

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia
Facultat de Veterinària



Universitat Autònoma de Barcelona

Expresión de moléculas pro- inflamatorias en modelos caninos de inflamación alérgica *in vivo* e *in vitro*

Rosa M. Torres Blanch
Julio 2003



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Farmacologia
Unitat de Farmacologia Veterinària

El **Dr. Fernando de Mora Pérez**, Profesor Titular del Departament de Farmacologia de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA: Que el trabajo titulado “**Expresión de moléculas pro-inflamatorias en modelos caninos de inflamación alérgica *in vivo* e *in vitro***”, cuya autora es ROSA M. TORRES BLANCH, ha sido realizado bajo su dirección y cumple las normas exigidas para optar al título de Doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Fernando de Mora Pérez

Bellaterra, a 12 de mayo de 2003

Ha estat un camí llarg, molt llarg ... Aquesta etapa del camí que ara culmina ha estat possible, sobretot, gràcies a tres pilars (i mig) fonamentals als quals els hi dedico aquesta tesi:

- La meva família, que sempre em va recolzar en ficar-me en aquest apassionant però també de vegades decebedor món de la recerca científica
- El Fernando, el meu director de tesis-amic-assessor científic i personal-psicoterapeuta a estones...en definitiva i per sobre de tot una gran PERSONA que m'ha ensenyat tantes i tantes coses, però la més important: que cal prioritzar sempre la vida personal per sobre de la laboral. Amb ell he après que és possible fer ciència sense grans recursos però amb moltes idees i molt d'entusiasme i inquietud, i col.laborant amb gent també entusiasta perquè encara que es trigui més també s'hi arriba i s'aprèn molt.
- El Kim, que amb la seva enorme paciència, generositat i amor ha fet més fàcils els moments difícils; i tot i no acabar d'entendre aquest submón de "bojos científics" m'ha engrescat a continuar i a realitzar una de les experiències més enriquidores que he tingut en els últims anys (l'estada als EUA).
- La personeta que m'ha ajudat a donar l'última embranzida per escriure la tesi i que a partir de l'octubre m'iniciarà en la desitjada etapa de mare.

Tots teniu com a mínim un motiu per formar part dels meus agraïments, espero que cadascun de vosaltres sapigueu el perquè.

Al **Kim** i a
tota la meva família, especialment: papá,
mamá, Txuspe, mami, Imma i Romario (també els
que ja no hi sou però sempre hi sereu). **Col.legi Sant Lluís**
Bosch de Pla i Atmell: als meus professors de ciències naturals
Padre Escribano i Tina. **Amics per sempre**: Els Bio30+"sufridores",
Patri i Eusebi, Piluca i Dani, Nurieta i Francesc, Nathalie i Chencho, Ester
i Xavi, Simoneta, Steffi i Olli, economistes, futbolistes, tots
i totes. **Laboratorio de análisis Dr. Echevarne**:
Dr. F. Echevarne, Dra.
Twose, Nina, Fátima i Joan
Huguet. **Bayer AG**
Wuppertal: Dr. Apeler,
Elsa, Peter, Steffi, Marcus.
Almirall Prodesfarma:
Lluís, Núria, Mireia, Rosa,
Jordi Beleta. **CIBBIM-Vall**
d'Hebron: Jaume
Reventós, Francina, Patri,
(Fernando, Pilarín, Anna,
i Carina, Rafa, sector
Mireia, Betto, Paco,
companyia **Centre de**
i "donantes". **Bioquímica**:
Tura i Alba **AP**: Blanca,
MJ, Santi, Francesca, Rosa,
Fernando i Marc. **Fisio**: Antonio,
Félix, Cristina i Oriol. **Yoli, Dani, Elena.** **Hospital Veterinari**:
UAB varis: Carlos de Multimèdia, Inma i Chema
del bar, Francesc de consergeria. **Virbac S.A., Isoquimen S.L.**
Galli Lab Stanford: Steve, Mindy, Deva, Carolina, Mariola,
Andrea, Kentaro, Susumu. De nou, al **Kim** i a
tota la meva família.

RÀCIES

Carmen. **Fàrmaco**: "a los presentes
Pere, conveni's team, chicas Univet, Sergi
omega) y a los ausentes (Muntserratina,

Laieti)". Dic, Duc i

Zoonosi: treballadors

Carles, Marta, Àlex,

Pere, Sílvia, Sílvia Sisó,

Dolors i Lluís. **Anatomia**:

Hospital Veterinari:

Fisio: Antonio, Yoli, Dani, Elena. **Hospital Veterinari**:

UAB varis: Carlos de Multimèdia, Inma i Chema
del bar, Francesc de consergeria. **Virbac S.A., Isoquimen S.L.**

Galli Lab Stanford: Steve, Mindy, Deva, Carolina, Mariola,

Andrea, Kentaro, Susumu. De nou, al **Kim** i a

tota la meva família.

Disseny: Jose Albert Ibáñez
(també "maestro paellero")

ABREVIATURAS

(no se incluyen abreviaturas de los reactivos incluidos en la sección de Material y Métodos)

A23187: ionóforo de calcio A23187

Ag: antígeno

anti-IgE: anticuerpo contra inmunoglobulina E

Asc S1: antígeno purificado de *Ascaris suum*

CCEC: células endoteliales caninas de carótida

CE: células endoteliales

DA: dermatitis atópica

EPR o EAR: fase temprana de la alergia

FcεRI: receptor de IgE de elevada afinidad

GAPDH: gliceraldehído-3- fosfato

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1

IgE: inmunoglobulina E

I.M.: intramuscular

I.V.: intravenoso

K.O.: knockout, deficiente para un gen

LPR o LAR: fase tardía de la alergia

LTB₄: leucotrieno B₄

LTC₄: leucotrieno C₄

MC: mastocitos

mRNA: RNA mensajero

PAF: factor activador de plaquetas

PGD₂: prostaglandina D₂

TID: test intradérmico de diagnóstico

Th1: linfocito del subtipo *helper* 1

Th2: linfocito del subtipo *helper* 2

TNF-α: factor de necrosis tumoral α

VCAM-1: molécula de adhesión vascular

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción.....	5
1 La inflamación alérgica.....	5
2 Función de los mastocitos en la inflamación alérgica	6
3 ICAM-1 y selectina P en las enfermedades alérgicas.....	8
4 La relación de los mastocitos con la selectina P y el ICAM-1.	
Importancia del TNF-α	10
5 El modelo canino de atopía	12
5.1 <u>Moléculas pro-inflamatorias en la dermatitis atópica canina</u>	13
5.2 <u>Los mastocitos caninos y la dermatitis atópica</u>	15
Hipótesis y objetivos.....	17
Material y métodos	19
1 Determinación de moléculas pro-inflamatorias en la piel canina	19
1.1 <u>Evaluación de la expresión de moléculas pro-inflamatorias en la piel de perros con dermatitis atópica</u>	19
1.1.2 <i>Criterios de inclusión de perros con dermatitis atópica</i>	21
1.1.3 <i>Obtención de muestras de la piel</i>	21
1.1.4 <i>Evaluación histológica de las biopsias de piel de perros con dermatitis atópica</i>	22
1.1.5 <i>Inmunohistoquímica de selectina P, ICAM-1 y TNF-α</i>	22
1.1.6 <i>Cuantificación de la expresión de selectina P, ICAM-1 y TNF-α en la piel de perros con dermatitis atópica</i>	24
1.2 <u>Evaluación de la expresión de moléculas de adhesión en fragmentos cutáneos caninos estimulados</u>	25
1.2.1 <i>Obtención de fragmentos cutáneos</i>	25
1.2.2 <i>Sensibilización y activación de mastocitos en fragmentos cutáneos</i>	26

1.2.3	<i>Determinación de la histamina liberada</i>	27
1.2.4	<i>Determinación de moléculas de adhesión en fragmentos cutáneos mediante RT-PCR</i>	27
2	Determinación de moléculas pro-inflamatorias inducidas en la interacción mastocito-célula endotelial	29
2.1	<u>Puesta a punto del modelo de comunicación mastocito-célula endotelial</u>	29
2.1.1	<i>Aislamiento de células endoteliales caninas</i>	29
2.1.2	<i>Caracterización inmunocitoquímica de las células endoteliales caninas</i>	31
2.1.3	<i>Activación de mastocitos caninos</i>	32
2.1.4	<i>Activación de células endoteliales mediante mediadores mastocitarios</i>	33
2.1.5	<i>Inhibición de la histamina y el TNF-α en los sobrenadantes de mastocitos estimulados</i>	34
2.2	<u>Expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales caninas</u>	35
2.2.1	<i>Determinación de ICAM-1 y selectina P en células endoteliales mediante citometría de flujo (FACS)</i>	35
2.2.2	<i>Análisis de la inmunotinción para selectina P e ICAM-1 en la membrana de las células endoteliales estimuladas</i>	37
3	Modelo de alergia cutánea canina inducida en perros Beagle para el análisis de moléculas pro-inflamatorias	38
3.1	<u>Caracterización de la respuesta inflamatoria en el modelo de alergia cutánea</u>	38
3.1.1	<i>Inducción de respuesta cutánea en perros hipersensibles a <i>Ascaris suum</i></i>	38
3.1.2	<i>Procesamiento de las biopsias</i>	39
3.1.3	<i>Detección de selectina P en biopsias cutáneas mediante</i>	

<i>inmunohistoquímica</i>	39
3.2 <u>El modelo del perro experimentalmente sensibilizado a <i>Ascaris suum</i></u>	39
<u>3.2.1 El test intradérmico de diagnóstico (TID)</u>	40
<u>3.2.2 Inducción experimental de sensibilidad al antígeno de <i>Ascaris suum</i> en perros Beagle</u>	40
a. Selección de perros Beagle naïve.....	40
b. Protocolo de sensibilización primaria	41
c. Evaluación clínica de los perros	42
Resultados	45
1 Expresión de moléculas pro-inflamatorias en la piel de perros con dermatitis atópica	45
1.1 <u>Datos clínicos de los perros atópicos seleccionados</u>	45
1.2 <u>Evaluación histopatológica de la piel</u>	45
1.3 <u>Expresión de selectina P, ICAM-1 y TNF-α en la piel de perros con dermatitis atópica</u>	48
2 Expresión de moléculas pro-inflamatorias en fragmentos de piel canina	52
2.1 <u>Liberación de histamina por fragmentos cutáneos estimulados con anti-IgE</u>	52
2.2 <u>Expresión de moléculas de adhesión en fragmentos cutáneos estimulados</u>	53
3 Expresión de moléculas pro-inflamatorias en el modelo de comunicación mastocito-célula endotelial	54
3.1 <u>Aislamiento, crecimiento y fenotipo de las células endoteliales caninas de carótida</u>	54
3.2 <u>Liberación de histamina y de TNF-α por los mastocitos caninos C₂ estimulados</u>	57

3.3	<u>Inducción de moléculas de adhesión endoteliales por parte de los mastocitos</u>	59
3.4	<u>Función de la histamina y el TNF-α mastocitario en el aumento de la expresión de selectina P e ICAM-1 en células endoteliales caninas</u>	62
4	Reacción de la piel a la inyección intradérmica de Ag en el modelo de alergia cutánea del perro hipersensible a <i>Ascaris suum</i>	64
4.1	<u>La inyección intradérmica de Ag en perros espontáneamente hipersensibles a <i>Ascaris suum</i> induce inflamación</u>	64
4.2	<u>Expresión cronológica de selectina P en la inflamación inducida por Ag</u>	66
4.3	<u>La inyección intradérmica de Ag induce sensibilización primaria en perros naïve</u>	67
	Discusión	71
1	Expresión de moléculas pro-inflamatorias en las lesiones cutáneas de perros con dermatitis atópica	71
2	Expresión inducida por mastocitos caninos de moléculas de adhesión en células endoteliales	74
3	El perro hipersensible a <i>Ascaris suum</i>: un modelo para el estudio de la inflamación alérgica cutánea	78
	Conclusiones	83
	Bibliografía	85

Resumen

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad alérgica de la piel que se manifiesta en individuos atópicos que entran en contacto con un alérgeno frente al cual son hipersensibles. La DA se manifiesta en el hombre y en el perro por la aparición súbita de picor y de lesiones cutáneas inmediatas (fase temprana o EAR). Además, en un elevado porcentaje de pacientes, la enfermedad evoluciona hacia una fase tardía (LAR) que se sustenta en un proceso inflamatorio y que es responsable posiblemente de los síntomas crónicos de la enfermedad. En la DA humana y canina la inflamación se constituye mayoritariamente de células dendríticas y linfocitos T. En ambas especies se ha demostrado que la respuesta inmunitaria es inicialmente del tipo Th2 y a medida que la enfermedad se hace crónica cambia al tipo Th1. Durante el reclutamiento de las células inflamatorias se activan entre otras, las moléculas de adhesión. Probablemente en dicha actividad participan los mastocitos (MC) de la dermis. La población mastocitaria está en un lugar privilegiado para coordinar el proceso inflamatorio por su situación anatómica próxima a los vasos sanguíneos y por su contenido en mediadores pro-inflamatorios. El conocimiento de los mecanismos de instauración de la inflamación en la DA es fundamental para establecer estrategias terapéuticas encaminadas a reducirla. Nos propusimos estudiar la expresión de la selectina P, el ICAM-1 y el TNF- α en la DA, así como la contribución de los MC a su inducción en modelos caninos *in vitro* e *in vivo*.

Se seleccionaron perros con DA espontánea en el Hospital Clínic Veterinari de la Universitat Autònoma de Barcelona. Mediante inmunohistoquímica, en las lesiones cutáneas de los animales seleccionados se observó una mayor expresión de selectina P que en las zonas no lesionadas. Dicho aumento se correlacionaba con una mayor adherencia de los leucocitos al endotelio vascular. Además mediante estudios *in vitro* con líneas celulares de MC caninos y células endoteliales de carótida canina, demostramos que los mediadores mastocitarios son capaces de inducir la expresión de selectina P

endotelial. Esto sugiere una relación funcional entre los MC y las células endoteliales de la dermis en la DA durante el establecimiento del proceso inflamatorio, y puede reflejar la importancia de la selectina P en las fases iniciales de la inflamación alérgica. Se evaluó también la expresión de TNF- α e ICAM-1 en los perros con DA espontánea. No se detectó un aumento significativo de ninguna de estas dos moléculas en las zonas lesionadas, pero los datos sugieren que existe una tendencia a la sobre-expresión de ambas. Se observó también que en la piel canina los MC son la fuente principal de TNF- α y se comprobó mediante estudios *in vitro* que el TNF- α mastocitario es capaz de inducir la expresión de ICAM-1 endotelial. De nuevo se establece una relación funcional del eje MC / TNF- α / ICAM-1 endotelial que puede tener relevancia en la patogenia de la inflamación alérgica en la DA, aunque se requiere de nuevos experimentos para determinar su contribución al proceso inflamatorio. Las dificultades que entrañan los estudios en perros con DA natural y el interés por evaluar el papel de los MC en este proceso *in vivo*, nos llevó a contribuir a la caracterización de un modelo canino de dermatitis alérgica: el perro hipersensible a *Ascaris suum*. La inyección intradérmica de antígeno (Ag) purificado de *Ascaris* induce una reacción inmediata (pápula) de la que son responsables mayoritarios los MC. Observamos que, además, se produce una inflamación en la dermis muy similar a la que se observa en el hombre. En el establecimiento del proceso inflamatorio en este modelo juega un papel relevante la selectina P, de la cual probablemente los MC sean inductores.

Además de su contribución a los síntomas inmediatos, los MC son capaces de promover la actividad pro-inflamatoria mediante la liberación de TNF- α y la inducción de la expresión de ICAM-1 y de selectina P. Dicha contribución puede tener especial relevancia en enfermedades atópicas como la DA en la cual se observa un incremento de diversas moléculas de adhesión y citocinas. Según nuestros estudios la selectina P, una molécula inducida por la actividad mastocitaria y expresada en las lesiones cutáneas de perros con DA, pudiera ser decisiva en el inicio del proceso inflamatorio alérgico y por lo tanto constituir

una diana interesante para su control farmacológico. La fluctuación de la expresión de selectina P ha sido observada también *in vivo* en el perro hipersensible a Ag de *Ascaris*, lo cual subraya la idoneidad de este modelo en el estudio de los mecanismos de inflamación alérgica, especialmente puesto que hemos establecido un protocolo de sensibilización que permite su rápida inducción.

Introducción

1 La inflamación alérgica

Un individuo atópico es aquel que tiene una predisposición genética a padecer enfermedades atópicas, es decir procesos de hipersensibilidad mediados por IgE frente a alérgenos ambientales. Las enfermedades atópicas se manifiestan clínicamente como asma alérgico, rinitis alérgica y dermatitis atópica (DA). Estos procesos alérgicos suelen en un gran tanto por ciento de los pacientes dividirse clínicamente en dos fases, la temprana y la tardía. En la fase temprana (*early allergic reaction*, EAR) los síntomas se desencadenan súbitamente cuando los mastocitos (MC) sensibilizados con IgE específicas unidas a su receptor de alta afinidad (FcεRI), son activados por la unión de los alérgenos a estas inmunoglobulinas. La consecuencia inmediata de esta activación es la rápida desgranulación de los MC y la consiguiente liberación de mediadores preformados y almacenados en los gránulos como la histamina y la triptasa. Tras ser activados, los MC sintetizan y secretan los mediadores lipídicos llamados eicosanoides derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos), que contribuyen también a la aparición de los síntomas de la fase temprana. Esta fase inicial suele, en un 70-80% de los casos, evolucionar hacia una fase tardía (*late allergic reaction*, LAR) convirtiéndose la enfermedad alérgica en un proceso crónico. Histopatológicamente la LAR se sustenta en una inflamación alérgica que se inicia con la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, seguida de un infiltrado celular con predominancia de eosinófilos y linfocitos T. La sintomatología de la LAR y las lesiones asociadas son consecuencia de la actividad celular local en el proceso inflamatorio. Por lo tanto, tiene especial importancia conocer la expresión de moléculas pro-inflamatorias en la LAR y la contribución de las distintas poblaciones celulares a la instauración de la inflamación.

Las células que constituyen el infiltrado celular característico de la inflamación alérgica son reclutadas mediante mecanismos moleculares propios de cualquier proceso inflamatorio. En estos mecanismos juegan un papel fundamental las quimiocinas y las moléculas de adhesión. Las quimiocinas o citocinas quimiotácticas son producidas y liberadas por las células presentes en el foco inflamatorio. Patrones determinados de expresión de estas quimiocinas (eotaxina, RANTES, MIP-1 α , MCP-1) inducen selectivamente el reclutamiento de eosinófilos, linfocitos Th2 y en algunos casos neutrófilos hacia el foco inflamatorio^{1,2}. Por otro lado, la expresión de determinadas moléculas de adhesión en las células endoteliales (CE) se encarga de retener a los leucocitos en los vasos y permitir su migración hacia los sitios de inflamación. Se conocen tres familias de moléculas de adhesión que cumplen de manera secuencial diversas funciones en el proceso de migración celular. Las selectinas expresadas por las CE se unen a sus ligandos de manera débil y transitoria, esto permite el enlentecimiento y rodamiento de los leucocitos sobre la superficie endotelial (*rolling*). Las integrinas (activadas previamente por las quimiocinas) junto con las moléculas de adhesión de la familia de las superinmunoglobulinas permiten la adhesión firme de los leucocitos al endotelio y la posterior diapédesis (transmigración) hacia el foco inflamatorio³. De entre las poblaciones celulares presentes en el lugar de la inflamación destacan los MC por su presencia desde el inicio del reclutamiento.

2 Función de los mastocitos en la inflamación alérgica

Existe abundante literatura que sugiere que los MC pueden ser importantes en el inicio del reclutamiento leucocitario en la inflamación alérgica. Los tres hechos que más claramente apuntan en esa dirección son: 1) que los MC se encuentran desde el inicio en los lugares donde se produce la inflamación alérgica y su actividad precede a la infiltración celular, 2) que su situación anatómica en los tejidos suele ser perivascular (junto a las vénulas post-capilares, donde se produce la transmigración leucocitaria), y 3) que los MC

activados inmunológicamente son capaces de liberar mediadores pro-inflamatorios pre-formados y de nueva síntesis que se sabe que contribuyen al proceso inflamatorio mediante el aumento de la permeabilidad vascular y la activación de las CE haciéndolas más adhesivas para los leucocitos.

Diversos estudios *in vivo* relacionan claramente a los MC activados con el reclutamiento leucocitario. En 1991 Wershil y cols.⁴ demostraron en el ratón que el reclutamiento de neutrófilos en una respuesta cutánea tardía mediada por IgE era dependiente de MC y en gran parte debida a la actividad del TNF- α liberado por éstos. También se ha visto que la desgranulación de MC mediante el compuesto 48/80 inicia el reclutamiento de leucocitos a los 30 minutos alcanzando el máximo entre las 2 y las 4 horas siguientes⁵. Se ha demostrado en pacientes con asma alérgico que tras la activación con alérgeno (mediada por IgE y MC) se produce un reclutamiento de linfocitos Th₂ en el que participaría la PGD₂, molécula producida y liberada por MC⁶.

Asimismo, se han estudiado *in vitro* los mecanismos por los cuales los MC contribuyen a la formación del infiltrado inflamatorio. Se ha comprobado que los MC liberan compuestos quimiotácticos para los leucocitos y se ha estudiado la capacidad de algunos de sus mediadores para atraer a determinadas células inflamatorias. De entre los mediadores mastocitarios preformados se sabe que la histamina atrae neutrófilos y eosinófilos actuando a través de su receptor H₁⁷ y que la triptasa induce la migración de granulocitos⁸. En lo que se refiere a los mediadores de MC sintetizados *de novo* se hicieron estudios con PGD₂ inyectándolo en perros y se vio que provocaba un marcado infiltrado eosinofílico⁹. También se ha descrito que el LTB₄¹⁰ y el PAF¹¹ (ambos liberados por MC activados) inducen la migración de neutrófilos, en colaboración con la histamina puede contribuir a este proceso¹². Además, los MC son capaces de producir diversas quimiocinas. Sintetizan y liberan IL-8¹³, GM-CSF¹⁴, eotaxina^{15,16}, MIP-1 α ¹⁷, RANTES y MCP-1¹⁸. En conjunto todos estos mediadores permiten que lleguen a la zona de inflamación las células que formarán el infiltrado, es decir, eosinófilos, linfocitos, monocitos y neutrófilos. No hay que olvidar que además, algunos de los mediadores secretados por los

MC son factores de crecimiento de muchas de las células reclutadas, aumentan así su supervivencia y por lo tanto prolongan su actividad en el infiltrado inflamatorio (IL-3 e IL-5 de eosinófilos y GM-CSF de neutrófilos).

La participación de los MC en el inicio del reclutamiento celular de la inflamación alérgica además de mediante factores quimiotácticos, también se produce mediante la inducción de la expresión de moléculas de adhesión (ver apartado siguiente). Si a todo ello se suma a la temprana participación de los MC en la reacción alérgica, esta población celular se sitúa en un lugar privilegiado para iniciar y coordinar la inflamación.

3 ICAM-1 y selectina P en las enfermedades alérgicas

Las moléculas de mayor relevancia en la formación del infiltrado celular en la inflamación alérgica son cuatro: la selectina P, la selectina E, el ICAM-1 y el VCAM-1¹⁹⁻²¹.

La selectina P se encuentra almacenada en los corpúsculos de Weibel-Palade de las células endoteliales y es rápidamente translocada a la superficie tras su activación. Allí se expresa de manera transitoria y aproximadamente a los 30 minutos se internaliza para ser reutilizada más tarde, o bien se degrada. Además, también puede ser inducida su síntesis *de novo*²², por ello su expresión se regula tanto en la fase de transcripción (mRNA) como en la de traducción (proteína). Como ya se ha comentado anteriormente, la selectina P es importante en el inicio del reclutamiento del infiltrado inflamatorio ya que permite el enlentecimiento reversible (*rolling*) de las células que pasan sobre el endotelio activado, facilitando la posterior adhesión de estas células. Sin embargo, también se ha visto que en el caso de la inflamación alérgica la expresión de esta molécula de adhesión puede mantenerse durante períodos prolongados²³, permitiendo el *rolling* selectivo de los eosinófilos²⁴ o incluso su adhesión a CE²⁵. En pacientes con asma alérgica se ha visto que los

neutrófilos y los eosinófilos expresan más ligando de selectina P (PSGL-1) y por tanto pueden ser reclutados mediante la unión a su molécula de adhesión hasta tres veces más que los leucocitos de pacientes control²⁶. En la piel inflamada de pacientes con DA se ha visto que la interacción de los eosinófilos con la selectina P es mayor²⁷, y se ha observado una mayor expresión de esta molécula de adhesión^{19,28,29}. Una estrategia terapéutica experimental antiasmática recientemente planteada consiste en prevenir el reclutamiento del infiltrado inflamatorio mediante antagonistas de PSGL-1 (ligando de la selectina P), entre otros³⁰. Además, en modelos de ratón de hiperreactividad bronquial en los que se delectona o bien se elimina (knockout, K.O.) el gen de la selectina P, la acumulación de eosinófilos disminuye en un 70% y un 90% respectivamente, y esto se refleja a su vez en una disminución de la hiperreactividad bronquial y de la inflamación peribronquial^{26,31}. En un modelo de inflamación cutánea mediada por IgE en el ratón se puede inhibir significativamente el infiltrado de neutrófilos y eosinófilos utilizando ratones K.O. para selectina P³² o bien mediante un anticuerpo anti-selectina P³³.

El ICAM-1 es una molécula de adhesión que se expresa constitutivamente en las CE aunque con diferente intensidad según el órgano en el que se encuentre². La expresión de ICAM-1 se incrementa en reacciones de inflamación alérgica ya sea de tipo cutáneo³⁴ o respiratorio^{2,21,35}. Su función en el reclutamiento celular es permitir la firme adhesión de los leucocitos a las CE y la trans migración hacia el foco inflamatorio. De acuerdo con esto, se ha observado que en un modelo de ratón deficiente en ICAM-1 la adhesión firme de los leucocitos se encuentra inhibida³⁶. También se ha visto que su expresión es necesaria para la migración de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos a lugares de inflamación. Prueba de ello es el hecho de que la expresión de ICAM-1 en el endotelio pulmonar se correlaciona con la máxima infiltración de leucocitos en pacientes con asma alérgico³⁷. Además, en el modelo de ratón deficiente en ICAM-1 el reclutamiento de eosinófilos se ve muy disminuído (60%) respecto a ratones control³⁶. El ICAM-1 se ha estudiado ampliamente en individuos atópicos y se ha visto que en pacientes con asma alérgico o con DA su

concentración sérica y su expresión en membrana son superiores a los encontrados en individuos sanos^{28,29}. Por esta razón el ICAM-1 constituye una diana terapéutica interesante³⁸. Así por ejemplo, en pacientes con rinitis, rinoconjuntivitis o bien asma alérgico en los que se ha probado inmunoterapia u otros tratamientos, se observa que la mejoría sustancial en los síntomas alérgicos se acompaña de una disminución en la expresión de ICAM-1³⁹⁻⁴¹.

De entre las diversas moléculas de adhesión que participan en el reclutamiento celular en un proceso inflamatorio, destacan la selectina P y el ICAM-1. Parece lógico pensar que sin la expresión de estas dos moléculas de adhesión el establecimiento del infiltrado inflamatorio no se produciría. Así, en un modelo experimental de ratón deficiente en selectina P y en ICAM-1 se ha visto que en procesos inflamatorios la migración celular disminuye notablemente^{36,42}. Por ejemplo, en el caso de una inflamación alérgica se vio que los eosinófilos rodaban más rápidamente porque no se enlentecía (*rolling*) eficientemente su paso sobre las CE activadas. Además, los eosinófilos carecían de adhesividad y en conjunto la ausencia de selectina P e ICAM-1 acababa dando lugar a una inhibición marcada del reclutamiento eosinofílico³⁶. Todos estos indicios sustentan la idea de que ambas moléculas de adhesión pueden ser importantes en el desarrollo de enfermedades alérgicas como la DA y el asma.

4 La relación de los mastocitos con la selectina P y el ICAM-1: importancia del TNF- α

La participación de los MC en el inicio del reclutamiento celular en la inflamación alérgica puede producirse mediante factores quimiotácticos y también mediante la inducción de moléculas de expresión. El primero en relacionar a los MC activados con las moléculas de adhesión fue el grupo de Klein⁴³ quien demostró que la desgranulación de los MC perivasculares daba lugar a la inducción de selectina E en la microvasculatura. Más tarde se demostró que esta inducción era fundamentalmente debida al TNF- α liberado

por los MC cutáneos activados^{44,45}. Más tarde, de Mora y cols.³² describieron que el reclutamiento de neutrófilos en una reacción inflamatoria mediada por IgE se producía por la acción de los mediadores mastocitarios al inducir la expresión de selectinas P y E. Concretamente, respecto a la selectina P, se sabe que la histamina promueve su translocación y el enlentecimiento leucocitario posterior^{46,47}. Recientemente se ha descrito que en ratones K.O. para el receptor H₁ de la histamina, en situación de conjuntivitis alérgica, el infiltrado inflamatorio característico de la LAR no se forma, y se ha demostrado en el mismo estudio que la formación de este infiltrado en el que sobretodo predominan los eosinófilos es mediado por selectina P a través del receptor H₁ de la histamina⁴⁸.

De la actividad de los mediadores de MC se sabe que en el ratón, la serotonina y algunos mediadores derivados de los lípidos de membrana como el LTC₄¹¹ y el PAF⁴⁹ también inducen la expresión de selectina P en las CE. Recientemente se vio en un modelo de inflamación cutánea en el ratón que la migración de neutrófilos producida por la inyección intradérmica de LTB₄ e IL-8 se reducía en más del 50% en presencia de un anticuerpo anti-selectina P⁵⁰, lo cual demuestra una vez más la importancia de esta molécula de adhesión para la instauración del infiltrado inflamatorio.

Además de estos mediadores, los MC también producen y secretan varias citocinas que pueden desencadenar la síntesis *de novo* de selectina P. Entre ellas, el TNF- α es capaz de inducir la expresión de esta selectina en diferentes especies: el ratón⁵¹, el perro², la vaca²² y el cerdo^{25,52}. En el hombre los datos son contradictorios^{25,52}. La citocina IL-4 también promueve la expresión de mRNA y de proteína de selectina P almacenada, pero esto no se traduce en un aumento tan marcado de la proteína en superficie²³ y actúa más lentamente que el TNF- α ⁵². La IL-13 es una citocina que en general produce efectos similares a la IL-4 y que también es producida y secretada por MC activados de manera inmunológica⁵³ y no inmunológica^{54,55}. Esta citocina estimula la síntesis de selectina P y como consecuencia se ha observado que favorece la adhesión

selectiva de los eosinófilos²⁵, las células predominantes en la inflamación alérgica.

Respecto al ICAM-1, se ha visto que la desgranulación de MC mediante el compuesto 48/80 induce el aumento de su expresión en el endotelio entre 2 y 4 horas después de la estimulación, coincidiendo con la máxima infiltración celular⁵. En cuanto a los mediadores mastocitarios, se ha sugerido que la histamina podría, de manera sinérgica con otros mediadores, estar ayudando a la inducción del aumento de ICAM-1⁵⁶. Del TNF- α se conoce su capacidad de estimular las CE (con diferencias entre especies) y ésto se refleja en el aumento de expresión, entre otras moléculas de adhesión, de ICAM-1⁵⁷. Se ha visto que activando CE o bien células epiteliales con sobrenadantes de MC activados se puede inducir la expresión de ICAM-1 y en los dos casos esta reacción se bloquea añadiendo un anticuerpo anti-TNF- α ^{58,59}. Además, se sabe que otras citocinas liberadas por los MC como son IL-1 e IFN- γ promueven un aumento del ICAM-1 en las CE⁶⁰.

Parece evidente que los MC por su elevado contenido en variedad de mediadores y su presencia en múltiples tejidos, son células muy versátiles y que se encuentran implicadas en muchos procesos patológicos, especialmente en los procesos alérgicos mediados por IgE.

5 El modelo canino de atopia

La DA canina es la segunda causa más común de prurito en el perro⁶¹ y es la enfermedad alérgica canina mayoritaria, ya que rara vez la atopia se manifiesta como un proceso alérgico que afecte a las vías respiratorias (rinitis, asma) o a la conjuntiva⁶².

Para estudiar en detalle los mecanismos moleculares y celulares de los procesos alérgicos se utilizan diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*, tanto

humanos como animales. Existen muchas similitudes fisiopatológicas y clínicas entre la DA humana y la canina: predisposición genética, sensibilidad a alérgenos ambientales (normalmente son los mismos, dado que comparten el mismo espacio físico), producción de anticuerpos sensibilizantes, aumento en la concentración de mediadores sistémicos y cutáneos, y propensión a desarrollar infecciones bacterianas epidérmicas y foliculares. Los perros con DA espontánea son por lo tanto, un buen modelo para el estudio de procesos alérgicos porque permite aportar valiosos datos sobre el comportamiento de células y la inducción de moléculas sin necesidad de manipulación previa por parte del experimentador. Además, para los experimentos *in vivo* también se dispone del modelo de dermatitis alérgica en perros Beagle espontáneamente hipersensibles a *Ascaris suum*. Se trata de un modelo animal de alergia que ha sido ampliamente utilizado, sobretodo en los años 80⁶³⁻⁶⁵. En estos perros, los títulos de IgE frente a antígeno (Ag) de *Ascaris suum* son elevados debido a que el Ag principal de *Ascaris suum*, Asc S1, genera reactividad cruzada con el Ag natural de *Toxocara canis* y el de *Toxascaris leonina*⁶⁶, y a que el perro se encuentra frecuentemente expuesto a estos parásitos. Cuando en estos perros se inyecta el Ag de *Ascaris* Asc S1 intradérmicamente se produce una respuesta cutánea característica. En primer lugar, se forma una pápula como consecuencia del edema (vasodilatación local) que se acompaña de eritema, esta reacción suele ser máxima a los 20 minutos y constituye la EAR. Pasadas 6 horas se observa macroscópicamente una induración como consecuencia del infiltrado celular de la inflamación alérgica, la LAR. Por lo tanto se trata de un buen modelo para el estudio de la alergia cutánea canina.

5.1 Moléculas pro-inflamatorias en la dermatitis atópica canina

Durante la fase tardía (LPR o LAR) de la DA canina se instaura un proceso inflamatorio en el que predominan los linfocitos T CD4⁺ y las células de Langerhans, y además el número eosinófilos es superior al normal^{67,68} (aunque hay cierta controversia al respecto). Son diversas las moléculas pro-

inflamatorias candidatas a coordinar el reclutamiento celular característico de estos procesos. Se sabe que la concentración de histamina en la piel de perros con DA aumenta con respecto a normales^{69,70}. El patrón de expresión de citocinas es bifásico, es decir Th₂ y Th₁^{71,72} y recientemente se ha observado en piel de perros con DA que también se expresa la quimiocina TARC y su receptor CCR4⁷³, dos moléculas implicadas en la migración de células Th₂ en procesos de inflamación alérgica en el hombre^{74,75}. Respecto a las moléculas de adhesión, han sido poco estudiadas en el perro pero se ha descrito que los niveles de expresión de proteína de selectina P en diferentes enfermedades inflamatorias de la piel (entre las que no se ha estudiado la DA) están aumentados y que se correlacionan positivamente con la acumulación del infiltrado inflamatorio⁷⁶. Dado que la selectina P es una molécula crucial en la adhesión celular, podría convertirse en una interesante diana para futuras intervenciones farmacológicas en los procesos alérgicos caninos, como ya se ha sugerido en el hombre³⁰.

Con respecto al ICAM-1, Olivry y cols.⁶⁸ han propuesto su neo-expresión en la lámina basal de los queratinocitos epidérmicos, así como un aumento de su expresión en CE dérmicas en muestras de piel lesionada de perros con DA. Sin embargo no se refieren datos cuantitativos de este marcador. La citocina pro-inflamatoria TNF- α es uno de los mayores inductores de ICAM-1 y también ha sido asociada en diversas ocasiones a procesos alérgicos espontáneos e inducidos^{77,78}. Además, en la piel el TNF- α se expresa mayoritariamente en los MC, población celular íntimamente ligada a las enfermedades atópicas y que por lo tanto, se considera un candidato potencial a desempeñar una función crucial en la inflamación alérgica canina. Se ha estudiado el grado de expresión de mRNA de TNF- α y se ha visto que se encuentra sobre-expresado en la piel lesionada de perros con DA^{71,72,79}, pero todavía no se han cuantificado los niveles de proteína de esta importante citocina pro-inflamatoria en la piel lesionada de perros atópicos.

5.2 Los mastocitos caninos y la dermatitis atópica

Hay muchas células candidatas a participar en los procesos alérgicos cutáneos caninos, la contribución individual de cada población celular se puede evaluar mediante estudios *in vitro* con suspensiones celulares. Como se ha explicado a lo largo de esta introducción los MC aparecen como una de las poblaciones celulares importantes en estos procesos puesto que pueden contribuir tanto a la fase temprana como a la fase tardía. La biología de los MC caninos comparte muchas similitudes con la de los MC humanos: los subtipos existentes, su distribución tisular, su contenido en mediadores preformados, los mediadores sintetizados *de novo* que liberan tras estimulación inmunológica (vía IgE) o no inmunológica. La homología entre alguno de estos mediadores es tal que los anticuerpos comerciales frente a las moléculas humanas pueden utilizarse frente a las caninas. Afortunadamente, para los estudios *in vitro* se dispone de líneas celulares mastocitarias caninas (inmortales)^{80,81} que facilitan su estudio, además de tener la posibilidad de trabajar con MC maduros recién aislados de la piel.

La implicación de los MC en la DA ha sido ampliamente sugerida, aunque existe controversia sobre si se encuentran en mayor número o no que en piel normal, se ha demostrado que existe una correlación en las zonas de la piel donde aparecen las lesiones cutáneas y la densidad de MC en esas regiones. Es posible que las diferencias entre individuos atópicos y no atópicos radique en la diferente funcionalidad de los MC como han sugerido algunos investigadores⁸². Así, se sabe que los MC de perros atópicos tienen mayor capacidad para liberar mediadores que los de los perros no atópicos⁷⁰. Además, Becker y cols.⁸³ propusieron que de los dos tipos de MC que se conocen según su contenido en mediadores, los que participan en la EPR son los del subtipo "atípico" o de mucosa (MMC), y los que participan en la LPR son los "típicos" o de conjuntiva (CTMC). Recientemente se ha observado que el SCF (ligando de C-kit), uno de los factores de crecimiento más importante para estas células, se encuentra aumentado en DA canina⁸⁴. A pesar de los pocos

Introducción

estudios que relacionan directamente a los MC del perro con la patogenia de la DA canina, sus características (mediadores, localización, etc.) los sitúa como una célula fundamental en su patogenia.

1 Hipótesis y objetivos

Los antecedentes bibliográficos expuestos nos permiten formular la siguiente hipótesis general:

“Los mecanismos que promueven la inflamación alérgica cutánea son muy similares en el hombre y en el perro y en ellos participan los mastocitos como células inductoras y la selectina P, el ICAM-1 y el TNF- α como moléculas pro-inflamatorias de relevancia”

Seguidamente se exponen las hipótesis específicas y los objetivos planteados para verificarlas.

Hipótesis 1

La selectina P, el ICAM-1 y el TNF- α participan en los mecanismos de instauración de la inflamación alérgica y su expresión está incrementada en las lesiones cutáneas.

Objetivo 1.1

Cuantificar la expresión de proteína de selectina P, ICAM-1 y TNF- α en biopsias de piel lesionada y no lesionada de perros con dermatitis atópica.

Hipótesis 2

Los mastocitos inducen la expresión de selectina P e ICAM-1 en células endoteliales mediante la liberación de histamina y TNF- α .

Objetivo 2.1

Evaluar el efecto de la estimulación inmunológica de los mastocitos en la expresión de moléculas de adhesión en modelos caninos *in vitro*.

Hipótesis y objetivos

Objetivo 2.2

Establecer un modelo de comunicación mastocito-célula endotelial con el fin de estudiar:

2.2.1 la capacidad de los mediadores de los mastocitos de inducir la expresión de selectina P e ICAM-1 en células endoteliales sin que se produzcan interacciones con otras poblaciones celulares,

2.2.2 la función de la histamina y el TNF- α en la inducción de selectina P e ICAM-1 en el modelo de comunicación mastocito-célula endotelial.

Hipótesis 3

La inyección intradérmica de antígeno de *Ascaris* en los perros espontáneamente hipersensibles a *Ascaris suum* induce además de una reacción inmediata, un proceso alérgico inflamatorio cutáneo y contribuye a la sensibilización inmunológica primaria.

Objetivo 3.1

Caracterizar el infiltrado inflamatorio que se produce tras la inyección de antígeno en perros espontáneamente hipersensibles a *Ascaris suum*.

Objetivo 3.2

Evaluar la expresión de selectina P tras la inyección de antígeno en perros espontáneamente hipersensibles a *Ascaris suum* a lo largo del tiempo.

Objetivo 3.3

Sensibilizar transcutáneamente perros Beagle *naïve* mediante inyecciones intradérmicas de antígeno de *Ascaris suum* y comprobar su reactividad cutánea al antígeno como futuro modelo para el estudio de la inflamación alérgica.

Material y métodos

1 Determinación de moléculas pro-inflamatorias en la piel canina

La expresión de moléculas pro-inflamatorias en la piel canina se evaluó en perros con dermatitis atópica (DA) y en fragmentos cutáneos estimulados de perros sanos

1.1 Evaluación de la expresión de moléculas pro-inflamatorias en la piel de perros con dermatitis atópica

1.1.1 *Criterios de inclusión de perros con dermatitis atópica*

Se establecieron dos grupos de 6 perros cada uno: perros con DA y perros no atópicos (control). La selección de perros atópicos se realizó en colaboración con la Unidad de Dermatología del Hospital Clínic Veterinari de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Ni en personas ni en perros se ha podido establecer ninguna característica clínica que sea patognómica de DA, por lo tanto el diagnóstico se basa en la presencia de un número mínimo de los síntomas más comúnmente asociados con la DA y el descarte de otras enfermedades. En nuestro estudio, el diagnóstico se basó en una historia clínica compatible con DA, la presencia de al menos 3 síntomas primarios y 3 secundarios de los criterios establecidos por Willemse⁸⁵ (Tabla 1) y la presencia en sangre de IgE específicas detectadas mediante el test Allerecept (Univet, Barcelona). Esta prueba *in vitro* consiste en un panel de 24 antígenos seleccionados de entre los que más comúnmente causan alergias en perros. La técnica se realiza en tres etapas, primero se pone en contacto el suero del perro (que contiene las IgE e IgG específicas) con los alérgenos que recubren los diferentes pocillos, a continuación se utiliza la cadena del receptor FcεRI marcada enzimáticamente para detectar las IgE alérgeno-específicas y por último se revela la reacción añadiendo el cromógeno⁸⁶.

Síntomas primarios

- Prurito
- Morfología y distribución típica:
Participación facial y/o digital
Liquenificación de la superficie flexora de la unión tarsal y/o la superficie extensora de la unión carpal
- Dermatitis crónica o crónica-recidivante
- Historia individual o familiar de atopía y /o predisposición racial

Síntomas secundarios

- Aparición de los primeros síntomas antes de los 3 años
- Eritema y quelitis facial
- Conjuntivitis bacteriana
- Hypoderma superficial de *Staphylococcus sp*
- Hiperhidrosis
- Test intradérmico a alérgenos positivo inmediato
- Concentración elevada de IgE alérgeno-específicas en suero
- Concentración elevada de IgG alérgeno-específicas en suero

Tabla 1. Criterios clínicos de diagnóstico de la dermatitis atópica canina según T. Willemse⁸⁵.

En la primera visita se hizo un examen citológico por impronta de diferentes zonas del lomo, abdomen y extremidades para detectar la posible presencia de *Malassezia*, infección bacteriana superficial y sobrecrecimiento bacteriano (BOG). Se consideró clínicamente relevante un número superior a 10 *cocci* por campo microscópico de 100x. En estos casos se trató a los animales con cefalexina (Rilexine 300, Virbac, 1 tableta/20Kg dos veces al día) durante 2 semanas y pasado este tiempo se volvió a evaluar el crecimiento bacteriano. También se hicieron raspados de piel y se excluyeron aquellos perros en los que se encontraron parásitos. Para realizar un diagnóstico diferencial de alergia alimentaria y alergia a las pulgas, todos los perros fueron sometidos a una dieta de eliminación casera de carne de caballo y patata o bien una dieta comercial (H&A de Purina) a la vez que a un tratamiento anti-pulgas durante 8 semanas. En aquellos animales en los que no se observó mejoría del prurito pudo descartarse hipersensibilidad alimentaria y alergia

a las pulgas. Solamente se seleccionaron perros que no hubieran sido tratados con anti-inflamatorios o anti-alérgicos durante un mínimo de tres semanas. Todos los procedimientos fueron aprobados por consentimiento escrito de los propietarios de los perros.

Los perros utilizados como grupo control se seleccionaron de entre los animales que acudieron al Hospital para ser esterilizados, en los que tras un examen dermatológico y una encuesta a los propietarios no se encontró ni historia, ni síntomas clínicos de prurito. Cabe destacar que por el tipo de intervención quirúrgica a la que fueron sometidos (ovariohisterectomía en el caso de hembras y castración en el caso de machos) estos perros fueron previamente anestesiados con acepromacina (0.05mg/Kg I.M.), buprenorfina (10µg/10Kg I.M.) usando como inductor tiopental (10mg/Kg I.V.) y finalmente para el mantenimiento halotano al 2%.

1.1.2 *Obtención de las muestras de piel*

Las muestras de piel se obtuvieron con punzón de 8mm² de diámetro. En los perros atópicos se tomaron dos biopsias tras aplicar anestesia local con lidocaína 2%, una muestra de la zona lesionada y otra de la zona no lesionada. De los perros control solamente se tomó una biopsia en condiciones de anestesia general antes de empezar la intervención quirúrgica.

Cada biopsia de piel se dividió en 2, una parte era incluida en OCT y rápidamente congelada en isopentano frío (previamente enfriado con N₂ líquido) y conservada a -80°C hasta su procesamiento con el criostato, la otra parte de la biopsia se fijó en una solución tamponada de formol al 10% durante toda la noche y se procesó al día siguiente en un incluser automático. El robot preparó las muestras para su posterior inclusión en

parafina. Para ello, fueron primero deshidratadas sumergiéndolas en una batería de alcoholes (70%, 96%, 100%, xilol) y después en parafina líquida. Este proceso duró 16 horas. Posteriormente las muestras se extrajeron del inclusor, se embebieron en parafina líquida (caliente) y rápidamente se introdujeron en un congelador de -20°C para la solidificación del bloque. Estos bloques se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

1.1.3 *Evaluación histológica de las biopsias de piel de perros con dermatitis atópica*

Para el análisis histológico se obtuvieron secciones de $5\mu\text{m}$ de los bloques de parafina, se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron examinados por un dermatopatólogo. Ésta evaluaba, entre otras características histológicas, el grado de inflamación en cada sección, así como el tipo de células que componían los infiltrados inflamatorios. Como referencia se utilizó una muestra de los archivos históricos del Departamento de Anatomía Patológica de un perro con DA crónica, además de datos publicados.

1.1.4 *Inmunohistoquímica de selectina P, ICAM-1 y TNF- α*

Mediante inmunohistoquímica se determinó la presencia de proteína de selectina P, de ICAM-1 y de TNF- α en la piel según el método indirecto del complejo avidina-biotina (ABC, Pierce). Puesto que la tinción mediante esta técnica dura 24 horas, las secciones deben estar sobre portas pre-tratados con poli-L-lisina para asegurar su adherencia firme durante el proceso. Previamente a la tinción se desparafinaron los portas tratándolos con xilol (6 min, 3 veces), con alcohol absoluto (3 min, 2 veces) y por último con alcohol 96% (3 min, 2 veces). Antes de empezar la tinción se

hicieron tres lavados de 5 min con solución salina tris-tamponada (TBS) a un pH de 7.5. En todas las muestras se bloqueó la biotina endógena mediante un kit específico de Vector y también se bloquearon posibles uniones inespecíficas utilizando suero del mismo animal del cual procedía el anticuerpo secundario (caballo o cabra). De forma resumida, la inmunohistoquímica consistió en una incubación durante toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario, seguido de una incubación con anticuerpo secundario biotinilado durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último la reacción se revelaba con ABC marcado enzimáticamente. Se utilizó un control negativo, permitiendo así descartar la posible unión inespecífica del anticuerpo primario. Para una mejor visibilidad posterior de la muestra se contrastaron todas las preparaciones brevemente (5 segundos) con hematoxilina. Para finalizar, tras ser deshidratadas se cubrieron con un medio de montaje hidrófobo (DPX) que permite almacenar las muestras durante largos períodos de tiempo sin alterar el color del pigmento. A continuación se detalla la técnica que se utilizó para cada molécula analizada.

La selectina P se analizó en secciones de parafina de 8µm y antes de empezar la inmunotinción se bloqueó la peroxidasa endógena incubando las secciones con metanol al 1% H₂O₂ durante 30min. Se utilizó el anticuerpo primario anti-selectina P canina MD3 diluído 1/10 (donado por la Dra. M. Doré, Universidad de Montréal, Canadá), seguido de un anticuerpo secundario biotinilado de caballo anti-IgG de ratón (Vector). El complejo ABC estaba unido a la enzima peroxidasa (Pierce). Como sustrato para la reacción enzimática se utilizó DAB (diaminobenzidina) enriquecido con iones metal. Tras diversas pruebas se vio que un tratamiento enzimático con proteasa XIV a 37°C durante 8min ayudaba a desenmascarar el antígeno antes de la incubación con el anticuerpo primario.

La tinción para ICAM-1 se hizo en secciones congeladas obtenidas mediante criostato. El anticuerpo primario utilizado fue el CL18/1D8, monoclonal específico para ICAM-1 canino donado por el Dr. M.L. Entman (Baylor College of Medicine, Houston, USA), seguidamente se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado de caballo anti-IgG de ratón (Vector). En esta ocasión el complejo ABC utilizado para el revelado estaba unido a la enzima fosfatasa alcalina (Pierce) y como sustrato se utilizó el cromógeno Fast-Red-Naphtol AS MX-levamisol (Sigma).

La inmunotinción para TNF- α canina se realizó en secciones de parafina. En primer lugar, para desenmascarar el antígeno se hizo un pre-tratamiento con 0.1% de proteasa XIV. El anticuerpo primario fue un policlonal de conejo anti-TNF α humano diluido 1/500 (IP-300, Genzyme, Cambridge, USA) que reconoce la molécula canina⁸⁷. En este caso el anticuerpo secundario fue de cabra anti-IgG de conejo (Vector), el complejo ABC estaba unido a fosfatasa alcalina y el sustrato fue Fast-Red-Naphtol AS MX-levamisol.

1.1.5 *Cuantificación de la expresión de selectina P, ICAM-1 y TNF- α en la piel de perros con dermatitis atópica*

La cuantificación de la expresión de las moléculas pro-inflamatorias detectadas se hizo a ciegas por dos observadores independientes. Los resultados se expresaron en número de vasos positivos (selectina P e ICAM-1) o de células positivas (TNF- α) por campo microscópico a 40 aumentos (40x).

El recuento de cada observador se hizo de la siguiente manera: las células o vasos positivos de tres zonas diferentes de la dermis tomadas al azar se contaron dos veces (por separado) a 40x. Se calculó la media de las tres zonas contadas y dado que las diferencias entre los recuentos de los dos

observadores no diferían en más de un 10%, el resultado final supuso la media de los datos de ambos.

El análisis estadístico se hizo utilizando el test de *t*-Student para datos apareados para comparar muestras de piel lesionada y no lesionada de los mismos perros y para datos no apareados cuando se compararon las muestras de perros atópicos con las del grupo control.

Además de este recuento de vasos y células positivas, también se analizó en detalle la intensidad de cada tinción y la localización celular y tisular de cada molécula pro-inflamatoria en los diferentes grupos de muestras. Se evaluaron tres campos a 40x en cada zona de la dermis (superficial, media, profunda) de cada biopsia. Este análisis fue un estudio ciego, es decir, que el observador desconocía la identidad de las muestras que evaluaba.

1.2 Evaluación de la expresión de moléculas de adhesión en fragmentos cutáneos caninos estimulados

Con la finalidad de determinar la expresión de moléculas de adhesión inducidas por MC en la piel canina, se planteó la realización de un estudio con fragmentos de piel estimulados vía IgE y también estimulados de forma no inmunológica (como control positivo de la técnica). Para valorar la expresión de las moléculas se determinaron los niveles de mRNA específico para moléculas de adhesión respecto de los detectados para un gen de expresión constitutiva, el GAPDH.

1.2.1 *Obtención de fragmentos cutáneos*

En perros sanos recién sacrificados se afeitó y desinfectó la zona abdominal y se tomaron muestras de piel de entre 2 y 4g. El tejido se

mantuvo en medio estéril con antibióticos (penicilina y estreptomina) y a 4°C hasta su posterior manipulación en la campana de flujo laminar.

Antes de ser troceada, cada muestra se lavó en medio completo DMEM 3 veces (DMEM+5% FCS+1% Penicilina/ Estreptomina), se puso en una placa de Petri y se eliminó el tejido adiposo con tijeras. Se pesó cada muestra y se cortaron los fragmentos con un bisturí. Los fragmentos obtenidos (aproximadamente 0.5-1mm³) se lavaron intensamente dos veces con medio completo DMEM antes de ser activados. Cabe destacar que dada la consistencia de la piel, el troceado de la misma es fundamental para facilitar el acceso de los reactivos a los MC.

1.2.2 *Sensibilización y activación de mastocitos en fragmentos cutáneos*

Para desencadenar una estimulación mediada por IgE se requiere de una sensibilización previa. Los fragmentos cutáneos se repartieron en dos placas de Petri, una con medio completo suplementado con un 20% de suero canino rico en IgE y la otra con medio conteniendo el mismo suero canino inactivado (control negativo) por calor para desnaturizar las IgE (56°C, 4 horas). Se incubaron los fragmentos con o sin IgE durante toda la noche a 37°C.

Tras 16 horas de incubación se lavaron dos veces los fragmentos cutáneos de ambas placas mediante agitación suave, intentando eliminar el exceso de IgE. Aproximadamente se distribuyeron 400mg de piel en cada tubo (de 1.5ml) y los fragmentos fueron estimulados con anti-IgE durante 2 horas a 37°C en un baño en agitación. Para determinar la condición óptima de activación de los MC cutáneos se probaron diferentes concentraciones de anti-IgE (1µg/ml, 3µg/ml, 10µg/ml, 30µg/ml, 50µg/ml). Con el fin de medir la actividad basal de los MC, en dos tubos no se añadió el estímulo. Todas las condiciones se hicieron por duplicado. Tras la incubación se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -20°C para determinar posteriormente la cantidad de histamina liberada. Los

fragmentos se congelaron inmediatamente con N₂ líquido, manteniéndose a -80°C hasta su utilización para la detección de moléculas de adhesión. Paralelamente, se estimularon algunos fragmentos de piel con 5µg/ml de LPS durante diferentes tiempos (30min, 2h, 4h, 16h) como control positivo.

1.2.3 Determinación de la histamina liberada

Para verificar la eficiencia de la estimulación de los MC se determinó la histamina liberada. Para ello se utilizó el método clásico descrito por Shore y cols.⁸⁸, que se describe brevemente a continuación. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos con 0.6 g de NaCl, a los que se añadió 1 ml de PCA (0.4 N), 0.25 ml de NaOH (5 N) y 2 ml de butanol. La solución resultante se agitó intensamente y se centrifugó a 600rcf durante 10 minutos. La fase orgánica superior se transfirió a tubos con 1.5 ml de NaOH (0.1 N) y se agitó; seguidamente se añadió 1.3 ml de HCl (0.1 N) y 1.9 ml de n-heptano y se volvió a agitar. Finalmente, en la solución quedaron dos fases, la superior se descartó y la inferior (acuosa) se alcalinizó añadiendo 200 µl de NaOH (0.1 N). La histamina se derivatizó con 50 µl de dialdehído oftálico (OPT) (10 mg/ml metanol) durante 4 min a temperatura ambiente. La reacción histamina-OPT se paró a un pH de 3.5 por adición de 50 µl de H₃PO₄ (2.5 N). Se determinó la presencia de histamina mediante fluorimetría excitando la solución a 345 nm y midiendo la fluorescencia resultante a 435 nm.

Cálculo de la histamina neta liberada: La determinación de la histamina en los sobrenadantes se hizo con la ayuda de una curva estándar de concentraciones conocidas de histamina. La histamina liberada por los fragmentos de piel estimulados se expresó como el incremento de histamina con respecto a la espontáneamente liberada por los fragmentos no estimulados, normalizando así los resultados obtenidos en experimentos diferentes.

$$\text{incremento de Hm} = \frac{\text{Hm liberada por fragmentos estimulados}}{\text{Hm liberada por los fragmentos no estimulados}}$$

(Hm equivale a concentración de Histamina)

1.2.4 *Determinación de moléculas de adhesión en fragmentos cutáneos mediante RT-PCR*

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar las moléculas de adhesión caninas selectina E, selectina P, ICAM-1 y VCAM-1. También se diseñaron oligonucleótidos para β -actina y GAPDH caninos, con el fin de tener un control interno de la técnica (se asume que ambos genes son de expresión constitutiva). El diseño de los oligonucleótidos se hizo teniendo en cuenta las secuencias ya descritas en el perro para algunas de las moléculas. Para otras hubo que recurrir a las zonas más conservadas de entre las homólogas de diferentes especies que ya estuvieran secuenciadas.

Se extrajo el RNA total de las muestras de piel con Tri-Reagent, se hizo la transcripción inversa de 5 μ g de RNA total de cada muestra con 10U de MMLV y 0.5 μ g de OligodT y se procedió a la amplificación por PCR de las moléculas citadas a continuación: VCAM-1, selectina E, ICAM-1, selectina P, β -actina y GAPDH. En todas ellas la reacción duró 35 ciclos en un volumen final de 50 μ l, conteniendo 1U de polimerasa y 5 μ M de nucleótidos. Para todas las moléculas amplificadas la desnaturalización se hizo a 95°C durante 1min y la extensión a 72°C durante 1 min. El resto de componentes y condiciones se optimizó para cada molécula tal y como se resume en la Tabla 2.

	Concentración de MgCl ₂	Cantidad de oligonucleótidos	Temperatura de hibridación
VCAM-1	1.5 mM	10 pmoles	50 °C
Selectina-E	1.5 mM	10 pmoles	50 °C
ICAM-1	2.5 mM	20 pmoles	50 °C
Selectina-P	2.5 mM	10 pmoles	50 °C
β-actina	3 mM	10 pmoles	55 °C
GAPDH	1.5 mM	10 pmoles	55 °C

Tabla 2. Condiciones experimentales específicas para la reacción de PCR, optimizadas para cada molécula

2 Determinación de moléculas pro-inflamatorias inducidas en la interacción mastocito-célula endotelial

Para evaluar la capacidad de los MC para inducir la expresión de moléculas de adhesión nos propusimos activar directamente las CE mediante mediadores mastocitarios. Para ello hubo que disponer previamente de ambas poblaciones celulares por separado: MC caninos y CE también de origen canino.

2.1 Puesta a punto del modelo de comunicación MC-CE

2.1.1 *Aislamiento de células endoteliales caninas*

Las CE utilizadas en este estudio se obtuvieron de la arteria carótida de perros recién sacrificados (CCEC). Antes de proceder a la disección se desangró el animal mediante punción en la yugular. Tras la localización de la vaina carotídea (yugular interna, tronco vago-simpático y carótida) se extrajo el paquete neurovascular dejando en el animal la vena yugular

interna. Se procedió de la misma manera para la otra carótida y ambas arterias (5-6cm de longitud cada una) se mantuvieron en PBS con antibióticos a 4°C hasta su manipulación bajo la campana de flujo laminar (Figura 1). Se diseccionó y eliminó el nervio vago, ambas carótidas se limpiaron de tejido conjuntivo y adiposo y se lavaron en PBS con antibióticos. A continuación se lavó muy lentamente el interior del vaso para eliminar pequeños coágulos (PBS 37°C). Se hizo una ligadura en uno de los extremos y se introdujo una solución 0.1% de colagenasa tipo I en medio M199, se cerró el otro extremo y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Pasado este tiempo se recogió la solución enzimática en medio completo M199 (M199+20%FCS+Hepes 25mM). Muy suavemente se pasó medio por el interior de los vasos para recoger posibles CE casi desprendidas y se añadió a la suspensión celular anterior. La suspensión celular se centrifugó a 400rcf durante 10 minutos y se resuspendió en un medio de crecimiento, que tiene como base el medio completo M199 añadiéndole 30µg/ml de ECGS y 50µg/ml de heparina. A continuación se representa esquemáticamente el proceso de aislamiento de CE.

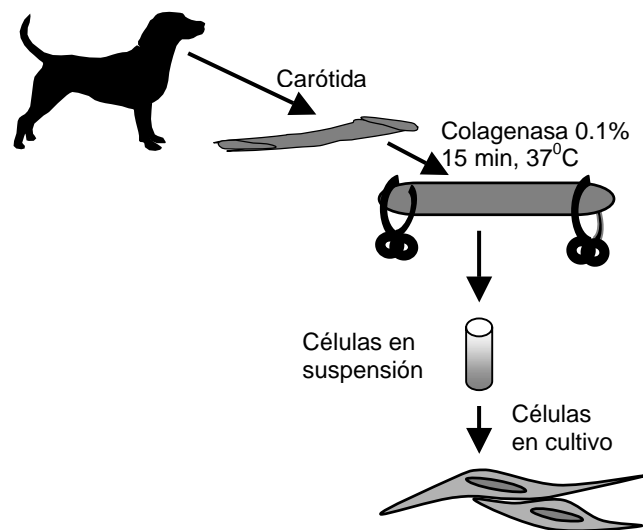


Figura 1. Proceso de aislamiento de células endoteliales de la carótida de perro.

Inicialmente, las células se cultivaron en dos o tres pocillos de una placa de 12 pocillos previamente gelatinizados. Entre las 3 y 4 primeras horas de incubación las células que no se adhirieron a la placa se descartaban con el primer cambio de medio. Cuando las células formaban una monocapa confluyente (normalmente a los 4-5 días del cultivo) se expandían dividiéndolas a razón de 1:3. Para ello hubo que despegar las células de la placa mediante un tratamiento enzimático con tripsina tamponada. Tras haberlas expandido 4 veces (pase 4) se congelaron todas las células (10^6 /ml) en N_2 líquido hasta su posterior manipulación. En total se aislaron células de tres perros diferentes (para los experimentos solamente se utilizaron células de dos lotes de aislamiento).

2.1.2 *Caracterización inmunocitoquímica de las células endoteliales caninas*

Para caracterizar las CE recién aisladas se hizo una inmunotinción para CD31 (PECAM) y otra para selectina P, ya que se sabe que ambas moléculas se encuentran de forma constitutiva en CE y no en células musculares (posibles contaminantes del cultivo).

Antes de la tinción, las células se centrifugaron (35rcf, 6min) sobre portas de vidrio (procedimiento conocido como citocentrífuga) tratados con suero para facilitar la adhesividad de las células. Entonces se conservaron a oscuras y a $-80^{\circ}C$ en presencia de gel de sílice para evitar su humidificación, se mantuvieron así hasta su uso. La técnica de inmunohistoquímica utilizada es muy similar a la usada para moléculas pro-inflamatorias en secciones de piel de perros atópicos y control (apartado 1.1.4) por lo que aquí únicamente se comentarán las diferencias específicas.

Antes de proceder a la tinción, las células centrifugadas se fijaron en formaldehído frío al 4% durante 10min y a $4^{\circ}C$ y tras lavar las preparaciones 3 veces se procedió a la inmunotinción. El anticuerpo primario que se utilizó para CD31 es un policlonal de conejo anti-CD31

humano (JC70, Dako, Dinamarca) y para selectina P el anticuerpo MD3, descrito en el apartado 1.1.4.

2.1.3 *Activación de mastocitos caninos*

Para obtener sobrenadantes ricos en mediadores mastocitarios se estimularon células de la línea C₂, establecida a partir de un mastocitoma canino⁸⁰. El tipo de estimulación utilizado fue independiente de IgE. La densidad celular a la que se hizo el experimento fue de 2×10^6 /ml en un volumen total de 3ml de DMEM+5%FCS. El cultivo se hizo en placas de 6 pocillos con 50ng/ml de PMA y 0.3 μ M de A23187. La activación se hizo a diferentes tiempos: 30min, 5h y 24h. A cada uno de estos tiempos se recogía el sobrenadante y se congelaba a -20°C. Se recogió también el sobrenadante de mediadores espontáneamente liberados por MC en reposo (actividad mastocitaria basal).

En estos sobrenadantes se midió la concentración de histamina y de TNF- α liberados por MC tanto estimulados como no estimulados (liberación espontánea). La medición de histamina se hizo mediante un inmunoensayo competitivo comercial (Immunotech, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras modificar la histamina presente en los sobrenadantes mediante un proceso de acilación, se incubaron las muestras junto con histamina acilada conjugada a fosfatasa alcalina (ELISA de competencia) en pocillos recubiertos de anticuerpos que reconocen la histamina modificada. Tras 2 h de incubación a 4°C, se lavaron los pocillos 3 veces y se incubó con el cromógeno para-nitrofenilfosfato (pNPP) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se paró la reacción con una solución de NaOH y se leyó la placa a 405nm. La curva estándar que se procesó paralelamente con las muestras permitió saber la concentración de histamina en nM. En este tipo de ensayo inmunológico, cuanto menor es la densidad óptica indica mayor cantidad de histamina presente en los sobrenadantes de MC

ya que compete con la histamina marcada y disminuye la coloración final (la histamina marcada es la que reacciona con el sustrato).

Se determinó también proteína y mRNA de TNF- α . La proteína de esta citocina pro-inflamatoria se detectó mediante un bioensayo de citotoxicidad de fibroblastos L929⁸⁹. Brevemente, se incubaron 50 μ l de cada sobrenadante durante 18-20 horas a 37°C en placa de 96 pocillos donde había una monocapa de fibroblastos. Al día siguiente se añadieron 10 μ l de una solución de 5mg/ml de bromuro de tetrazolio (MTT) y a las 4 horas se agregaron 50 μ l de dimetilformamida (DMF). Se incubó toda la noche a 37°C y al día siguiente se midió la densidad óptica a 570nm. La curva estándar que se procesó paralelamente con las muestras permitió medir la concentración de TNF- α en pg/ml. En este bioensayo la densidad óptica es mayor en las muestras (en este caso sobrenadantes) con mayor cantidad de TNF- α , ya que produce mayor citotoxicidad.

El mRNA de TNF- α se detectó mediante RT-PCR. Para analizar la cinética de síntesis de TNF- α se estimularon MC C₂ con PMA e ionóforo a diferentes tiempos (30min, 1h, 2h, 3h y 4h), paralelamente se mantuvieron células sin estimular que se recogían a los mismos tiempos que las anteriores. Se extrajo RNA total de las células con el kit comercial Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se retrotranscribieron 800ng de RNA total de cada muestra como en el apartado 1.2.4 y para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos específicos para TNF- α canino, utilizando también el control interno de GAPDH.

2.1.4 Activación de células endoteliales mediante mediadores mastocitarios

Para estimular las CE primero se descongelaron y se cultivaron las CE del pase 4 utilizando placas de 24 pocillos previamente gelatinizados. Cuando

la confluencia fue de un 85% (aproximadamente) se aspiró el medio y se añadieron los sobrenadantes obtenidos de la estimulación de los MC caninos C₂. La incubación se hizo durante 16 horas a 37°C. Las últimas 48 horas del cultivo (incluida la estimulación) se hicieron en presencia de polimixina B (50µg/ml) para inhibir el efecto de posibles endotoxinas endógenas ya que también podrían activar las CE.

Para una mejor interpretación de los resultados se hicieron tres tipos de controles. En primer lugar se incubaron células con el sobrenadante de MC en reposo para ver si la actividad basal de los MC podía activar las CE. Además, se incubaron algunas células directamente con 50ng/ml PMA y 0.3µM A23187 para ver si el estímulo utilizado para los MC podía por sí solo inducir la expresión de moléculas de adhesión en las CE. Por último, se estimularon con 100ng/ml de LPS como control positivo de la técnica y también para tener una referencia con la que comparar la intensidad de la fluorescencia obtenida con los sobrenadantes mastocitarios.

2.1.5 *Inhibición de la histamina y el TNF-α en los sobrenadantes de mastocitos estimulados*

Para averiguar si la histamina y el TNF-α eran responsables de la inducción de las moléculas de adhesión, se inhibió su acción (cada uno por separado) y se utilizaron estos sobrenadantes para estimular las CE.

El bloqueo del TNF-α de los sobrenadantes se hizo por adición del anticuerpo policlonal anti-TNF-α de ratón neutralizante (este anticuerpo reconoce la molécula canina). La incubación del sobrenadante con el anticuerpo 1/1000 se hizo a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, con estos sobrenadantes tratados se determinó de nuevo la presencia (en este caso ausencia) de TNF-α mediante bioensayo. Por otro lado, para bloquear los receptores H₁ de las CE se incubaron estas células durante

20 minutos con una solución 10^{-6} M de loratadina (antihistamínico- H_1) antes y durante la activación.

2.2 Expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales caninas

2.2.1 *Determinación de ICAM-1 y selectina P en CE mediante citometría de flujo (FACS)*

Se incubaron las células con los sobrenadantes de los MC (ver apartado anterior) y pasadas las 16 horas de estimulación se aspiró el medio de los pocillos. Inmediatamente se despegaron las células de cada uno de ellos mediante una muy breve proteólisis enzimática (tripsina). Desde este punto toda la técnica se realizó a 4°C para evitar la internalización de las moléculas expresadas en la superficie celular. Se recogieron las CE y se centrifugaron en frío con el tampón de lavado para citometría de flujo (PBS+0.1%BSA+0.1%Azida sódica). Las células de cada pocillo se repartieron en tres tubos de tinción para poder realizar en cada población celular tres marcajes diferentes. La tinción se hizo para ICAM-1 (CL18/1D8) y selectina P (MD3) incubando las muestras con el anticuerpo primario correspondiente ($10\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos en hielo. Además, se tiñó con un anticuerpo primario de especificidad irrelevante y con el mismo isotipo que el de las moléculas anteriores, siendo en ambos casos IgG_1 . Así, el control de isotipo era el control negativo de la tinción y permitió discernir la unión específica e inespecífica del anticuerpo secundario. Se lavaron dos veces en frío y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con FITC durante 30 minutos, a oscuras y a 4°C . Se volvieron a hacer dos lavados y se fijaron con una solución PBS+1%PFA en frío. Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur mediante el programa CellQuest (ambos de Becton Dickinson, USA).

El análisis de las células en el citómetro de flujo permite la medición simultánea de varias características físicas de una célula individual. Estas mediciones se toman mientras las células pasan por un flujo laminar fluido (500-4000 células/segundo). La interacción de la célula con el haz del láser es detectada por el citómetro de forma dual: como dispersión de la luz incidente y como fluorescencia emitida. Esto hace que se puedan medir hasta cinco variables de cada célula que pasa a través del láser: tamaño relativo, granularidad interna e intensidad de fluorescencia relativa (FL1, FL2 y FL3). Actualmente, en los citómetros de flujo más modernos se pueden detectar hasta 12 fluorescencias diferentes⁹⁰. La intersección del haz del láser con la corriente de células hace que la luz se disperse en todas las direcciones. El detector que mide la dispersión frontal dará los valores que correlacionan con el tamaño relativo de la célula (*forward scatter* o FSC), la complejidad interna (granularidad) de la célula (*side scatter* o SSC) se correlaciona con la medida de la dispersión lateral del haz del láser (Figura 2).

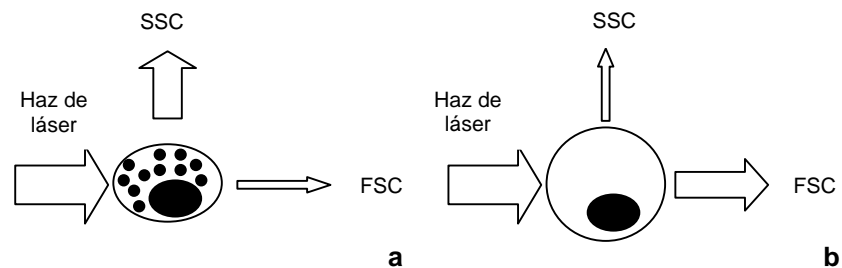


Figura 2. Representación de la dispersión del haz de láser al pasar dos tipos de células diferentes. **a)** Una célula pequeña pero compleja internamente **b)** Una célula grande sin granularidad interna.

Para poder obtener toda esta información es necesario realizar una calibración y un ajuste de los detectores del citómetro. Además, tiene que describirse previamente una plantilla con los diagramas de adquisición y, si es necesario, limitar el análisis a la población de estudio mediante un

gate. En los diagramas de adquisición (Figura 3) se comparan los parámetros de interés de dos en dos y pueden representarse solapados los histogramas de fluorescencia de diferentes muestras a comparar (Figura 13)

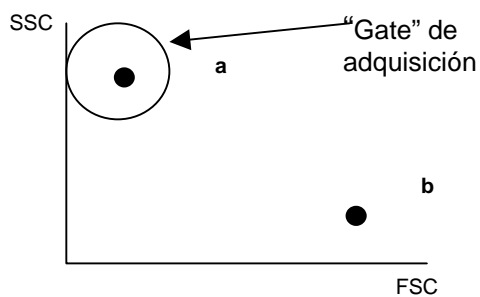


Figura 3. Diagrama de adquisición en el que se indica la disposición que representaría las células a y b de la figura 2. También se indica a modo de ejemplo un "gate" de adquisición.

2.2.2 Análisis de la inmunotición para selectina P e ICAM-1 en la membrana de las células endoteliales estimuladas

El análisis mediante citometría de flujo de las moléculas de adhesión en estudio dan como resultado una fluorescencia media de todas las células analizadas en el mismo tubo. A este valor se le resta la fluorescencia inespecífica del control negativo de isotipo. La expresión de las moléculas de adhesión se calcula como el "incremento de expresión inducida con respecto a la expresión basal".

Los resultados fueron expresados como media \pm SEM. El número de veces que se repitió cada experimento (n) fue de 12, excepto los experimentos en los que se inhibió la histamina o el TNF- α , que fueron 5 y 3 respectivamente. Las diferencias entre medias fueron analizadas dos a

dos utilizando el test *t*-Student para datos apareados. La significancia estadística se consideró a partir de $p < 0.05$.

3 Modelo de alergia cutánea canina inducida en perros Beagle para el análisis de moléculas pro-inflamatorias

Se completó el estudio sobre perros atópicos con la caracterización y evaluación de un modelo canino de dermatitis alérgica que permite mayor versatilidad en el análisis de las diferentes fases de la reacción cutánea inducida por Ag.

3.1 Caracterización de la respuesta inflamatoria en el modelo de alergia cutánea

El Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona dispone de perros Beagle espontáneamente sensibilizados a *Ascaris suum*. En estos perros se ha estudiado ampliamente la reacción cutánea inmediata tras inyección de Ag. Se hizo un experimento piloto para caracterizar la inflamación tras inyección intradérmica de Ag.

3.1.1 Inducción de respuesta cutánea en perros hipersensibles a *Ascaris suum*

Con el objetivo de estudiar el curso de la reacción cutánea en este modelo de alergia, se provocó la formación de pápulas mediante el test intradérmico de diagnóstico (TID) (apartado 3.2.1) y se tomaron biopsias a diferentes tiempos antes y después de la inyección del Ag: 20 min, 1h, 2h,

6h, 12h y 24h. Paralelamente se inyectó suero fisiológico (control negativo) y se tomaron biopsias a los mismos tiempos.

3.1.2 *Procesamiento de las biopsias*

Las biopsias de piel fueron procesadas siguiendo el mismo protocolo que en los apartados 1.1.2 y 1.1.3 para un análisis histológico rutinario en el que se determinó el grado de inflamación y la composición del infiltrado inflamatorio.

3.1.3 *Detección de selectina P en biopsias cutáneas mediante inmunohistoquímica*

Se hicieron secciones de los bloques de parafina sobre portas tratados con Poli-L-lisina y se siguió el mismo protocolo del apartado 1.1.4 para la inmunotinción de selectina P.

Cálculo de la expresión de selectina P: Por un lado, se hicieron dos recuentos a ciegas de todos los vasos positivos en cada muestra y se calculó la media de ambas mediciones. Por otro lado, y con la ayuda de un analizador de imágenes, se midió el área que ocupaba cada sección. Finalmente se hizo el cálculo del número de vasos positivos por mm² dividiendo ambos resultados

3.2 El modelo del perro experimentalmente sensibilizado a *Ascaris suum*

El modelo de perro hipersensible a *Ascaris suum* es muy útil para el estudio de la alergia cutánea pero un factor limitante a su utilización es la selección de los perros sensibles. Nos propusimos por lo tanto inducir la

sensibilización experimental de perros *naïve* para su más fácil disponibilidad ante futuros estudios.

3.2.1 *El test intradérmico de diagnóstico (TID)*

El TID es el que se utiliza para diferenciar entre perros sensibles al Ag de *Ascaris suum* Asc S1 de los que no lo son (*naïve* para ese Ag), por lo tanto los perros que tienen IgE específica de Ag de los que no. La inyección intradérmica de diagnóstico se hace en la región dorsal del animal y consiste en inyectar 10 μ l de Ag purificado a una concentración de 10 μ g/ml. Esta inyección siempre va acompañada de otra de igual volumen de suero fisiológico como control negativo. La reacción cutánea se evalúa a los 20 min (cuando es máxima) y se compara con el control negativo.

3.2.2 *Inducción experimental de sensibilidad al antígeno de Ascaris suum en perros Beagle*

El procedimiento experimental se dividió en tres partes: en primer lugar se hizo la selección de los perros *naïve*, seguidamente se procedió a la sensibilización experimental de éstos y por último se hizo el seguimiento de la reactividad cutánea a lo largo del tiempo así como la evaluación clínica de todos los perros.

a) *Selección de perros Beagle naïve*: La selección de los perros *naïve* se hizo mediante el TID con el Ag de *Ascaris suum* AscS1 de Greer Laboratories. Esta prueba de diagnóstico es muy sensible para detectar IgE antígeno-específico en la piel, como demuestra un artículo reciente en el que se ha visto que en un modelo canino de alergia con niveles indetectables de anticuerpo en suero se puede inducir una reacción cutánea mediada por antígeno⁹¹. Los perros Beagle utilizados fueron

criados para experimentación en Isoquimen SL (Barcelona) y se mantuvieron bajo control veterinario y estrictas condiciones sanitarias.

En una colonia de perros Beagle adultos se hizo el TID a 50 de ellos y todos resultaron negativos a la inyección intradérmica de AscS1. De este grupo se seleccionaron 10 hembras adultas (1-2 años) *naïve* para nuestro estudio. Además del TID se hizo un análisis paralelo de las heces en el que no se encontraron parásitos ascáridos adultos. La ausencia de respuesta cutánea al Ag responde a un eficiente programa de desparasitación junto con el mantenimiento de estos perros en un ambiente libre de parásitos. El protocolo de desparasitación de los animales fue el siguiente: en las semanas 1, 3 y 5 de edad se administró pamoato de pirantel 100mg/7Kg (Canex de Pfizer SA, Madrid), en la semana 7 se les daba el ascaricida citrato de piperacina 2g/Kg (Ascaricida-N, también de Pfizer) y por último, en la semana 11, un comprimido (cada 10Kg) de 50mg de pamoato de pirantel, 50mg de praziquantel y 150mg de febantel (Drontal Plus, de Bayer). Por lo tanto, esta colonia de perros de Isoquimen seguramente no ha tenido ningún contacto con parásitos caninos comunes como *Toxocara canis* o *Toxascaris leonina*, ni tampoco ha desarrollado una respuesta inmunitaria frente a alérgenos ascaridios.

b) Protocolo de sensibilización primaria: Se sometió a los 10 perros *naïve* a un programa de sensibilización intradérmica. Se les administraron dos inyecciones intradérmicas de Ag (AscS1) en la piel de la región dorsal a dosis elevada en el día 0 y el día 7 (Figura 4). La cantidad de Ag fue superior a la que normalmente se utiliza en el TID. La sensibilización primaria se obtuvo inyectando 10 μ l de 100 μ g/ml de AscS1. La inyección intradérmica del Ag previno que los perros lamieran parte de la solución de Ag, evitando así otras posibles rutas de sensibilización como sería la oral si la aplicación del Ag hubiera sido

tópica. Este sistema aseguró además que la cantidad total de proteína alergénica entrara en contacto con la dermis durante tiempo suficiente. Además del TID que se hizo a los 10 perros seleccionados, se fue evaluando la reacción cutánea al Ag a diferentes tiempos durante el estudio (día 7 y 14). Finalmente se les volvió a realizar el TID dos meses después de finalizar el protocolo de sensibilización para ver la durabilidad de la reacción cutánea a lo largo del tiempo.

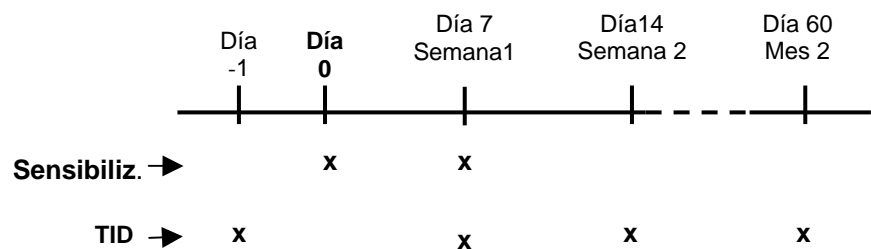


Figura 4. Esquema del protocolo de sensibilización y de los TID realizados a lo largo del estudio en todos los perros Beagle *naïve*.

c) *Evaluación clínica de los perros:* A lo largo de todo el estudio los perros seleccionados estuvieron bajo observación clínica. Se prestó especial atención a las condiciones clínicas de la piel en los sitios de inyección. Además se controló la temperatura corporal, las frecuencias respiratoria y cardíaca, las mucosas y los nódulos linfáticos por si aparecieran posibles trastornos. También se hizo un análisis microscópico de las heces en diferentes fases del estudio para detectar posibles huevos de ascáridos.

Cálculo de la reacción cutánea neta: La intensidad de la reacción cutánea inmediata (edema local) se expresó como el área total en mm². Sobre papel de acetato se dibujó el perímetro de las pápulas. El área de éste se calculó mediante un programa de análisis de imagen. Para descartar una reacción cutánea inespecífica se restó la reacción

observada al inyectar el control negativo. Un área neta por debajo de 30mm^2 se consideró negativa. Se hicieron comparaciones estadísticas para datos no apareados con el test de *t*-Student.

Resultados

1 Expresión de moléculas pro-inflamatorias en la piel de perros con dermatitis atópica

1.1 Datos clínicos de los perros atópicos seleccionados

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron 6 perros con dermatitis atópica (DA) entre los pacientes de la Unidad de Dermatología del Hospital Clínic Veterinari de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). En la Tabla 3 se resumen los datos clínicos más relevantes de cada animal. El rango de edad de los perros fue de entre 1 y 5 años, el grupo se compuso de 3 hembras y 3 machos. En la primera visita la mayoría de ellos (5 de 6) tenía pioderma superficial, por lo que fueron tratados durante 2 semanas con cefalexina (Rilexine 300, Virbac, 1 tableta/20Kg dos veces al día). Tras el tratamiento se volvió a evaluar el crecimiento bacteriano cutáneo y los perros en los que no se observó infección se incluyeron en el estudio. Todos los animales finalmente incluidos sufrían de prurito y generalmente entre las lesiones de la piel destacaban eritema y alopecia. Además, también todos los perros seleccionados tenían concentraciones elevadas de IgE específicas frente a ácaros del polvo.

1.2 Evaluación histopatológica de la piel

Se analizaron las biopsias de piel lesionada y no lesionada de los perros atópicos. Las biopsias de piel no lesionada tenían la apariencia de piel normal (Foto 1a). En la Tabla 2 se resumen las características histológicas más relevantes observadas en las biopsias de la piel lesionada. En la epidermis de estas biopsias se observó hiperplasia e hiperqueratosis. En la dermis, la inflamación fue entre leve y moderada, de localización perivascular entre las zonas superficial y media (Foto 1b y 1c).

Ref. perro	Evaluación de biopsias cutáneas		Diagnóstico										
	Grado de inflamación	Diagnóstico histopatológico	Criterios primarios*					Criterios secundarios**					Allercept***
1	leve	Hiperqueratosis y queratosis folicular	a	b	c		e	f		h		j	15
2	leve	Dermatitis perivascular hiperplásica	a	b	c		e	f		h		j	2
3	moderado	Dermatitis perivascular hiperplásica	a	b	c		e	f	g			j	3
4	moderado	Dermatitis perivascular hiperplásica	a	b	c			f		h		j	24
5	moderado	Dermatitis perivascular hiperplásica	a			d	e			h		j	4
6	moderado	Dermatitis perivascular hiperplásica	a		c		e			h	i	j	12

Tabla 2. Resumen de los datos clínicos más relevantes de los perros atópicos incluidos en el estudio y del diagnóstico histopatológico de sus biopsias cutáneas.

***a**= prurito / **b**= implicación facial y/o digital / **c**= dermatitis crónica / **d**= historia de atopia / **e**= predilección racial

****f**= síntomas antes de los 3 años / **g**= eritema y quelitis facial / **h**= pioderma superficial / **i**= hiperhidrosis / **j**= IgE (allercept +)

***número de alérgenos frente a los que se detectaron IgE específicas

El infiltrado celular se componía de linfocitos, neutrófilos, mastocitos (MC), algunos eosinófilos y raramente se observaron células plasmáticas. No se

podieron identificar células dendríticas ni subpoblaciones linfocitarias por no haber realizado tinciones específicas para estas células. Este infiltrado es compatible con un cuadro de DA.

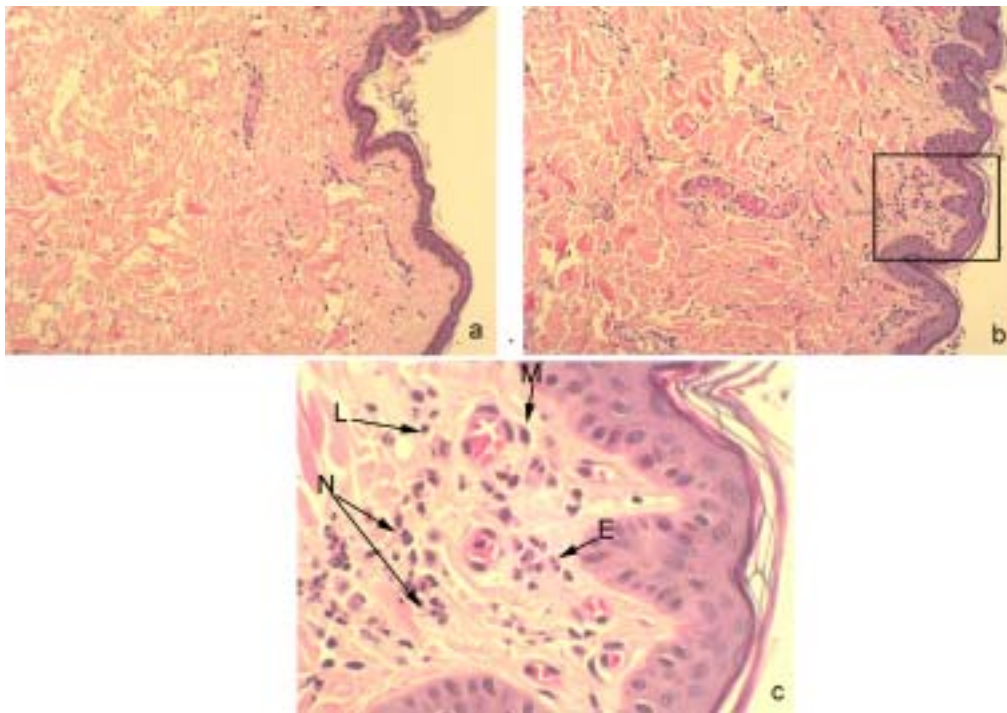


Foto 1 a) Aspecto histológico de la piel normal (10x) en la zona no lesionada de uno de los perros incluidos en el estudio. **b)** Piel (10x) de una zona con lesiones del mismo perro (representativo del resto del grupo de perros seleccionados) que presenta hiperplasia (HP) e hiperqueratosis (HQ) en la epidermis, y vasodilatación e infiltración inflamatoria (IC) en la dermis superficial y media **c)** Detalle de una zona con infiltrado celular y vasodilatación superficial (40x). Nótese la presencia de mastocitos (M), linfocitos (L), neutrófilos (N) y eosinófilos (E).

1.3 Expresión de selectina P, ICAM-1 y TNF- α en la piel de perros con dermatitis atópica

Mediante inmunohistoquímica se detectó la expresión de tres moléculas pro-inflamatorias en la piel de zona lesionada y de zona no lesionada de los perros atópicos seleccionados. Además, también se determinó la expresión de proteína en la piel de los perros no atópicos.

Selectina P

La inmunotinción para selectina P fue específica para las CE (Foto 2a) de los vasos de la dermis así como para las plaquetas activadas. Los vasos positivos fueron siempre vénulas y capilares y en general en la dermis profunda de todas las muestras la intensidad de la tinción fue mayor. En la Figura 5 se representa la expresión de proteína de selectina P en la piel lesionada y en la piel no lesionada de los perros atópicos. El número de vasos positivos para selectina P en la piel lesionada fue 4 veces superior al de la piel no lesionada, siendo los datos consistentes para cada zona de la dermis evaluada (superficial, media y profunda) y para cada uno de los perros incluidos en el estudio. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) según el test de *t*-Student. En el grupo de muestras de piel lesionada fue donde se observó mayor número de CE positivas con un patrón de tinción mixto, es decir, que se detectó selectina P tanto en el citoplasma como en la membrana. También se observó marginación celular en muchas muestras, localizada mayoritariamente en la dermis superficial y media. Esta marginación celular se valoró semi-cuantitativamente encontrándose una correlación con el grado de expresión de selectina P.

En las muestras de piel de los perros no atópicos la expresión de selectina P fue similar a la observada en las muestras de piel lesionada. Esta expresión incrementada de selectina P en los perros no atópicos se acompañó de una reacción aguda inespecífica y muy distinta a la observada en las muestras de perros atópicos, que se caracterizó por presentar vasodilatación intensa, gran

cantidad de neutrófilos atravesando los vasos y agregados plaquetarios activados que expresan selectina P.

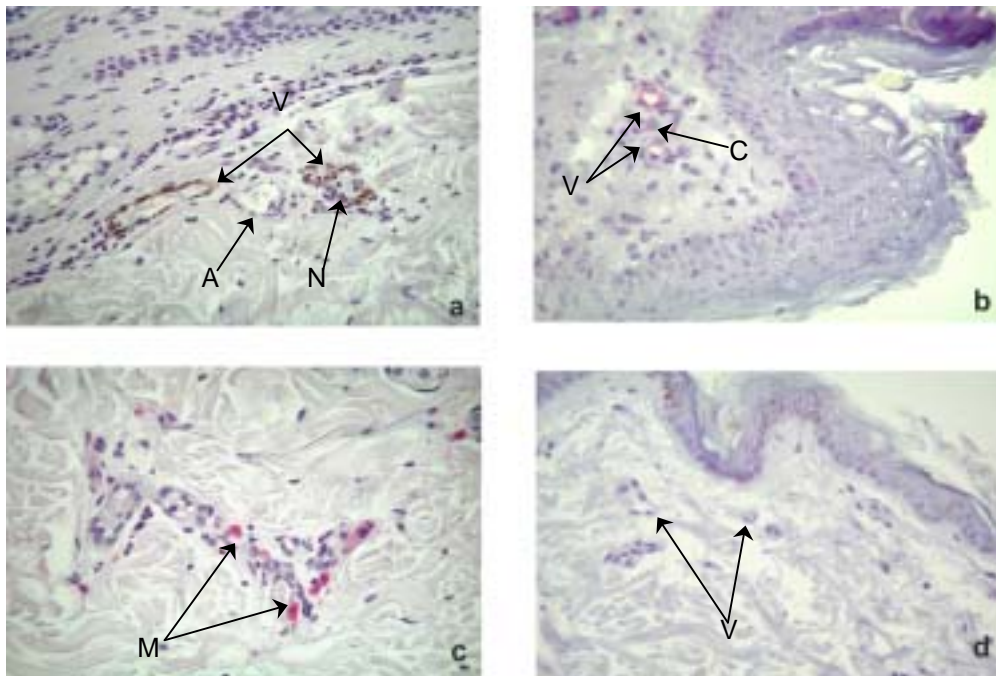


Foto 2. Muestras de piel canina inmunoteñidas para **a)** selectina P (marcaje con DAB, color marrón), vénulas (V), arteriolas (A) y neutrófilos (N) **b)** ICAM-1 (marcaje con Fast Red, color fucsia), vasos positivos (V) **c)** TNF- α (marcaje con Fast Red, color fucsia), mastocitos (M) y **d)** control de isotipo, vasos (V). (Todas las fotos tomadas a 40x)

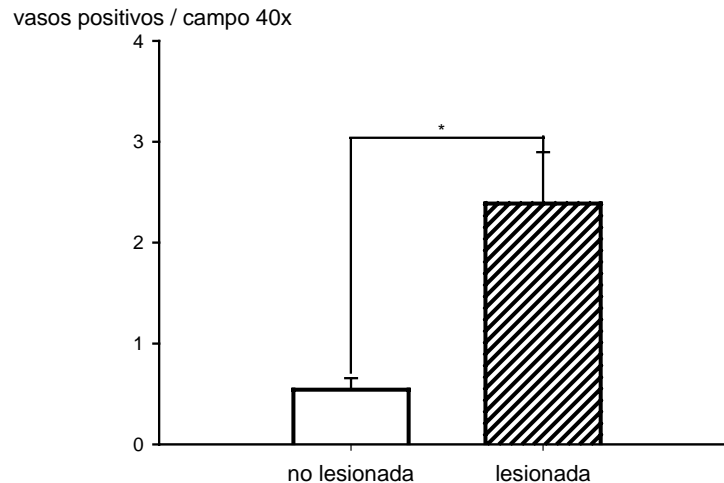


Figura 5. Expresión de proteína de selectina P en la piel de perros con dermatitis atópica (n=6). En el gráfico se representa el número de vasos positivos por campo microscópico de 40x en piel no lesionada y piel lesionada de los mismos perros (*p<0.05)

ICAM-1

La expresión de ICAM-1 se detectó mediante inmunohistoquímica en muestras de piel congelada en OCT (Foto 2b). La tinción fue mayoritariamente observada en los vasos sanguíneos pero también se vio en algunos queratinocitos y MC de la piel lesionada y la piel no lesionada de los perros atópicos seleccionados. El número de vasos positivos para ICAM-1 por campo microscópico de 40x fue superior en las muestras de la piel lesionada (Figura 6) en 5 de los 6 perros, aunque bajo nuestras condiciones experimentales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El mayor número de vasos teñidos se encontró en la dermis superficial y media. En las muestras de la piel lesionada también se observó tinción en el epitelio de las glándulas sudoríparas. En los perros no atópicos el número de vasos positivos fue inferior al de la piel lesionada y la piel no lesionada de los atópicos.

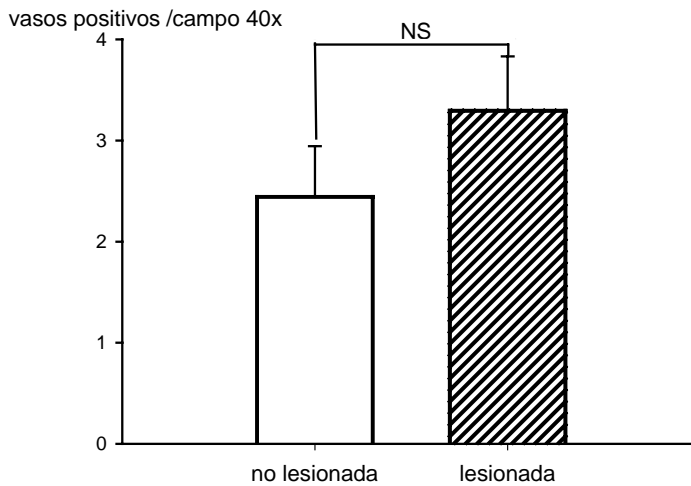


Figura 6. Expresión de proteína de ICAM-1 en la piel de perros con dermatitis atópica (n=6). En el gráfico se representa el número de vasos positivos por campo microscópico de 40x en piel no lesionada y piel lesionada de los mismos perros.

TNF- α

Se detectó la expresión de proteína de TNF- α mediante inmunohistoquímica en muestras de piel (Foto 2c). La tinción fue observada únicamente en células que por su morfología y localización se identificaron como MC. En general, se tiñeron los MC localizados en cualquier zona de la dermis, aunque en los perifoliculares la intensidad fue mayor tanto en los perros atópicos como en los no atópicos. Se encontró mayor número de células positivas en las muestras de piel lesionada que en las de piel no lesionada pero, bajo nuestras condiciones, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (Figura 7). El tanto por ciento de incremento de expresión de TNF- α (26.43%) entre los dos grupos de muestras de los perros atópicos estuvo en el mismo rango que el incremento de ICAM-1 (34.8%). En las muestras de los perros no atópicos el número de células positivas para TNF- α fue menor que en las de piel lesionada y las de piel no lesionada.

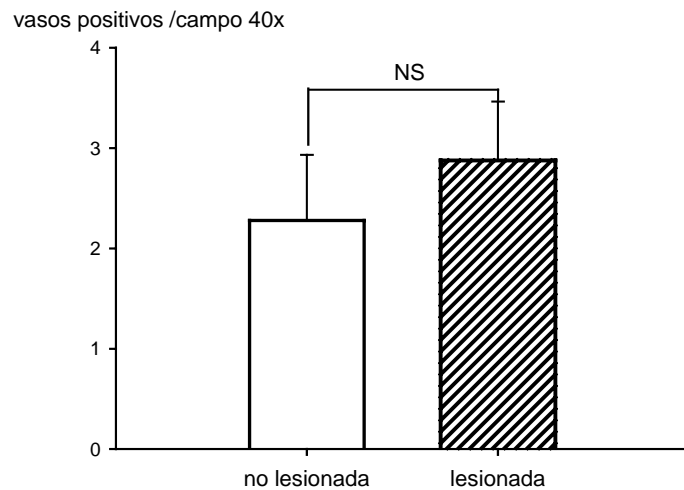


Figura 7. Expresión de proteína de TNF- α en la piel de perros con dermatitis atópica (n=6). En el gráfico se representa el número de células positivas por campo microscópico de 40x en piel no lesionada y piel lesionada de los mismos perros.

2 Expresión de moléculas pro-inflamatorias en fragmentos de piel canina

2.1 Liberación de histamina por fragmentos cutáneos estimulados con anti-IgE

Para comprobar la posibilidad de estimular los MC en piel entera *in vitro*, se utilizaron fragmentos cutáneos previamente sensibilizados con IgE que se incubaron con diferentes concentraciones de anti-IgE. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la histamina liberada. La histamina excretada tras la estimulación con anti-IgE se relacionó con la histamina basal (o histamina liberada espontáneamente), es decir sin el estímulo presente. Como se observa en la Figura 8, la histamina se liberó de forma dosis-dependiente llegando a observarse un incremento máximo de más de 10 veces la cantidad liberada espontáneamente.

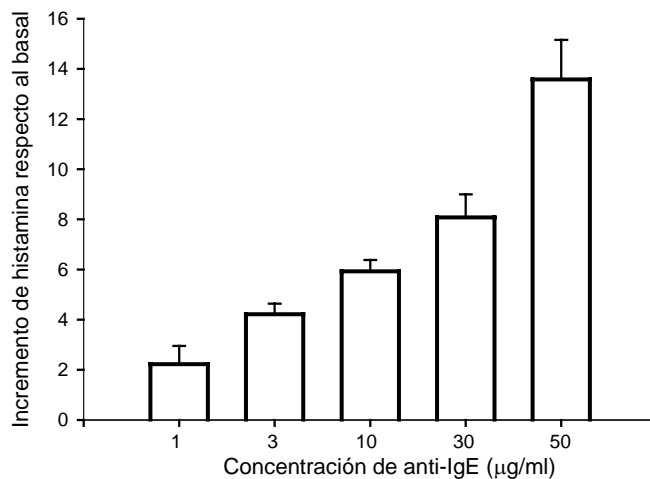


Figura 8. Liberación de histamina por fragmentos de piel sensibilizados con IgE y estimulados con concentraciones crecientes de anti-IgE (n=2).

2.2 Expresión de moléculas de adhesión en fragmentos cutáneos estimulados

Una vez comprobada la activación de los MC en la piel canina entera, se evaluó si dicha estimulación podía inducir la expresión *de novo* de moléculas de adhesión en los fragmentos cutáneos. Para detectar el mRNA de las moléculas de adhesión se utilizó la técnica de RT-PCR que fue puesta a punto estimulando fragmentos con LPS, asegurando así la activación directa e intensa de las CE (control positivo). Tal y como es habitual, paralelamente a la detección de las moléculas de interés también se procedió a la detección del gen constitutivo β -actina en todas las condiciones experimentales como control interno de la técnica.

La expresión de β -actina fue muy similar en todas las condiciones, indicando que la cantidad de mRNA retrotranscrito era prácticamente la misma. En los fragmentos de piel estimulados con LPS se detectó selectina E, VCAM-1 e ICAM-1. En los fragmentos cutáneos activados inmunológicamente mediante IgE/anti-IgE, bajo nuestras condiciones experimentales, únicamente se detectó la expresión *de novo* de VCAM-1. En ninguno de los casos se detectó mRNA de selectina P (Tabla 4).

TIPO DE ESTIMULACIÓN	MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DETECTADAS POR RT-PCR			
	Selectina E	VCAM-1	ICAM-1	Selectina P
LPS	x	x	x	nd
IgE/anti-IgE	nd	x	nd	nd

Tabla 4. Expresión de moléculas de adhesión en fragmentos cutáneos estimulados inmunológicamente (IgE/anti-IgE) y estimulados con LPS (control positivo) (nd = no detectado)

3 Expresión de moléculas pro-inflamatorias en el modelo de comunicación mastocito-célula endotelial

Para establecer el modelo de comunicación MC-CE hubo que disponer de ambas poblaciones celulares en suspensión. Existen líneas celulares de MC caninos pero no de CE caninas, y por ello tuvo que ponerse a punto el aislamiento de CE caninas de carótida (CCEC).

3.1 Aislamiento, crecimiento y fenotipo de las células endoteliales caninas de carótida

La digestión de la pared de arterias carótidas proporciona una suspensión celular pura de CE. Una vez aisladas las células, se depositan en pocillos

gelatinizados, donde se distribuyen como agregados celulares. Estos acúmulos son los focos desde los cuales las CE crecen formando la típica imagen de adoquinado (*cobblestone*) y se expanden hasta generar una monocapa. Tras el primer período de incubación, las células endoteliales confluyen en 7 ó 10 días, en esta fase se despegan de los pocillos mediante una muy leve digestión con tripsina (pase 1) y se divide el contenido celular de 1 pocillo en 4 pocillos. Cada vez que las células confluyen formando una monocapa se vuelven a redistribuir en nuevos pocillos o placas (según la cantidad de células de las que se disponga). Nuestros experimentos se realizaron en pase 5 con el fin de obtener un número suficiente de células que permitiera abarcar un mínimo de condiciones experimentales. Las células se crioconservaron en pase 4 hasta su utilización posterior. La viabilidad celular fue superior al 95% tras la descongelación y antes de su estimulación.

Las células aisladas se identificaron como CE según su morfología, sus características de crecimiento y su fenotipo mediante inmunotinción (inmunocitoquímica y citometría de flujo). Su morfología era poligonal, con un núcleo central (Foto 3a). Mediante inmunocitoquímica se vio que estas células eran positivas para el marcador de membrana CD31 (Foto 3b) y para selectina P en el citoplasma (Foto 3c). También se analizaron las células en reposo mediante citometría de flujo y no se vio expresión constitutiva de selectina P en membrana pero sí de ICAM-1 (Figura 9).

Un aislamiento y cultivo eficientes podía resultar en más de 2×10^7 CCEC 100% puras. La presencia de células musculares contaminantes se detectó muy pronto en alguno de los cultivos por 4 motivos: el tipo de expansión en la placa en el que las células crecen superpuestas, por su morfología fusiforme y por la ausencia de CD31 en la superficie y de selectina P en el citoplasma. Cuando se detectaron células contaminantes el cultivo fue descartado.

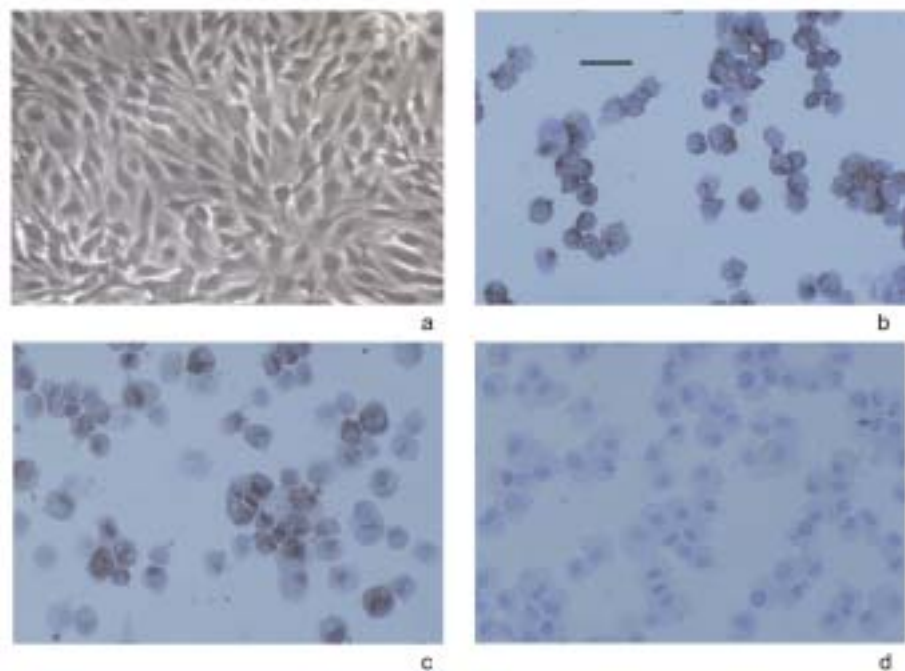


Foto 3. Fenotipo de células endoteliales caninas de carótida: **a)** Monocapa confluyente de CCEC 4 días después de aislarlas mediante digestión enzimática, **b)** Expresión del marcador CD31 en la membrana de CCEC, **c)** Expresión de selectina P en el citoplasma de CCEC, **d)** Control negativo de isotipo para las tinciones de inmunocitoquímica. Barra=23.36 μ m

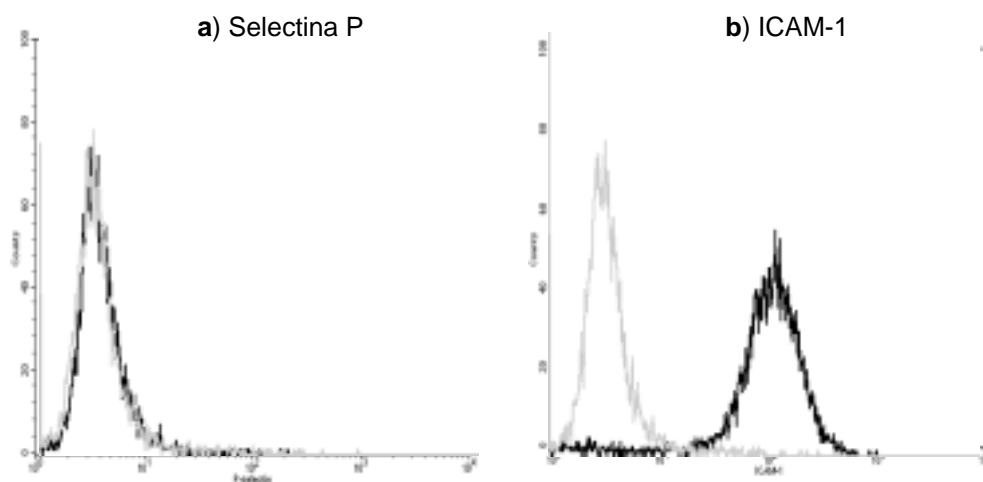


Figura 9. Histogramas de fluorescencia de citometría de flujo de células endoteliales caninas no activadas teñidas para **a)** selectina P y **b)** ICAM-1. La línea gris representa la tinción de isotipo y la línea negra la tinción específica para cada molécula de adhesión.

3.2 Liberación de histamina y de TNF- α por los mastocitos caninos C₂ estimulados

Una vez establecidas las condiciones para aislar y cultivar las CCEC se procedió a activar los MC durante diferentes períodos de tiempo (30min, 5h y 24h), y con los mediadores liberados se estimularon posteriormente las CCEC. Se quiso comprobar la presencia de dos mediadores mastocitarios fundamentales en procesos inflamatorios: histamina y TNF- α .

Mediante un kit comercial de ELISA competitivo se determinó la cantidad de histamina en los sobrenadantes de MC estimulados. Utilizando un bioensayo de citotoxicidad celular se evaluó la concentración de la citocina pro-inflamatoria TNF- α en los mismos sobrenadantes.

En el sobrenadante de 30min no se detectó TNF- α pero sí histamina (25.52nM), en los de 5 y 24 horas se detectaron ambos mediadores en cantidades crecientes (Tabla 5). El sobrenadante de 5h contenía de media 124.53nM de histamina y 25.21pg/ml de TNF- α , y el de 24h 199.5nM de histamina y 66.3pg/ml de TNF- α . Paralelamente a estas mediciones se hicieron ensayos de viabilidad celular a todos los tiempos y se descartó la posibilidad de que el aumento de mediadores en los sobrenadantes fuera consecuencia de una creciente mortalidad a lo largo del tiempo.

	Sobrenadantes de mastocitos		
	30min	5h	24h
Histamina (nM)	25.52	124.53	199.5
TNF-α (pg/ml)	<2	25.21	66.3

Tabla 5. Cantidad de histamina y TNF- α detectada en los sobrenadantes de los mastocitos estimulados.

Además de determinar la cantidad de proteína de la citocina pro-inflamatoria TNF- α también se hizo una prueba piloto en la que se determinó mediante RT-PCR la expresión de mRNA para TNF- α de nueva síntesis en MC C₂ estimulados a diferentes tiempos. Como control interno de la técnica, se evaluó la expresión del gen constitutivo β -actina del cual se detectaron niveles muy similares en todas las muestras. Como control negativo se utilizaron MC sin estimular y como control positivo linfocitos caninos estimulados con PHA. En los MC sin activar únicamente se detectó expresión de TNF- α a los 30min de tener los MC en cultivo y ésta fue muy leve, en los demás tiempos no se detectó expresión de esta citocina pro-inflamatoria. En los MC activados se detectó TNF- α de nueva síntesis en todos los tiempos pero el máximo de expresión se observó en las células que habían sido estimuladas durante 2 horas (Figura 10).

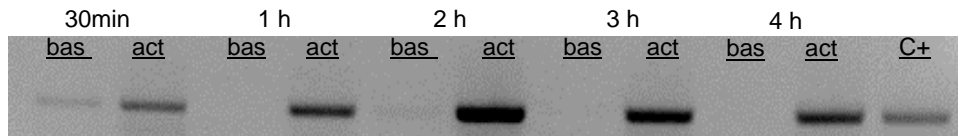


Figura 10. Expresión de TNF- α de nueva síntesis en mastocitos C₂ a diferentes tiempos tras ser estimulados (act) o no (bas), C+ es el control positivo.

3.3 Inducción de moléculas de adhesión endoteliales por parte de los mastocitos

Se incubaron los sobrenadantes de los MC con las CCEC para determinar el efecto de los mediadores mastocitarios en la expresión de moléculas de adhesión.

El nivel basal de la expresión de selectina P e ICAM-1 se midió tras incubar las CCEC con los sobrenadantes de los MC sin estimular, es decir con los mediadores de los MC liberados espontáneamente y no hubo diferencias en la expresión constitutiva de ambas moléculas de adhesión. A esta expresión basal se le dio un valor de 1, de manera que cualquier incremento inducido por mediadores liberados tras estimulación de los MC se expresó como "incremento sobre el nivel basal".

Antes de analizar el efecto de los sobrenadantes de los MC activados sobre la expresión de moléculas de adhesión en las CCEC, se midió el efecto directo sobre las CE de los reactivos utilizados para la estimulación de MC. El PMA y el ionóforo no estimularon las CCEC lo cual indicó que cualquier efecto observado sería consecuencia de la actividad de los mediadores de MC sobre las CE.

Selectina P

En la Figura 11 se representa la expresión de selectina P en CCEC incubadas con mediadores de los MC liberados a diferentes tiempos. Los mediadores preformados (sobrenadante 30 min), que se liberan inmediatamente después de la estimulación, inducen de manera significativa la expresión de selectina P (incremento de 1.62) al compararse con la condición basal (efecto de los mediadores espontáneamente liberados) en que no se observaba expresión de esta molécula de adhesión. La inducción de selectina P se acentuó tras la activación de CCEC con mediadores mastocitarios de nueva síntesis, como reflejan las barras de 5 h (aumento máximo, de casi 3 veces la expresión basal) y de 24h (aumento de 2.2 veces la expresión basal).

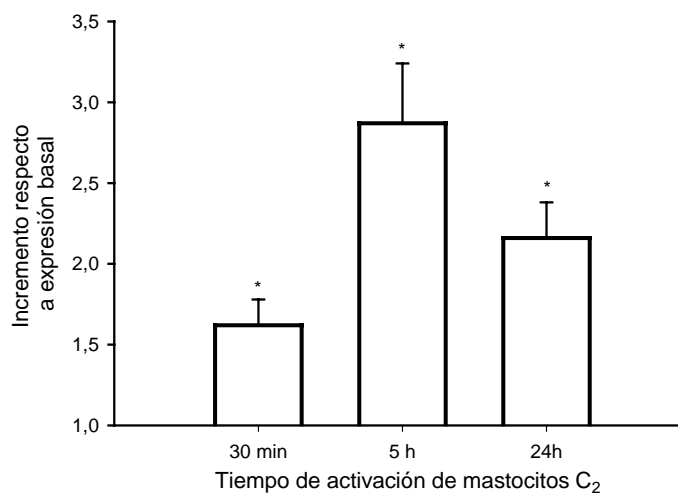


Figura 11. Expresión de selectina P en CCEC tras estimulación con mediadores liberados por mastocitos C₂ activados (n=12).

ICAM-1

En la Figura 12 se refleja el aumento de expresión de ICAM-1 en CCEC incubadas con mediadores liberados por los MC. Estas células expresan ICAM-1 de manera constitutiva y los mediadores mastocitarios preformados

(sobrenadante 30min) no indujeron un aumento significativo de la expresión basal. En cambio, los mediadores de nueva síntesis promovieron un aumento de la expresión de ICAM-1, como representan las barras de 5h (incremento de 2.8 veces respecto al basal) y de 24h (incremento de 1.8 veces respecto al basal) de la Figura 12.

Se hicieron dos experimentos piloto en los que se incluyó la estimulación de las CCEC con el sobrenadante de 12h y se confirmó que el máximo de expresión se consiguió con el sobrenadante de 5h para ambas moléculas de adhesión.

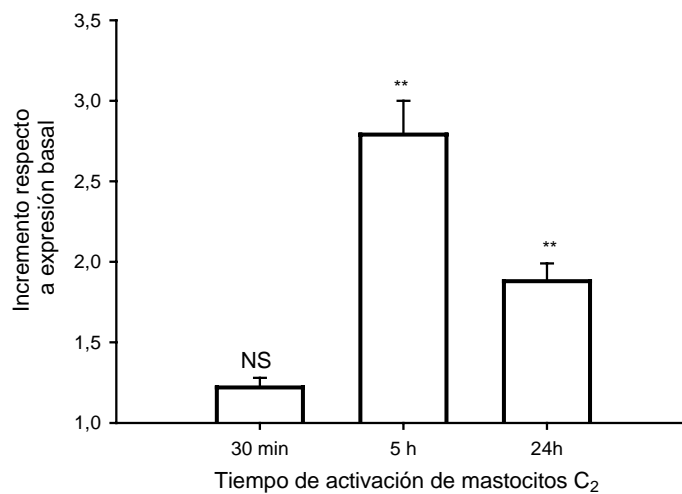


Figura 12. Expresión de ICAM-1 en células endoteliales tras la estimulación con mediadores de mastocitos C₂ (n=12)

Como referencia del grado de activación, en un experimento piloto se incubaron CCEC con LPS y se comparó su efecto sobre la expresión de las moléculas de adhesión con el de los sobrenadantes de MC activados. En la Figura 13 se representa una superposición de los histogramas de fluorescencia resultantes de la inducción de la expresión de selectina P (a) y de ICAM-1 (b) bajo diferentes condiciones. El aumento de expresión de ICAM-1 promovido directamente por LPS fue similar al máximo obtenido con los mediadores

mastocitarios liberados a las 5h (en este caso también a las 24h) y, en cambio, no se observaron cambios en la expresión basal de selectina P por efecto directo del LPS.

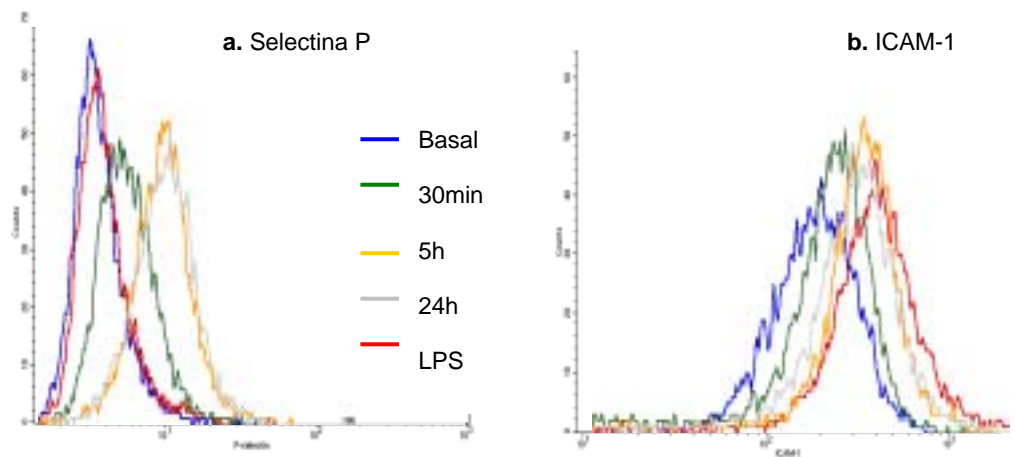


Figura 13. Comparación de la expresión de **a)** selectina P y de **b)** ICAM-1 inducida por sobrenadantes mastocitarios a distintos tiempos y por LPS (línea roja). En azul se representa la expresión basal.

3.4 Función de la histamina y el TNF- α mastocitario en el aumento de la expresión de selectina P e ICAM-1 en células endoteliales caninas

De entre los mediadores mastocitarios liberados por los MC estimulados, la histamina y el TNF- α fueron los candidatos mayoritarios a ejercer el efecto inductor en la expresión de selectina P e ICAM-1, respectivamente. Ambos mediadores fueron liberados por los MC C₂ activados, tal y como se describe en el apartado 3.2 de esta sección.

Para determinar la importancia de la histamina como inductor de selectina P se incubaron las CCEC (antes y durante el estímulo con los mediadores mastocitarios) con un antagonista del receptor H₁ de la histamina (loratadina). De esta manera, se bloqueó la acción directa de la histamina sobre sus

receptores H_1 . En ninguno de los tiempos se observaron cambios en la expresión de selectina P ni de ICAM-1 (Tabla 6).

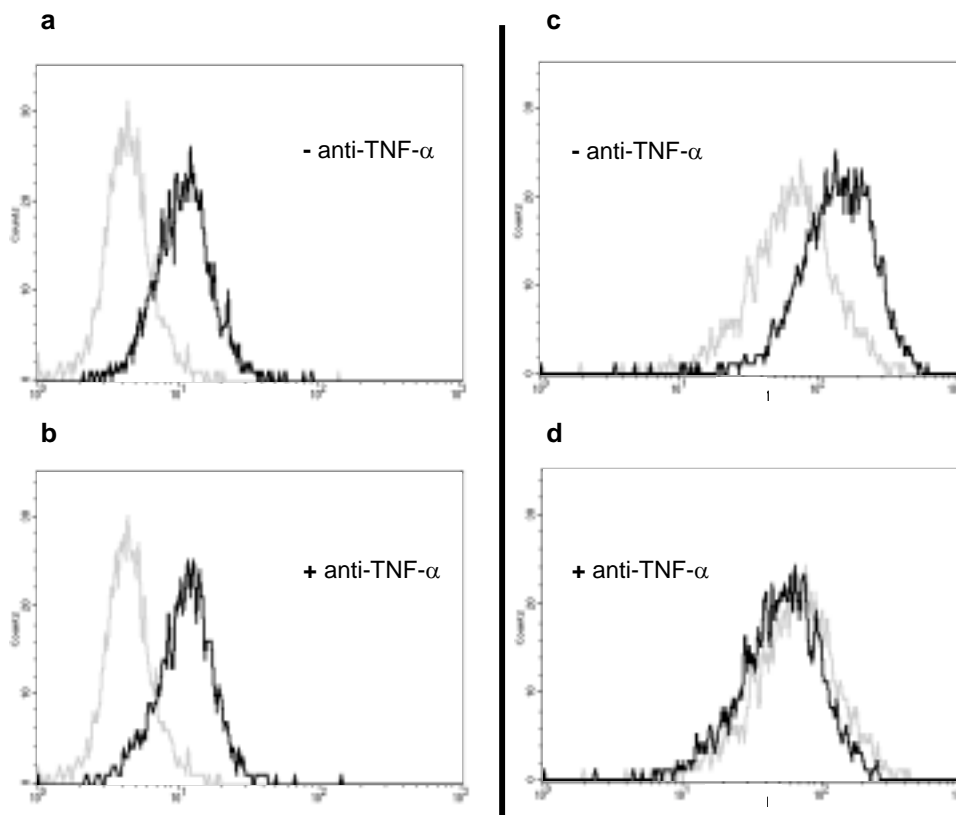


Figura 14. Comparación de los histogramas de fluorescencia de la expresión de selectina P (a,b) e ICAM-1 (c,d) en ausencia y presencia de un anticuerpo neutralizante de $TNF-\alpha$. La línea gris representa células endoteliales en reposo y la línea negra las células endoteliales estimuladas.

Con respecto al $TNF-\alpha$, se bloqueó su actividad en los sobrenadantes mediante un anticuerpo neutralizante y aunque en el caso de selectina P no se observaron cambios, la expresión de ICAM-1 revirtió hasta niveles basales (Figura 14).

Tiempo de estimulación → de mastocitos	Selectina P			ICAM-1		
	30min	5h	24h	30min	5h	24h
Antihistamínico- H₁ (n=5)	1.51±0.07	2.66±0.29	2.57±0.42	1.19±0.18	2.45±0.39	1.90±0.29
Vehículo (n=5)	1.45±0.09	3.22±0.56	2.78±0.22	1.29±0.22	2.32±0.72	2.08±0.04

Tabla 6. Expresión de selectina P e ICAM-1 en células endoteliales tratadas con un antihistamínico-H₁ y activadas con mediadores de mastocitos (n=5)

4 Reacción de la piel a la inyección intradérmica de Ag en el modelo de alergia cutánea del perro hipersensible a *Ascaris suum*

4.1 La inyección intradérmica de Ag en perros espontáneamente hipersensibles a *Ascaris suum* induce inflamación

La inyección intradérmica de Ag en perros hipersensibles provoca en primer lugar una reacción inmediata (EPR) consecuencia de la activación de los MC que a su vez activa el endotelio. Esto conduce a una extravasación y vasodilatación que macroscópicamente se observa como una pápula acompañada de eritema. Esta pápula suele ser máxima entre los 15 y 20 minutos.

Con el fin de ver si la reacción cutánea tras inyección de Ag además de reacción inmediata provoca un proceso inflamatorio, se hizo un experimento en

un perro espontáneamente hipersensible a *Ascaris suum* y se evaluó la inflamación a diferentes tiempos después de haber inyectado el Ag. Justo antes de la inyección y a los 20min, 60min, 2h, 6h, 12h y 24h se obtuvieron biopsias cutáneas en las zonas de reacción (de inyección), que se procesaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Antes de la inyección (tiempo 0), la piel tenía el aspecto de una piel normal. Tras la inyección intradérmica del Ag, ya a los 20 minutos (Foto 5a) pudieron observarse cambios en la piel como la aparición de un edema superficial, una vasodilatación superficial y profunda, y un elevado número de neutrófilos llegando a formar parte del incipiente infiltrado inflamatorio acompañado de algunos eosinófilos. Pasada 1 hora, se vio que el edema era intenso y difuso, la vasodilatación se acompañaba de marginación celular evidente y el infiltrado todavía se componía de neutrófilos pero el número de eosinófilos era superior al de los 20min (Foto 5b). A las 2 horas, el edema y la vasodilatación fueron menores, las células inflamatorias ya se observaron fuera de los vasos y en el infiltrado predominaban los eosinófilos, con pocos neutrófilos y algunos linfocitos. Seis horas después de la inyección de Ag, el edema disminuyó mucho, la vasodilatación fue muy leve y el infiltrado inflamatorio fue difuso con predominancia de eosinófilos y algunos linfocitos (Foto 5c). Por último, también se obtuvo una biopsia a las 24 horas de la inyección intradérmica y se observaron sólo restos de edema y de vasodilatación pero todavía con abundantes eosinófilos en el infiltrado (Foto 5d).

Paralelamente, se inyectó suero fisiológico (vehículo) y se obtuvieron biopsias en los mismos tiempos que tras la inyección de Ag y el análisis histológico únicamente reveló un ligero edema en la zona de la inyección que prácticamente desapareció pasada la primera hora.

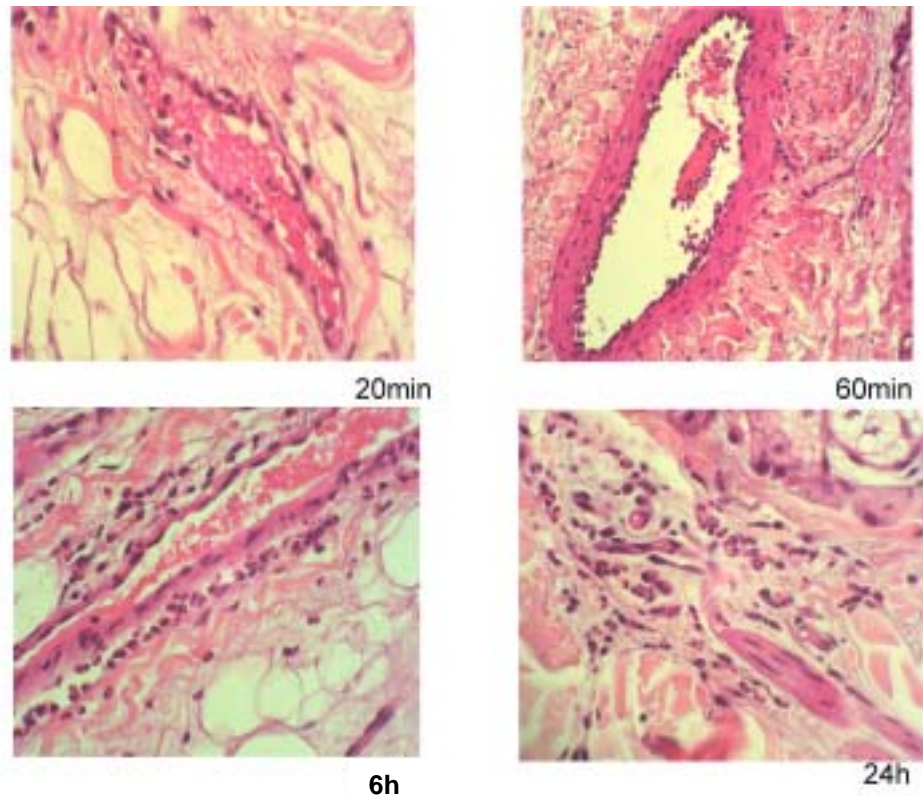


Foto 5. Evolución del infiltrado inflamatorio a lo largo del tiempo: **a)** 20min (40x), **b)** 60min (20x), **c)** 6h (40x), **d)** 24h (40x) tras la inyección de Ag en la piel de un perro espontáneamente hipersensible a *Ascaris suum*.

4.2 Expresión cronológica de selectina P en la inflamación inducida por Ag

Se analizó también en las biopsias cutáneas de los diferentes tiempos la expresión de moléculas pro-inflamatorias. Mediante inmunohistoquímica se determinó la expresión cronológica de proteína de selectina P en biopsias cutáneas obtenidas a diferentes tiempos tras la inyección intradérmica de Ag de *Ascaris suum* (Asc S1). Se hizo un recuento del número total de vasos positivos y se relacionó con el área de la muestra, calculada con ayuda de un analizador de imágenes.

El grado de expresión de selectina P fue cambiando en función del tiempo (Figura 15), alcanzando el pico máximo 2 horas después de la inyección del Ag. En los controles con suero fisiológico también se detectó expresión de selectina P, aunque fue constante a lo largo del tiempo (datos no mostrados).

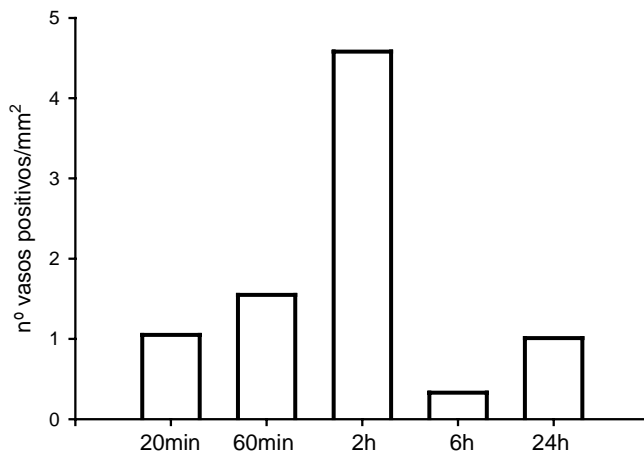


Figura 15- Expresión de selectina P en biopsias cutáneas de la lesión inducida por la inyección intradérmica de Asc S1 en un estudio piloto (n=1).

4.3 La inyección intradérmica de Ag induce sensibilización primaria en perros *naïve*

La inyección intradérmica de Ag, además de provocar una reacción cutánea inmediata seguida de un proceso inflamatorio en la piel de perros hipersensibles a *Ascaris suum* podría inducir en perros *naïve* sensibilización a través de la piel. Puesto que se trata de un modelo de alergia cutánea muy útil se evaluó la posibilidad de inducir experimentalmente la sensibilización de perros *naïve* para incrementar la disponibilidad del mismo (ante la necesidad de seleccionar los sensibilizados de forma natural).

Resultados

Antes de empezar el proyecto, se comprobó que ninguno de los perros había desarrollado hipersensibilidad natural al Ag de *Ascaris*. A los 7 días de iniciar el protocolo de sensibilización, 5 de los 10 perros mostraron una clara reacción cutánea (Figura 16) tras TID de AscS1. Tras la segunda administración de Ag, el día 14 un sexto perro también mostró una clara reacción cutánea positiva (perro 9, Figura 16).

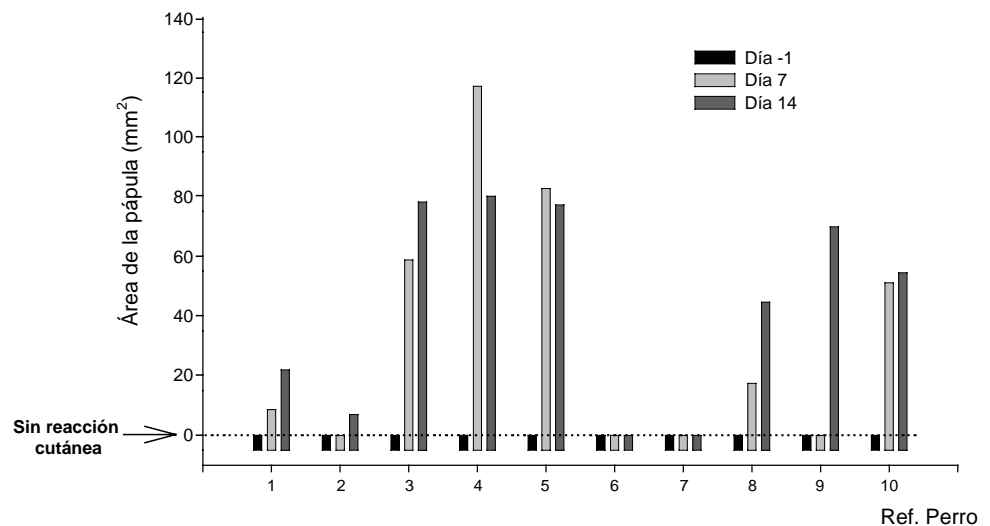


Figura 16. Mediciones individuales de las pápulas resultantes de la inyección de antígeno de *Ascaris* AscS1 en 10 perros Beagle *naïve*, antes y durante el protocolo de sensibilización primaria.

Como se observa en el gráfico de la Figura 16, tras el protocolo de sensibilización un 60% de los perros desarrollaron reacción cutánea positiva al inyectar el Ag intradérmicamente. En la Figura 17 se muestra la diferencia significativa entre la evolución de las medias de las áreas de las pápulas (tras inyección de Ag) en los perros sensibilizados y en los no sensibilizados.

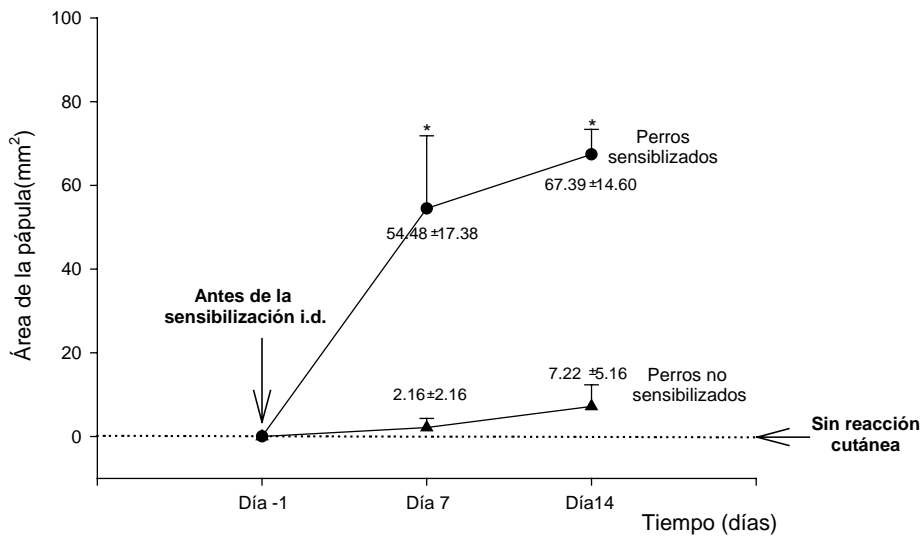


Figura 17- Representación de las medias de las áreas de las pápulas tras inyección de Ag de los perros sensibilizados (círculo, media ± SEM, n=6) y de los no sensibilizados (triángulo, media ± SEM, n=4). La comparación entre ambos grupos se hizo mediante el test de *t*-Student para datos no apareados y se demostró que eran significativamente diferentes (*p<0.05).

Durante el estudio se hizo un seguimiento clínico a los perros y únicamente apareció una lesión eczematosa en 4 de los 6 perros que posteriormente resultaron sensibilizados, un día después de la primera inyección de Ag. Esta lesión desapareció por completo en 2 ó 3 días tras tratarlos con yodo y no dejó signos clínicos visibles. Además, no se identificaron ni huevos ni parásitos ascáridos adultos en heces en ningún momento a lo largo del estudio.

Para evaluar si la respuesta cutánea tras inyección de Ag se mantenía a lo largo del tiempo, 2 meses después del inicio del proyecto los perros fueron nuevamente sometidos a la inyección intradérmica de Asc S1. Los seis perros que tuvieron una respuesta cutánea positiva en el día 14, la siguieron teniendo pasados 2 meses.

Discusión

1 Expresión de moléculas pro-inflamatorias en las lesiones cutáneas de perros con dermatitis atópica

La piel lesionada de los perros seleccionados con dermatitis atópica (DA) presentaba características histológicas similares a las descritas en el hombre⁹² y el propio perro^{68,85,93}. Algunas descritas por otros autores, como la presencia de células dendríticas, no pudieron ser observadas en nuestro estudio debido a que el análisis histológico se hizo en muestras teñidas con hematoxilina-eosina y no con tinciones específicas para marcadores celulares. Puesto que normalmente en el diagnóstico de la DA no se suelen realizar biopsias cutáneas en las condiciones de este estudio, no hay referencias previas sobre el tipo e intensidad de la reacción inflamatoria que se encontraría. La inflamación fue entre leve y moderada y con un número de células inflamatorias bajo en comparación con lo observado en datos bibliográficos previos y en nuestra biopsia histórica usada como referencia. En las muestras de piel lesionada no se observó ni exocitosis celular en la epidermis, ni presencia destacable de eosinófilos en la dermis. Es probable que la ausencia de infección bacteriana debido a la antibioticoterapia previa a la obtención de las biopsias cutáneas explique que la inflamación no sea tan intensa. Esto pondría de manifiesto la importancia que pueden llegar a tener las toxinas bacterianas actuando como superantígenos o como estimuladores directos de algunas células cutáneas. Como sucede en la DA humana⁹² la presencia de estos co-estímulos inmunológicos desencadenaría procesos pro-inflamatorios que ayudarían a mantener e incrementar la inflamación cutánea en individuos atópicos. Puesto que los perros con DA se han tratado con antibióticos, la inflamación observada en las lesiones cutáneas no se verá influenciada por la presencia de bacterias, pudiendo evaluar así de forma aislada el “efecto atópico” sobre la tendencia a expresar proteínas pro-inflamatorias.

Se ha demostrado que las células endoteliales (CE) de las muestras de piel lesionada de perros atópicos expresan mayor cantidad de proteína funcional de selectina P que las de las muestras de piel no lesionada tal y como se había descrito anteriormente en el hombre²⁸, siendo esta expresión mayoritaria en capilares y vénulas. Se sabe que la selectina P se encuentra almacenada en los corpúsculos de Weibel-Palade en el interior de las CE y que se transloca a la membrana tras la estimulación, aunque también puede ser sintetizada *de novo*. Si esta proteína se expresa paralelamente en ambas localizaciones (patrón mixto de tinción), puede llegar a detectarse mediante inmunotinción. Mediante un estudio ciego se contó un mayor número de vasos positivos con este patrón mixto en la zona lesionada, sugiriendo una activación celular mayor que en las muestras de piel no lesionada, donde la tinción fue fundamentalmente citoplasmática. También observamos que el aumento de la expresión de selectina P se correlacionaba con un aumento de la marginación celular, sobretodo en la dermis superficial y media de las muestras de piel lesionada. Esta marginación refleja el rodamiento y enlentecimiento celular (*rolling*) mediado por las selectinas endoteliales. Esto indica que la proteína de selectina P observada en los vasos positivos era funcional. De manera similar, otros autores han observado una correlación entre la expresión de selectina P y el número de leucocitos infiltrantes en perros con enfermedades inflamatorias de la piel (pero no han estudiado la DA)⁷⁶. Estos datos reflejan probablemente la importancia de la selectina P en el reclutamiento de células inflamatorias en la piel de perros con DA, convirtiéndola en una posible diana farmacológica para futuras terapias.

El grado de expresión de proteína de selectina P en muestras de perros no atópicos fue parecida al encontrado en las muestras de piel lesionada de los perros atópicos. Aunque estas observaciones fueron inicialmente sorprendentes, cabe destacar dos cuestiones relacionadas con este fenómeno. Por un lado, es posible que la expresión de selectina P fuera inducida por el halotano utilizado en la anestesia, puesto que se ha descrito que este compuesto es capaz de alterar la expresión de selectina P⁹⁴. Por otro lado, paralelamente a la sobre-expresión de selectina P en el grupo control, se

observó una reacción aguda con agregados plaquetarios activados y positivos para selectina P, además de una vasodilatación intensa. Esta reacción de tipo agudo no guardaba relación morfológica alguna con la reacción inflamatoria observada en la piel de perros con DA, por lo que la elevada expresión de selectina P en las muestras de perros no atópicos fue considerada como un artefacto.

En referencia a la expresión de ICAM-1, se encontró una tendencia a un incremento en el número de vasos que expresan esta molécula de adhesión en la piel lesionada de perros con DA comparándolo con la piel no lesionada. En las muestras de la piel no lesionada de estos perros, a su vez, se observó una tendencia a una expresión mayor que en los perros no atópicos. Es posible que la reacción aguda artefactual observada en estos últimos perros pueda haber alterado los niveles de ICAM-1 que se observarían en otras condiciones. Estos resultados añaden una perspectiva cuantitativa a estudios previos hechos en perros atópicos⁶⁸ y son análogos a los observados en la piel lesionada, no lesionada y sana en muestras de piel de pacientes humanos con DA²⁸. Analizando la expresión de proteína de TNF- α encontramos una tendencia muy parecida a la de la expresión de ICAM-1. También en muestras de piel de pacientes atópicos se ha observado un aumento de esta citocina⁷⁷. Recientemente, Olivry y cols.⁹⁵ han publicado un trabajo en el que utiliza la inmunofluorescencia para detectar proteína de TNF- α en la piel de perros con DA. Se trata de un estudio clínico en el que únicamente se valora la expresión proteica tras el tratamiento con un fármaco y con el placebo. Por lo tanto, no existen trabajos previos en los que se cuantifique esta proteína en piel lesionada y no lesionada de perros atópicos. Sin embargo, nuestras observaciones concuerdan con los resultados encontrados por otros autores acerca de la expresión de mRNA para esta citocina pro-inflamatoria en muestras de piel de perros con DA^{71,72,79}. La correlación entre la expresión de ICAM-1 y de TNF- α en piel lesionada y piel no lesionada sugiere una asociación funcional entre ambas moléculas en la DA *in vivo*, como por ejemplo que el incremento de proteína de ICAM-1 sea inducido en gran medida por el

TNF- α . Esto concordaría con los resultados de nuestros experimentos *in vitro* en los que demostramos que la inducción de la sobre-expresión de ICAM-1 en las CE se produce debido a la actividad del mediador mastocitario TNF- α ⁹⁶, como también se ha visto en las CE humanas⁵⁸.

Es probable que la tendencia observada a una expresión mayor de ICAM-1 y TNF- α en las muestras de piel lesionada hubiera sido estadísticamente significativa si el estudio se hubiera realizado con más de 6 perros por grupo. Además, probablemente en presencia de toxinas bacterianas hubiéramos encontrado niveles superiores de TNF- α (procedente de queratinocitos estimulados) de ICAM-1 y por tanto también un mayor grado de inflamación.

Las moléculas pro-inflamatorias estudiadas son posibles dianas farmacológicas para el control de la inflamación cutánea. Su implicación en las lesiones de la DA indica el interés de seguir investigando en esta dirección, probablemente profundizando en el conocimiento de la relación entre las poblaciones celulares implicadas en la instauración de la inflamación alérgica.

2 Expresión inducida por mastocitos caninos de moléculas de adhesión en células endoteliales

Para dilucidar la contribución de los MC al aumento de expresión de las moléculas pro-inflamatorias observado, se estableció un modelo de comunicación MC-CE en el que se estudió de forma aislada el efecto de los mediadores mastocitarios sobre las CE.

Para la obtención de las CE caninas (CCEC) maduras se ha puesto a punto una técnica sencilla y rápida de perfusión de carótidas de perro. Mediante esta técnica de aislamiento se obtiene una suspensión de células viables puras de origen arterial. Puesto que estas células pueden expandirse en cultivo, congelarse y volverse a cultivar sin que pierdan reactividad o viabilidad, tras un solo proceso de aislamiento pueden llegar a realizarse entre 20 y 25

experimentos como el llevado a cabo para este estudio (ver *Material y Métodos*). Además, comparando las células aisladas de dos perros, su fenotipo y comportamiento en cultivo fue el mismo, lo cual indica la reproductibilidad de la técnica.

En las CE en reposo se detectó mediante inmunocitoquímica CD31 en la membrana y selectina P en el citoplasma y mediante citometría de flujo ICAM-1 en la membrana (pero no selectina P en la membrana, corroborando lo observado mediante inmunocitoquímica). Estas observaciones indican que la manipulación a la que se someten las CCEC durante el proceso de aislamiento no altera posiblemente el fenotipo normalmente observado en este tipo de CE *in vivo*⁹⁷.

La mayoría de los experimentos realizados *in vitro* en los que se estudia la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio se han llevado a cabo en CE provenientes de vena umbilical (HUVEC), de microvasculatura dérmica (HDMEC) o de aorta bovina (BAEC). No se conoce la importancia relativa del endotelio arterial comparado con el endotelio venoso o capilar en la inflamación aunque se ha sugerido que a veces las diferencias entre diversos procesos inflamatorios podrían ser debidas a la expresión diferencial de moléculas de adhesión en arterias y en venas⁹⁸.

A pesar de haberse utilizado modelos caninos de inflamación *in vivo* e *in vitro*, existe poca información sobre el uso en experimentos *in vitro* de CE caninas. La morfología adoquinada y la expresión de ICAM-1 y selectina P descritas en las CCEC también han sido observadas en CE caninas aisladas de vena yugular. Probablemente en futuros estudios en los que se comparen estos dos tipos de CE se encuentren diferencias en su fenotipo que reflejarán su diferente comportamiento en situaciones fisiológicas y patológicas. Esto sugeriría que también las interacciones MC-CE puedan ser diferentes en función del origen de las CE.

Hay un interés creciente en conocer las propiedades pro-inflamatorias de los MC, particularmente su contribución al reclutamiento celular. Recientemente se

ha descrito que los MC pueden transportar IFN- γ (y posiblemente otras citocinas) en su membrana, lo cual supone un nuevo mecanismo de presentación de moléculas⁹⁹. Con respecto a las moléculas de adhesión, en nuestro estudio se ha detectado la inducción de mRNA de VCAM-1 en fragmentos de piel canina tras la estimulación de los MC cutáneos vía IgE. Otros investigadores han observado un aumento de expresión de proteína de VCAM-1, selectina E e ICAM-1 en el endotelio inducido por mediadores expresados constitutivamente en MC mediante contacto célula-célula¹⁰⁰. Por el contrario, en el modelo que nosotros proponemos los mediadores liberados espontáneamente no inducen cambios en la expresión de ICAM-1 ni de selectina P. Además, los mediadores liberados tras la activación promueven el aumento de expresión de las moléculas de adhesión sin necesitar el contacto directo entre dos poblaciones celulares. Esto haría que en los procesos inflamatorios los MC activados pudieran interactuar con un mayor número de células de su entorno mediante la liberación de sus mediadores.

La activación de los MC C₂ con PMA e ionóforo durante 5 y 24h induce un incremento en la expresión de la selectina P endotelial. Entre los mediadores liberados por los MC detectamos histamina, y se ha descrito que utilizada en diferentes condiciones experimentales induce la expresión de selectina P^{46-48,101,102}. La mayoría de estos estudios sugieren que este efecto es, al menos en parte, mediado por receptores H₁ y apuntan a los MC como fuente principal de esta histamina. Sin embargo, en nuestro estudio el aumento de expresión de selectina P observado en CCEC e inducido por MC activados parece independiente de la histamina. Para hacer esta afirmación nos basamos en dos observaciones: por un lado vemos que la adición de un antagonista del receptor H₁ no disminuye la expresión de selectina P, y por otro lado las fluctuaciones del contenido en histamina en los sobrenadantes no se acompañan de cambios paralelos en la expresión de selectina P. Además, no creemos que en nuestro modelo esta expresión sea mediada por receptores H₂ como han sugerido otros autores¹⁰¹ porque en los experimentos preliminares en los que se incubaron CCEC directamente con histamina (10⁻⁵M, 10⁻⁶M) no

se observó un aumento de expresión de selectina P (datos no mostrados). Así pues, en concordancia con lo anteriormente descrito en estudios con ratas *in vivo*¹⁰³, hemos demostrado que los MC modulan la expresión de selectina P a través de mediadores mastocitarios preformados o de nueva síntesis. Se sabe que citocinas como la IL-4^{23,25,52} y la IL-13²⁵ entre otros mediadores tienen capacidad para inducir la expresión de selectina P. A pesar de que algunos investigadores han descrito que el TNF- α puede inducir un aumento de la expresión de selectina P endotelial⁵², el TNF- α funcional liberado por los MC C₂ activados no ha participado en la inducción de la sobre-expresión de esta molécula de adhesión observada en las CCEC. Es remarcable que en CE caninas de yugular sí se ha descrito la inducción de mRNA de selectina P mediada por TNF- α ¹⁰⁴. Probablemente, esta diferencia funcional entre CE arteriales y venosas refleje un comportamiento pro-inflamatorio diferente también *in vivo*.

El aumento de ICAM-1 en la membrana de las CCEC promovido por los sobrenadantes de 5 y 24h es atribuible en su totalidad al TNF- α liberado por MC, ya que al incubar estos sobrenadantes con un anticuerpo neutralizante para esta citocina pro-inflamatoria, la expresión de ICAM-1 revierte hasta niveles basales. Además no observamos ningún efecto sinérgico entre la histamina y el TNF- α en la expresión de ICAM-1 como han sugerido otros autores⁵⁶ ya que el antagonista de H₁ no indujo cambios en los niveles de expresión. De acuerdo con estos resultados, tampoco se observó un incremento en la expresión de ICAM-1 al incubar las CCEC con el sobrenadante de 30min, en el que no se detectó TNF- α preformado. Con MC de ratón estimulados se observaron resultados muy parecidos, aboliéndose por completo la inducción de ICAM-1 mediante un anticuerpo anti-TNF- α ⁵⁸. También se ha visto que los sobrenadantes de MC humanos de conjuntiva estimulados mediante IgE/anti-IgE aumentan la expresión de ICAM-1 en células epiteliales vía TNF- α ⁵⁹. Éstos no dejan de ser datos sorprendentes dada la capacidad de los MC para liberar IL1- β y PAF, dos inductores de ICAM-

1 en otros tipos celulares. Probablemente esto desenmascare la especificidad e importancia del TNF- α de MC sobre el ICAM-1 endotelial y sugiera la importancia en el control farmacológico de este eje en condiciones en las que la inflamación sea dirigida por los MC como puede ser la DA.

Un análisis en profundidad de la comunicación de los MC C₂ sobre las CCEC puede aportar datos fundamentales sobre los mecanismos involucrados en el reclutamiento de células inflamatorias en procesos alérgicos. El modelo *in vitro* que proponemos puede ser importante en procesos inflamatorios mediados por interacciones MC-CE, como los que sustentan la reacción alérgica tardía de la DA. Esto reforzaría la idea que hemos planteado en el apartado anterior de que en la piel con lesiones de perros con DA la tendencia al aumento de la expresión de ICAM-1 observada sea inducida por el TNF- α procedente de MC cutáneos estimulados.

3 El perro hipersensible a *Ascaris suum*: un modelo para el estudio de la inflamación alérgica cutánea

Además de las particulares ventajas del estudio de los mecanismos de inflamación alérgica en perros con DA y en suspensiones celulares *in vitro* se dispone del modelo de perro hipersensible a *Ascaris suum*. Este modelo de alergia ha sido utilizado para el estudio de la respuesta cutánea inmediata o EPR tras la inyección intradérmica de Ag¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ y sobretodo para el estudio de la respuesta asmática tardía tras inhalación de Ag de *Ascaris suum*¹⁰⁸⁻¹¹¹. La fase inmediata o temprana se inicia con una vasodilatación local, seguida de extravasación que macroscópicamente se manifiesta como una pápula acompañada de eritema. Esta pápula es máxima a los 20 minutos y es debida a la activación de los MC cutáneos como consecuencia de que el Ag se deposita directamente en la dermis, se une a las IgE específicas en la membrana de estas células y provoca su desgranulación. La histamina liberada por los MC activará la microvasculatura dérmica provocando vasodilatación.

Esto explica que como control positivo en la prueba de inyección intradérmica de Ag se utilice histamina.

Aproximadamente en un 50% de los perros sensibilizados a *Ascaris suum* la respuesta a la inhalación de Ag es bifásica, es decir que se da una respuesta inmediata seguida de una respuesta tardía^{64,112}. El presente estudio se ha llevado a cabo para comprobar si la inyección intradérmica de Ag de *Ascaris suum* provoca un proceso inflamatorio tras la reacción cutánea inmediata. Es muy probable que el proceso inflamatorio que se desencadene posteriormente sea iniciado por mediadores mastocitarios, como se ha observado en el hombre¹¹³ y como sugiere un reciente estudio en el que la inyección intradérmica de anti-IgE en perros atópicos provoca una reacción cutánea bifásica¹¹⁴.

A los 20 minutos de la inyección intradérmica del Ag se empiezan a observar neutrófilos que podrían estar siendo atraídos entre otros mediadores preformados por la histamina liberada por los MC activados⁷. A partir de las 2 horas las células inflamatorias que predominan son los eosinófilos. Probablemente su reclutamiento se vea facilitado por la expresión de selectina P, que también alcanza su pico máximo de expresión a las 2 horas de la inyección de Ag. La estrecha relación entre el reclutamiento de eosinófilos en los sitios de inflamación y la expresión de selectina P en endotelio vascular ha sido previamente observada en modelos humanos de alergia *in vitro*^{24-27,30}. El aumento de expresión de selectina P puede estar inducido por la activación de los MC cutáneos, tal y como se observa en nuestro modelo *in vitro* de comunicación MC-CE. Cabe destacar que el patrón de células inflamatorias observado a diferentes tiempos tras estimulación con Ag es similar al descrito en el hombre^{113,115} y también en el perro¹¹⁴, aunque al no haber realizado tinciones específicas para células dendríticas o subpoblaciones linfocitarias faltan datos que lo corroboren.

El modelo del perro hipersensible a *Ascaris suum* es muy útil para el estudio de procesos inflamatorios cutáneos inmunomediados, sobretudo para estudiar el

papel de los MC. Uno de los factores limitantes para avanzar en la evaluación de la inflamación alérgica en este modelo es la disponibilidad del mismo, puesto que se requiere de un rastreo en numerosa población de perros Beagle hasta encontrar los individuos espontáneamente sensibilizados. Por este motivo nos planteamos la posibilidad de inducir la sensibilización al Ag de *Ascaris suum* en perros Beagle *naïve*. Tras el protocolo de sensibilización primaria por inyección intradérmica repetida del Ag de *Ascaris* purificado, el 60% de la población experimental resultó finalmente sensibilizado, tal y como reflejaba la reacción cutánea tras la inyección de antígeno. Recientemente en un estudio hecho con un modelo canino de alergia se ha descrito que la inyección intradérmica de Ag es más sensible que la medición de IgE específicas en suero, seguramente debido a una vida media más larga de las IgE unidas al tejido respecto de las del suero⁹¹. Precisamente esta prueba nos permitió detectar una reacción positiva al Ag 2 meses después del último estímulo con Ag, cuando normalmente entre 4 y 6 semanas después del contacto con el Ag los niveles de IgE alérgeno-específico en suero ya han decaído. El Ag inyectado intradérmicamente además de provocar una reacción cutánea inmediata seguida de un proceso inflamatorio, participa directamente en la inducción de la sensibilización primaria. Esto indica la importancia de la piel como órgano inmunitario tal y como han sugerido otros investigadores anteriormente^{116,117}. El éxito de este método evitará largos procesos de selección de animales (no siempre posibles) o su sensibilización desde el nacimiento^{118,119}.

Hacen falta más estudios para conocer los mecanismos celulares que se desencadenan al inyectar el Ag por primera vez en este modelo de alergia cutánea de perros experimentalmente sensibilizados a *Ascaris suum*. Probablemente el procesamiento del Ag lo hacen las células dendríticas de la dermis, que viajarían a nódulos linfáticos locales, donde presentarían el alérgeno a los linfocitos T *naïve* permitiéndoles en un segundo contacto con el mismo antígeno migrar a la piel (*homing*). En concordancia con esta teoría, recientemente Olivry y cols.¹¹⁴ han descrito un aumento a lo largo del tiempo de

células dendríticas en la dermis de perros atópicos tras la inyección intradérmica de Ag, así como tras la inyección de anti-IgE en piel de perros no atópicos. Una vez estos perros han sido sensibilizados, la inyección intradérmica de antígeno estimularía directamente a los MC con IgE específicas dando lugar a la misma reacción bifásica (reacción inmediata y reacción tardía)¹¹³ que la observada en los perros espontáneamente hipersensibles a Asc S1. Cabe destacar, que la entrada del Ag por primera vez mediante otras vías puede desencadenar mecanismos inmunológicos diferentes. Por ejemplo, si la vía de entrada fuera subcutánea¹¹⁸ el sistema inmunitario de la piel seguramente no sería directamente activado. En cambio, si ésta fuera percutánea¹¹⁹ las células dendríticas de la epidermis (células de Langerhans) serían las principales instigadoras de la sensibilización primaria, como probablemente ocurre de forma natural en la sensibilización de los individuos atópicos. La vía de entrada del Ag utilizada en nuestro estudio se aproxima más a esta última, que parece ser más “fisiológica”. Además, es posible que por la proximidad física de la aguja a la epidermis y su orientación invertida en el momento de la inyección, parte de la solución de Ag difunda hacia la base de la epidermis. Precisamente aquí es donde se encuentran localizadas las células de Langerhans y por tanto no se descarta que la vía de sensibilización intradérmica pudiera compartir, en parte, el mecanismo de sensibilización primaria con la vía percutánea.

Aunque se deberían realizar estudios de mayor duración, probablemente los perros que fueron finalmente sensibilizados tenían un bagaje genético diferente a los que no respondieron, teniendo los primeros predisposición a desarrollar respuestas de tipo IgE, o sea que se trataba de individuos atópicos. Se cree que la genética de los procesos alérgicos en humanos y en perros Beagle es muy similar¹²⁰. Así pues, dada la heredabilidad del rasgo “atópico”, es probable que la endogamia de los Beagle de laboratorio haya contribuido al alto porcentaje de animales que se han sensibilizado en nuestro estudio. Además, cabe la posibilidad de que el eczema provocado por la primera inyección

Discusión

intradérmica de Ag del protocolo de sensibilización en 4 de los 6 perros positivos al final del estudio sea un reflejo de su condición “atópica”.

La obtención de perros hipersensibles a *Ascaris suum* mediante el protocolo de inmunización transcutánea facilita la disponibilidad de este modelo de alergia cutánea. Esto permitirá futuros estudios sobre la caracterización de los procesos inflamatorios, pudiendo facilitar así el conocimiento de nuevas dianas terapéuticas para combatir mejor los procesos alérgicos de la piel.

Conclusiones

1. El grado de inflamación en las lesiones cutáneas de perros con dermatitis atópica sin infección bacteriana concomitante es de leve a moderado. Es probable que, al igual que en la dermatitis atópica humana, los superantígenos bacterianos contribuyan decisivamente a la intensidad del proceso inflamatorio en la dermatitis atópica canina.
2. La expresión de proteína de selectina P funcional en las lesiones cutáneas de perros con dermatitis atópica es superior a la de la piel no lesionada. La selectina P puede, por lo tanto, jugar un papel importante en el inicio del reclutamiento de células inflamatorias en la piel de perros atópicos.
3. Mediadores de mastocitos, tanto preformados como de nueva síntesis, inducen la expresión de selectina P en células endoteliales aisladas de carótida canina. Dicho incremento no está mediado ni por los receptores histamínicos H_1 ni por la actividad del $TNF-\alpha$. Es probable que el aumento de selectina P observado en las lesiones de perros con dermatitis atópica sea debido, al menos en parte a la actividad mastocitaria.
4. La inyección intradérmica de antígeno de *Ascaris suum* a perros hipersensibles induce una respuesta inmediata (pápula) y una respuesta tardía (inflamación) que cursa con un aumento de la expresión de selectina P. Se trata por lo tanto de un modelo idóneo para el estudio de los mecanismos de inflamación alérgica cutánea.
5. Las proteínas de ICAM-1 y de $TNF-\alpha$ no son inducidas en un proceso inflamatorio cutáneo leve en perros con dermatitis atópica. A pesar de no observarse un incremento significativo se adivina una tendencia al aumento de ICAM-1 y de $TNF-\alpha$. Dicho aumento probablemente se

reflejaría estadísticamente si se analizaran muestras cutáneas con un grado de inflamación superior. Además, se observa una correlación entre el grado de expresión de ambas moléculas, lo cual pudiera ser la consecuencia de una relación funcional entre el TNF- α y el ICAM-1 cutáneos.

6. El TNF- α de nueva síntesis, pero no el almacenado, liberado por mastocitos estimulados es responsable de la inducción del aumento de expresión de ICAM-1 en células endoteliales aisladas de carótida canina *in vitro*. Quizás esta relación funcional explique la correlación entre el grado de expresión de ambas moléculas detectado en perros con dermatitis atópica.
7. La inyección intradérmica repetida de Ag de *Ascaris suum* a perros *naïve* predispuestos genéticamente induce la activación del sistema inmunitario (o sensibilización). Dichos perros sensibilizados desarrollan posteriormente lesiones cutáneas tras la inyección intradérmica de antígeno. Se establece así un mecanismo de inducción del modelo de perro hipersensible que permitirá avanzar más rápidamente en el conocimiento de las moléculas involucradas en la instauración de la inflamación alérgica cutánea.
8. El aislamiento mediante digestión enzimática del endotelio de carótida canina proporciona un número elevado y viable de células endoteliales puras, idóneo para el estudio de la biología de esta población celular.

Bibliografía

1. Teran LM. CCL chemokines and asthma. *Immunol Today* 2000;21:235-241.
2. Montefort S, Gratziau C, Goulding D, et al. Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J Clin Invest* 1994;93:1411-1421.
3. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-314.
4. Wershil BK, Wang Z-S, Gordon JR, et al. Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. *J Clin Invest* 1991;87:446-453.
5. Christofidou-Solomidou M, Murphy JF, Albelda SM. Induction of E-selectin dependent leukocyte recruitment by mast cell degranulation in human skin grafts transplanted on SCID mice. *Am J Pathol* 1996;148:177-188.
6. Matsuoka T, Hiroyuki T, et al. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 2000;287:2013-2017.
7. Falus A, MK. Histamine: an early messenger in inflammatory and immune reactions. *Immunol Today* 1992;13:154-156.
8. Walls AF, He S, Teran LM, et al. Granulocyte recruitment by human mast cell tryptase. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:372-373.
9. Emery DL, Djokic DT, Graf PD, et al. Prostaglandin D2 causes accumulation of eosinophils in the lumen of the dog trachea. *J Appl Physiol* 1989;67:959-962.

Bibliografía

10. Hoover RL, Karnovsky MJ, Austen KF, et al. Leukotriene B₄ action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. *Proc Nat Acad Sci* 1984;84:2191-2193.
11. Zimmerman GA, McIntyre M, Mehra M, et al. Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J Cell Biol* 1990;110:529-540.
12. Thorlacius H LL, Hedqvist P, Raud J. Microvascular actions of histamine: synergism with Leukotriene B₄ and role in allergic leukocyte recruitment. *Clin Exp Allergy* 1997;27:445-451.
13. Moller A, Lippert U, Lessmann D, et al. Human mast cells produce IL-8. *J Immunol* 1993;151:3261-3266.
14. Okayama Y, Kobayashi H, Ashman LK, et al. Human lung mast cells are enriched in the capacity to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to IgE-dependent stimulation. *Eur J Immunol* 1998;28:708-715.
15. Das AM, Flower RJ, Perretti M. Resident mast cells are important for eotaxin-induced eosinophil accumulation *in vivo*. *J Leuk Biol* 1998;64:156-162.
16. Hogaboam C, Kunkel SL, Strieter RM, et al. Novel role fo transmembrane SCF for mast cell activation and eotaxin production in mast cell-fibroblast interactions. *J Immunol* 1998;160:6166-6171.
17. Yano K, Yamaguchi M, de Mora F, et al. Production of macrophage inflammatory protein-1 α by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE binding ability. *Lab Invest* 1997;77:185-193.

18. Selvan RS, Butterfield JH, Krangel MS. Expression of multiple chemokine genes by a human mast cell leukemia. *J Biol Chem* 1994;269:13893-13899.
19. Wakita H, Sakamoto T, Tokura Y, et al. E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as critical adhesion molecules for infiltration of T lymphocytes and eosinophils in atopic dermatitis. *J Cut Pathol* 1994;21:33-39.
20. Jung K, Linse F, Pals ST, et al. Adhesion molecules in atopic dermatitis: patch tests elicited by house dust mite. *Contact Dermatitis* 1997;37:163-172.
21. Gosset P, Tillie-Leblond I, Janin A, et al. Expression of E-selectin ICAM-1 and VCAM-1 on bronchial biopsies from allergic and non-allergic asthmatic patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1995;106:69-77.
22. Bischoff J BC. Regulation of P-selectin by TNF- α . *Biochem Bioph Res Com* 1995;210:174-180.
23. Yao L PJ, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. IL-4 or OSM induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med* 1996;184:81-92.
24. Patel KD. Eosinophil tethering to IL-4-activated endothelial cells requires both P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood* 1998;92:3904-3911.
25. Woltman G, McNulty CA, Dewson G, et al. IL-13 induces PSGL-1/p-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to HUVEC under flow. *Blood* 2000;95:3146-3152.
26. Dang B, Wiehler S, Patel K. Increased PSGL-1 expression on granulocytes from allergic-asthmatic subjects results in enhanced leukocyte recruitment under flow conditions. *J Leuk Biol* 2002;72:702-710.

Bibliografía

27. Satoh T, Kaneko M, Ming-Hua W, et al. Contribution of selectin ligands into the skin patients with atopic dermatitis. *Eur J Immunol* 2002;32:1274-1281.
28. Jung K, Linse F, Heller R, et al. Adhesion molecules in atopic dermatitis: VCAM-1 and ICAM-1 expression is increased in healthy-appearing skin. *Allergy* 1996;51:452-460.
29. Barker JNWN. Adhesion molecules in cutaneous inflammation. *Ciba Found Symp* 1995;189:91-106.
30. Wardlaw AJ. Eosinophil trafficking in asthma. *Clin Med* 2001;1:214-218.
31. De Sanctis GT, Wolyniec WW, Green F, et al. Reduction of allergic airways responses in P-selectin-deficient mice. *J Appl Physiol* 1997;83:681-687.
32. de Mora F, Williams CMM, Frenette PS, et al. P- and E-selectins are required for the leukocyte recruitment, but not the tissue swelling, associated with IgE- and mast cell-dependent inflammation in mouse skin. *Lab Invest* 1998;78:497-505.
33. Wada Y, Kuzuhara A, Hanamura M, et al. Role of selectins on IgE-mediated skin reaction. *Br J Pharmacol* 2000;131:1531-1536.
34. Hirai S, Kageshita T, Kimura T, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble E-selectin levels in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1996;134:657-661.
35. Kobayashi T, Hashimoto S, Imai K, et al. Elevation of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and sE-selectin levels in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 1994;96:110-115.

36. Broide DH HD, Sriramanao P. Inhibition of eosinophil rolling and recruitment in P-selectin-and ICAM-1-deficient mice. *Blood* 1998;91:2847-2856.
37. Wegner CD GR, Reilly P, Haynes N, Lets LG and Rothlein R. Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 1990;247:456-459.
38. Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakoleva TV, et al. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* 2002;22:146-167.
39. Silvestri M, Spallarossa D, Battistini E, et al. Changes in inflammatory and clinical parameters and in bronchial hyperreactivity asthmatic children sensitized to house dust mites following sublingual immunotherapy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2002;12:52-59.
40. Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. A randomized, double-blind trial of the effect of treatment with montelukast on bronchial hyperresponsiveness and serum eosinophilic cationic protein (ECP), soluble interleukin 2 receptor (sIL-2R) and soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:257-263.
41. Ciprandi G, Tosca MA, Passalacqua G, et al. Intranasal mometasone furoate reduces late-phase inflammation after allergen challenge. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:433-438.
42. Bullard DC QL, Lorenzo I, Quinlin WM, Doyle NA, Bosse R, Vestweber D, Doerschuk CM, Beaudet AL. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest* 1995;95:1782-1788.

Bibliografía

43. Klein LM, Lavker RM, Matis WL, et al. Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion. *Proc Nat Acad Sci* 1989;86:8972-8976.
44. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, et al. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α , which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Nat Acad Sci* 1991;88:4220-4224.
45. Yan H-C, Delisser HM, Pilewski JM, et al. Leukocyte recruitment into human skin transplants onto severe combined immunodeficient mice induced by TNF- α is dependent on E-selectin. *J Immunol* 1994;152:3053-3063.
46. Jones DA, Abbassi O, McIntire LV, et al. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J* 1993;65:1560-1569.
47. Kubes P, Kanwar S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol* 1994;152:3570-3577.
48. Izushi K, Nakahara H, Nobuyuki T, et al. The role of histamine H₁ receptors in late-phase reaction of allergic conjunctivitis. *Eur J Pharmacol* 2002;440:79-82.
49. Zimmerman GA PS, McIntyre MT,. Leukotrienes C4 and D4: inflammatory agonists that induce PAF synthesis and endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *Advances of Reumatology and Inflammation* 1992;J Fritschs and Müller-Peddinghaus:p49.
50. Ohnishi M, Imanishi N. Role of P-selectin in the emigration of neutrophils to chemoattractant-induced cutaneous inflammation in mice. *Inflammation* 2000;24:583-593.

51. Gotsch U JU, Dominis M, Vetsweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha *in vivo*. *Cell Adhes Commun* 1994;2:7-14.
52. Stocker CJ, Sugars KL, Harari OA, et al. TNF- α , IL-4, and IFN γ regulate differential expression of P- and E-selectin expression by porcine aortic endothelial cells. *J Immunol* 2000;164:3309-3315.
53. Burd PR, Thompson WC, Max EE, et al. Activated mast cells produce interleukin 13. *J Exp Med* 1995;181:1373-1380.
54. Toru H PR, Ra C, Yata J, Nakanata T. Human mast cells produce IL-13 by high-affinity IgE receptor cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4-primed human mast cells. *J Allergy Clin immunol* 1998;102:491-502.
55. Kanbe N KM, Yamashita T, Kurimoto F, Yanagihara Y, Miyachi Y. Cord-blood-derived human cultured mast cells produce IL-13 in the presence of stem cell factor. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;119:138-142.
56. Miki I, Kusano A, Ohta S, et al. Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. *Cellular Immunology* 1996;171:285-288.
57. Abbas AK LA, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. Fourth ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000.
58. Meng H, Tonnensen M G, Marchese M J CRA, et al. Mast cells are potent regulators of endothelial cell adhesion molecule ICAM-1 and VCAM-1 expression. *J Cell Physiol* 1995;165:40-53.
59. Cook EB, Stahl JL, Barney NP, et al. Olopatadine inhibits anti-immunoglobulin E-stimulated conjunctival mast cell upregulation of ICAM-1

Bibliografía

expression on conjunctival epithelial cells. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87:424-429.

60. Raab M, Daxecker H, Markovic S, et al. Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. *Clin Chim Acta* 2002;321.

61. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. *Small animal dermatology*. Saunders WB, 2001.

62. Olivry T, de Boer DJ, Griffin CE, et al. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexikon. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81:143-146.

63. Hirshman CA. The basenji-greyhound dog model of asthma. *Chest* 1985;87S:172S-178S.

64. Dollery CT, Eady R, Fuller RW, et al. Bronchial anaphylaxis in *Ascaris* sensitive dogs. *Br J Pharmacol* 1987;90:34P.

65. Woolley MJ, Lane CG, Ellis R, et al. Role of airway eosinophils in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness in dogs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1508-1512.

66. Christie JF, Dunbar B, Kennedy MW. The ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris suum*: epitope stability, mass spectrometry, and N-terminal sequence comparison with its homologue in *Toxocara canis*. *Clin Exp Immunol* 1993;92:125-132.

67. Sinke J, Thepen T, Bihari I, et al. Immunophenotyping of skin-infiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;57:13-23.

68. Olivry T, Naydan DK, Moore PF. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Am J Dermatopathol* 1997;19:477-486.
69. Nimmo Wilkie JS, Yager JA, Eyre P, et al. Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. *Vet Pathol* 1990;27:179-186.
70. de Mora F, Garcia G, Puigdemont A, et al. Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis. *Inflamm Res* 1996;45:424-427.
71. Maeda S, Fujiwara S, Omori K, et al. Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;88:79-87.
72. Nuttall TJ, Knight PA, McAlees SM, et al. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2002;32:789-795.
73. Maeda S, Okayama M, Omori K, et al. Expression of CC chemokine receptor 4 (CCR4) mRNA in canine atopic skin lesion. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;90:145-154.
74. Nakatani T, Kaburagi Y, Shimada Y, et al. CCR4 memory CD4+ T lymphocytes are increased in peripheral blood and lesional skin from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:353-358.
75. Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, et al. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:535-541.

Bibliografía

76. Chénier S, Doré M. P-selectin expression in canine cutaneous inflammatory diseases and mast cell tumors. *Vet Pathol* 1998;35:85-93.
77. de Vries IJ, Langeveld-Wildschut EG, van Reijssen FC, et al. Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: effect of TNF-alpha and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:461-468.
78. Junghans V, Gutgesell C, Jung T, et al. Epidermal cytokines IL1-beta, TNF-alpha, and IL-12 in patients with atopic dermatitis: response to application of house dust mite antigens. *J Invest Dermatol* 1998;111:1184-1188.
79. Olivry T, Dean GA, Tompkins MB, et al. Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Exp Dermatol* 1999;8:204-211.
80. DeVinney R, Gold WM. Establishment of two dog mastocytoma cell lines in continuous culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:413-420.
81. Lazarus SC, DeVinney R, McCabe LJ, et al. Isolated canine mastocytoma cells: propagation and characterization of two cell lines. *Am J Physiol* 1986;251:C935-C944.
82. Auxilia ST, Hill PB. Mast cells distribution in normal dog skin: a possible explanation for the predilection sites of AD. *British Small Animal Veterinary Association* 1999;p236.
83. Becker AB, Chung KF, McDonald DM, et al. Cutaneous mast cell heterogeneity: response to antigen in atopic dogs. *J Allergy Clin Immunol* 1986;78:937-942.

84. Hammerberg B, Olivry T, Orton SM. Skin mast cell histamine release following stem cell factor and high-affinity immunoglobulin E receptor cross-linking in dogs with atopic dermatitis. *Vet Derm* 2001;12:339-346.
85. Willemse TA. Atopic skin disease: a review and reconsideration of diagnostic criteria. *J Small Anim Pract* 1986;27:771-778.
86. Univet SA. Panel de alergenos allercept. Barcelona.
87. Pickvance E, Oegema T, Thompson R. Immunolocalization of selected cytokines and proteases in canine articular cartilage after transarticular loading. *J OrthopRes* 1993;11:313-323.
88. Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH. A method for the fluorimetric assay of histamine. *J Pharm Exp Ther* 1959;127:182-186.
89. Leal-Berumen I, Snider D, Barajas-López C, et al. Cholera toxin increases IL-6 synthesis and decreases TNF- α production by rat peritoneal mast cells. *J Immunol* 1996;156:316-321.
90. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, et al. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry. A view from Stanford. *Clin Chem* 2002;48:1819-1827.
91. Zemmann B, Griot-Wenk M, Marti E, et al. Allergic pulmonary and ocular tissue responses in the absence of serum IgE antibodies (IgE) in an allergic dog model. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:373-378.
92. Leung DW. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:860-876.

Bibliografía

93. Scott DW. Observations on canine atopy. *J Am Anim Hosp Assoc* 1981;17:91-100.
94. Morisaki H, Suematsu M, Wakabayashi Y, et al. Leukocyte-endothelium interaction in the rat mesenteric microcirculation during halothane or sevoflurane anaesthesia. *Anesthesiology* 1997;87:591-598.
95. Olivry T, Dunston SM, Rivierre C, et al. A randomized controlled trial of misoprostol monotherapy for canine atopic dermatitis: effects on dermal cellularity and cutaneous tumour necrosis factor-alpha. *Vet Derm* 2003;14:37-46.
96. Torres R, de Castellarnau C, Ferrer L, et al. Mast cells upregulation of P-selectin and intercellular adhesion molecule 1 on carotid endothelial cells in a new *in vitro* model of mast cell to endothelial cell communication. *Immunol Cell Biol* 2002;80:170-177.
97. Panés J, Perry MA, Anderson DC, et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression *in vivo*. *Am J Physiol* 1995;269.
98. Kalogeris TJ, Kevil CG, Laroux FS, et al. Differential monocyte adhesion and adhesion molecule expression in venous and arterial endothelial cells. *Am J Physiol* 1999;276:L9-L19.
99. Brooks B, Briggs DM, Eastmond NC, et al. Presentation of IFN- γ to nitric oxide-producing cells: a novel function for mast cells. *J Immunology* 2000;164:573-579.
100. van Haaster CM DJ, Engels W, Lemmens JMR, Gijzen AP, Hornstra G, van der Vusse GJ, Duijvestijn AM. Mast cell-mediated induction of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in endothelial cells *in vitro*: constitutive release of

inducing mediators but no effect of degranulation. *Eur J Physiol* 1997;435:137-144.

101. Yamaki K, Thorlacius H, Xie X, et al. Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br J Pharmacol* 1998;123:390-399.

102. Asako H, Kurose I, Wolf R, et al. Role of H1 receptors and P-selectin in histamine-induced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules. *J Clin Invest* 1994;93:1508-1515.

103. Thorlacius H, Raud J, Rosengren-Beezley S, et al. Mast cell activation induces P-selectin-dependent leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules *in vivo*. *Biochem Bioph Res Com* 1994;203:1043-1049.

104. Doré M SJ. Regulation of P-selectin expression by inflammatory mediators in canine jugular endothelial cells. *Vet Pathol* 1996;33:662-671.

105. Queralt M, Brazis P, Merlos M, et al. Inhibitory effects of rupatadine on mast cell histamine release and skin wheal development induced by *Ascaris suum* in hypersensitive dogs. *Drug Dev Res* 1998;44:49-55.

106. Booth BH, Patterson R, Talbot CH. Immediate-type hypersensitivity in dogs: cutaneous, anaphylactic, and respiratory responses to *Ascaris*. *J Lab Clin Med* 1970;76:181-189.

107. De Vos C, Maleux MR, Baltés E, et al. Inhibition of histamine and allergen skin wheal by cetirizine in four animal species. *Ann Allergy* 1987;59:278-282.

108. Itabashi S, Ohrui T, Sekizawa K, et al. Late asthmatic response cause peripheral airway hyperresponsiveness in dogs treated with metopirone. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101:215-220.

Bibliografía

109. Ohrui T, Sekizawa K, Aikawa T, et al. Vascular permeability and airway narrowing during late asthmatic response in dogs treated with metopirone. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:933-943.
110. Turner CR, Spannhake EW. Acute topical steroid administration blocks mast cell increase and late asthmatic response of the canine peripheral airways. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:421-427.
111. McGrogan I, Janssen LJ, Wattie J, et al. Release of epithelium-derived PGE₂ from canine trachea after antigen inhalation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998;274:L220-L225.
112. Woolley MJ, Lane CG, Ellis R, et al. Role of airway eosinophils in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness in dogs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1508-1512.
113. Langeveld-Wildschut EG, Thepen T, Bihari I, et al. Evaluation of the atopy patch test and the cutaneous late-phase reaction as relevant models for the study of allergic inflammation in patients with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:1019-1027.
114. Olivry T, Dunston SM, Murphy KM, et al. Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. *Vet Derm* 2001;12:49-58.
115. Zweiman B, Moskovitz AR, von Allmen C. Comparison of inflammatory events in skin sites with and without cutaneous late-phase reaction after prominent immediate IgE-mediated responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:110-115.

116. Saloga J, Knop J. Does sensitization through the skin occur? *Allergy* 2000;55:905-909.
117. Beck LA, Leung DY. Allergen sensitization through the skin induces systemic allergic responses. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:S258-S263.
118. Egli KS, Schiessl B, Roosje PJ, et al. Evaluation of the usefulness of sensitization to aeroallergens as a model for canine atopic dermatitis in genetically predisposed Beagles. *Am J Vet Res* 2002;63:1329-1336.
119. McCall C, Geoly F, Clarke K. Genetically high IgE puppies sensitized epicutaneously develop house dust mite-specific IgE and dermatitis at site of allergen exposure. 17th ESVD-ECVD Congress Veterinary Dermatology 2001;p.174.
120. de Weck AL, Mayer P, Stumper B, et al. Dog allergy, a model for allergy genetics. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:55-57.