mL) durante 15 min previamente a la estimulación inmunológica. Sin embargo, la co-estimulación con el SCF tampoco indujo la liberación de β -hexosaminidasa en las células C_2 .

Sin embargo, la activación de las células C_2 mediante el ionóforo de calcio A23187 (0,1- 3 μ M) provocó una liberación de β -hexosaminidasa proporcional a la concentración del estímulo utilizada. La liberación máxima ($13,92 \pm 2,09\%$) se obtuvo a la concentración de 3 μ M. Cuando se utilizó el compuesto PMA (50

3. Experimentos

ng/mL) como co-estímulo junto con el ionóforo de calcio, la liberación de β -hexosaminidasa se vio incrementada, y se alcanzó una liberación máxima del mediador del $23,95 \pm 1,96\%$. Así, la co-estimulación con PMA e ionóforo de calcio indujo un aumento estadísticamente significativo de la liberación de β -hexosaminidasa en comparación a la estimulación mediante ionóforo de calcio sólo ($P > 0,05$).

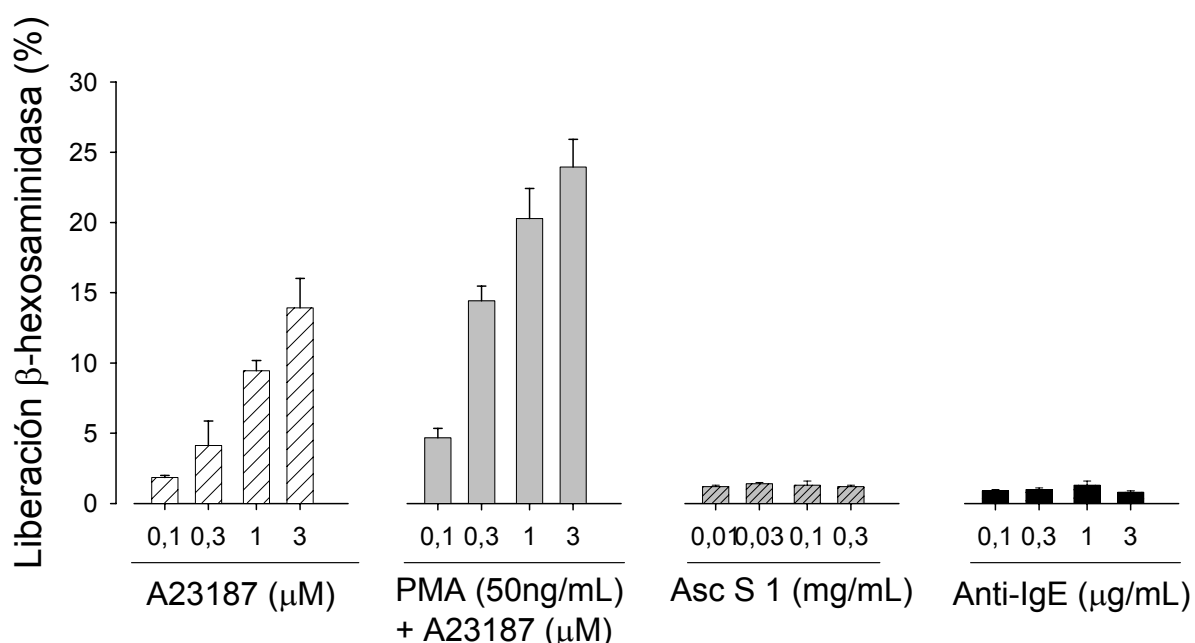


Figura 1. Porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa de las células C_2 sensibilizadas y estimuladas mediante ionóforo de calcio A23187 sólo (barras rayadas), o en combinación con 50 ng/mL de PMA (barras grises), Asc S 1 (barras grises rayadas) y anti-IgE canina (barras negras). Cada barra representa la media \pm error estándar de seis experimentos independientes.

3.2.3.2. Liberación de $TNF-\alpha$

La liberación del $TNF-\alpha$ se evaluó en las células C_2 previamente sensibilizadas y estimuladas a lo largo de 24 horas. Como muestra la Figura 2, cuando las células fueron estimuladas mediante el uso del antígeno Asc S 1 (0,1 mg/mL) o del anticuerpo anti-IgE (1 μ g/mL), no se detectó la producción de $TNF-\alpha$ a

3. Experimentos

ninguno de los tiempos de estimulación probados. La co-estimulación de las células con SCF (50 ng/mL) junto con el anticuerpo anti-IgE tampoco indujo la liberación de TNF- α .

La Figura 2 muestra, sin embargo, una producción de TNF- α en las células C₂ activadas con PMA (50 ng/mL) e ionóforo de calcio (0,3 μ M) durante un periodo de 24 horas. La liberación de la citocina aumentó de forma dependiente al tiempo de estimulación, y fue máxima entre las 2 y las 6 horas tras la estimulación celular.

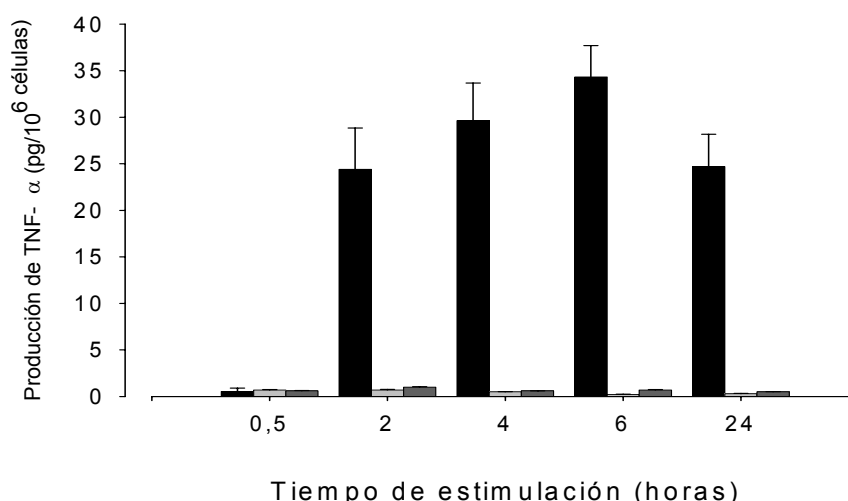


Figura 2. Producción de TNF- α en las células C₂ sensibilizadas y estimuladas mediante ionóforo de calcio A23187 y PMA (barras negras), AsC S 1 (barras grises rayadas) y anti-IgE canina (barras blancas). Cada barra representa la media \pm error estándar de seis experimentos independientes.

3.2.3.3. Expresión de los receptores específicos para las IgE

Tal y como muestran los resultados obtenidos tras analizar las células mediante una técnica de citometría de flujo, observamos que las células C₂ expresan receptores para las IgE en su membrana.

3. Experimentos

La Figura 3a muestra la fluorescencia detectada tras sensibilizar las células con suero rico en IgE y teñirlas con un anticuerpo monoclonal anti-IgE canina, en comparación a la fluorescencia detectada en las células incubadas con suero canino inactivado por calor (en el cual el dominio de unión de la cadena pesada de las IgE había sido desnaturalizado por el calor y, por tanto, no se había producido la sensibilización de las células). Paralelamente, y con el fin de descartar la existencia de una unión inespecífica del anticuerpo anti-IgE a otros componentes del suero canino diferentes a las IgE, las células C₂ fueron sensibilizadas con IgE canina monoclonal y fueron seguidamente teñidas con el anticuerpo monoclonal anti-IgE canina. Se observó una clara diferencia entre la intensidad de fluorescencia detectada en las células sensibilizadas con IgE canina monoclonal en comparación a la intensidad de fluorescencia detectada en las células no sensibilizadas (Figura 3b). Además, se realizaron controles negativos adecuados utilizando un anticuerpo control (de especificidad irrelevante) en sustitución al anticuerpo anti-IgE, que demostraron la ausencia de uniones inespecífica del anticuerpo primario.

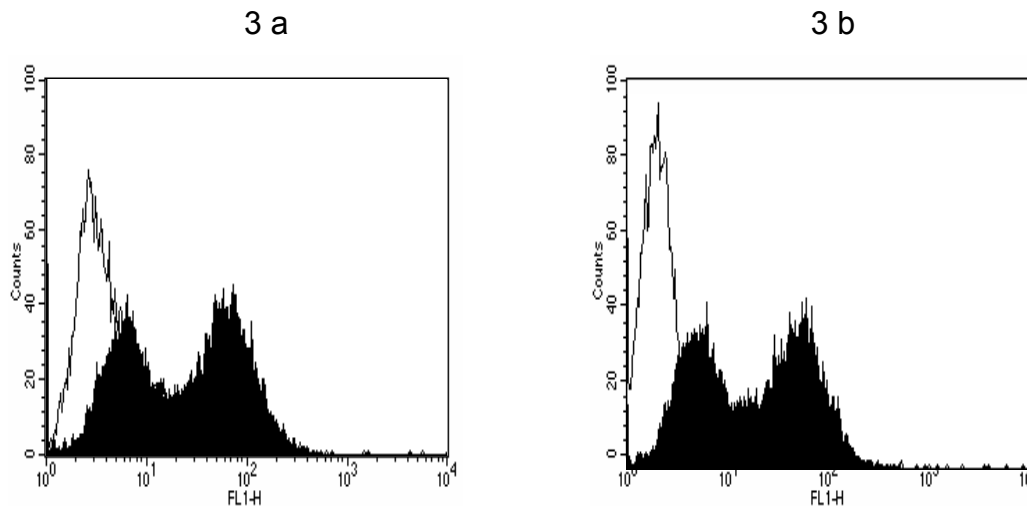


Figura 3. Análisis citométrico de la unión de las IgE a la membrana de las células C₂. Las células fueron sensibilizadas con suero canino rico en IgE (histograma negro) o con suero canino inactivado por calor (56°C/4h) (histograma blanco) (Figur 3a). La sensibilización también se llevó a cabo con IgE canina monoclonal (histograma negro) o en ausencia de IgE (histograma blanco) (Figura 3b). Para el análisis celular se realizó una doble tinción mediante el anticuerpo monoclonal anti-IgE canina y el anticuerpo de cabra anti-IgG conjugado al fluorocromo FITC.

3.2.4. Discusión

En este estudio hemos analizado la actividad secretora de las células C₂, mantenidas en cultivo tras ser activadas mediante estímulos inmunológicos (dependientes de IgE). La actividad de los mastocitos fue analizada a través del análisis de la liberación de un mediador preformado (β -hexosaminidasa) y uno de nueva síntesis (TNF- α). La respuesta celular obtenida mediante los estímulos inmunológicos (antígeno y anti-IgE) fue comparada con la respuesta obtenida tras la activación mediante estímulos no inmunológicos. Tal y como hemos demostrado mediante el análisis citométrico, las células C₂ expresan receptores específicos para las IgE capaces de unir estas inmunoglobulinas, sin embargo, estas células han perdido la capacidad de ser activadas a través de estos receptores.

Desde el establecimiento de la línea celular C₂ en 1986, han sido reportados numerosos estudios centrados en la caracterización de su función secretora. Los primeros trabajos fueron llevados a cabo en células recién disgregadas del mastocitoma extraído de ratones atímicos. Los resultados derivados de estos estudios mostraban que las células C₂ eran capaces de liberar histamina y proteasas tras ser activadas mediante un antígeno o el ionóforo de calcio A23187 (*Lazarus y cols., 1986*) (*Caughey y cols., 1988*). Además, se había observado que estas células eran capaces de producir mediadores de nueva síntesis como las prostaglandinas (*Emery y cols., 1988*). En 1996 Thomas y colaboradores demostraron por primera vez la presencia y la liberación de TNF- α preformado en el citoplasma de las células C₂ recién disgregadas del mastocitoma, activadas mediante antígeno o ionóforo de calcio.

El hecho de trabajar con las células C₂ mantenidas en cultivo continuo, en lugar de utilizar las células recién disgregadas del mastocitoma, presenta numerosas ventajas, y constituye un método mucho más práctico para estudiar la función de estas células. Sin embargo, existen pocos datos referentes a la estimulación dependiente de IgE de estas células mantenidas en estas condiciones. Nosotros hemos investigado el efecto de dos estímulos inmunológicos de

3. Experimentos

probada efectividad en mastocitos maduros cutáneos (*Brazís y cols., 1998*) (antígeno Asc S 1 y anticuerpo anti-IgE), sobre la capacidad secretora de las células C₂ mantenidas en cultivo continuo. La activación de estas células tras haberlas sensibilizado durante una semana con suero canino rico en IgE no indujo la desgranulación celular a ninguna de las concentraciones de los estímulos utilizadas. Tampoco se detectó producción de citocinas (TNF- α) en las células activadas mediante los mismos estímulos inmunológicos.

Por el contrario, la activación de las células C₂ con estímulos no inmunológicos indujo tanto la liberación de β -hexosaminidasa ($23,95 \pm 1,96\%$) como la síntesis de TNF- α ($34,34 \pm 2,34$ pg/mL). A pesar de que Thomas y colaboradores (1996) habían reportado que las células C₂ recién disgregadas del mastocitoma contenían TNF- α preformado asociado a sus gránulos citoplasmáticos, en nuestro estudio no observamos concentraciones de TNF- α detectables hasta las 2 horas post-estimulación, lo cual sugiere que la mayor parte de la citocina detectada en los sobrenadantes celulares fue sintetizada tras la estimulación. En conclusión, estos resultados indican que, a pesar de que las células C₂ son una fuente de TNF- α y β -hexosaminidasa, estos mediadores no pueden ser liberados mediante la estimulación inmunológica de las células.

Los estudios realizados por DeVinney y colaboradores (1990) en esta misma línea celular cultivada en presencia de suero procedente de perros alérgicos, mostraban que las células eran capaces de liberar histamina tras una estimulación antigénica. Por ello, los autores sugerían que la presencia de IgE en el medio de cultivo podía prevenir la eliminación de los receptores para las IgE en estas células, o incluso inducir la expresión de nuevos receptores, aumentando así la reactividad de las células frente a un estímulo inmunológico. De acuerdo con estos datos, estudios más recientes han demostrado que la estimulación de basófilos y mastocitos a través de los receptores Fc ϵ RI es más eficaz si el cultivo de estas células se realiza en presencia de altas concentraciones de IgE (*Yamaguchi y cols., 1997*) (*MacGlashan y cols., 1998*).

En este estudio, las células C₂ fueron cultivadas en ausencia de IgE, y previamente a su estimulación, fueron incubadas durante 7 días en presencia de suero canino rico en IgE. En función de los datos reportados por DeVinney y colaboradores entre otros autores, pensamos que la ausencia de IgE en el medio de cultivo de las células podría haber inducido la pérdida de los receptores Fc ϵ RI en la superficie de estas células. Sin embargo, el profundo análisis citométrico al que sometimos las células C₂ mostró que éstas conservan los receptores específicos para las IgE y son capaces, a través de ellos, de unir las IgE, lo cual sugiere un correcto funcionamiento de la subunidad α del receptor.

A pesar de que los estudios citométricos revelaron que las células C₂ preservan, tras pases celulares sucesivos, los receptores para las IgE, éstos podrían encontrarse expresados en un número demasiado bajo como para inducir la desgranulación celular. Sin embargo, la falta de estimulación inmunológica de las células C₂ podría deberse también, y más probablemente, a un defecto en la funcionalidad de los receptores, que impediría la transducción de las señales bioquímicas necesarias para la estimulación celular. Para contrastar estas hipótesis sería necesario realizar nuevos experimentos con el fin de estudiar los mecanismos bioquímicos específicos responsables de la activación de las células C₂ a través de sus receptores Fc ϵ RI.

3.3. EFECTO DEL STEM CELL FACTOR SOBRE LA CAPACIDAD SECRETORA DE LOS MASTOCITOS CUTÁNEOS CANINOS.

3.3.1. Introducción

Los mastocitos cutáneos actúan como células inmunoreguladoras en las reacciones alérgicas. La activación de los mastocitos a través de las IgE unidas a su membrana celular induce la liberación inmediata de diferentes mediadores preformados, así como la transcripción de citocinas inflamatorias y quimiocinas específicas para los leucocitos que son, en parte, responsables de la fase tardía de las reacciones alérgicas (*Gordon y cols., 1990*). Además de las IgE, existen otros factores capaces de inducir la activación de los mastocitos. Así, se sabe que el stem cell factor (SCF), un factor de crecimiento específico para los mastocitos, está también involucrado en la funcionalidad de estas células (*Tsai y cols., 1991*).

El SCF, también llamado ligando del *c-kit*, promueve la diferenciación y maduración de las células precursoras de los mastocitos. Además, este factor de crecimiento juega un importante papel en la supervivencia de los mastocitos ya maduros (*Tsai y cols., 1991*) (*Valent, 1994*). Estudios llevados a cabo en el perro han demostrado que la incubación durante 5 semanas de las células de la médula ósea canina en un medio al que se ha añadido SCF, incrementa la supervivencia y la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas (*Shull y cols., 1992*). Además, Thomas y colaboradores (1996) han observado que las células aisladas de un mastocitoma canino incubadas durante 12 semanas con SCF presentan más gránulos citoplasmáticos y una expresión elevada de TNF- α en comparación con las células cultivadas en ausencia de este factor de crecimiento.

Además de sus propiedades como factor de crecimiento, el SCF es capaz de estimular y potenciar la actividad secretora de los mastocitos maduros activados a través del receptor Fc ϵ RI. De esta manera, el SCF es capaz de inducir la liberación de mediadores preformados (histamina) y de nueva síntesis (leucotrienos y prostaglandinas) en los mastocitos cutáneos humanos

(Columbo y cols., 1992). De forma similar, Wershil y colaboradores (1992) observaron que el SCF inyectado en la piel de los ratones estimulaba la desgranulación de los mastocitos cutáneos *in vivo*.

Por otra parte, algunos estudios *in vitro* han demostrado que la co-estimulación de los mastocitos mediante SCF y anti-IgE puede potenciar de forma importante la activación dependiente del receptor FcεRI en los mastocitos peritoneales de rata (Lin y cols., 1996) y en los mastocitos intestinales humanos (Bischoff y cols., 1997), entre otras poblaciones celulares (Frenz y cols., 1997). En los mastocitos caninos maduros, sin embargo, se han realizado pocos estudios al respecto.

Por ello, los **objetivos** de este trabajo han sido; en primer lugar, evaluar el efecto del SCF recombinante canino, utilizado como co-estímulo junto con la anti-IgE, sobre la liberación de mediadores por parte de los mastocitos cutáneos caninos, y en segundo lugar, analizar qué efecto puede tener el SCF, utilizado como factor de crecimiento, sobre la integridad y la actividad secretora de los mastocitos cutáneos caninos cultivados durante un periodo de tiempo prolongado.

Con el fin de evaluar la respuesta secretora de los mastocitos, hemos analizado la liberación de un mediador preformado como la histamina, y la producción de una citocina de nueva síntesis como el TNF- α , tras la activación de estas células a través de su receptor FcεRI.

Para ello, hemos aislado los mastocitos de la piel canina, y los hemos cultivado durante 5 días en presencia o en ausencia de SCF recombinante canino. El cultivo de los mastocitos cutáneos maduros en un medio suplementado con SCF podría constituir un modelo *in vitro* válido para analizar de qué forma pueden influir los cambios en el microambiente del mastocito sobre sus propiedades funcionales, bioquímicas y morfológicas.

3.3.2. Material y Métodos.

3.3.2.1. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Madrid): o-ftaldialdehído (OPT), sal difosfatada de histamina, colagenasa (tipo I), hialuronidasa (tipo I-S), proteasa (tipo XIV), albúmina bovina (fracción V), *soybean trypsin inhibitor* (STI), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), cicloheximida, solución de poli-L-lisina y diaminobencidina (DAB). La penicilina-estreptomina, el medio mínimo esencial modificado Dulbecco's Eagle's (DMEM), el suero bovino fetal (FCS), la glutamina, la histidina, la fungizona, la tripsina-EDTA y el sodio dodecil sulfato (SDS) fueron obtenidos de Gibco (Life technologies, Barcelona). El kit de bloqueo de la biotina endógena, y el kit para la detección del anticuerpo secundario (Vectastain ABC kit) fueron obtenidos de Vector Laboratories (Burlingame, Canada). El anticuerpo policlonal anti-IgE canina fue suministrado por Bethyl Laboratoires (Montgomery, TX, USA). El TNF- α recombinante murino y el anticuerpo anti-TNF- α fueron obtenidos de Genzyme (Cambridge, MA, USA). El SCF recombinante canino nos fue amablemente cedido por el Dr. Morstyn (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA).

3.3.2.2. Protocolo experimental

Aislamiento y cultivo de los mastocitos cutáneos

Se tomaron biopsias cutáneas del área abdominal de 8 perros machos de diferentes razas que habían sido eutanasiados en el Centre d'Accollida d'Animals de Companyia del Ayuntamiento de Barcelona. El aislamiento de los mastocitos cutáneos fue llevado a cabo mediante una técnica puesta a punto en nuestro laboratorio (*de Mora y cols., 1993*). Brevemente, las biopsias de piel fueron troceadas en fragmentos de hasta 1 mm³ de tamaño tras separar el tejido graso. Los fragmentos cutáneos se lavaron mediante dos centrifugaciones consecutivas (400 rcf, 10 min) y posteriormente fueron digeridos enzimáticamente durante 180 min a 37°C en MEM (15 mL / gramo de

3. Experimentos

piel) suplementado con colagenasa, hialuronidasa, proteasa, desoxiribonucleasa, antibióticos y albúmina bovina. Tras la digestión enzimática, se obtuvo una población heterogénea de células que contenía aproximadamente de un 2% de mastocitos. La suspensión celular fue filtrada y las células fueron resuspendidas en DMEM suplementado con glutamina 2mM, histidina 1,6 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 50 µg/mL de gentamicina y un 5% de FCS, e incubadas en presencia o en ausencia de SCF exógeno (6 ng/mL) durante un periodo de tiempo de hasta 5 días en los experimentos de liberación de histamina y de 4 días para la determinación del TNF- α .

Sensibilización de los mastocitos cutáneos

Tras el periodo de incubación de las células se procedió al recuento de los mastocitos mediante la tinción de las células con el colorante metacromático de azul de Kimura (*Kimura y cols., 1973*) y se determinó la viabilidad celular, que resultó ser siempre superior al 95%, mediante la tinción de azul tripano. Posteriormente los mastocitos fueron sensibilizados mediante su incubación en DMEM (37°C/ 2 h) al que se añadió un 5% de suero rico en IgE procedente de 4 perros sensibles al parásito *Ascaris suum*. La finalidad del proceso de sensibilización era alcanzar la máxima ocupación de los receptores de IgE presentes en la membrana de los mastocitos para posteriormente activarlos con el anticuerpo anti-IgE.

Activación de los mastocitos cutáneos

Para los experimentos en los que se determinó la liberación de histamina, las células fueron lavadas mediante dos centrifugaciones en PBS y resuspendidas en PBS que contenía Ca⁺² 1mM y Mg⁺² 1mM. Posteriormente fueron distribuidas en tubos que contenían 2x10⁴ mastocitos en un volumen de 500µL de PBS. Las células fueron activadas mediante 3 condiciones diferentes: **1)** estimulación con SCF a 3 concentraciones diferentes: 10, 50, 100 ng/mL durante 30 min. **2)** estimulación mediante el anticuerpo policlonal anti-IgE

3. Experimentos

canina (1µg/mL) durante 30 min. **3)** preincubación en presencia de SCF (50 ng/mL) durante 15 min seguidos de la adición de la anti-IgE canina (1µg/mL) durante otros 30 min. El período de preincubación de las células con el SCF fue establecido en función de los estudios llevados a cabo en mastocito cutáneos humanos (*Columbo y cols., 1992*). Además, se seleccionó la concentración de SCF de 50 ng/mL como la óptima para co-estimular las células junto con la anti-IgE después de un experimento preliminar con 4 concentraciones de SCF (10, 20, 50 y 100 ng/mL). La activación se realizó a 37°C en constante agitación, y se detuvo a 0°C. Las muestras se centrifugaron a 2.630 rcf, durante 20 min a 4°C para separar el sedimento celular de su sobrenadante. Los sobrenadantes celulares (500 µL) fueron traspasados a tubos que contenían 0,5 mL de ácido perclórico 0,8 N y se mantuvieron a 4°C para favorecer la precipitación de las proteínas. Previamente a la determinación de la histamina liberada por los mastocitos cutáneos, las muestras fueron centrifugadas a 10.900 rcf durante 4 minutos para separar las proteínas que habían precipitado.

Para la determinación del TNF- α , las células fueron lavadas mediante dos centrifugaciones en PBS y resuspendidas a una concentración de 2×10^5 mastocitos/ mL de DMEM con STI (200 µg/mL) en ausencia de FCS. La suspensión celular fue distribuida en alícuotas de 100µL en una placa de 96 pocillos y seguidamente los mastocitos fueron estimulados con SCF (50ng/mL), con anti-IgE (1µg/mL), o bien co-estimulados con SCF (50ng/mL) y anti-IgE (1µg/mL). Los sobrenadantes celulares se recogieron a diferentes tiempos (1, 2, 4, 6, 8h) tras la estimulación para determinar el contenido en TNF- α mediante un bioensayo de citotoxicidad. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Determinación de la histamina liberada

Para la determinación de la histamina liberada por los mastocitos se utilizó el método espectrofluorimétrico clásico descrito por Shore y colaboradores (1959) y modificado por Sullivan y colaboradores (1975). Brevemente, las muestras (1mL) fueron transferidas a tubos que contenían 0,6 g de NaCl, a los cuales se

3. Experimentos

añadieron 1 mL de PCA (0,4N), 0,25 mL de NaOH (5N) y 2 mL de butanol. Tras la agitación de las muestras, se centrifugaron a 600 rcf durante 10 min a 20°C y se recuperó la fase superior orgánica, que fue traspasada a tubos que contenían 1,5 mL de NaOH (1N) saturado con NaCl. Tras agitarlas de nuevo, 1,3 mL de HCl (0,1N) y 1,9 mL de n-heptano fueron añadidos a la fase orgánica. Después de agitar las muestras, 1 mL de la fase acuosa se alcalinizó con 200 μ L de NaOH (1N). La histamina presente se derivatizó incubando las muestras a temperatura ambiente con 50 μ L de OPT (10mg/mL metanol) durante 4 min. La reacción histamina-OPT se detuvo al acidificar la muestra con 50 μ L de H₂PO₄ (2,5N) y su fluorescencia se determinó mediante espectrofluorimetría a las longitudes de onda de excitación y emisión de 350 nm y 450 nm respectivamente.

Determinación del TNF- α liberado mediante un bioensayo de citotoxicidad

La concentración del TNF- α presente en los sobrenadantes celulares fue determinada mediante una técnica de bioensayo modificada a partir de la descrita por Gordon y Galli (1991), basada en la sensibilidad al TNF- α de la línea de fibroblastos murinos L929. Brevemente, las células L929 (10⁶ cel /mL) fueron distribuidas en una placa de 96 pocillos en alícuotas de 50 μ L / pocillo y fueron incubadas durante una noche en medio de cultivo RPMI suplementado con un 5% FCS, 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y un 1% de HEPES 1M. Tras la incubación, el medio fue aspirado y reemplazado por medio fresco al que se añadieron 5 μ g/mL de cicloheximida y 100 μ g/mL de STI. Después, fueron añadidas las muestras (50 μ L/pocillo) y los estándares de TNF- α murino recombinante (de 2 a 2.000 pg/mL). Tras un periodo de incubación de 18 h a 37°C se añadieron 10 μ L de MTT (5mg/mL) por pocillo y la placa fue incubada durante 4h más. Seguidamente, se añadieron en cada pocillo 50 μ L de una solución de N, N-dimetilformamida al 50% y de SDS al 20% para disolver los cristales de MTT formados únicamente por las células vivas. La placa fue incubada de nuevo durante una noche, y las densidades ópticas se determinaron mediante un lector de ELISA a una longitud de onda

de 570 nm. Los resultados finales fueron extrapolados a partir de la curva construida con los estándar de TNF- α recombinante murino.

Detección del TNF- α en las células cutáneas mediante inmunocitoquímica

Con el fin de identificar la fuente celular del TNF- α detectado en los sobrenadantes celulares, se realizó un estudio inmunocitoquímico del conjunto de células cutáneas. Las células fueron activadas con anti-IgE durante 2 h en presencia de brefeldina A (10 μ g/mL) para favorecer la acumulación de proteínas en el citoplasma celular. Las células fueron centrifugadas en portas pretratados con poli-L-lisina y FCS, secadas al aire y fijadas en acetona fría durante 10 min. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó mediante la incubación de las preparaciones en una solución de 0,1% de peróxido de hidrógeno en metanol. Tras lavar las preparaciones con TBS, se bloqueó la actividad de la biotina endógena mediante la incubación, 15 minutos, con una solución que contenía Avidina D y posteriormente otros 15 minutos con una solución de biotina. Las preparaciones se incubaron con suero normal de cabra para evitar las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. Las preparaciones fueron incubadas toda la noche a 4°C con 100 μ L del anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo anti-TNF- α humano) a una dilución 1:500. Paralelamente, se realizaron los controles negativos de isotipo para comprobar que no existía una unión inespecífica del anticuerpo primario. Tras repetidos lavados de las preparaciones con TBS, se incubaron (1h) con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-IgG de conejo. Para el revelado de la tinción, las preparaciones fueron lavadas de nuevo y se incubaron con el complejo avidina-biotina (1/100) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se incorporó el substrato (DAB). Las preparaciones fueron contrastadas con hematoxilina o azul alcian.

3.3.2.3. Análisis estadístico de los datos

Los resultados se han expresado como la media aritmética \pm error estándar de 6-8 experimentos. Las comparaciones entre las diferentes medias se han

llevado a cabo mediante el test de la *t* de Student con un nivel de significación de 0,05.

La liberación de histamina se expresó en forma de porcentaje respecto al contenido total de histamina del mastocito y fue calculado tal y como se indica en el Experimento 3.1. (apartado 3.1.2.4.).

3.3.3. Resultados

3.3.3.1. Efecto de la co-estimulación de los mastocitos con SCF y anti-IgE sobre la liberación de histamina.

Como muestra la Figura 1, cuando las células fueron activadas con SCF sólo (10, 50, 100 ng/mL) no se observó liberación de histamina. En cambio, los mastocitos estimulados con anti-IgE (1µg/mL) liberaron una media del $24,00 \pm 2,4\%$ del contenido celular en histamina.

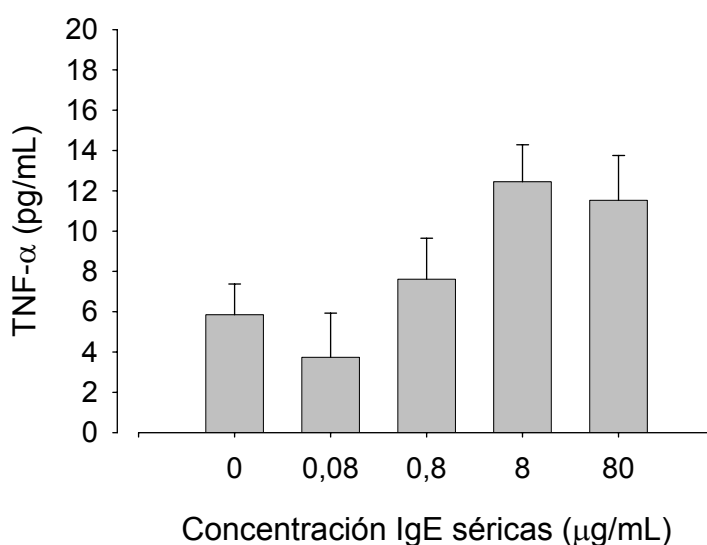


Figura 1. Efecto del SCF sobre la liberación de histamina inducida por la anti-IgE en los mastocitos caninos aislados de la piel. Las células fueron preincubadas con SCF (10, 20, 50, 100 ng/mL) durante 15 minutos y seguidamente activadas mediante anti-IgE. Cada barra representa la media \pm error estándar de seis experimentos independientes.

Tal y como se observa en la figura 1, la preincubación de los mastocitos con SCF a concentraciones comprendidas entre 10 y 100 ng/mL durante 15 min previamente a la estimulación con anti-IgE (1 μ g/mL), incrementó la liberación de histamina de forma proporcional a la concentración de SCF utilizada. La máxima liberación de histamina se alcanzó al preincubar las células con 50 ng/mL de SCF y estimularlas con anti-IgE. Por ello, se eligió la concentración de 50 ng/mL de SCF como la concentración óptima para realizar los siguientes experimentos.

3.3.3.2. Efecto del SCF sobre la liberación de histamina de los mastocitos cutáneos recién aislados y cultivados.

La Figura 2 muestra el porcentaje de histamina liberado por los MC cultivados durante 5 días en un medio sin SCF. Tal y como se observa, la liberación de histamina fue aumentando en función de los días de cultivo. Así, la liberación media de histamina inducida por la anti-IgE en los mastocitos recién aislados (0 días de cultivo) fue del 14,23 \pm 1,9% y este porcentaje aumentó de forma importante tras 3 y 5 días de cultivo de las células (26,43 \pm 3,5% y 35,45 \pm 2,3% respectivamente). La preincubación de los mastocitos con SCF (50 ng/mL) durante 15 min previamente a la estimulación con anti-IgE (1 μ g/mL) indujo un aumento en la liberación de histamina en las células tanto recién aisladas (de 14,23 a 21,88 \pm 4,2%) como en los mastocitos cultivados (de 26,43 a 40,48 \pm 5,5% y de 35,45 a 46,70 \pm 4,7% a los 3 y 5 días de cultivo). Sin embargo, el SCF utilizado como estímulo, no indujo la desgranulación de los mastocitos a ninguna de las concentraciones probadas.

Como muestra la Figura 2b, la liberación de histamina en los mastocitos cultivados durante 5 días en presencia de SCF (6 ng/mL) y estimulados con anti-IgE, aumentó también a lo largo del tiempo de cultivo (14,23 \pm 1,9% en los mastocitos recién aislados, 38,10 \pm 5,1% tras 3 días de cultivo y 46,81 \pm 1,9% tras 5 días de cultivo). De nuevo, la incubación de las células con SCF (50 ng/mL) previamente a la estimulación con anti-IgE potenció de forma significativa el porcentaje de histamina liberada, llegando a ser de 21,88 \pm 4,2% en los

3. Experimentos

mastocitos recién aislados, y de $56,96 \pm 5,2$ y $58,15 \pm 5,2\%$ en los mastocitos cultivados durante 3 y 5 días respectivamente.

Estos resultados muestran que el porcentaje medio de liberación de histamina resultó ser significativamente mayor en las células cultivadas en un medio suplementado con SCF, que en las células cultivadas en ausencia de SCF exógeno (Figura 2).

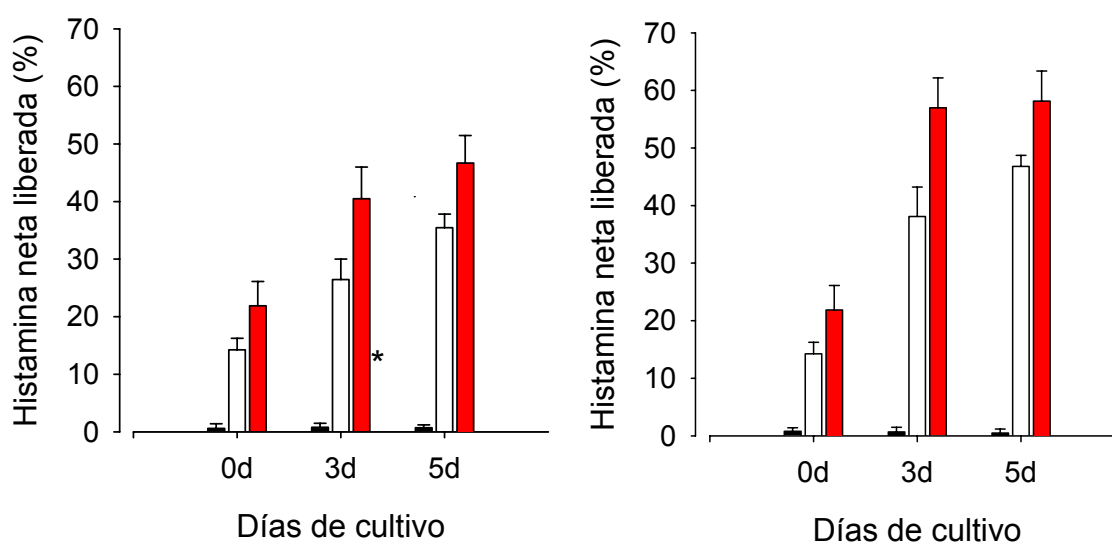


Figura 2. Liberación de histamina en los mastocitos aislados de la piel cultivados en ausencia (a) o en presencia (b) de SCF exógeno, y estimulados mediante SCF (50 ng/mL) (barras negras), anti-IgE (1 μ g/mL) (barras blancas) o co-estimulados con SCF (50 ng/mL) y anti-IgE (1 μ g/mL) (barras grises). Cada barra representa la media \pm error estándar de seis experimentos independientes (* $p > 0,05$ respecto a las células no co-estimuladas con SCF).

3. Experimentos

3.3.3.3. Efecto del SCF sobre la producción de TNF- α en mastocitos cutáneos cultivados.

Los mastocitos activados con SCF sólo (50 y 100 ng/mL) no liberaron concentraciones detectables de TNF- α a ninguno de los tiempos de estimulación.

La Figura 3 (a) muestra la producción de TNF- α (pg/mL) de los mastocitos cultivados durante 4 días en un medio sin SCF añadido. La máxima liberación de TNF- α en los mastocitos activados a través del Fc ϵ RI fue de $1,78\pm 0,8$ pg/mL y se obtuvo tras 2 h de estimulación. Cuando las células fueron incubadas durante 15 min con SCF (50ng/mL) y estimuladas mediante anti-IgE, la producción de TNF- α aumentó de forma significativa, alcanzándose la liberación máxima ($7,60\pm 1,5$ pg/mL) a las 6 h post-estimulación.

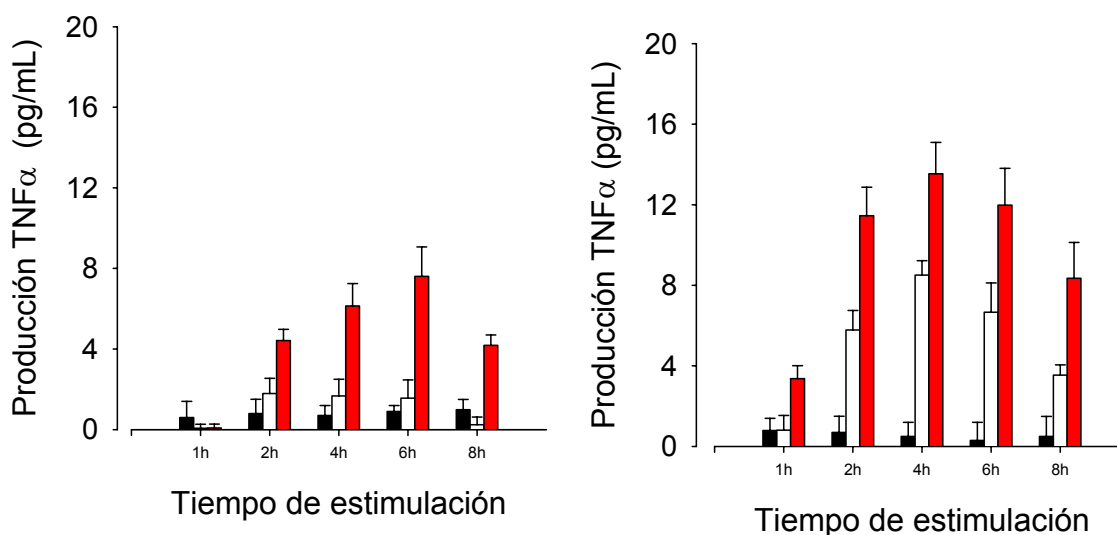


Figura 3. Producción de TNF- α en los mastocitos aislados de la piel cultivados en ausencia (a) o en presencia (b) de SCF exógeno, y estimulados mediante SCF (50 ng/mL) (barras negras), anti-IgE (1 μ g/mL) (barras blancas) o co-estimulados con SCF (50 ng/mL) y anti-IgE (1 μ g/mL) (barras grises). Cada barra representa la media \pm error estándar de un total de 6 experimentos independientes (* $P < 0,05$ respecto a las células no co-estimuladas con SCF).

La producción de TNF- α de las células que fueron cultivadas durante 4 días en presencia de SCF fue, tal y como muestra la Figura 3 (b), de $8,51 \pm 0,7$ pg/mL tras 4 h de estimulación con anti-IgE. En estas células, la co-estimulación mediante SCF (50 ng/mL) y anti-IgE potenció de forma importante la producción de TNF- α ($13,54 \pm 1,6$ pg/mL) a las 4 h de estimulación.

De forma general, la producción de TNF- α en las células cultivadas en presencia de SCF fue aproximadamente dos veces mayor a la observada en las células cultivadas en un medio no suplementado (Figura 3).

3.3.3.4. *Inmunocitoquímica*

Mediante una técnica de inmunocitoquímica se consiguió detectar la presencia de TNF- α en el interior de las células cutáneas. Los mastocitos cutáneos fueron identificados mediante una tinción realizada con el colorante azul alcian, que tiñe de forma selectiva los proteoglicanos presentes en el citoplasma de los mastocitos. Así, se determinó la presencia de TNF- α en el 99% de los mastocitos. Además, se observó que otras células cutáneas presentes en la preparación fueron marcadas positivamente con el anticuerpo anti-TNF- α . Por ello, es necesario interpretar con cautela los resultados obtenidos, ya que una parte de la concentración de TNF- α detectada en los sobrenadantes celulares podría proceder, además de los mastocitos, de otras células cutáneas (macrófagos, células de Langerhans, queratinocitos...) capaces de producir esta citocina.

3.3.4. **Discusión**

En este estudio se demuestra que el SCF es capaz de aumentar la liberación de histamina y la síntesis de TNF- α en los mastocitos maduros caninos activados a través del Fc ϵ RI.

3. Experimentos

Así, se analizó el efecto que podía ejercer el SCF (utilizado como factor de crecimiento añadido al medio de cultivo de los mastocitos, o bien utilizado como co-estímulo junto con la anti-IgE) sobre la capacidad secretora de los mastocitos.

Independientemente de la presencia, o no, de SCF exógeno durante el cultivo de los mastocitos, se observó una correlación positiva entre la capacidad de liberación de histamina de los mastocitos y el tiempo en que estas células fueron mantenidas en cultivo. De este modo, la liberación de histamina en los mastocitos cultivados fue aumentando a lo largo de los 5 días de cultivo. La presencia de células intersticiales como los fibroblastos, capaces de producir la forma soluble o membranal del SCF, podría explicar las diferencias detectadas en la liberación de histamina entre los mastocitos cultivados y las recién aislados de la piel. Coherentes con nuestra hipótesis, estudios llevados a cabo por Taylor y colaboradores (1995) sugerían que el incremento en la capacidad secretora de los mastocitos a lo largo del tiempo de cultivo podría reflejar la recuperación, mediada en parte por el SCF, de sus propiedades celulares tras el agresivo proceso de digestión enzimática. En cualquier caso, el aumento de la viabilidad y la capacidad secretora de los mastocitos cutáneos caninos cultivados durante 5 días indica que en estas condiciones, estas células constituyen un modelo adecuado para realizar estudios *in vitro* de modulación de la actividad de los mastocitos.

Con el fin de estudiar el efecto que ejerce el SCF añadido al medio de cultivo como factor de crecimiento, sobre la liberación de mediadores de los mastocitos, cultivamos las células aisladas de la piel durante 5 días en un medio suplementado con 6ng/mL de SCF recombinante canino. Así, observamos que los mastocitos cultivados en presencia de SCF liberaban un porcentaje de histamina significativamente superior al liberado por las células cultivadas en ausencia de SCF exógeno. Asimismo, la producción y la liberación de TNF- α también se vio incrementada por la presencia en el medio de cultivo del SCF.

Si bien el SCF añadido al medio de cultivo ejerció un importante efecto sobre la liberación de histamina (aumentando su liberación en aproximadamente 1,5

3. Experimentos

veces respecto a la liberación de histamina de las células cultivadas en un medio no suplementado con SCF), el efecto sobre la producción de TNF- α fue todavía más marcado (incremento de hasta 6 veces). Ello indicaba que el efecto del SCF es particularmente importante en las fases tardías de la transducción de la señal, tras la activación celular.

A pesar de que los estudios inmunocitoquímicos mostraron que los mastocitos cutáneos no estimulados presentaban TNF- α preformado en su citoplasma, no pudimos detectar la presencia del TNF- α en el sobrenadante celular hasta las 2 horas después de la estimulación celular, lo cual sugería que la mayor parte del TNF- α liberado al medio había sido sintetizado de nuevo tras la activación celular.

El SCF por sí solo no fue capaz de inducir la desgranulación de los mastocitos en nuestro estudio. A pesar de que Valent y colaboradores (1992) habían demostrado que el SCF es un potente estímulo de los mastocitos maduros, que actúa independientemente de las IgE, no se pudo detectar la liberación de ninguno de los mediadores estudiados ni en las células recién aisladas de la piel, ni en las células cultivadas estimuladas mediante SCF. Sin embargo, cuando el SCF fue utilizado como co-estímulo (a una concentración de 50 ng/mL) junto con la anti-IgE, la liberación de los mediadores preformados y de los de nueva síntesis fue potenciada de forma significativa. De nuevo, el efecto del SCF como co-estímulo fue más marcado sobre la producción de TNF- α que sobre la liberación de histamina. Ello indicaba que la preincubación de las células con SCF tiene un efecto más importante sobre los mecanismos de transcripción génica y síntesis proteica celular que sobre los mecanismos responsables de la desgranulación de los mastocitos. En concordancia con nuestros resultados, Ishizuka y colaboradores (1998) demostraron que el SCF actúa a nivel de la transcripción del TNF- α y puede, por tanto, regular la producción de esta citocina en los mastocitos activados a través del Fc ϵ RI. En el mismo estudio los autores investigaron el mecanismo por el cual el SCF es capaz de potenciar la estimulación inmunológica de los mastocitos y concluyeron que tanto el SCF como la anti-IgE activan miembros similares de

3. Experimentos

la familia de las MAP cinasas. Por otra parte, contrariamente a los resultados citados, Lin y colaboradores (1996) habían reportado que el SCF no ejerce ningún efecto sobre la producción de TNF- α en los mastocitos de rata.

Es interesante destacar que el efecto del SCF como co-estímulo es más importante en las células cultivadas en un medio no suplementado con SCF que en presencia de SCF exógeno. Esta misma observación también había sido reportada por Columbo y colaboradores (1992) en un estudio en el que demostraban que el efecto potenciador del SCF sobre la liberación de mediadores de los mastocitos se veía notablemente atenuado cuando las células habían sido cultivadas durante 24 horas en un medio suplementado con SCF. Este fenómeno podría deberse a una desensibilización de los receptores para el SCF presentes en la superficie de los mastocitos cultivados en presencia de SCF. Estas observaciones implican, por tanto, nuevas similitudes entre los mastocitos humanos y caninos.

Finalmente, podemos destacar que el marcado efecto que ejerce el SCF sobre la funcionalidad de los mastocitos confiere a este factor de crecimiento un papel sumamente importante en algunas patologías cutáneas, como la dermatitis atópica, que se caracterizan por la acumulación de mastocitos y el aumento en la liberación de mediadores específicos de los mastocitos. Ello implicaría que un aumento en la concentración del SCF en la piel podría contribuir al mantenimiento de la activación de los mastocitos en las reacciones alérgicas a través de la liberación aumentada de histamina y de TNF- α , una de las citocinas más importantes involucradas en la fase tardía de las reacciones alérgicas.

3.4. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE IgE SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES FcεRI Y LA LIBERACIÓN DE TNF-α EN LOS MASTOCITOS CUTÁNEOS CANINOS

3.4.1. Introducción

La unión de las IgE a sus receptores de alta afinidad (FcεRI) en la membrana de mastocitos y basófilos y el posterior entrecruzamiento de los receptores mediado por un alérgeno, constituye el primer paso de la cascada de reacciones que culminan en la liberación de los mediadores pro-inflamatorios (*Shaikh y cols., 1997*).

Las IgE, además de desarrollar un papel crucial en la activación mastocitaria, son capaces de regular la expresión de los receptores FcεRI en la superficie de los basófilos y los mastocitos (*Yamaguchi y cols., 1997*) (*Welker y cols., 1997*) (*Shaikh y cols., 1997*) (*Yamaguchi y cols., 1999*). Las primeras evidencias de este fenómeno fueron reportadas por Conroy y colaboradores (1977), quienes mostraron la existencia de una correlación positiva entre la concentración de IgE séricas y el nivel de expresión de los receptores FcεRI en basófilos humanos. Posteriormente, la sobreexpresión de los FcεRI inducida por las IgE fue observada también en los mastocitos murinos mediante un estudio realizado por Yamaguchi y colaboradores (1997). Este trabajo mostraba por primera vez que los mastocitos expuestos a concentraciones elevadas de IgE liberaban concentraciones mayores de mediadores (serotonina, IL-6, IL-4) tras la activación con anti-IgE. Recientemente, se han reportado resultados similares en mastocitos humanos desarrollados a partir de células de la médula ósea (*Yamaguchi y cols., 1999*) y en la línea celular HMC-1 de mastocitos humanos (*Welker y cols., 1997*).

El hecho de que las IgE sean capaces de inducir la sobreexpresión de los receptores FcεRI presenta implicaciones clínicas importantes. Por ello, han sido desarrolladas nuevas terapias que tienen por objetivo disminuir la

concentración de IgE funcionales en pacientes alérgicos (*Fahy y cols., 1997*) (*MacGlashany cols., 1997; Sainiy cols., 1999*).

Hasta el momento, la influencia que podía ejercer la concentración de IgE sobre la función secretora de los mastocitos maduros caninos no había sido estudiada en profundidad. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio con mastocitos aislados de la piel de perros alérgicos (expuestos a altas concentraciones de IgE) y no alérgicos, no habían mostrado diferencias significativas en la liberación de histamina por parte de ambas poblaciones celulares. En vista de los resultados, una de las explicaciones que sugeríamos era la falta de especificidad de la histamina para reflejar las posibles diferencias causadas por un cambio en la densidad de los receptores celulares. Además, en coherencia con nuestros datos, los estudios realizados en los mastocitos murinos habían demostrado que el incremento en la liberación de mediadores, inducido por una sobreexpresión de los Fc ϵ RI, era más marcado en la producción de citocinas que en la liberación de mediadores preformados (*Yamaguchi y cols., 1997*). Por ello, sugerimos que si las IgE podían inducir un aumento en la expresión de los receptores Fc ϵ RI en los mastocitos caninos, este incremento podría tener consecuencias más importantes en la liberación de mediadores de nueva síntesis como las citocinas.

Así, los **objetivos** fijados en este trabajo fueron;

- En primer lugar, analizar el efecto que puede ejercer la adición de IgE séricas al medio de cultivo de los mastocitos maduros aislados de la piel del perro sobre su capacidad secretora. Para ello analizamos la liberación de una citocina, el TNF- α , tras la estimulación inmunológica de las células.
- En segundo lugar, evaluar la expresión de los receptores Fc ϵ RI en la membrana de los mastocitos maduros aislados de la piel del perro, tras cultivarlos en presencia de una concentración elevada de IgE.

3.4.2. Material y Métodos

3.4.2.1. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid): colagenasa (tipo I), hialuronidasa (tipo I-S), proteasa (tipo XIV), albúmina bovina (fracción V), *soybean trypsin inhibitor* (STI), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), y cicloheximida. La penicilina-estreptomicina, el medio mínimo esencial modificado Dulbecco's Eagle's (DMEM), el medio RPMI, el suero bovino fetal (FCS), la glutamina, la histidina, la fungizona, la tripsina-EDTA y el sodio dodecil sulfato (SDS) fueron obtenidos de Gibco (Life technologies, Barcelona). El anticuerpo policlonal anti-IgE canina fue suministrado por Bethyl Laboratoires (Montgomery, TX, USA) y el anticuerpo monoclonal anti-IgE canina nos fue amablemente cedido por el Dr. Hammerberg (Universidad de North Carolina, NC, USA). El TNF- α recombinante murino fue obtenido de Genzyme (Cambridge, MA, USA). El SCF recombinante canino nos fue amablemente cedido por el Dr. Morstyn (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA).

3.4.2.2. Protocolo experimental

Aislamiento y cultivo de los mastocitos cutáneos

Las biopsias cutáneas fueron tomadas del área abdominal de ocho perros eutanasiados en el Centre d'Acollida d'Animals de Companyia del Ayuntamiento de Barcelona. El aislamiento de los mastocitos fue llevado a cabo mediante la técnica puesta a punto en nuestro laboratorio (de Mora, 1993), ya descrita en los experimentos 3.1. y 3.3. La suspensión de células cutáneas obtenidas tras la digestión enzimática fue filtrada, y después de lavar las células en MEM, éstas fueron cultivadas durante 5 días en medio completo (DMEM suplementado con glutamina 2mM, histidina 1,6 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 50 μ g/mL de gentamicina, 6 ng/mL de SCF) y en presencia de diferentes concentraciones de suero canino rico en IgE (concentraciones finales de 0 a 80 mg de IgE /mL de medio). El suero utilizado

3. Experimentos

en estos experimentos se obtuvo de 4 perros de raza Beagle sensibilizados espontáneamente a *Ascaris suum*. De forma paralela, se realizaron experimentos control en los que se utilizó el mismo suero canino inactivado por calor (56°C/4h) para desnaturalizar la fracción Fc de las IgE.

Activación de los mastocitos

Con el fin de evaluar si la adición de suero rico en IgE al medio de cultivo podía influenciar la producción de TNF- α en los mastocitos, se realizó un experimento preliminar, en el que las células fueron cultivadas durante 5 días en medio completo suplementado con diferentes concentraciones de suero canino rico en IgE (de 0 a 80 μ g IgE/ mL medio). Tras el periodo de cultivo, las células fueron lavadas en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y se determinaron tanto la viabilidad celular como el número de mastocitos. La sensibilización de los mastocitos se realizó mediante la incubación (2 h) de las células en DMEM en presencia de un 5% de suero rico en IgE. Tras la sensibilización, las células fueron lavadas de nuevo, y fueron resuspendidas en DMEM con STI (200 μ g/mL) en ausencia de FCS. Los mastocitos (2x10⁴ mastocitos /100 μ L) fueron activados mediante la adición de la anti-IgE (1 μ g/mL) tras la preincubación con SCF (50ng/mL) durante 15 min. Los sobrenadantes celulares se recogieron 5 horas después de la estimulación para determinar el contenido en TNF- α mediante un bioensayo de citotoxicidad. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Bioensayo para la determinación del TNF- α

La actividad y la concentración del TNF- α fueron determinadas en los sobrenadantes celulares mediante la técnica de bioensayo modificada a partir de la descrita por Gordon y Galli (1991), basada en la sensibilidad al TNF- α de la línea de fibroblastos murinos L929 . Brevemente, las células L929 (10⁶ cel /mL) fueron distribuidas en alícuotas de 50 μ L/pocillo y fueron incubadas durante una noche en RPMI suplementado con un 5% FCS, 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y un 1% de HEPES 1M. Tras la incubación, el medio fue aspirado y reemplazado por medio fresco al que se

3. Experimentos

añadieron 5 μ g/mL de cicloheximida y 100 μ g/mL de STI. Después, fueron añadidas las muestras (50 μ L/pocillo) y los estándares de TNF- α murino recombinante (de 2 a 2000 pg/mL).

Tras la incubación (18 h a 37°C) se añadieron 10 μ L de MTT (5mg/mL) por pocillo y tras 4h de incubación se añadió una solución de al 50% de N, N-dimetilformamida y 20% de SDS, a pH 7,4 para disolver los cristales de MTT. La placa fue incubada de nuevo durante una noche, y las densidades ópticas se determinaron mediante un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados finales fueron extrapolados a partir de la curva construida con los estándar de TNF- α recombinante murino.

Expresión de los receptores para las IgE

La detección de la expresión de los receptores específicos para las IgE en la membrana de las células cutáneas se realizó mediante citometría de flujo. Después del periodo de cultivo de 5 días en presencia de suero rico en IgE (concentración óptica de 8 μ g/mL) o suero inactivado por calor, la suspensión de células fue repartida en alícuotas de 5×10^5 células y sensibilizadas durante 1 hora a 4°C en un medio que contenía un 5% de suero rico en IgE. De forma paralela, y como control negativo, las células fueron incubadas con suero inactivado o bien en ausencia de suero canino. Tras dos lavados, las células fueron incubadas durante 30 min a 4°C con 100 μ L del anticuerpo primario (anti-IgE canina monoclonal) (10 μ g/mL PBS). Además, se realizaron duplicados que se incubaron con 100 μ L de un anticuerpo (IgG de ratón) de especificidad irrelevante (10 μ g/mL) y con el mismo isotipo que el anticuerpo primario. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizó un lavado en PBS, y las células fueron incubadas durante otros 30 min a 4°C en la oscuridad con 100 μ L del anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón conjugado a ficoeritrina (PE). Después de dos lavados, las células se fijaron en 200 μ L de PBS que contenía un 1% de formaldehído. Una vez fijadas, fueron analizadas mediante el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.4.2.3. Análisis estadístico de los datos

Los resultados se han expresado como la media aritmética \pm error estándar de 6-8 experimentos en el estudio de la liberación de TNF- α y de 4 experimentos en los estudios de citometría de flujo. Las comparaciones entre las diferentes medias se han llevado a cabo mediante el test de la t de Student con un nivel de significación de 0,05.

3.4.3. Resultados

3.4.3.1. Efecto de la concentración de suero canino sobre la producción de TNF- α en los mastocitos estimulados a través de las IgE

La Figura 1 muestra la producción de TNF- α de los mastocitos cultivados durante 5 días en presencia de diferentes concentraciones de IgE sérica (de 0 a 80 μ g IgE /mL medio). Las células fueron previamente sensibilizadas durante 2 horas en DMEM que contenía un 5% de suero rico en IgE. La estimulación se llevó a cabo mediante la incubación de las células durante 15 min con SCF (50 ng/mL) seguida de la anti-IgE (1 μ g/mL), los sobrenadantes celulares fueron recogidos tras 5 horas de estimulación. Como muestra la figura, se observó una correlación dosis-dependiente entre la concentración de IgE sérica añadida al medio de cultivo y la concentración de TNF- α liberada por los mastocitos cutáneos. La máxima liberación de TNF- α se alcanzó tras cultivar las células en presencia de una concentración de IgE sérica de 8 μ g/mL .

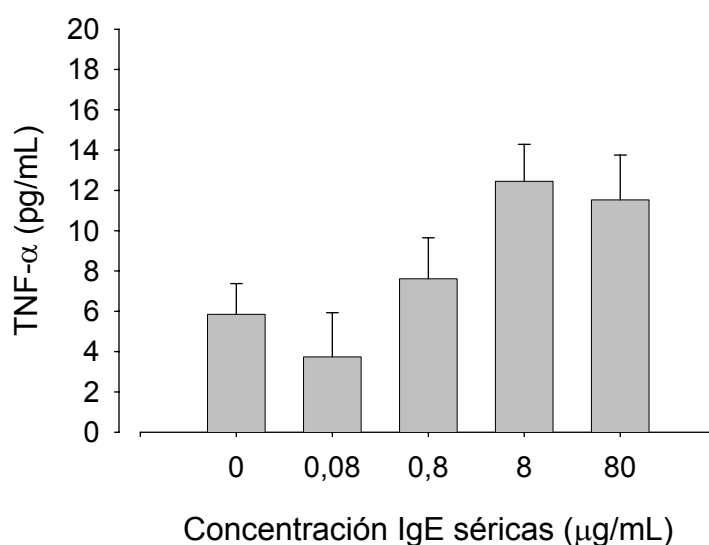


Figura 1. Efecto dosis-dependiente de la concentración de IgE sérica sobre la liberación de TNF- α en los mastocitos cutáneos sensibilizados y activados mediante anti-IgE.

3.4.3.2. Efecto de la concentración de IgE séricas sobre la producción de TNF α en mastocitos estimulados de forma inmunológica y no inmunológica.

Con el fin de determinar el efecto específico de las IgE (añadidas al medio de cultivo) sobre la producción de TNF- α realizamos un experimento en el que cultivamos las células bajo 2 condiciones diferentes: 1) en presencia de IgE séricas (8 $\mu\text{g/mL}$) o 2) en presencia de suero canino inactivado por calor. Tras el periodo de cultivo, las células fueron sensibilizadas (2h) y estimuladas a través de los receptores Fc ϵ RI (mediante anti-IgE) (Figura 2a). Tal y como muestra la Figura 2a, las células que habían estado cultivadas en presencia de IgE séricas liberaron una concentración de TNF- α significativamente superior a la liberada por las células cultivadas con el suero inactivado. Este incremento en la liberación de TNF- α no reflejaba, sin embargo, un aumento general de la función secretora de las células, ya que la liberación de TNF- α en ambas poblaciones celulares (cultivadas con IgE sérica normal o inactivada) no mostró diferencias significativas tras la activación celular no dependiente de los receptores Fc ϵ RI (mediante ionóforo de calcio A23187 y PMA) (Figura 2b). Por

ello, pensamos que la diferencia en la producción de TNF- α observada en las células activadas mediante anti-IgE podría reflejar un cambio en la expresión de los receptores Fc ϵ RI en la membrana de los mastocitos.

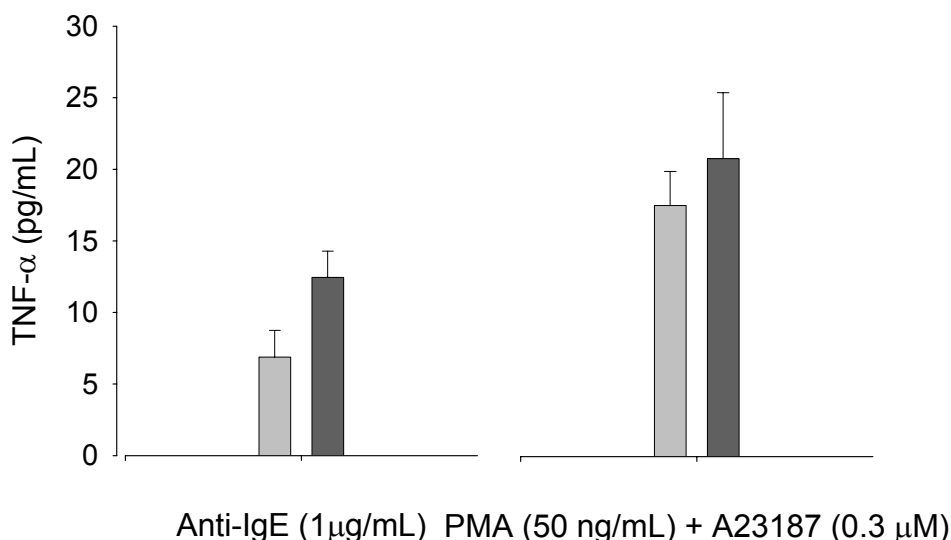


Figura 2. Liberación de TNF- α en las células cultivadas durante 5 días en presencia (barras negras) o en ausencia (barras grises) de IgE, activadas mediante anti-IgE (2 a) o mediante ionóforo de calcio A23187 y PMA (2 b).

3.4.3.3. Análisis de la expresión de los receptores Fc ϵ RI

Detección de las células que expresan los receptores Fc ϵ RI

Con el fin de detectar la población de células cutáneas capaces de unir las IgE, se realizó un análisis mediante citometría de flujo. Las células fueron incubadas durante 1 hora con un 5% de suero rico en IgE (Figura 3a) o bien con suero inactivado por calor (en el cual las IgE habían perdido la capacidad de unión al receptor) (Figura 3b). La Figura 3a muestra la intensidad de fluorescencia obtenida al analizar las células sensibilizadas. En este

3. Experimentos

histograma de fluorescencia se identifican las células cutáneas positivas para el receptor $Fc\epsilon RI$, que muy probablemente reflejan el número de mastocitos.

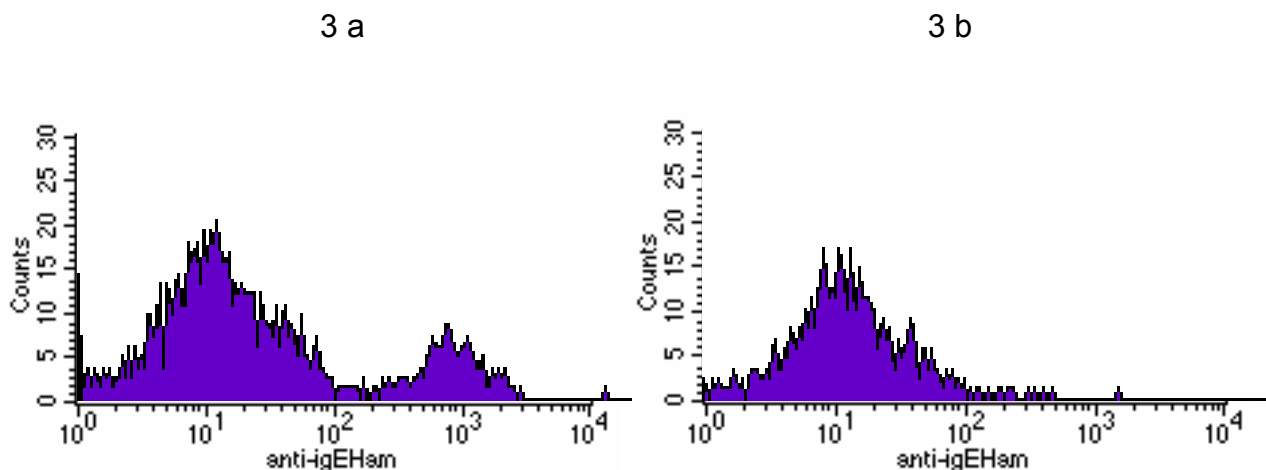


Figura 3. Histogramas de fluorescencia de citometría de flujo de las células sensibilizadas durante 1 hora con suero canino rico en IgE (3 a) y no sensibilizadas (3 b). Las células fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal anti-IgE canina y seguidamente con un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado al fluorocromo ficoeritrina.

Efecto de las IgE séricas sobre la expresión de los receptores $Fc\epsilon RI$ en los mastocitos.

Las células fueron cultivadas durante 5 días en presencia de suero rico en IgE (8 μ g IgE/mL medio) o suero inactivado (el mismo suero, previamente calentado a 56°C durante 4h para desnaturalizar el dominio de unión de las IgE). Tras el periodo de cultivo, las células fueron sensibilizadas durante 1 h a 4°C para permitir la saturación de los receptores $Fc\epsilon RI$ presentes en la membrana de los mastocitos. Para detectar la unión de las IgE a sus receptores se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-IgE canina. La Figura 4 muestra cómo el porcentaje de células positivas (células que mostraron fluorescencia para la expresión del receptor $Fc\epsilon RI$) fue aproximadamente el doble en las células cultivadas con suero rico en IgE, en comparación a las células cultivadas en ausencia de IgE (suero inactivado). En todos los experimentos se utilizaron anticuerpos irrelevantes como control negativo de

las anti-IgE con el fin de descartar la existencia de uniones inespecíficas de las anti-IgE a la superficie celular.

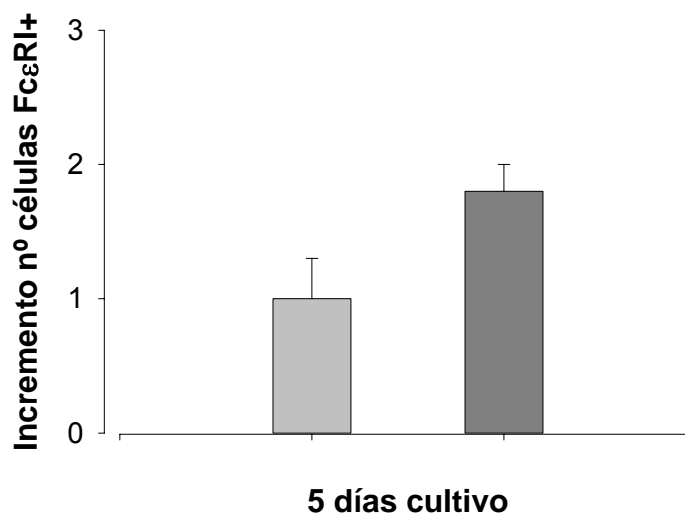


Figura 4. Incremento en el número de células marcadas de forma positiva para el receptor FcεRI tras ser cultivadas durante 5 días en presencia (barra negra) o en ausencia (barra gris) de IgE.

3.4.4. Discusión

En este trabajo hemos evaluado de qué forma puede influir una alta concentración de IgE séricas sobre dos aspectos de la biología de los mastocitos: la expresión de los receptores FcεRI en su membrana, y la producción de TNF-α tras una estimulación dependiente de los receptores FcεRI. Hemos mostrado que los mastocitos maduros cutáneos cultivados durante 5 días en un medio suplementado con IgE séricas, expresan una densidad mayor de receptores FcεRI y liberan concentraciones más altas de TNF-α tras su activación inmunológica, en comparación a las células cultivadas durante el mismo periodo en ausencia de IgE.

3. Experimentos

Existen evidencias que indican que las IgE regulan la expresión de los receptores Fc ϵ RI en la superficie de mastocitos y basófilos humanos (MacGlashan y cols., 1997) (Welker y cols., 1997) (Yano y cols., 1997) (Yamaguchi y cols., 1999) y murinos (Yamaguchi y cols., 1997) (Lantz y cols., 1997), tanto *in vivo* como *in vitro*.

Una de las consecuencias más importantes que se derivan de la sobreexpresión de los receptores Fc ϵ RI en la membrana de los mastocitos es el incremento en la capacidad de liberación de los mediadores tras activar los mastocitos mediante un estímulo inmunológico. Este efecto es más marcado en la síntesis de mediadores que en la liberación de mediadores preformados, tal y como lo apuntan diversos estudios (Conroy y cols., 1977) (Yamaguchi y cols., 1997).

Así, con el fin de analizar las consecuencias funcionales derivadas de cultivar los mastocitos en un ambiente rico en IgE, analizamos la liberación de TNF- α en estas células. En un primer experimento observamos que las células, que habían sido cultivadas durante 5 días en un medio suplementado con concentraciones altas de suero canino rico en IgE, liberaban concentraciones mayores de TNF- α . Tras la obtención de estos resultados, nuestro objetivo fue discriminar si realmente eran las IgE las responsables de este fenómeno, o si, por el contrario, el incremento en la liberación de TNF- α era debido a un aumento general de la capacidad secretora de las células.

Así, comparamos la liberación de TNF- α entre las células cultivadas en un medio rico en IgE y cultivadas en un medio sin IgE, tras activarlas de forma no inmunológica (ionóforo de calcio y PMA). Los resultados obtenidos demostraron que tanto las células cultivadas en presencia de IgE, como las células mantenidas sin IgE, respondían de forma similar a un estímulo no dependiente del receptor Fc ϵ RI. Sin embargo, la activación de ambas poblaciones celulares con anti-IgE mostró un aumento significativo en la producción de la citocina en las células cultivadas con IgE en comparación con las células cultivadas en ausencia de IgE. Estos datos sugerían, por tanto, que

el cultivo de las células en presencia de IgE podía presentar consecuencias sobre la expresión de los receptores FcεRI en los mastocitos cutáneos.

Con el fin de analizar el efecto del cultivo con IgE sobre la expresión de los receptores de alta afinidad para las IgE en la superficie de los mastocitos, las células fueron analizadas mediante una técnica de citometría de flujo. En primer lugar se identificó la población de células cutáneas capaces de unir IgE. En la piel de los pacientes atópicos existen otras poblaciones celulares (como las células de Langerhan's), además de los mastocitos, que son capaces de expresar receptores FcεRI en su membrana, y que por lo tanto pueden unir IgE. Sin embargo, nosotros trabajamos con biopsias de piel de perros sanos. Se ha demostrado que la piel de pacientes sanos contiene pocas células IgE+, y que se encuentran todas localizadas en la dermis (*Klupal y cols., 1997*). Además, los estudios de inmunocitoquímica han revelado que los mastocitos son las únicas células capaces de ser teñidas mediante un anticuerpo anti-IgE en la piel normal canina (*Olivry y cols., 1996*). Por todo ello, parece probable que las células IgE+ identificadas en este estudio, correspondan a los mastocitos, y que el receptor responsable de la unión de las IgE a su superficie sea el FcεRI.

La expresión de los receptores FcεRI fue examinada en las células mantenidas bajo diferentes condiciones (en presencia o en ausencia de IgE). A pesar de que el número de mastocitos, determinado mediante la tinción de azul de Kimura, no fue significativamente diferente entre las células mantenidas bajo ambas condiciones, el porcentaje de células FcεRI+ fue aproximadamente el doble en las células que habían sido cultivadas en presencia de IgE, comparado con las células cultivadas en ausencia de IgE, tras la saturación de los receptores.

Estos resultados parecen indicar que existe una correlación positiva entre la detección de un número mayor de células FcεRI+ y la liberación aumentada de TNF-α en los mastocitos cultivados en presencia de una concentración alta de IgE. Así pues, tal y como se ha demostrado en el hombre y en el ratón, las IgE podrían inducir un aumento en la densidad de los receptores FcεRI en la

3. Experimentos

superficie de los mastocitos caninos, que favorecería la sensibilización de las células con un mayor número de moléculas de IgE y que finalmente podría provocar el aumento en la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α .

Finalmente, estos resultados muestran nuevas similitudes entre la funcionalidad de los mastocitos humanos y caninos. Además, pueden ser útiles en el desarrollo de nuevas terapias para el control de los procesos alérgicos en el perro.

4. DISCUSIÓN

El mastocito está ampliamente involucrado en la patogenia de la dermatitis atópica. Los pacientes que sufren dermatitis atópica crónica, presentan un incremento en la densidad de los mastocitos cutáneos (*Nimmo Wilkiey cols., 1990*) (*Damsgaard y cols., 1997*) (*Huang y cols., 2000*), así como un aumento de mediadores liberados específicamente por los mastocitos (*Bradding y cols., 1994*) (*de Mora y cols., 1996*) (*Ackermann y Harvima, 1998*).

Los mastocitos inician las reacciones alérgicas a través de su unión a las IgE, sin embargo, existe todavía una importante controversia respecto al papel exacto que ejercen las IgE en la fase crónica de estas reacciones (*Leung, 1993*) (*Zweiman, 1993*) (*Groeben y cols., 1997*). A pesar de que en el hombre, el 80% de los pacientes que sufren dermatitis atópica presenta un nivel sérico de IgE elevado (*Leung, 1993*), todavía no está claro que este aumento indique realmente un papel patogénico de las IgE o simplemente sea la consecuencia de la estimulación de otras células inflamatorias (*Hanifin, 1990*). En el perro existen menos datos al respecto, sin embargo múltiples estudios demuestran que no existe una correlación directa entre el nivel de IgE séricas y la severidad de la enfermedad (*Hill y cols., 1995*) (*Jackson y cols., 1996*) (*Hammerberg y cols., 1997*).

La hipótesis de este trabajo se basa en estudios realizados en el ratón (*Yamaguchi y cols., 1997*) y en el hombre (*Yano y cols., 1997*) (*Welker y cols., 1997*) (*Yamaguchi y cols., 1999*), en los que se demuestra que las IgE tienen un papel regulador de la expresión de los receptores Fc ϵ RI en la membrana de los mastocitos. Mediante la sobreexpresión de los Fc ϵ RI, inducida por las IgE, los mastocitos activados a través de los receptores Fc ϵ RI, son capaces de liberar concentraciones elevadas de mediadores inflamatorios y contribuir así al desarrollo de los procesos alérgicos.

El objetivo final de este estudio era evaluar de qué forma influyen las modificaciones en el nivel de IgE del microambiente del mastocito canino sobre su actividad secretora. El conocimiento de la influencia que ejercen las IgE

sobre la patogenia de la dermatitis atópica canina podría contribuir al desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos en esta especie.

Los resultados obtenidos en este estudio se discuten en 6 apartados:

- Puesta a punto de las técnicas *in vitro* de sensibilización pasiva, estimulación inmunológica y detección de mediadores preformados y de nueva síntesis por parte de los mastocitos caninos aislados de la piel, estimulados a través del receptor Fc ϵ RI (Apartados 4.1-4.2)
- Comparación de la capacidad de liberación de histamina de mastocitos procedentes de perros alérgicos (expuestos a altas concentraciones de IgE) frente a perros sanos (Apartado 4.3).
- Utilización de la línea de mastocitos caninos neoplásicos (C₂), como fuente celular alternativa a los mastocitos cutáneos aislados para medir la producción de citocinas (Apartado 4.4). Puesta a punto de nuevos métodos para mantener viables los mastocitos maduros en cultivo durante un período de tiempo mayor (Apartado 4.5).
- Capacidad secretora y expresión de los receptores Fc ϵ RI en mastocitos cutáneos maduros cultivados en presencia de altas concentraciones de IgE (Apartado 4.6).

4.1. Sensibilización pasiva y estimulación de los mastocitos cutáneos caninos

Los mastocitos presentan, como hemos visto, receptores de alta afinidad para las IgE independientemente de su localización, lo cual los hace susceptibles de ser sensibilizados (*Church y Levi-Schaffer, 1997*). El proceso de sensibilización pasiva de los mastocitos implica la unión de las IgE a la superficie de la célula, preparándola así para ser activada por un antígeno que producirá un entrecruzamiento de los Fc ϵ RI del mastocito, tal y como ocurre en el organismo (*Coleman, 1990*).

La sensibilización pasiva de los mastocitos pulmonares mediante la incubación de los anillos bronquiales con suero de pacientes alérgicos, constituye un modelo *in vitro* muy utilizado en el estudio del asma en el hombre (*Ben-Jebria y cols., 1993*) (*Tuñon de Lara y cols., 1995*). Se ha observado que existe una correlación positiva entre la concentración de IgE presente en el suero utilizado para sensibilizar los bronquios y la broncoconstricción observada tras la activación mediante el antígeno (*Rabe y cols., 1993*) (*Tuñon de Lara y cols., 1995*).

En la piel también se han utilizado modelos para imitar los procesos alérgicos. Las técnicas más frecuentemente usadas para sensibilizar los mastocitos cutáneos consisten en la incubación de biopsias de piel en un medio rico en IgE.

En este estudio, hemos llevado a cabo la sensibilización pasiva de los mastocitos dérmicos una vez aislados del tejido y tras mantenerlos en cultivo durante una noche. Los datos obtenidos indican que la sensibilización de los mastocitos con un suero rico en IgE, previamente a la estimulación inmunológica de estas células, es imprescindible para activar la desgranulación de los mastocitos (*García y cols., 1998*) (*Brazís y cols., 1998*). Ello sugiere que tras el proceso de dispersión y digestión enzimática de las células, éstas presentan la mayoría de sus receptores desocupados. La falta de IgE unidas a

los mastocitos recién aislados podría deberse al agresivo proceso enzimático mediante el cual se dispersan las células.

Debido a la alta afinidad que presenta el FcεRI por las IgE ($K_a=10^{-10}/M$), la sensibilización de los mastocitos tras ser incubados en un medio rico en IgE es un proceso rápido (*Coleman, 1988*). Sin embargo, con el fin de optimizar la técnica de sensibilización, realizamos diferentes experimentos en paralelo en los que los mastocitos fueron incubados en presencia de IgE durante 2 horas y durante una noche. Los resultados obtenidos no revelaron diferencias en la liberación de histamina por parte de ambas poblaciones tras estimularlas mediante estímulos inmunológicos, lo cual confirmaba la validez de ambas técnicas de sensibilización.

La duda que se nos planteó tras la sensibilización pasiva de los mastocitos cutáneos mediante su incubación con suero canino era la posible falta de especificidad del proceso. El suero canino presenta, además de las IgE, otros anticuerpos (IgG) capaces de unirse a los mastocitos mediante receptores diferentes (*Reedy y cols., 1997*) y de provocar su activación (*Mekori y Metcalfe, 1999*). En nuestro estudio llevamos a cabo un control previo para comprobar que únicamente el FcεRI era el receptor implicado en la activación mastocitaria tras su sensibilización. Para ello nos servimos de la naturaleza termolábil de las IgE (*Ishizaka y Ishizaka, 1970*), que pierden su capacidad de unión al FcεRI tras ser sometidas a 56°C durante 4 horas. La sensibilización de los mastocitos cutáneos con suero inactivado (en el cual las IgE, y no las IgG, habían sido desnaturalizadas por calor) bloqueó completamente su desgranulación cuando se activaron las células mediante un antígeno o un anticuerpo anti-IgE.

De estos primeros resultados pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- Los mastocitos caninos aislados de la piel conservan, tras el proceso de aislamiento enzimático, los receptores FcεRI y pueden ser, por tanto, sensibilizados *in vitro* y estimulados a través del FcεRI.

- La sensibilización pasiva, previa a la estimulación inmunológica de los mastocitos maduros aislados de la piel, es indispensable para que la activación celular tenga lugar.

4.2. Mediadores liberados por los mastocitos caninos aislados de la piel: la histamina y el TNF- α

Una vez optimizada la técnica de sensibilización pasiva de los mastocitos cutáneos caninos, estudiamos la capacidad secretora de estas células, estimuladas a través del receptor Fc ϵ RI. Como ya hemos visto, tras el entrecruzamiento de los receptores Fc ϵ RI se liberan los mediadores inflamatorios en dos fases separadas en el tiempo; así en algunos minutos después de la activación de los mastocitos, se secretan los mediadores (histamina, heparina, proteasas, eicosanoides) responsables de la llamada fase temprana de la respuesta alérgica (*Holgate, 1996*) (*Metcalfe y cols., 1997*) (*White, 1999*). Unas horas después de la desgranulación (3h-48h), son sintetizados y liberados los mediadores (citocinas, quimiocinas...) que determinan, en parte, la instauración de la fase tardía de la respuesta alérgica (*Zweiman y cols., 1998*) (*Nagai y cols., 2000*).

En este estudio se han utilizado principalmente dos mediadores como marcadores de la activación de los mastocitos: la histamina y el TNF- α , que a su vez caracterizan respectivamente el inicio de la fase inmediata y tardía de la reacción alérgica.

4.2.1. La histamina

La **histamina** presenta la característica de ser un mediador exclusivo de los mastocitos y de los basófilos (*Church y cols., 1982*) (*White, 1990*), lo cual era especialmente importante en nuestro modelo pues trabajamos con todas las células dérmicas, y no con una población de mastocitos purificada.

El contenido y la liberación de histamina tras la activación de los mastocitos cutáneos aislados de la piel del perro a través de estímulos no inmunológicos, fue caracterizado previamente por de Mora y colaboradores en 1993. Los mastocitos caninos aislados contienen entre 4-5 pg de histamina por célula y liberan, tras ser estimulados mediante ionóforo de calcio, entre el 20-30% de su contenido total de histamina. Estos resultados se aproximan a los obtenidos en los mastocitos cutáneos humanos (*Benyon y cols., 1986*) (*Church, 1997*).

En este trabajo se llevó a cabo la estimulación inmunológica (dependiente del FcεRI) de los mastocitos mediante dos tipos de estímulos: el antígeno purificado del parásito *Ascaris suum* y el anticuerpo anti-IgE. Con el fin de sensibilizar los mastocitos previamente a la estimulación, las células se incubaron en presencia de suero rico en IgE obtenido de perros de raza Beagle sensibilizados espontáneamente a *Ascaris suum*. En estudios preliminares se obtuvieron las curvas dosis-respuesta de la concentración de histamina liberada por los mastocitos en función de la concentración de estímulo utilizada (Figura 1 y 2/ Experimento 3.1).

La liberación máxima de histamina, como hemos comprobado en nuestro estudio, es diferente en función del estímulo utilizado: el antígeno produce generalmente una liberación de histamina menor ($\cong 12\%$) que el anticuerpo anti-IgE ($\cong 30\%$). Este hecho podría ser debido a que el primer estímulo se une únicamente a las IgE antígeno-específicas, mientras que los anticuerpos anti-IgE lo hacen a la totalidad de IgE unidas al mastocito.

Estudios llevados a cabo en el ratón y en el hombre revelan que la función de los mastocitos maduros puede ser también regulada por mecanismos dependientes del receptor del SCF (SCFR) (*Columbo y cols., 1992*) (*Kawasaki y cols., 1995*) (*Sperr y cols., 1996*) (*Bischoff y cols., 1996*). El ligando del SCFR, el SCF, puede actuar estimulando o bien potenciando la liberación de histamina inducida por estímulos dependientes de las IgE. En nuestro estudio evaluamos la liberación de histamina tras estimular los mastocitos con SCF recombinante canino.

Contrariamente a los resultados obtenidos por otros grupos (*Columbo y cols., 1992*), no observamos liberación de histamina tras estimular los mastocitos aislados de la piel con SCF recombinante canino (10, 50, 100 ng/mL) durante 30 min. Existen estudios que han demostrado que para activar los mastocitos únicamente a través del SCFR, es necesario un periodo más largo de incubación con el SCF (> 45 min) (*Sperr y cols., 1996*), ello podría ser la causa de la falta de activación observada en nuestro trabajo.

Por otra parte, nuestros estudios han demostrado que, de forma similar a lo observado en el ratón y en el hombre, la co-estimulación de los mastocitos maduros caninos mediante SCF y anti-IgE potencia de forma importante la liberación de histamina en estas células. Los mecanismos bioquímicos responsables de esta sinergia en la estimulación del mastocito se conocen parcialmente, e indican que la activación de ambos receptores (SCFR y FcεRI) provoca rutas de transducción intracelulares similares. Sin embargo, las respuestas biológicas de los mastocitos tras ser activados a través del FcεRI (supresión de la proliferación celular) o del SCFR (inducción de la proliferación celular) son muy diferentes (*Galli y cols., 1994*).

4.2.2. El factor de necrosis tumoral (TNF-α)

El TNF-α, a pesar de no ser una citocina exclusiva de los mastocitos, es un mediador proinflamatorio ampliamente asociado a las reacciones alérgicas (*Walsh y cols., 1991*) (*Galli, 1993*). Diversos estudios han demostrado que los mastocitos de pacientes alérgicos presentan un aumento en la expresión del TNF-α (*Bradding y cols., 1994*) (*Ackermann y Harvima, 1998*). Los estudios de Yamada y colaboradores han demostrado también un aumento en la expresión de RNAm para el TNF-α en biopsias cutáneas de pacientes atópicos 2 horas después de la inyección intradérmica del alérgeno (*Yamada, 1995*). Además, la capacidad del TNF-α para inducir la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1), necesarias para la migración de las células inflamatorias desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos (*Walsh y cols., 1991*) (*Ackermann y Harvima, 1998*) (*Laan y cols., 1998*), le confiere una especial

importancia en la patogenia de las reacciones alérgicas. Finalmente, el mastocito presenta una parte de TNF- α preformada en sus gránulos, que se libera en forma activa tras su desgranulación (*Gordon y Galli, 1990*) (*Costa y cols., 1997*), y permite a esta citocina actuar de forma inmediata. Por todo ello, el TNF- α fue escogido en este trabajo como un marcador adecuado de la capacidad de síntesis de mediadores por parte del mastocito.

Dada la falta de reactivos y tests comerciales para medir el TNF- α canino, y con la finalidad de detectar tanto la concentración de TNF- α que liberan los mastocitos cutáneos, como la cinética de esta liberación, se puso a punto una técnica de bioensayo. Esta técnica, modificada a partir de la técnica descrita por Gordon y colaboradores (1991) y basada en la citotoxicidad que presenta una línea de fibroblastos murinos (L929) frente al TNF- α , permite no tan sólo detectar la concentración de TNF- α presente en el sobrenadante celular, sino también verificar su actividad biológica (*Eskandari y cols., 1990*).

Los mastocitos cutáneos contienen cantidades de **TNF- α preformado** en su citoplasma (*Klein y cols., 1989*) (*Walsh y cols., 1991*). En nuestro estudio tratamos de medir la cantidad exacta de TNF- α presente en los gránulos citoplasmáticos del mastocito cutáneo no estimulado, sin embargo esta parte del TNF- α fue indetectable (< 2 pg/mL) mediante la técnica de bioensayo utilizada. De forma similar, en los estudios de Thomas y colaboradores (1996) llevados a cabo en mastocitos caninos neoplásicos, no se consiguió medir la concentración de la citocina liberada tras la desgranulación, a pesar de detectarla mediante una técnica de inmunocitoquímica (*Thomas y cols., 1996*).

No obstante, pudimos evaluar la cantidad de **TNF- α de nueva síntesis** que es liberado por el mastocito tras su activación. Para ello estimulamos las células mediante estímulos inmunológicos y no inmunológicos:

Liberación del TNF- α tras la activación de los mastocitos mediante ionóforo y PMA

El ionóforo de calcio y el PMA son dos secretagogos que actúan de forma sinérgica en la producción del TNF- α (Plaut y cols., 1989). La acción del PMA sobre la PKC incrementa la activación de algunos factores de transcripción (AP-1, NF-AT) necesarios para la síntesis del RNAm que dará lugar al TNF- α (Nechushtan y Razin, 1998). El ionóforo de calcio ejerce su función aumentando la concentración de calcio intracelular, que mediante la vía de la calmodulina/ calcineurina actúa también sobre el factor de transcripción NF-AT (Reischl y cols., 1999) (Binham y Austen, 2000).

La concentración media de TNF- α en el sobrenadante detectada tras estimular los mastocitos caninos con ionóforo de calcio y PMA fue de 95,96 pg/ 10^5 mastocitos. Este resultado es marcadamente mayor que el reportado por otros grupos como el de Okayama y colaboradores (1998), quienes observaron que los mastocitos cutáneos humanos liberaban una media de 12,27 pg TNF- α / 10^5 mastocitos tras activarlos con otros estímulos no inmunológicos como la sustancia P. La explicación a esta diferencia podría hallarse en el hecho de que, a diferencia del estudio de Okayama realizado en mastocitos purificados recién aislados, en nuestro estudio los mastocitos fueron estimulados junto con el resto de células cutáneas, y tras haberlos cultivado durante 5 días después de su aislamiento, lo cual podría aumentar significativamente la producción de la citocina.

Liberación del TNF- α tras la activación de los mastocitos mediante anti-IgE

El entrecruzamiento de dos o más receptores Fc ϵ RI adyacentes desencadena, como hemos visto, una serie de reacciones intracelulares que tienen como consecuencia la activación de factores de transcripción en el núcleo del mastocito, necesarios para la síntesis del TNF- α . Sin embargo, en nuestro modelo, la activación de los mastocitos cutáneos mediante anti-IgE (1 μ g/mL) provocó la producción de cantidades mínimas de esta citocina (8,90 pg/ 10^5

mastocitos). Coherentes con nuestros resultados, los datos aportados por Bissonnete y colaboradores (1997) y Okayama y colaboradores (1998) revelaban concentraciones similares de TNF- α (8,63 pg y de aproximadamente 9 pg por 10^5 mastocitos respectivamente) en mastocitos cutáneos humanos activados mediante anti-IgE.

Con el fin de potenciar la producción de TNF- α por parte de los mastocitos, activamos las células mediante los receptores Fc ϵ RI y SCFR simultáneamente. Uno de los primeros estudios llevados a cabo en mastocitos peritoneales de rata había demostrado que la incubación con SCF, previa a la estimulación de los mastocitos a través del receptor Fc ϵ RI, no tenía ningún efecto en la producción de TNF- α (*Lin y cols., 1996*). Posteriormente, el efecto potenciador del SCF utilizado como co-estímulo junto con la anti-IgE reveló un importante incremento de la síntesis del TNF- α en mastocitos murinos (*Ishuzuka y cols., 1998*) (*Gagari, 1997*). La activación de los tres miembros de la familia de las MAP cinasas producido tanto a través de la activación del SCFR, como tras el entrecruzamiento de los receptores Fc ϵ RI, parece ser la responsable de esta sinergia en la producción de TNF- α por parte de los mastocitos murinos (*Ishuzuka y cols., 1998*).

En nuestro estudio, la utilización del SCF como co-estímulo junto con la anti-IgE, aumentó significativamente la producción de TNF- α , llegando a detectarse una media de 38,0 pg/ 10^5 mastocitos.

La concentración máxima de TNF- α liberada por los mastocitos caninos aislados de la piel estimulados tanto mediante estímulos inmunológicos como no inmunológicos, se obtuvo tras las 4-6 horas después de su activación. A pesar de que estimulamos las células en presencia de un inhibidor de la actividad de las proteasas (*soybean trypsin inhibitor*), observamos que existía una degradación progresiva de esta citocina y que a partir de las 6 horas tras la estimulación de los mastocitos, la concentración de TNF- α medido en los sobrenadantes celulares disminuía significativamente (Figura 4 y 5/ Experimento 3.3).

La cinética de la liberación del TNF- α resultó similar utilizando estímulos inmunológicos y no inmunológicos, sin embargo observamos que la concentración de TNF- α liberada era mucho menor cuando se utilizaba una vía dependiente de las IgE para activar las células en comparación a la activación no inmunológica. La explicación a esta diferencia observada, podría basarse en el hecho de que el TNF- α , contrariamente a la histamina, no es un mediador exclusivo de los mastocitos. Por ello, los estímulos no inmunológicos como el ionóforo de calcio y el PMA podrían activar la síntesis de TNF- α no sólo en los mastocitos, sino también en otras poblaciones celulares presentes en el conjunto de células cutáneas (macrófagos, linfocitos T, células de Langerhans o queratinocitos) cuya capacidad para sintetizar TNF- α ha sido demostrada (Celada, 1994).

Estudio inmunocitoquímico del TNF- α

Como ya hemos comentado anteriormente, en la piel canina existen otras células, además de los mastocitos, capaces de sintetizar TNF- α . Sin embargo, en la piel normal humana, los mastocitos son las únicas células que presentan esta citocina preformada en su citoplasma (Walshy cols., 1991).

Con el fin de identificar la fuente celular del TNF- α detectado en los sobrenadantes de las células estimuladas, llevamos a cabo un estudio inmunocitoquímico del conjunto de células aisladas de la piel. Mediante una doble tinción utilizando un anticuerpo policlonal anti-TNF- α humano (previamente demostrada su reacción cruzada con el TNF- α canino) (Frangogiannis y cols., 1998) y el colorante de azul alcian (tinción específica para los mastocitos), se detectaron los mastocitos productores de TNF- α . De la población celular obtenida tras la digestión de la piel, se observó que prácticamente todos los mastocitos son capaces de sintetizar el TNF- α tras ser estimulados, tal y como indicaba la doble tinción positiva de estas células. Además, se observaron otras células cutáneas marcadas positivamente para el TNF- α . Debemos interpretar, por tanto, con cautela nuestros resultados dado que parte del TNF- α determinado en los sobrenadantes celulares mediante la

técnica de bioensayo podría provenir de alguna otra población celular distinta al mastocito.

De los resultados expuestos en este apartado derivan las siguientes conclusiones:

- Los mastocitos caninos aislados de la piel liberan histamina y producen una concentración máxima de TNF- α a las 4-6 horas tras ser estimulados a través de los receptores Fc ϵ RI.
- El SCF utilizado como un estímulo no provoca la liberación de histamina ni de TNF- α en los mastocitos caninos aislados de la piel.
- La co-estimulación de los mastocitos mediante SCF y anti-IgE potencia de forma significativa la liberación de histamina y de TNF- α .

4.3. Liberación de histamina a partir de mastocitos aislados de la piel de perros alérgicos y de perros sanos.

Con el fin de evaluar la influencia que puede ejercer una concentración elevada de IgE sobre la capacidad secretora de los mastocitos activados a través del receptor Fc ϵ RI, se comparó la liberación de histamina procedente de mastocitos aislados de la piel de perros alérgicos (atópicos y sensibles a *Ascaris suum*), expuestos a concentraciones elevadas de IgE, y la de perros sanos. Los mastocitos fueron obtenidos a partir de biopsias de piel e incubados durante una noche para permitir su recuperación tras la digestión enzimática. Tras este periodo de incubación, fueron sensibilizados y estimulados mediante antígeno de *Ascaris suum* (Asc S 1) o anticuerpos anti-IgE.

A pesar de que los mastocitos de perros alérgicos estaban sobreexpuestos a las IgE *in vivo*, no se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de histamina liberado por los mastocitos aislados de perros alérgicos y de perros sanos, tras estimularlos a través del receptor Fc ϵ RI. Este resultado difiere de los obtenidos por Jackson y colaboradores en 1996, que

demostraban que los basófilos obtenidos de perros alérgicos liberan una cantidad de histamina significativamente mayor que los basófilos de perros sanos, a pesar de no observarse ninguna correlación entre la capacidad de liberación de histamina y la concentración de IgE séricas de los animales estudiados (*Jackson y cols., 1996*).

En nuestro estudio, tras la obtención de estos resultados, sugerimos varias explicaciones:

a) El hecho de mantener las células procedentes de ambas poblaciones de perros (alérgicos y no alérgicos) durante una noche en ausencia de IgE podría haber provocado una disminución en el número de receptores Fc ϵ RI, que enmascararía las posibles diferencias en la densidad de Fc ϵ RI existentes entre ambas poblaciones celulares. Sobre este fenómeno, existen estudios llevados a cabo en basófilos humanos y en la línea RBL-1 de basófilos de rata que demuestran que la eliminación por degradación de los receptores Fc ϵ RI de la superficie de los basófilos se acelera cuando las células se encuentran incubadas a una densidad baja y en un medio sin IgE (*Furuichi y cols., 1985*) (*MacGlashan y cols., 1998*).

b) Además, consideramos la posibilidad de que los mastocitos necesitaran una densidad mínima de receptores Fc ϵ RI activados para alcanzar su desgranulación. En ese caso, un incremento en el número de receptores Fc ϵ RI no tendría como consecuencia un aumento en la liberación de histamina. A pesar de que los mastocitos humanos requieren el entrecruzamiento de un número muy bajo de receptores de IgE para alcanzar la desgranulación (*MacGlashan y cols., 1997*) (*Reischl y cols., 1999*), diversos estudios demuestran que la sobreexpresión de los receptores Fc ϵ RI en estas células conlleva un aumento en la liberación de histamina (*Yamaguchi y cols., 1999*), lo cual pondría en duda esta hipótesis.

c) Por otra parte, existen estudios que sostienen que la capacidad de liberación de histamina de los basófilos y los mastocitos tras su estimulación

inmunológica, no depende exclusivamente del número de IgE unidas a los receptores FcεRI, sino también de factores intrínsecos al individuo (*Conroy y cols., 1977*) (*Yamaguchi y cols., 1996*). Esta propiedad celular inherente al individuo, conocida como “*releasability*” (capacidad de liberación) podría justificar la falta de diferencias en la liberación de histamina observada entre los mastocitos de ambas poblaciones.

d) Por último, de acuerdo con los resultados obtenidos por otros investigadores en mastocitos humanos (*Schroeder y cols., 1997*) y murinos (*Yamaguchi y cols., 1997*), las consecuencias funcionales de una sobreexpresión de los receptores FcεRI son generalmente más marcadas en la producción de mediadores de nueva síntesis como las citocinas, en comparación a la liberación de mediadores preformados. Así, los estudios llevados a cabo en mastocitos murinos expuestos a una concentración elevada de IgE durante 4 días, revelaban un incremento en la liberación de serotonina (mediador preformado) de aproximadamente 1,6 veces sobre la liberación del mismo mediador en los mastocitos cultivados sin IgE. Sin embargo, cuando se analizó el aumento en la producción de mediadores de nueva síntesis como la IL-6, el incremento observado en la concentración de la citocina fue de hasta 6 veces (*Yamaguchi y cols., 1997*).

De los datos obtenidos mediante este estudio comparativo podemos concluir que:

- Los mastocitos cutáneos procedentes de la piel de perros alérgicos (atópicos y sensibles a *Ascaris suum*) y de perros sanos liberan cantidades similares de histamina tras su estimulación a través del receptor FcεRI.

Finalmente, para confirmar si las IgE ejercen alguna influencia en la capacidad secretora del mastocito cutáneo canino, consideramos necesario realizar nuevos experimentos en los que se midiera la producción de mediadores de nueva síntesis, cuya producción parece más sensible a los cambios en la

densidad de los receptores Fc ϵ RI. Para ello decidimos orientar los siguientes experimentos hacia el análisis del TNF- α . Dado que el TNF- α no es una citocina exclusiva de los mastocitos, estimamos importante realizar este estudio en una población pura de mastocitos caninos susceptibles de ser activados mediante estímulos inmunológicos; para ello escogimos la línea C₂ de mastocitos caninos neoplásicos.

4.4. Caracterización funcional de la línea celular C₂ mantenida en cultivo

La línea C₂ de mastocitos caninos fue originada en 1986 por Lazarus y colaboradores a partir de un mastocitoma canino. Tras sucesivos pases de esta neoplasia en ratones atímicos, se obtuvo una línea celular cuyas características principales eran su contenido en histamina y la expresión de receptores funcionales para las IgE (Lazarus y cols., 1986). Los estudios de DeVinney y colaboradores (1990) demostraron posteriormente que esta línea celular puede mantenerse *in vitro* durante pases consecutivos, y es por tanto una fuente interesante de mastocitos.

Nuestro objetivo fue, en primer lugar, caracterizar la actividad secretora de la línea celular C₂ mantenida en cultivo tras ser estimulada a través del receptor Fc ϵ RI, con la finalidad de estudiar la liberación de los mediadores inflamatorios de estas células, cultivadas en presencia o en ausencia de IgE. Para ello medimos la liberación de un mediador preformado como es la β -hexosaminidasa y un mediador de nueva síntesis como es el TNF- α tras activar las células mediante antígeno y anticuerpos anti-IgE.

Los resultados indicaron que, a pesar de que las células C₂ son capaces de liberar β -hexosaminidasa (23,95 \pm 1,96%) y TNF- α (34,34 \pm 2,34 pg/10⁶ células) mediante estímulos no inmunológicos como el ionóforo de calcio y el PMA, son incapaces de responder frente a estímulos inmunológicos, tras incubarlos durante 7 días en presencia de suero canino rico en IgE. Estos resultados difieren de los obtenidos por DeVinney y colaboradores, que reportaron que las células C₂ cultivadas de forma permanente con suero rico en IgE procedente

de perros alérgicos, liberaban histamina tras la estimulación mediante antígeno (*DeVinney y Gold, 1990*). Tras los resultados obtenidos en nuestro estudio, sugerimos que el hecho de mantener las células en cultivo sin la presencia constante de una concentración alta de IgE, podría haber provocado la degradación de los receptores Fc ϵ RI en la membrana de estas células, tal y como otros autores han descrito (*Furuichiy cols., 1985*). Sin embargo, para contrastar esta hipótesis realizamos un análisis de las células C₂ mediante citometría de flujo.

Debido a que actualmente no existen anticuerpos comerciales capaces de reconocer la cadena α del receptor Fc ϵ RI canino, decidimos utilizar el anticuerpo monoclonal 15-1 que reconoce la subunidad α del receptor Fc ϵ RI humano. Este anticuerpo, sin embargo, no mostró reacción cruzada con el receptor canino. Por ello, finalmente, utilizamos un método indirecto para marcar el receptor, basado en la sensibilización de las células con IgE monoclonal canina o suero canino rico en IgE y la tinción mediante un anticuerpo monoclonal anti-IgE canino. La fluorescencia obtenida mediante esta tinción claramente demostró que las células C₂ son capaces de unir IgE a su membrana, mediante el receptor Fc ϵ RI.

La evidencia de la expresión de receptores específicos para las IgE en la membrana de las células C₂, unida a la falta de secreción de los mediadores estudiados (β -hexosaminidasa y TNF- α) tras la estimulación de las células mediante anti-IgE o antígeno, sugería una incorrecta función de los receptores Fc ϵ RI. De forma similar, en la línea de mastocitos humanos RBL se ha descrito un fallo en la transducción de las señales bioquímicas que se suceden tras el entrecruzamiento de sus receptores Fc ϵ RI; en esta línea celular se ha observado una deficiencia en la producción del inositol fosfato, que se traduce en una falta de movilización del calcio intracelular (*Field y cols., 2000*). A pesar de que todavía no han sido estudiados los mecanismos específicos que provocan la falta de activación de las células C₂ activadas a través del receptor Fc ϵ RI, sugerimos que la subunidad α de los receptores Fc ϵ RI en esta línea celular funciona correctamente, ya que permite la unión de las IgE.

En nuestro estudio, a pesar de mantener las células C₂ en presencia de IgE durante 7 días, no conseguimos estimularlas a través de sus receptores FcεRI, detectados mediante citometría de flujo. Sin embargo, existen estudios en el hombre que demuestran que es posible aumentar e incluso inducir la expresión de estos receptores en mastocitos y basófilos procedentes de líneas celulares neoplásicas (HMC-1 y KU812 respectivamente) (*Welker y cols., 1997*) (*Welker y cols., 1997*). Así, el cultivo de los mastocitos de la línea HMC-1 durante 10 días en presencia de sobrenadante de fibroblastos aumentaba de forma significativa la expresión de los receptores FcεRI en estas células (*Welker y cols., 1997*). Por otra parte, la adición de IgE policlonal humana al medio de cultivo de estas células, también inducía la sobreexpresión de los receptores FcεRI. Estos resultados, sin embargo, difieren de los obtenidos por otros grupos, en los que se afirma que las células de la línea de mastocitos humanos HMC-1 no presentan receptores específicos para las IgE en su membrana (*Butterfield y cols., 1988*) (*Yano y cols., 1997*).

Finalmente, a pesar de la falta de estimulación inmunológica de las células C₂, creemos que sería interesante profundizar en el estudio de los mecanismos bioquímicos intracelulares responsables de este fenómeno.

De la caracterización funcional de los mastocitos de la línea C₂ se derivan las siguientes conclusiones:

- Los mastocitos caninos de la línea C₂ contienen β-hexosaminidasa y TNF-α pero son incapaces de liberarlos mediante una estimulación inmunológica.
- Las células C₂ expresan receptores FcεRI en su membrana que son capaces de unir las IgE, pero que no son funcionales.

Una vez observado que la línea de mastocitos neoplásicos C₂ no era válida para valorar la influencia de las IgE sobre la capacidad secretora de los mastocitos caninos, nos propusimos mantener en cultivo los mastocitos maduros aislados de la piel, con el fin de poderlos conservar viables durante

unos días expuestos a concentraciones altas de IgE, y poder evaluar así las consecuencias funcionales de esta exposición.

4.5. Cultivo y mantenimiento de los mastocitos cutáneos *in vitro*.

El mantenimiento en cultivo de los mastocitos durante un periodo de tiempo prolongado es indispensable para evaluar aspectos como la respuesta de estas células frente a cambios en su microambiente (*Levi-Schaffer y cols., 1995*). Existen diversos grupos que han desarrollado técnicas *in vitro* que permiten mantener los mastocitos en cultivo:

- Furitsu y colaboradores (1989) consiguieron por primera vez obtener mastocitos humanos a partir del co-cultivo de células indiferenciadas del cordón umbilical junto con fibroblastos cutáneos de ratón. Tras 14 semanas en cultivo, las células obtenidas presentaban gránulos citoplasmáticos, que contenían histamina y expresaban receptores de alta afinidad para las IgE.
- Posteriormente otros grupos llevaron a cabo la diferenciación de mastocitos mediante el cultivo de células indiferenciadas en un medio enriquecido con SCF (*Mitsui y cols., 1993*). Así, se observó que el principal efecto del SCF consistía en mantener viables, de forma selectiva, los mastocitos inmaduros.

Estos estudios demostraron que, mediante el co-cultivo de las células del cordón umbilical junto con fibroblastos, se obtenían mastocitos de características similares a los mastocitos cutáneos maduros, sin embargo, las mismas células cultivadas únicamente con SCF se transformaban en mastocitos similares a los pulmonares o intestinales, que permanecían inmaduros incluso tras 14 semanas de cultivo (*Mitsui y cols., 1993*). Además, el análisis con el microscopio electrónico realizado en células humanas del cordón umbilical cultivadas en presencia de SCF e IL-6 revela que los mastocitos que se desarrollan en cultivo nunca llegan a ser completamente maduros (*Matsushima y cols., 2000*). A pesar del interés de las técnicas

citadas para la obtención de mastocitos maduros, nos pareció más útil mantener viables los mastocitos maduros aislados de tejidos, en lugar de inducir su diferenciación a partir de células inmaduras.

Existen diversos estudios llevados a cabo en mastocitos humanos aislados de la piel (*Levi-Schaffer y cols., 1995*), o del pulmón (*Levi-Schaffer y cols., 1987*) que revelan que el cultivo de estas células, ya maduras, en presencia de fibroblastos no tan sólo las mantiene viables sino que además aumenta su capacidad de respuesta frente a estímulos dependientes de las IgE. Este fenómeno podría atribuirse a la producción de SCF por parte de los fibroblastos, que actúa potenciando la estimulación inmunológica de los mastocitos. Estudios similares llevados a cabo por Bischoff y colaboradores en mastocitos humanos aislados del intestino, han demostrado que la adición de SCF al medio de cultivo permite mantener estas células viables y funcionales durante 162 días (*Bischoff y cols., 1997*) (*Bischoff y cols., 1999*). Todos los estudios citados concluyen que la respuesta secretora de los mastocitos maduros aislados y mantenidos en cultivo, se asemeja más a la respuesta de los mastocitos *in vivo*. Así, el hecho de cultivar las células en un medio suplementado que imita el ambiente de los mastocitos *in vivo* mejora claramente su funcionalidad.

En nuestro estudio cultivamos los mastocitos aislados de la piel, en presencia del resto de células dérmicas y utilizamos el SCF recombinante canino añadido al medio de cultivo como factor de crecimiento específico para los mastocitos. Nuestro objetivo era prolongar al máximo y de forma selectiva la viabilidad de los mastocitos cutáneos maduros para poder utilizarlos en nuestros estudios funcionales. Así, los mastocitos recién aislados de la piel fueron cultivados en presencia o en ausencia de SCF recombinante canino durante 5 días, a lo largo de los cuales se analizó la viabilidad y la capacidad secretora de las células frente a estímulos inmunológicos.

La principal dificultad que tuvimos que superar en un principio para llevar a cabo el cultivo de los mastocitos cutáneos fue la contaminación microbiana, ya que la piel del perro presenta, de forma fisiológica, una importante carga

bacteriana que es difícil de eliminar. Tras el cultivo de los mastocitos durante 5 días observamos que, independientemente de la presencia o ausencia de SCF recombinante añadido al medio de cultivo, existía una correlación positiva entre la capacidad de liberación de histamina de los mastocitos y los días que habían estado las células en cultivo. Este fenómeno ya había sido observado por otros grupos. Así, Taylor y colaboradores subrayaban en un estudio llevado a cabo en mastocitos peritoneales de rata, que el cultivo de estas células en un medio no enriquecido con factores de crecimiento exógenos inducía un aumento significativo en la liberación de serotonina tras estimular las células con SCF o anti-IgE, en comparación a la respuesta obtenida por las células recién aisladas (*Taylor y cols., 1995*). El mismo estudio revelaba que el incremento en la liberación de mediadores observado, iba acompañado de un incremento en la densidad de los receptores para el SCF.

En nuestro modelo, sugerimos que los fibroblastos presentes durante el cultivo de los mastocitos podrían constituir una fuente de SCF que actuaría mejorando la supervivencia de las células y potenciaría la liberación de mediadores inflamatorios tras la activación de los mastocitos. Además, otros autores han observado que el contacto directo de los mastocitos con otras poblaciones celulares a través de moléculas de superficie, como la ICAM-1, potencia la activación de los mastocitos inducida mediante antígenos (*Inagaki y cols., 1995*) (*Inamura y cols., 1998*).

Además del incremento en la secreción de mediadores, debido al hecho de mantener en cultivo las células durante 5 días, observamos que la adición de SCF recombinante (6ng/mL) al medio de cultivo provocaba un aumento significativo en la liberación de histamina y la producción de TNF- α tras la estimulación inmunológica de las células. Así, los mastocitos cultivados en presencia de SCF durante 5 días liberaban aproximadamente 1,5 veces más histamina y 6 veces más TNF- α que las mismas células cultivadas sin SCF y estimuladas mediante anti-IgE. El marcado efecto del SCF sobre la producción de TNF- α sugiere que este factor de crecimiento podría presentar un efecto más importante sobre la transcripción génica y la síntesis protéica del mastocito

que sobre su desgranulación. En concordancia con nuestros resultados, Ishizuka y colaboradores demostraban que el SCF regula la producción de TNF- α inducida por un estímulo inmunológico mediante la activación de diversos miembros de la familia de las MAP-K, que incrementan la transcripción del TNF- α (Ishizuka y cols., 1998).

De los resultados obtenidos de estos experimentos, podemos concluir :

- La capacidad de liberación de histamina tras la estimulación inmunológica de los mastocitos caninos aislados de la piel aumenta en relación al tiempo de cultivo de las células.

- El SCF, añadido al medio de cultivo como un factor de crecimiento de los mastocitos, potencia la liberación de histamina y de TNF- α tras la estimulación inmunológica de las células.

- El cultivo *in vitro* de los mastocitos cutáneos aislados constituye un modelo válido para analizar las consecuencias funcionales que implican los cambios en el microambiente de las células.

Una vez puesta a punto la técnica que nos permitía mantener los mastocitos viables en cultivo durante una semana, evaluamos los efectos que podía ejercer una concentración elevada de IgE en el medio de cultivo de estas células, sobre la expresión de receptores específicos para las IgE y sobre su capacidad de producción de TNF- α .

4.6. Influencia de las IgE sobre la expresión de los receptores Fc ϵ RI y la liberación de TNF- α en los mastocitos cutáneos caninos

El receptor de alta afinidad para las IgE (Fc ϵ RI) presente en la membrana de los mastocitos constituye el principal elemento mediante el cual los mastocitos son activados en una reacción alérgica (Shaikh y cols., 1997) (Okayama y cols., 2000). Por ello, el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de

este receptor parece clave para entender, en parte, la patogenia de las enfermedades alérgicas. En 1977 los estudios llevados a cabo por Conroy y colaboradores correlacionaron por primera vez, en los basófilos de pacientes atópicos, la densidad de los receptores Fc ϵ RI con el nivel de IgE sérico (Conroy y cols., 1977) (Stallman y cols., 1977). Posteriormente, se sugirió que las IgE podrían actuar como reguladoras de la expresión del Fc ϵ RI en estas células, sin embargo no fue hasta el año 1997 cuando se observó que la concentración de IgE pueden regular la expresión de los Fc ϵ RI en los mastocitos (Yamaguchi y cols., 1997) (Yamaguchi y cols., 1999) (Welker y cols., 1997) (Shaikh y cols., 1997).

Una de las consecuencias más importantes derivadas del incremento en la densidad de los receptores Fc ϵ RI en el mastocito es el aumento de la capacidad secretora que adquiere esta célula, tras ser estimulada de forma inmunológica. Así, los mastocitos murinos cultivados en presencia de altas concentraciones de IgE liberan concentraciones elevadas de serotonina, IL-6 e IL-4 en respuesta a una estimulación antigénica (Yamaguchi y cols., 1997). En el hombre, estudios similares llevados a cabo en mastocitos derivados de células de la médula ósea o procedentes de mastocitomas expuestos a una concentración elevada de IgE, revelan también un aumento en la producción de MIP-1 α , histamina y triptasa (Welker y cols., 1997) (Yano y cols., 1997) (Yamaguchi y cols., 1999). Además, es interesante destacar que algunas de estas citocinas liberadas por los mastocitos (IL-4 y MIP-1 α) contribuyen también a la producción de IgE por parte de los linfocitos B, de forma que favorecen la perpetuación y el mantenimiento de la reacción alérgica.

Actualmente, y en base a las consecuencias funcionales que presenta la activación inmunológica de los mastocitos sobreexpuestos a las IgE, y por tanto sobresensibilizados, se han desarrollado terapias anti-alérgicas que se basan en la reducción de la activación del receptor mediante la disminución de las IgE séricas (Fahy y cols., 1997). Estos tratamientos, basados en la administración de anticuerpos monoclonales anti-IgE al paciente, reducen la concentración de IgE séricas capaces de sensibilizar mastocitos y basófilos, y tienen como

consecuencia final la disminución de los receptores Fc ϵ RI en estas células (*MacGlashan y cols., 1997*) (*Saini y cols., 1999*), y la atenuación, por tanto, de la fase temprana y la fase tardía de la respuesta alérgica (*Fick, 1999*).

El perro desarrolla, de forma espontánea, un síndrome atópico asociado a altos niveles de IgE y a una alta sensibilidad a ciertos alérgenos, que se manifiesta clínicamente como dermatitis atópica y rinitis o conjuntivitis (*de Weck y cols., 1997*), sin embargo, en esta especie las consecuencias que puede presentar la sobreexposición de los mastocitos a las IgE no habían sido todavía estudiadas en profundidad.

En nuestro estudio, pretendíamos evaluar algunos de los efectos que puede presentar un aumento en la concentración de IgE en el entorno de los mastocitos caninos. Para ello, los mastocitos aislados de la piel fueron cultivados 5 días durante los cuales fueron mantenidos en presencia o en ausencia de suero canino rico en IgE. Después del periodo de cultivo, analizamos la producción de TNF- α tras sensibilizarlos y estimularlos con anti-IgE así como también la expresión de los receptores Fc ϵ RI en la superficie de su membrana celular.

En un estudio preliminar observamos que existía una correlación dosis-dependiente entre la concentración de suero canino añadido al medio de cultivo y la concentración de TNF- α liberado por los mastocitos cutáneos previamente sensibilizados y activados mediante anti-IgE (Figura 1/ Experimento 3.4.). Tras este primer estudio era necesario comprobar que eran las IgE, y no otros factores presentes en el suero, las responsables de este efecto. Para ello, cultivamos las células de forma paralela en presencia de suero canino rico en IgE y de suero canino inactivado (sometido a 56°C durante 4h). Tras el cultivo, los mastocitos fueron sensibilizados para saturar los receptores Fc ϵ RI y activados mediante anti-IgE. El aumento significativo en la capacidad secretora de las células cultivadas en presencia de suero canino rico en IgE, en comparación a las incubadas con suero inactivado, confirmaba que las IgE eran las responsables del aumento en la producción de TNF- α .

Posteriormente, confirmamos que el aumento en la producción de TNF- α observado tras cultivar las células en presencia de IgE, no era debido a un aumento en la funcionalidad general de las células, ya que la estimulación no inmunológica de las células no mostró diferencias significativas en la liberación de TNF- α entre las dos poblaciones (cultivadas en presencia o ausencia de IgE). Estos datos indican que el cultivo de los mastocitos en presencia de IgE produce un aumento en la liberación de TNF- α únicamente cuando se estimulan las células a través del receptor Fc ϵ RI, lo cual sugiere que estas células pueden expresar una densidad de receptores Fc ϵ RI aumentada.

El análisis citométrico de la expresión de los receptores para las IgE en la membrana de las células cutáneas indicó que el número de células Fc ϵ RI+ cultivadas en un ambiente rico en IgE era aproximadamente el doble, respecto a las células cultivadas en ausencia de IgE. Además, de forma interesante, el aumento en el número de células Fc ϵ RI+ se correlacionaba con el aumento en la producción de TNF- α detectado en las células estimuladas mediante anti-IgE.

En el ratón, únicamente los mastocitos y los basófilos expresan el receptor Fc ϵ RI, sin embargo en el hombre, la expresión del receptor Fc ϵ RI se extiende además a monocitos (*Sihra y cols., 1997*), eosinófilos (*Smith y cols., 2000*), células de Langerhans y células dendríticas (*Bieber y cols., 1992*) (*Osterhoff y cols., 1994*). Por ello, y debido a que trabajamos con todo el conjunto de células cutáneas, y no con la población de mastocitos puros, nos planteamos qué contribución podían tener las otras poblaciones celulares en nuestro trabajo:

- Estudios de citometría de flujo han demostrado que el nivel de expresión del Fc ϵ RI en las poblaciones celulares citadas es considerablemente menor, incluso en condiciones alérgicas, comparado con el nivel de expresión detectado en los mastocitos (*Kinet, 1999*).

- Además, los estudios realizados por Klubal y colaboradores (1998) revelaban que la piel de pacientes sanos presenta pocas células IgE+, todas ellas situadas en la dermis superficial, que coinciden con la localización de los mastocitos.
- Finalmente, en el perro las técnicas de inmunohistoquímica llevadas a cabo en la piel de pacientes sanos han revelado que las únicas células IgE+, teñidas mediante un anticuerpo monoclonal anti-IgE canina, son los mastocitos dérmicos (*Olivry y cols., 1996*).

Por todo ello, sugerimos que las células IgE+ detectadas mediante citometría de flujo correspondían a los mastocitos, que son capaces de unir las IgE a través de sus receptores de alta afinidad FcεRI.

Es interesante destacar que tanto el aumento en la producción de TNF-α como en el número de células FcεRI+ fue inducido por la adición de IgE al medio de cultivo, pero sin embargo no tuvo lugar cuando las IgE séricas presentaban su fracción Fc desnaturalizada (suero inactivado por calor). Ello sugiere que, para inducir la expresión de los receptores FcεRI es necesario, no tan sólo la presencia de IgE en el medio de cultivo, sino la presencia de IgE *unidas* al mastocito. De acuerdo con nuestros estudios, otros grupos han demostrado que los mecanismos de sobreexpresión de los receptores FcεRI en los mastocitos son el resultado de una disminución en la degradación de los receptores (y no de la síntesis de nuevos receptores) debida a la acción “protectora” de la unión de las IgE al receptor (*Furuichi y cols., 1985*) (*Kinet, 1999*).

De los resultados obtenidos de estos experimentos, podemos concluir :

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">- El mantenimiento <i>in vitro</i> de los mastocitos cutáneos caninos en un ambiente rico en IgE incrementa la capacidad de liberación de TNF-α por parte de estas células estimuladas de foma inmunológica. |
|--|

- El aumento significativo del número de mastocitos FcεRI+ cultivados en un medio rico en IgE, podría reflejar una sobreexpresión del receptor FcεRI en la superficie de estas células.
- De forma similar a lo que ocurre en el hombre y en el ratón, las IgE pueden inducir la sobreexpresión de receptores FcεRI en la superficie de los mastocitos, que se traduce en un aumento en la producción de TNF- α cuando estas células son estimuladas a través de sus receptores FcεRI.

5. CONCLUSIONES

1. Los mastocitos caninos aislados de la piel conservan, tras el proceso de aislamiento enzimático, los receptores de alta afinidad para las IgE y pueden ser, por tanto, sensibilizados *in vitro* y estimulados a través de ellos.

2. Los mastocitos cutáneos procedentes de la piel de perros atópicos y sensibles a *Ascaris suum*, expuestos a altas concentraciones de IgE, y de perros sanos liberan cantidades similares de histamina tras su estimulación a través del receptor Fc ϵ RI.

3. Los mastocitos caninos de la línea C₂ contienen β -hexosaminidasa y TNF- α que son capaces de liberar únicamente mediante una estimulación no inmunológica. Estas células expresan receptores Fc ϵ RI que son capaces de unir las IgE, pero que no son funcionales.

4. Los mastocitos cutáneos caninos pueden ser mantenidos en cultivo mediante la adición del SCF como factor de crecimiento selectivo para estas células. Este sistema de cultivo *in vitro* provoca un aumento de la capacidad secretora de los mastocitos y constituye además un modelo válido para analizar las consecuencias funcionales que implican los cambios en el microambiente de los mastocitos.

5. La co-estimulación de los mastocitos mediante SCF y anti-IgE potencia de forma significativa la liberación de histamina y de TNF- α . El SCF, por sí solo, no provoca la liberación de histamina ni de TNF- α en los mastocitos caninos aislados de la piel.

6. Los mastocitos cutáneos aislados, expuestos a altas concentraciones de IgE liberan concentraciones mayores de TNF- α y presentan una expresión de receptores Fc ϵ RI mayor que las mismas células cultivadas en ausencia de IgE.

5. Conclusiones

7. De forma similar a lo que ocurre en el hombre y en el ratón, las IgE pueden inducir la sobreexpresión de receptores Fc ϵ RI en la superficie de los mastocitos caninos, que se traduce en un aumento en la producción de TNF- α cuando estas células son estimuladas a través de sus receptores Fc ϵ RI.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK , Lichtman AH, Pober JS (1997). "Cellular and molecular immunology". W.B. Saunders Company, Third Edition, USA.
2. Ackermann L, Harvima IT (1998). "Mast cells of psoriatic and atopic dermatitis skin are positive for TNF- α and their degranulation is associated with expression of ICAM-1 in the epidermis." *Arch Dermatol Res*, 290: 353-359.
3. Aiyappa A, Guo L, Francoeur G, Sieftring A, Faust S, Regan R, Krah R, Lawton T (2000). "Recombinant chimeric canine anti-IgE monoclonal antibody therapy removes free and total serum IgE and eliminates skin test reactivity in ragweed sensitized dogs." *Vet Dermatol*, 11: 12.
4. Alam R, Kumar D, Anderson-Walters D, Forsythe PA (1994). "Macrophage inflammatory protein-1 α and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo." *J Immunol*, 152: 1298-1303.
5. Amon U, Nitschke M, Dieckmann D, Gibbs BF, Wehrhahn C ,Wolff HH (1994). "Activation and inhibition of mediator release from skin mast cells: a review of in vitro experiments." *Clin Exp Allergy*, 24: 1098-1104.
6. Barker JNWN, Mitra RS, Griffiths CEM, Dixit VM ,Nickoloff BJ (1991). "Keratinocytes as initiators of inflammation." *Lancet*,337: 211-214.
7. Beck LA ,Leung DY (2000). "Allergen sensitization through the skin induces systemic allergic responses." *J Allergy Clin Immunol*,106: 258-263.
8. Ben-Jebria A, Marthan R, Rosetti M ,Savineau JP (1993). "Effect of passive sensitization on the mechanical activity of human isolated bronchial smooth muscle induced by substance P, neurokinin A and VIP." *Br J Pharmacol*,109: 131-136.
9. Benyon RC (1989). "The human skin mast cell." *Clin Exp Allergy*,19: 375-387.
10. Benyon RC, Bissonnette EY ,Befus AD (1991). "Tumor necrosis factor- α dependent cytotoxicity of human skin mast cells is enhanced by anti-IgE antibodies." *J Immunol*,147: 2253-2258.
11. Benyon RC, Church MK, Clegg LS ,Holgate ST (1986). "Dispersion and characterization of mast cells from human skin." *Int Archs Allergy Appl Immunol*,79: 332-334.
12. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D ,de la Salle C (1992). "Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for Immunoglobulin E (Fc ϵ RI)." *J Exp Med*,175: 1285-1290.

6. Bibliografia

13. Binham CO, Austen FK (2000). "Mast cell responses in the development of asthma." *J Allergy Clin Immunol*,105: S527-34.
14. Bischoff SC, Dahinden CA (1992). "c-kit ligand: a unique potentiator of mediator release by human lung mast cells." *J Exp Med*,175: 237-244.
15. Bischoff SC, Schwengberg S, Raab R, Manns MP (1997). "Functional properties of human intestinal mast cells cultured in a new culture system: enhancement of IgE receptor-dependent mediator release and response to stem cell factor." *J Immunol*,159: 5560-5567.
16. Bischoff SC, Schwengberg S, Wordelmann K, Weimann A, Raab R ,Manns MP (1996). "Effect of c-kit ligand, stem cell factor, on mediator release by human intestinal mast cells isolated from patients with inflammatory bowel disease and controls." *Gut*,38: 104-114.
17. Bischoff SC, Sellge G, Lorentz A, Sebald W, Raab R ,Manns MP (1999). "IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells." *Proc Natl Acad Sci USA*,96: 8080-8085.
18. Bischoff SC, Sellge G, Schwengberg S, Lorentz A ,Manns MP (1999). "Stem cell factor-dependent survival, proliferation and enhanced releasability of purified mature mast cells isolated from human intestinal tissue." *Int Arch Allergy Immunol*,118: 104-107.
19. Bonnefoy J-Y, Aubry J-P, Gauchat J-F, Graber P, Life P, Flores-Romo L, Mazzei G (1993). "Receptors for IgE." *Curr Opin Immunol*,5: 944-949.
20. Bos JD, Kapsenberg ML (1986). "The skin immune system." *Immunol Today*,7: 235-240.
21. Bos JD, Kapsenberg ML (1993). "The skin immune system: progress in cutaneous biology." *Immunol Today*,14: 75-78.
22. Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, Bews JPA, Hunt TC, Okayama Y, Heusser CH, Bullock GR, Church MK, Holgate ST (1992). "Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells." *J Exp Med*,176: 1381-1386.
23. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH ,Holgate ST (1994). "Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- α in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines." *Am J Respir Cell Mol Biol*,10: 471-480.
24. Brazís P, Queralt M, de Mora F, Ferrer L, Puigdemont A (1998). "Comparative study of histamine release from skin mast cells dispersed from atopic, ascaris-sensitive and healthy dogs." *Vet Immunol Immunopathol*,66: 43-51.

6. Bibliografía

25. Bruijnzeel-Koomen CAFM, Van Wichen DF, Toonstra J, Berrens L, Bruijnzeel PBL (1986). "The presence of IgE molecules of epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatitis." *Arch Derm Res*,278: 199-205.
26. Butler JM, Peters JE, Hirshman CA, White CR, Margolin LB ,Hanifin JM (1983). "Pruritic dermatitis in asthmatic basenji-greyhound dogs: a model for human atopic dermatitis." *J Am Acad Dermatol*,8: 33-38.
27. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G ,Gleich GJ (1988). "Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia." *Leuk Res*,12: 345-355.
28. Cadiot C, Ibisch C, Bourdeau P ,Gatto H (2000). "In vitro assay for detection of canine keratinocyte activation: preliminary results for pharmacological tests of activation/regulation." *Vet Dermatol*,11: 58.
29. Cairns JA, Walls AF (1997). "Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts." *J Clin Invest*,99: 1313-1323.
30. Calonico LD, Phillips MJ, McDonald DM, Gold WM (1985). "An ultrastructural analysis of dog mastocytoma cells and normal mast cells." *Anatomical Rec*,212: 399-407.
31. Caughey GH, Lazarus SC, Viro NF, Gold WM, Nadel JA (1988). "Tryptase and chymase: comparison of extraction and release in two dog mastocytoma lines." *Immunology*,63: 339-344.
32. Celada A (1994). "Inmunología básica." Editorial Labor, S.A., Primera edición, Barcelona.
33. Coca AF, Cooke RA (1923). "On the classification of the phenomena of hypersensitiveness." *J Immunol*,8: 163-182.
34. Coleman JW (1988). "A kinetic analysis of the *in vitro* sensitization of murine peritoneal mast cells with monoclonal IgE anti-DNP antibody." *Immunol*,64: 527-531.
35. Coleman JW (1990). "Conditioned medium from concanavalin A-stimulated spleen cells inhibits the IgE-dependent sensitization of murine peritoneal mast cells *in vitro*." *Immunology*,69: 150-154.
36. Coleman JW, Buckley MG, Taylor AM, Banks EMS, Williams CMM, Holliday MR ,Thompson J (1995). "Effects of interleukin-4 or stem cell factor on mast cell mediator release and cytokine gene expression." *Int Arch Allergy Immunol*,107: 154-155.
37. Columbo M, Horowitz EM, Botana LM, MacGlashan DW, Bochner BS, Gillis S, Zsebo CM, Galli SJ ,Lichtenstein LM (1992). "The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast

6. Bibliografía

cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils." *J Immunol*,149: 599-608.

38. Compton SJ, Cairns JA, Holgate ST, Walls AF (1998). "The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 β and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells." *J Immunol*,161: 1939-1946.

39. Conroy MC, Adkinson NF, Lichtenstein LM (1977). "Measurements of IgE on human basophils: relation to serum IgE and anti-IgE-induced histamine release." *J Immunol*,118: 1317-1321.

40. Costa JJ, Weller PF, Galli SJ (1997). "The cells of the allergic response. Mast cells, basophils, and eosinophils." *JAMA*,278: 1815-1822.

41. Cruz PD, Bergstresser PR (1990). "Antigen processing and presentation by epidermal Langerhans cells." *Dermatol Clinics*,8: 633-647.

42. Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I (1998). "Characteristics and regulation of the expression of interleukin 1 receptors by murine Langerhans cells and keratinocytes." *Arch Dermatol Res*,290: 688-695.

43. Church MK (1997). "Investigating bradykinin-induced reactions in the skin through microdialysis." *Clin Exp Allergy*,27: 28-32.

44. Church MK, Benyon RC, Clegg LS, Holgate ST (1989). "Immunoharmacology of mast cells." *Handbook of Exp Pharmacol*,87: 129-158.

45. Church MK, Levi-Schaffer F (1997). "The human mast cell." *J Allergy Clin Immunol*,99: 155-160.

46. Church MK, Okayama Y, El-Lati S (1991). "Mediator secretion from human skin mast cells provoked by immunological and non-immunological stimulation." *Skin Pharmacol*,1: 15-24.

47. Church MK, Pao G, Holgate S (1982). "Characterization of histamine secretion from mechanically dispersed human lung mast cells: effects of anti-IgE, calcium ionophore A23187, compound 48/80, and basic polypeptides." *J Immunol*,129: 2116-2121.

48. Damsgaard TE, Olesen AB, Sorensen FB, Thestrup-Pedersen K, Schiotz PO (1997). "Mast cells and atopic dermatitis. Stereological quantification of mast cells in atopic dermatitis and normal human skin." *Arch Dermatol Res*,289: 256-260.

49. de Mora F, García G, Ferrer L, Arboix M (1993). "Canine cutaneous mast cells dispersion and histamine secretory characterization." *Vet Immunol Immunopathol*,39: 421-429.

6. Bibliografia

50. de Mora F, Garcia G, Puigdemont A, Arboix M, Ferrer L (1996). "Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis." *Inflammatory Research*,45: 424-427.
51. de Weck AL, Mayer P, Stumper B, Schiessl B, Pickart L (1997). "Dog allergy, a model for allergy genetics." *Int Arch Allergy Immunol*,113: 55-57.
52. DeVinney R, Gold WM (1990). "Establishment of two dog mastocytoma cell lines in continuous culture." *Am J Respir Cell Mol Biol*,3: 413-420.
53. Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet J-P (1993). "Abolition of anafilaxis by targeted disruption of the high affinity Immunoglobulin E receptor α chain gene." *Cell*,75: 969-976.
54. Doré M, Simon SI, Hughes BJ, Entman ML, Smith CW (1995). "P-selectin and CD18-mediated recruitment of canine neutrophils under conditions of shear stress." *Veterinary Pathology*,32: 258-268.
55. Dvorak AM, Costa JJ, Monahan-Earley RA, Fos P, Galli SJ (1998). "Ultrastructural analysis of human skin biopsy specimens from patients receiving recombinant human stem cell factor: Subcutaneous injection of rhSCF induces dermal mast cell degranulation and granulocyte recruitment at the injection site." *J Allergy Clin Immunol*,101: 793-806.
56. Ehrlich P (1877). "Beitrage zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer verwendung in der mikroskopischen technik." *Arch mikr Anat*,13: 263.
57. Emery DL, DeVinney R, Northfield MR, Gold WM (1988). "Prostaglandin generation by dog mastocytoma cells with doxorubicin." *Clin Invest*,36: 117a.
58. Eskandari MK, Nguyen DT, Kunkel SL, Remick DG (1990). "Wehi 164 subclone 13 assay for TNF:sensitivity, specificity, and reliability." *Immunological Investigations*,19: 69-79.
59. Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, Liu JT, Su JQ, Reimann J, Fick RB, Boushey HA (1997). "The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects." *Am J Respir Crit Care Med*,155: 1828-1834.
60. Fick RB (1999). "Anti-IgE as novel therapy for the treatment of asthma." *Curr Opin Pulm Med*,5: 76-80.
61. Field KA, Apgar JR, Hong-Geller E, Siraganian RP, Baird B, Holowka D (2000). "Mutant RBL mast cells defective in FcepsilonRI signaling and lipid raft biosynthesis are reconstituted by activated rho-family GTPases." *Mol Biol Cell*,11: 3661-3673.
62. Flanagan JG, Leder P (1990). "The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts." *Cell*,63: 185-194.

6. Bibliografia

63. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML (1998). "Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion." *Circulation*,98: 699-710.
64. Frangogiannis NG, Perrard JL, Mendoza LH, Burns AR, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML (1998). "Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion." *Circulation*,98: 687-698.
65. Frenz AM, Gibbs BF, Pearce FL (1997). "The effect of recombinant stem cell factor on human skin and lung mast cells and basophil leukocytes." *Inflamm Res*, 46:35-39.
66. Furitsu T, Saito H, Dvorak AM, Schwartz LB, Irani AMA, Burdick JF, Ishizaka K, Ishizaka T (1989). "Development of human mast cells in vitro." *Proc Natl Acad Sci USA*,86: 10039-10043.
67. Furuichi K, Rivera J, Isersky C (1985). "The receptor for immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells: Effect of ligand binding on receptor expression." *Proc Natl Acad Sci USA*,82: 1522-1525.
68. Gagari E, Tsai M, Lantz CS, Fox LG, Galli SJ (1997). "Differential release of mast cell interleukin-6 via c-kit." *Blood*,89: 2654-2663.
69. Galli SJ (1993). "New concepts about the mast cell." *N Engl J Med*,328: 257-265.
70. Galli SJ (1997). "The mast cell: a versatile effector cell for a challenging world." *Int Arch Allergy Immunol*,113: 14-22.
71. Galli SJ, Costa JJ (1995). "Mast-cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation." *Allergy*,50: 851-862.
72. Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK (1993). "Mast cell cytokines in allergy and inflammation." *Agents Actions Suppl*,43: 209-220.
73. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN (1994). "The kit ligand, stem cell factor." *Adv Immunol*,55: 1-96.
74. García G, Brazís P, Majó N, Ferrer L, de Mora F, Puigdemont A (1998). "Comparative morphofunctional study of dispersed mature canine cutaneous mast cells and BR cells, a poorly differentiated mast cell line from a dog subcutaneous mastocytoma." *Vet Immunol Immunopathol*,62: 323-337.
75. Gauchat J, Henchoz S, Mazzei G, Aubry J, Brunner T, Blasey H, Life P, Talabot D, Flores-Romo L, Thompson J, Kishi K, Butterfield J, Dahinden C, Bonnefoy J (1993). "Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils." *Nature*,365: 340-343.

6. Bibliografia

76. Gibbs BF, Arm JP, Gibson K, Lee TH, Pearce FL (1997). "Human lung mast cells release small amounts of interleukin-4 and tumour necrosis factor- α in response to stimulation by anti-IgE and stem cell factor." *Eur J Pharmacol*,327: 73-78.
77. Gordon J, Galli SJ (1990). "Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF/cachectin." *Nature*,346: 274-276.
78. Gordon JR, Burd PR, Galli SJ (1990). "Mast cells as a source of multifunctional cytokines." *Immunol Today*,11: 458-464.
79. Gordon JR, Galli SJ (1994). "Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via de Fc ϵ RI. Role of mast cell-derived transforming growth factor β and tumor necrosis factor α ." *J Exp Med*,180: 2027-2037.
80. Grewe M, Bruhinzeel-Koomen CAFM, Schöpf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutman J (1998). "A role for Th₁ and Th₂ cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis." *Immunol Today*,19: 359-361.
81. Groeben H, Lindeman KS, Davis FM, Cheng WI, Sampson HA, Hirshman CA (1997). "Dermal and airway responses to monoclonal antibodies specific for canine IgE." *Vet Immunol Immunopathol*,58: 209-218.
82. Hammerberg B, Bevier D, DeBoer DJ, Olivry T, Orton SM, Gebhard D, Vaden SL (1997). "Auto IgG anti-IgE and IgG x IgE immune complex presence and effects on ELISA-based quantitation of IgE in canine atopic dermatitis, demodectic ascariasis and helminthiasis." *Vet Immunol Immunopathol*,60: 33-46.
83. Hanifin JM (1990). "Immunologic aspects of atopic dermatitis." *Dermatol Clinics*,8: 747-750.
84. Hanifin JM (2000). "Atopic dermatitis: basic and comparative observations." *Vet Dermatol*,11: 11.
85. Herz U, Bunikowski R, Renz H (1998). "Role of T cells in atopic dermatitis." *Int Arch Allergy Immunol*,115: 179-190.
86. Hill PB, Moriello KA, DeBoer DJ (1995). "Concentrations of total serum IgE, IgA, and IgG in atopic and parasitized dogs." *Vet Immunol Immunopathol*,44: 105-113.
87. Holgate ST (1996). "The immunopharmacology of mild asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology*,98: s7-16.
88. Holgate ST, Church MK (1995). "Allergy." Ed. Mosby-Wolfe.

6. Bibliografia

89. Huang HP, Chang PH, Lai MK (2000). "Distribution of cutaneous mast cells at pruritic and nonpruritic sites in dogs with and without atopic dermatitis." *Vet Derm*,11: 60.
90. Inagaki N, Kawasaki H, Nagai H (1995). "Characterization of purification-associated reduction in IgE-dependent histamine release from rat peritoneal mast cells." *Inflamm Res*,44: 541-547.
91. Inamura N, Mekori YA, Bhattacharyya SP, Bianchine PJ, Metcalfe DD (1998). "Induction and enhancement of Fc ϵ RI-dependent mast cell degranulation following coculture with activated T cells: dependency of ICAM-1 and leukocyte function-associated antigen (LFA)-1-mediated heterotypic aggregation." *J Immunol*,160: 4026-4033.
92. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB (1986). "Two subtypes of human mast cells that have distinct neutral protease compositions." *Proc Natl Acad Sci USA*,83: 4464-4468.
93. Ishizaka K, Ishizaka T (1967). "Identification of gamma-E antibodies as a carrier of reaginic activity." *J Immunol*,99: 1187-1198.
94. Ishizaka K, Ishizaka T (1970). "The significance of immunoglobulin E in reaginic hypersensitivity." *Ann Allergy*,28: 189-202.
95. Ishizuka T, Kawasome H, Terada N, Takeda K, Gerwins P, Keller GM, Johnson GL, Gelfand EW (1998). "Stem cell factor augments Fc ϵ RI-mediated TNF- α production and stimulates MAP kinases via a different pathway in MC/9 mast cells." *J Immunol*,161: 3624-3630.
96. Jackson HA, Miller HRP, Halliwell RE (1996). "Canine leucocyte histamine release: response to antigen and to anti-IgE." *Vet Immunol Immunopathol*,53: 195-206.
97. Karimi K, Redegeld FA, Heijdra B, Nijkamp FP (1999). "Stem cell factor and Interleukin-4 induce murine bone marrow cells to develop into mast cells with connective tissue type characteristics *in vitro*." *Exp Hematol*,27: 654-662.
98. Kawasaki H, Inagaki N, Kimata M, Nakai N, Nagai H (1995). "Selective potentiation of IgE-dependent histamine release from rat peritoneal mast cells by stem cell factor." *Life Sciences*,57: 2377-2383.
99. Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Bhushan M, Griffiths CEM (2000). "Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization." *Br J Dermatol*,142: 401-412.
100. Kimura I, Moritani Y, Tanizaki Y (1973). "Basophils and bronchial asthma with reference to reagin type allergy." *Clin Allergy*,3: 195-202.
101. Kinet J-P (1999). "The high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI): From physiology to pathology." *Annu Rev Immunol*,17: 931-972.

102. Klein LM, Lavker RM, Matis WL, Murphy GF (1989). "Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion." *Proc Natl Acad Sci USA*,86: 8972-8976.
103. Klubal R, Osterhoff B, Wang B, Kinet JP, Maurer D, Stingl G (1997). "The high-affinity receptor for IgE is the predominant IgE-binding structure in lesional skin of atopic dermatitis patients." *J Invest Dermatol*,108: 336-342.
104. Kondo S, Sauder DN (1997). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF- α -induced skin inflammation." *Eur J Immunol*,27: 1713-1718.
105. Kovacs EH (1991). "Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue." *Immunol Today*,12: 17-23.
106. Kube P, Audigé L, Küther K, Welle M (1998). "Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques." *Histochem Cell Biol*,110: 129-135.
107. Kunkel SL, Standiford T, Kasaka K, Strieter RM (1991). "Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in lung." *Exp Lung Res*,17: 17-23.
108. Kurosawa M, Inamura H, Kanbe N, Igarashi Y, Tomita T, Takeda J, Mitayachi Y (1998). "Phase-contrast microscopic studies using cinematographic techniques and scanning electron microscopy on IgE-mediated degranulation of cultured human mast cells." *Clin Exp Allergy*,28: 1007-1012.
109. Laan MP, Koning H, Baert MRM, Oranje AP, Buurman WA, Savelkoul HFJ, Neijens HJ (1998). "Levels of soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble E-selectin, tumor necrosis factor- α , and soluble tumor necrosis factor receptor p55 and p75 in atopic children." *Allergy*,53: 51-58.
110. Lantz CS, Yamaguchi M, Oettgen HC, Katona IM, Miyajima I, Kinet J, Galli SJ (1997). "IgE regulates mouse basophil Fc ϵ RI expression in vivo." *J Immunol*,158: 2517-2521.
111. Lazarus SC, DeVinney R, McCabe LJ, Finkbeiner WE, Elias DJ, Gold WM (1986). "Isolated canine mastocytoma cells: propagation and characterization of two cell lines." *Am J Physiol*,251: C935-C944.
112. Leal-Berumen I, Conlon P, Marshall J (1994). "IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide." *J Immunol*,152: 5468-5476.
113. Leung DYM (1993). "Role of IgE in atopic dermatitis." *Curr Opin Immunol*,5: 956-962.

6. Bibliografia

114. Leung DYM (1999). "Pathogenesis of atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol*,104: s99-108.
115. Levi-Schaffer F, Austen FK, Caulfield JP, Heinn A, Gravallesse PM ,Stevens RL (1987). "Co-culture of human lung-derived mast cells with mouse 3T3 fibroblasts: morphology and IgE-mediated release of histamine, prostaglandin D2, and leukotrienes." *J Immunol*,139: 494-500.
116. Levi-Schaffer F, Kelav-Appelbaum R ,Rubinchik E (1995). "Human foreskin mast cell viability and functional activity is maintained *ex vivo* by coculture with fibroblasts." *Cell Immunol*,162: 211-216.
117. Lewis T (1927). "The blood vessels of the human skin and their responses". Shaw, London.
118. Lin TJ, Bissonnette E, Hirsh A ,Befus AD (1996). "Stem cell factor potentiates histamine secretion by multiple mechanisms, but does not affect tumour necrosis factor release from rat mast cells." *Immunology*,89: 301-307.
119. London CA, Kisseberth WC, Galli SJ, Geissler EN ,Helfand SC (1996). "Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours." *J Comp Pathol*,115: 399-414.
120. MacGlashan D, McKenzie-White J, Chichester K, Bochner BS, Davis FM, Schroeder JT ,Lichtenstein LM (1998). "In vitro regulation of FcεR1α expression on human basophils by IgE antibody." *Blood*,5: 1633-1643.
121. MacGlashan DW, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A ,Lichtenstein LM (1997). "Serum IgE level drives basophil and mast cell IgE receptor display." *Int Arch Allergy Immunol*,113: 45-47.
122. Malveaux FJ, Conroy MC, Adkinson NF ,Lichtenstein LM (1978). "IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration." *J Clin Invest*,62: 176-.
123. Matsushima Y, Ishikawa O, Kurosawa M ,Miyachi Y (2000). "Stem cell factor and IL-6 do not promote complete maturation of human cultured mast cells from umbilical cord blood cells: an ultrastructural study." *J Dermatol Sci*,24: 4-13.
124. McNeil HP (1996). "The mast cell and inflammation." *Aust NZ J Med*,26: 216-225.
125. Mehlhop PD, Van de Rijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR ,Oettgen HC (1997). "Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma." *Proc Natl Acad Sci USA*,94: 1344-1349.
126. Mekori YA ,Metcalf DD (1999). "Mast cell-T cell interactions." *J Allergy Clin Immunol*,104: 517-523.

6. Bibliografia

127. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA (1997). "Mast cells." *Physiol Rev*,77: 1033-1079.
128. Mitsui H, Furitsu T, Dvorak AM, Irani A-MA, Schwartz LB, Inagaki N, Takei M, Ishizaka K, Zsebo KM, Gillis S, Ishizaka T (1993). "Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand." *Proc Natl Acad Sci USA*,90: 735-739.
129. Mudde G, Van Reijssen FC, Boland GF, De Gast GC, Brujinzeel PLB, Brujinzeel-Koomen C (1990). "Allergen presentation by epidermal Langerhans' cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE." *Immunology*,69: 335-341.
130. Nagai H, Abe T, Yamaguchi I, Mito K, Tsunematsu M, Kimata M, Inagaki N (2000). "Role of mast cells in the onset of IgE-mediated late-phase cutaneous response in mice." *J Allergy Clin Immunol*,106: S91-98.
131. Nechushtan H, Razin E (1998). "Deciphering the early-response transcription factor networks in mast cells." *Immunol Today*,19: 441-441.
132. Nimmo Wilkie JS, Yager JA, Eyre P, Parker WM (1990). "Morphometric analysis of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE." *Vet Pathol*,27: 179-186.
133. Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD (2000). "Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma." *J Immunol*,164: 4332-4339.
134. Olivry T, Dean GA, Tompkins MB, Dow JL, Moore PF (1999). "Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs." *Exp Dermatol*,8: 204-211.
135. Olivry T, Moore PF, Affolter VK, Naydan DK (1996). "Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis." *Arch Dermatol Res*,288: 579-585.
136. Oppel T, Schuller E, Gunther S, Moderer M, Haberstock J, Bieber T, Wollenberg A (2000). "Phenotyping of epidermal dendritic cells allows the differentiation between extrinsic and intrinsic forms of atopic dermatitis." *Br J Dermatol*,143: 1193-1198.
137. Osterhoff H, Rappersberger K, Wang B, Koszik F, Ochiai K, Kinet J-P, Stingl G (1994). "Immunomorphologic characterization of FcεRI-bearing cells within the human dermis." *J Invest Dermatol*,102: 315-320.
138. Pierce FL (1982). "Calcium and histamine secretion from mast cells." *Progress Med Chem*,19: 59-109.

6. Bibliografia

139. Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE (1989). "Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc ϵ RI or to calcium ionophores." *Nature*,339: 64-67.
140. Rabe KF, Morton B, Dent G, Colemean RA, Magnussen H (1993). "Increased responsiveness to histamine, anti-IgE and allergen after passive sensitization of human airways *in vitro*." *Eur Respir J*,6: 481S.
141. Ravetch JV, Kinet J-P (1991). "Fc receptors." *Annu Rev Immunol*,9: 457-492.
142. Razin E, Petch I, Rivera J (1995). "Signal transduction in the activation of mast cells and basophils." *Immunol Today*,16: 370-373.
143. Reedy, L.M., Miller WH, Willemsse T (1997). "Allergic skin diseases of dogs and cats." W.B. Saunders Company Ltd., Second Edition.
144. Reischl IG, Coward WR, Church MK (1999). "Molecular consequences of human mast cell activation following Immunoglobulin E receptor (IgE-Fc ϵ RI) interaction." *Biochem Pharmacol*,58: 1841-1850.
145. Renz H, Jujo K, Bradley K, Domenico J, Gelfand E, Leung D (1992). "Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon γ ." *J Invest Dermatol*,99: 403-408.
146. Roitt I, Brostoff J, Male D (1998). "Immunology." Fifth ed. London: Mosby International Ltd.
147. Rottapel R, Reedijk M, Williams DE, Lyman SD, Anderson DM, Pawson T, Bernstein A (1991). "The steel/w transduction pathway: kit autophosphorylation and its association with a unique subset of cytoplasmic signaling proteins is induced by the steel factor." *Mol Cell Biol*,11: 3043-3051.
148. Rudolf MP, Furuwaka K, Miescher S, Vogel M, Kricek F, Stadler BM (1997). "Effect of anti-IgE antibodies on Fc ϵ RI-bound IgE." *J Immunol*,157: 5646-5652.
149. Ruoss SJ, Hartmann T, Caughey GH (1991). "Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts." *J Clin Invest*,88: 493-500.
150. Saini SS, MacGlashan DW, Sterbinsky SA, Togias A, Adelman DC, Lichtenstein LM, Bochner BS (1999). "Down-regulation of human basophil IgE and Fc ϵ RI α surface densities and mediator release by anti-IgE-infusion is reversible *in vitro* and *in vivo*." *J Immunol*,162: 5624-5630.
151. Sawada K, Nagai H, Basaki Y, Yamaya H, Ikizawa K, Watanabe M, Kojima M, Matsuura N, Kuniwa M (1996). "The expression of murine cutaneous late phase reaction requires both IgE antibodies and CD4 T cells." *Clin Exp Allergy*,27: 225-231.

6. Bibliografia

152. Scott DW, Miller WH, Griffin CE (2001). "Muller & Kirk's small animal dermatology". WB Saunders Company, 6th Edition. USA.
153. Schechter NM, Slavin D, Fetter RD, Lazarus GS, Fräki JE (1988). "Purification and identification of two serine class proteinases from dog mast cells biochemically and immunologically similar to human proteinases trypsin and chymase." *Arch Biochem Biophys*, 262: 232-244.
154. Schroeder JT, MacGlashan DW, MacDonald SM, Kageyama A, Lichtenstein LM (1997). "Regulation of IgE-dependent IL-4 generation by human basophils treated with glucocorticoids." *J Immunol*, 158: 5448-5454.
155. Sechi S, Roller PP, Willette-Brown J, Kinet JP (1996). "A conformational rearrangement upon binding of IgE to its high affinity receptor." *J Biol Chem*, 271: 19256-19263.
156. Shaikh N, Rivera J, Hewlett BR, Stead RH, Zhu F, Marshall JS (1997). "Mast cell Fc ϵ RI expression in the rat intestinal mucosa and tongue is enhanced during *Nippostrongylus brasiliensis* infection and can be up-regulated by in vivo administration of IgE." *J Immunol*, 158: 3805-3812.
157. Shull RM, Suggs SV, Langley KE, Okino KH, Jacobsen FW, Martin FH (1992). "Canine stem cell factor (c-kit ligand) supports the survival of hematopoietic progenitors in long-term canine marrow culture." *Exp Hematol*, 20: 1118-1124.
158. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB (1997). "Expression of high-affinity IgE receptors (Fc ϵ RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: Relationship to total serum IgE concentrations." *J Allergy Clin Immunol*, 99: 699-706.
159. Sinke JD, Thepen T, Bihari IC, Rutten VPMG, Willemse T (1998). "Immunophenotyping of skin-infiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis." *Vet Q*, 20 (suppl 1): S107.
160. Smith SJ, Ying S, Meng Q, Sullivan MHF, Barkans J, Kon OM, Sihra B, Larche M, Levi-Strauss C, Kay AB (2000). "Blood eosinophils from atopic donors express messenger RNA for the α , β , and γ subunits of the high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) and intracellular, but not cell surface, a subunit protein." *J Allergy Clin Immunol*, 105: 309-317.
161. Sperr WR, Agis H, Czerwenka K, Virgolini I, Bankl HC, Müller MR, Zsebo K, Lechner K, Valent P (1996). "Effects of cyclosporin A and FK-506 on stem cell factor-induced histamine secretion and growth of human mast cells." *J Allergy Clin Immunol*, 98: 389-399.
162. Stallman PJ, Aalberse RC, Bruhl PC, Van Elven EH (1977). "Experiments on passive sensitization of human basophils, using quantitative immunofluorescence microscopy." *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 54: 364-370.

6. Bibliografia

163. Subramanian N ,Bray MA (1987). "Interleukin 1 release histamine from human basophils and mast cells in vitro." *J Immunol*,138: 271-275.
164. Suter MM (1995). "The skin as an immunologic organ." *Proceedings. ESVD 12th Annual Congress*: 70.
165. Taylor AM, Galli SJ ,Coleman JW (1995). "Stem-cell factor, the kit ligand, induces direct degranulation of rat peritoneal mast cells in vitro and in vivo: dependence of the in vitro effect on period of culture and comparison of stem-cell factor with other mast cell-activating agents." *Immunology*,86: 427-433.
166. Thomas PS, Pennington DW, Schreck RE, Levine TM ,Lazarus SC (1996). "Authentic 17kDa tumour necrosis factor is synthesized and released by canine mast cells and up-regulated by stem cell factor." *Clin Exp Allergy*,26: 710-718.
167. Thorlacius H, Raud J, Rosengren-Beezley S, Forrest MJ, Hedqvist P ,Lindbom L (1994). "Mast cell activation induces P-selectin-dependent leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules in vivo." *Biochem Biophys Res Commun*,203: 1043-1049.
168. Tsai M, Chen R-H, Tam S-Y, Blenis J ,Galli SJ (1993). "Activation of MAP kinases, pp90^{rsk} and pp70-S6 kinases in mouse mast cells by signaling through the c-kit receptor tyrosine kinase or Fc ϵ RI: rampamycin inhibits activation of pp-70-S6 kinase and proliferation in mouse mast cells." *Eur J Immunol*,23: 3286-3291.
169. Tsai M, Shih L, Newlands GFJ, Takeishi T, Langley KE, Zsebo KM, Miller HRP, Geissler EN ,Galli SJ (1991). "The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype." *J Exp Med*,174: 125-131.
170. Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN ,Galli SJ (1991). "Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor." *Proc Natl Acad Sci USA*,88: 6382-6386.
171. Tsai M, Tam S-Y ,Galli SJ (1993). "Distinct patterns of early response gene expression and proliferation in mouse mast cells stimulated by stem cell factor, interleukin-3, or IgE and antigen." *Eur J Immunol*,23: 867-872.
172. Tunon de Lara JM, Okayama Y, Savineau J-P ,Marthan R (1995). "IgE-induced passive sensitization of human isolated bronchi and lung mast cells." *The European Respiratory Journal*,8: 1861-1865.
173. Valent P (1994). "The riddle of the mast cell:kit (CD117)-ligand as the missing link?" *Immunol Today*,15: 111-114.
174. Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser H ,Virchow J (1992). "Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation

and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage." *Am Rev Respir Dis*,146: 109-115.

175. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf H, Whitaker D ,Murphy G (1991). "Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α , which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1." *Proceeding National Academy of science USA*,88: 4220-4224.

176. Wang B, Amerio P ,Sauder DN (1999). "Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration." *J Leukoc Biol*,66: 33-39.

177. Welker P, Grabbe J, Zuberbier T ,Grützkau A (1997). "IgE upregulates expression of the high affinity IgE receptor Fc ϵ RI on human mast cells." *J Allergy Clin Immunol*,99: S103.

178. Welker P, Grabbe J, Zuberbier T ,Henz BM (1997). "GM-CSF downregulates expression of tryptase, Fc epsilon RI and histamine in HMC-1 mast cells." *Int Arch Allergy Immunol*,113: 284-286.

179. Welle M (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol*,61: 233-245.

180. Wershil BK, Tsai M, Geissler EN, Zsebo KM ,Galli SJ (1992). "The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces c-kit receptor-dependent mouse mast cell activation in vivo. Evidence that signaling through the c-kit receptor can induce expression of cellular function." *J Exp Med*,175: 245-255.

181. Wershil BK, Wang Z, Gordon JR ,Galli SJ (1991). "Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent." *J Clin Invest*,87: 446-453.

182. White M (1999). "Mediators of inflammation and the inflammatory process." *J Allergy Clin Immunol*,103: S378-381.

183. White MV (1990). "The role of histamine in allergic diseases." *J Allergy Clin Immunol*,86: 599-605.

184. White MV (1993). "Mast cell secretagogues. In: *Mast cells in health and disease*." New York: Dekker: 109-128.

185. Willemse A (1986). "Atopic skin disease: A review and a reconsideration of diagnostic criteria." *J Small Anim Pract*,27: 771.

186. Wollemberg A ,Bieber T (2000). "Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions." *Allergy*,55: 205-213.

187. Xia H, Du Z, Craig S, Klish G, Noben-Trauth N, Kochan JP, Huff TH, Irani AA ,Schwartz LB (1997). "Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc ϵ receptor type I expression in recombinant human stem cell

6. Bibliografia

factor-dependent fetal liver-derived human mast cells." *J Immunol*,159: 2911-2921.

188. Yamada (1995). "Cytokine expression in atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol*,96: 1069.

189. Yamaguchi M, Hirai K, Ohta K, Suzuki K, Kitani S, Takaishi T, Ito K, Ra C, Morita Y (1996). "Nonreleasing basophils convert to releasing basophils by culturing with IL-3." *J Allergy Clin Immunol*,97: 1279-1287.

190. Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, Miyajima I, Kinet JP, Galli SJ (1997). "IgE enhances mouse mast cell Fc ϵ RI expression in vitro and in vivo: Evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions." *J Exp Med*,184: 663-672.

191. Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, Lantz CS, Noben-Trauth N, Ra C, Costa JJ, Galli SJ (1999). "IgE enhances Fc ϵ receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cell: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc ϵ receptor expression and mediator release." *J Immunol*,162: 5455-5465.

192. Yan HC, Delisser HM, Pilewski JM, Barone KM, Szklut PJ, Chang X-J, Ahern TJ, Langer-Safer P, Albelda SM (1994). "Leukocyte recruitment into human skin transplanted onto severe combined immunodeficient mice induced by TNF-alpha is dependent on E-selectin." *J Immunol*,152: 3053-3063.

193. Yano K, Yamaguchi M, de Mora F, Lantz CS, Butterfield JH, Costa JJ, Galli SJ (1997). "Production of macrophage inflammatory protein-1alpha by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability." *Lab Invest*,77: 185-193.

194. Yong LCJ (1997). "The mast cell: origin, morphology, distribution, and function." *Exp Toxic Pathol*,49: 409-424.

195. Zweiman B (1993). "The late-phase reaction: role of IgE, its receptor and cytokines." *Curr Opin Immunol*,5: 950-955.

196. Zweiman B, Moskovitz AR, von Allmen C (1998). "Comparison of inflammatory events in skin sites with and without cutaneous late-phase reactions after prominent immediate IgE-mediated responses." *J Allergy Clin Immunol*,101: 110-114.