



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departamento de Farmacología, de Toxicología y de Terapéutica

Unidad de Farmacología, Facultad de Veterinaria

Validación Preclínica del Receptor EP2 Mastocitario como Diana Terapéutica Antiasmática

Judith Plaza Almolda

TESIS DOCTORAL

Bellaterra, 2016



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Validación Preclínica del Receptor EP2 Mastocitario como Diana Terapéutica Antiasmática

Tesis Doctoral presentada por: Judith Plaza Almolda

**PARA ACCEDER AL TÍTULO DE DOCTORA DENTRO DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
DE FARMACOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, DE TERAPÉUTICA Y DE
TOXICOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**

Dirigida por: Fernando de Mora Pérez

UNIDAD DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE VETERINARIA



Bellaterra, 2016



Universitat Autònoma
de Barcelona

Departamento de Farmacología, de Toxicología y de Terapéutica

Unidad de Farmacología, Facultad de Veterinaria

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

Validación Preclínica del Receptor EP2 Mastocitario como Diana Terapéutica Antiasmática

El Dr. **Fernando de Mora Pérez**, Profesor Titular del Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Validación preclínica del receptor EP2 mastocitario como diana terapéutica antiasmática**”, cuya autora es **Judith Plaza Almolda**, se ha realizada bajo su dirección, y considerando que cumple con las condiciones exigidas para optar al título de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona, autoriza su defensa pública para que sea evaluada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos que corresponden, firma el presente certificado en Bellaterra a 2 de Febrero de 2016,

Director de la Tesis

Doctoranda

Fernando de Mora Pérez

Judith Plaza Almolda

*Dedicada a todos los que luchan por un objetivo y a pesar de las
dificultades del camino no se rinden*

Never take a breath for granted

La ejecución de este proyecto de tesis doctoral ha sido posible gracias a una **beca FI de la Generalitat de Catalunya** concedida para el período comprendido entre abril 2012 hasta marzo 2015.

El trabajo de investigación realizado se ha subvencionado gracias a la participación en dos proyectos de investigación financiados por el **Instituto de Salud Carlos III**. “Evaluación preclínica del receptor prostanoide 2 (EP2) como diana terapéutica en el asma alérgica” (PS09/00171, de abril a noviembre de 2012) y “Validación del receptor EP2 mastocitario como diana antiasmática y diseño de un biomedicamento de acción selectiva” (PI12/01872, 2012-2015).

*“Most people say that it is the intellect which makes a great scientist.
They are wrong: it is character”*

Albert Einstein

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	23
ÍNDICE DE TABLAS.....	27
ABREVIATURAS.....	31
I. RESUMEN.....	39
II. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	45
1. El Asma: Una Lacra Sanitaria.....	45
2. Necesidad de Nuevas Dianas Antiasmáticas.....	46
2.1. Complejidad fisiopatológica del asma.....	46
2.2. Tratamiento actual del asma y nuevas perspectivas.....	48
2.3. El omalizumab: un medicamento biotecnológico antiasmático.....	50
3. Los Mastocitos.....	52
3.1. Población celular clave en el asma.....	53
3.2. El mastocito como diana terapéutica.....	54
4. El Eje PGE2-Mastocito-Asma.....	56
4.1. Prostaglandinas: de moléculas proinflamatorias a moléculas antiinflamatorias. Un cambio de paradigma.....	56
4.2. Beneficios de la PGE2 en el asma.....	57
4.3. Mastocitos y receptores prostanoideos EP.....	59
4.4. Eje PGE2-MC-EP2-Asma: candidato a diana terapéutica.....	62
5. El Ratón: Un Modelo Idóneo para Estudios Preclínicos de Alergia In Vivo....	65
5.1. Modelos de asma alérgica en el ratón.....	65
5.2. Ratón transgénico: herramienta útil como modelo de estudio.....	66
III. HIPÓTESIS & OBJETIVOS.....	71
1. Hipótesis.....	71
2. Objetivos.....	71

IV. SUBPROYECTOS.....	75
Resumen del Planteamiento Experimental General.....	75
SUBPROYECTO 1: Efecto de la Modulación del Receptor EP2 Mastocitario.....	79
1. Abordaje Experimental del Objetivo 1.....	79
2. Material & Métodos.....	81
2.1. Estudio de la actividad mastocitaria en cultivos de origen humano y de ratón	81
2.1.1. Evaluación de la respuesta mastocitaria en cultivos mastocitarios de ratón	81
2.1.2. Evaluación de la respuesta mastocitaria en cultivos mastocitarios humanos	87
2.2. Efecto del agonismo y antagonismo EP2 en la respuesta de las vías respiratorias a aeroalérgenos in vivo.....	90
2.2.1. Procedimientos experimentales.....	90
2.2.2. Valoración del efecto de la sensibilización y de los tratamientos en la función respiratoria.....	96
2.3. Análisis estadístico.....	100
3. Resultados Comentados.....	102
3.1. Efecto de la activación del receptor EP2 mastocitario.....	102
3.1.1. Comparación del efecto de agonistas del receptor EP2 en poblaciones mastocitarias heterogéneas (fenotípicamente diversas).....	102
3.1.2. Efecto del agonista EP2 CP-533536 en la respuesta de las vías respiratorias a aeroalérgenos in vivo.....	109
3.2. Determinar el impacto del bloqueo del receptor EP2 en la actividad mastocitaria in vitro y en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón.....	113
3.2.1. Efecto del antagonismo EP2 en cultivos de mastocitos pulmonares de ratón (LMC).....	114
3.2.2. Efecto del antagonismo EP2 y del SCG en la respuesta de las vías respiratorias de ratones sensibilizados a aeroalérgenos.....	115

SUBPROYECTO 2: Ratón Transgénico con Sobreexpresión del Receptor EP2 en Mastocitos.....	123
1. Abordaje Experimental del Objetivo 2.....	123
2. Material & Métodos.....	125
2.1. Generación de ratones transgénicos con sobreexpresión del receptor EP2....	125
2.1.1. Fases del desarrollo del ratón transgénico EP2.....	125
2.1.2. Análisis de la sobreexpresión EP2 mediante Western Blot.....	127
2.2. Evaluación del efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario in vitro.....	133
2.2.1. Cultivos celulares.....	133
2.2.2. Evaluación de la respuesta mastocitaria mediante liberación de β -hexosaminidasa.....	134
2.3. Evaluación del efecto de la sobreexpresión EP2 en ratones sensibilizados a aeroalérgenos.....	136
2.3.1. Procedimientos experimentales.....	136
2.3.2. Valoración del efecto de la sensibilización y de los tratamientos en la función respiratoria.....	141
2.4. Análisis estadístico.....	145
3. Resultados Comentados.....	146
3.1. Desarrollo de ratones transgénicos con sobreexpresión EP2.....	146
3.1.1. Generación de los ratones transgénicos EP2.....	146
3.1.2. Selección de los ratones transgénicos que sobreexpresan EP2.....	147
3.2. Evaluar preliminarmente el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario in vitro.....	153
3.2.1. Efecto del agonista EP2 butaprost y de la PGE2 en cultivos primarios peritoneales de ratones WT y TG.....	153
3.2.2. Efecto del agonista EP2 butaprost, del antagonista EP2 AH6809 y de la PGE2 en cultivos primarios pulmonares de ratones WT y TG.....	155

3.3. Evaluar preliminarmente el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón.....	157
3.3.1. Efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 en las vías aéreas de ratones expuestos a HDM.....	157
3.3.2. Efecto de la PGE2 en la respuesta de las vías aéreas de ratones con sobreexpresión del receptor EP2 expuestos a HDM	162
SUBPROYECTO 3: Inhibición Mastocitaria mediante Agonismo EP2 y Bloqueo de la IgE.....	171
1. Abordaje Experimental del Objetivo 3.....	171
2. Material & Métodos.....	173
2.1. Evaluación del efecto de agonistas EP2 y anti-IgE sobre la actividad mastocitaria in vitro.....	173
2.1.1. Cultivos celulares.....	173
2.1.2. Evaluación de la respuesta mastocitaria mediante liberación de β-hexosaminidasa.....	176
2.2. Modelos de anafilaxia dependientes de mastocitos.....	178
2.2.1. PCA (anafilaxia cutánea pasiva).....	178
2.2.2. PRA (anafilaxia respiratoria pasiva).....	183
2.3. Análisis estadístico.....	189
3. Resultados Comentados.....	190
3.1. Evaluación preclínica comparativa de la efectividad de la inhibición mastocitaria mediante agonismo EP2 y bloqueo de la IgE in vitro e in vivo.....	190
3.1.1. Determinar el efecto inhibitorio del agonismo EP2 y anti-IgE in vitro en poblaciones mastocitarias que expresan el receptor humano de la IgE.....	190
3.1.2. Comparación del efecto del agonismo EP2 y de anti-IgE in vivo en un modelo de anafilaxia cutánea dependiente de mastocitos.....	199

3.2. Desarrollo de un modelo de anafilaxia respiratoria en ratones transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE.....	203
3.2.1. Efecto de la sensibilización local con IgE humana en la actividad mastocitaria de ratones FcεRI^{-/-} hFcεRI⁺ y FcεRI^{-/-} hFcεRI^{-/-}.....	204
3.2.2. Efecto de la sensibilización local con IgE humana en la broncoconstricción de las vías aéreas en ratones FcεRI^{-/-} hFcεRI⁺.....	206
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	211
1. La Activación Selectiva del Receptor EP2 Reduce la Actividad Mastocitaria mediante Interacción Directa.....	211
2. La Activación Selectiva del Receptor EP2 Reduce la Alteración Respiratoria en Ratones Sensibilizados a Aeroalérgenos.....	214
3. Relación Funcional entre la Reducción de la Actividad Mastocitaria mediante Activación EP2 y la Reducción de la Alteración Alérgica/Respiratoria.....	216
4. Potencial Terapéutico del Agonismo EP2 frente a la Neutralización de la IgE (Anti-IgE).....	220
5. Sinergia Agonismo EP2 y Anti-IgE: Propuesta de un Modelo In Vivo.....	222
VI. CONCLUSIONES.....	227
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	231
VIII. ANEXOS.....	257
1. Cultivos Primarios de Ratón.....	257
1.1. Lavado peritoneal para obtener PDMC.....	257
1.2. Cultivo de mastocitos pulmonares (LMC).....	257
2. Vías de Administración de Compuestos y Fármacos.....	258

2.1. Administración intranasal.....	258
2.2. Administración intravenosa (cola).....	258
2.3. Administración intraperitoneal.....	259
2.4. Administración intradérmica.....	259
2.5. Administración intravenosa (seno retroorbital).....	259
2.6. Administración intratraqueal (<i>Microsprayer Aerosolizer</i> de Penn-Century).....	260
2.7. Sedación por anestesia de gases (Isoflurano).....	260
3. Análisis Función Pulmonar y Recogida de Muestras.....	261
3.1. Traqueotomía y canulación del ratón.....	261
3.2. Pletismografía invasiva (<i>Buxco Finepointe</i>).....	261
3.3. Exsanguinación vía punción intracardiaca.....	261
3.4. Lavado broncoalveolar (BAL).....	262
3.5. Recogida del pulmón para evaluación de la actividad mastocitaria.....	262
4. Tinción Diff-Quick CITOSPINS: Recuento de Células Inflamatorias del BAL.....	263
5. Prueba de Activación de la Línea Celular Humana de Mastocitos LAD2.....	264
6. Distribución de Azul de Ébano por los Lóbulos Pulmonares tras Administración Intratraqueal con el <i>Microsprayer Aerosolizer</i>.....	265

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de la sensibilización a alérgenos en las vías aéreas.....	47
Figura 2. Esquema representativo del mecanismo de acción del omalizumab.....	51
Figura 3. Esquema representativo de la infiltración mastocitaria en diversas estructuras importantes de las vías aéreas en el asma.....	54
Figura 4. Imágenes representativas a diferente escala (500µm y 250µm) de la cantidad y tipo de infiltración eosinofílica en ratones sensibilizados a HDM sin tratamiento (A, B) y tratados con PGE2 (C, D).....	59
Figura 5. Efecto de los agonistas PGE2/EP2 en liberación mastocitaria dependiente de IgE de diferentes poblaciones de mastocitos humanos y de ratón.....	61
Figura 6. Efecto del eje PGE2-EP2 en la actividad mastocitaria y en la patología de las vías aéreas de ratones sensibilizados a HDM.....	63
Figura 7. Estructura química de una sulfonamida y del compuesto CP-533536.....	88
Figura 8. Estructura química de la Prostaglandina E2, del Butaprost y del CP-533536.....	89
Figura 9. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto del agonista EP2, CP-533536, en las vías aéreas.....	93
Figura 10. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto del antagonista EP1/EP2 (AH6809) y el cromoglicato de sodio (SCG) en las vías aéreas.....	95
Figura 11. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto del agonista EP2, Butaprost, en las vías aéreas de animales <i>knock out</i> (KO EP2) y <i>wild type</i> (WT).....	96
Figura 12. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratón.....	103
Figura 13. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratón.....	103
Figura 14. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos pulmonares (LMC) de ratón.....	104
Figura 15. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en la línea celular de mastocitos de ratón C57.....	106

Figura 16. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) CP-533536 y del (B) butaprost en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en la línea celular humana de mastocitos LAD2.....	108
Figura 17. Efecto del agonista selectivo EP2 CP-533536 en la actividad mastocitaria pulmonar en un modelo murino de asma por exposición a ácaros del polvo (HDM).....	110
Figura 18. Células inflamatorias totales (A) y recuento diferencial en % (B) en ratones expuestos a HDM y tratados con CP-533536.....	111
Figura 19. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones expuestos a HDM y tratados con un agonista selectivo EP2.....	113
Figura 20. Efecto del antagonista EP1/EP2, AH6809, en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos pulmonares (LMC) de ratón.....	114
Figura 21. Células inflamatorias totales (A), % del recuento diferencial (B) y eosinofilia pulmonar (C) en ratones BALB/c expuestos a HDM y tratados con AH6809 y SCG.....	116
Figura 22. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones BALB/c expuestos a HDM y tratados con el AH6809 y el SCG.....	118
Figura 23. Esquema de la construcción transgénica Alpha-Chymase-EP2-SV40PA para la generación de ratones con sobreexpresión del receptor EP2 en mastocitos.....	126
Figura 24. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario en las vías aéreas de animales transgénicos EP2 y wild type EP2.....	139
Figura 25. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto de la prostaglandina E ₂ en las vías aéreas de animales transgénicos EP2 y wild type EP2.....	141
Figura 26. Imagen de la autorradiografía obtenida de la hibridación de la sonda radioactiva sobre la membrana de ensayo de Southern blot en la F0 (A) y en F1 (B).....	146
Figura 27. Expresión basal del receptor EP2 de la PGE ₂ , de la CPA3 y de la β-actina en fragmentos pulmonares de ratones WT y TG de la línea L3. Imagen representativa de un Western Blot.....	151
Figura 28. Expresión basal del receptor EP2 de la PGE ₂ en fragmentos pulmonares de ratones WT y TG. Análisis densitométrico.....	152
Figura 29. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratón de la línea L2.....	154

Figura 30. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratón de la línea L2.....	155
Figura 31. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, del antagonista AH6809 y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en LMC de las líneas L2 y L3.....	156
Figura 32. Actividad mastocitaria en ratones WT y TG con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM de la línea L3 y L4.....	158
Figura 33. Recuento diferencial de células inflamatoria totales en ratones WT y TG con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM de la línea L2 (A), línea L3 (B) y línea L4 (C).....	159
Figura 34. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones WT y TG con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM de la línea L2 (A), línea L3 (B) y línea L4 (C).....	161
Figura 35. Actividad mastocitaria en ratones WT y TG que sobreexpresan el receptor EP2 expuestos a HDM y tratados con PGE2.....	163
Figura 36. Recuento diferencial de células inflamatoria totales en ratones WT y TG con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM y tratados con PGE2 de la línea L3 (A) y línea L4 (B)...	164
Figura 37. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones WT (A) y TG (B) con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM y tratados con PGE2 de la línea L3.....	166
Figura 38. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones WT (A) y TG (B) con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM y tratados con PGE2 de la línea L4.....	166
Figura 39. Modelo de PCA en ratones FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺ (<i>background</i> BALB/c).....	180
Figura 40. Tratamiento con el agonista EP2, butaprost, y el anticuerpo monoclonal anti IgE, omalizumab en un modelo de PCA en ratones FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺ (<i>background</i> BALB/c).....	180
Figura 41. Modelo de anafilaxia respiratoria pasiva (PRA) en ratones FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺ (<i>background</i> BALB/c).....	185
Figura 42. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) butaprost y del anticuerpo monoclonal anti-IgE (B) omalizumab en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en LAD2.....	192
Figura 43. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) butaprost y del anticuerpo monoclonal anti-IgE (B) BSW17 en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en LAD2.....	193
Figura 44. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) CP-533536 y del anticuerpo monoclonal anti-IgE (B) omalizumab en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en LAD2.....	194

Figura 45. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) CP-533536 y del anticuerpo monoclonal anti-IgE (B) omalizumab en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en la línea celular RS-ATL8.....	196
Figura 46. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) butaprost y del anticuerpo monoclonal anti-IgE (B) omalizumab en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en PDMC de ratones FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺	198
Figura 47. Efecto de dosis crecientes de Chimeric human IgE anti-NP en la respuesta mastocitaria in vivo inducida por FcεRI en ratones FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺	200
Figura 48. Efecto de Chimeric human IgE-anti NP en la respuesta mastocitaria in vivo inducida por FcεRI en machos y hembras FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺ (A), e imagen donde se observa la reacción anafiláctica (B).....	200
Figura 49. Efecto del anticuerpo monoclonal anti IgE (omalizumab) en la respuesta mastocitaria in vivo inducida por FcεRI en ratones FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺	202
Figura 50. Efecto del agonista selectivo EP2 (butaprost) en la respuesta mastocitaria in vivo inducida por FcεRI en ratones FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺	202
Figura 51. Efecto del agonista selectivo EP2 (butaprost) en la respuesta mastocitaria in vivo inducida por FcεRI en hembras FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺	203
Figura 52. Actividad mastocitaria en ratones transgénicos FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺ sensibilizados y no sensibilizados a Chimeric human IgE anti NP y tratados con el antígeno específico NP-BSA....	204
Figura 53. Actividad mastocitaria en ratones transgénicos FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺ sensibilizados y no sensibilizados a Chimeric human IgE anti NP y tratados y no tratados con el antígeno específico NP-BSA.....	205
Figura 54. Actividad mastocitaria en ratones transgénicos que no expresan el receptor humano de la IgE, FcεRI ^{-/-} hFcεRI ^{-/-} , sensibilizados y no sensibilizados a IgE y tratados y no tratados con el antígeno específico NP-BSA.....	206
Figura 55. Broncoconstricción (BHR) en ratones FcεRI ^{-/-} hFcεRI ⁺ sensibilizados y no a IgE humana y tratados con el antígeno específico NP-BSA.....	207
Figura 56. Prueba de activación de la línea celular LAD2 de más de 8 meses de mantenimiento en cultivo.....	264
Figura 57. Prueba de activación de la línea celular LAD2 de 1 mes de mantenimiento en cultivo.....	264

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medio de lavado para el cultivo de mastocitos peritoneales.....	83
Tabla 2. Solución de Kimura para recuento específico de mastocitos.....	83
Tabla 3. Medio completo básico para la línea celular CIM/C57.1.....	84
Tabla 4. Tampón HEPES para el ensayo de degranulación mastocitaria.....	85
Tabla 5. Tampón Citrato 0.04M para el ensayo de degranulación mastocitaria.....	86
Tabla 6. Glicina 0.4M para el ensayo de degranulación mastocitaria.....	86
Tabla 7. Tampón de lisis HEPES para la extracción de proteínas.....	99
Tabla 8. La tabla resume el recuento de células total, el recuento de mastocitos, porcentaje de viabilidad y porcentaje de pureza en cultivos primarios de mastocitos pulmonares (LMC).....	104
Tabla 9. Tampón de lisis RIPA para la extracción de proteínas.....	130
Tabla 10. La tabla resume el recuento de células total, porcentaje de viabilidad, porcentaje de pureza de mastocitos y concentración de proteína total en cultivos de mastocitos pulmonares (LMC) en la cuarta semana de cultivo de las líneas transgénicas L2, L3 y L4.....	148
Tabla 11. La tabla resume el recuento de células total, porcentaje de viabilidad, porcentaje de pureza de mastocitos y concentración de proteína total en cultivos de mastocitos peritoneales (PDMC) en la cuarta semana de cultivo de las líneas transgénicas L2 y L3.....	149
Tabla 12. La tabla resume la concentración de proteína total en fragmentos de tejido pulmonar de las líneas de ratones transgénicos L2 y L3.....	150

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Debido a la gran cantidad de conceptos expresados mediante abreviaturas en la tesis, a continuación se detallan por orden alfabético las palabras o enunciados completos que representan:

ADN:	ácido desoxirribonucleico
AH6809:	antagonista receptor EP1/EP2 de la PGE2
AHR:	hiperreactividad bronquial (<i>airway hyperreactivity</i> o <i>airway hyperresponsiveness</i>)
AINE:	antiinflamatorio no esteroideo
AMP:	adenosina monofosfato
AMPc:	AMP cíclico
ANOVA:	análisis de la varianza
anti-COX-2:	anticuerpo contra la ciclooxigenasa-2
anti-IgE:	anticuerpo contra la inmunoglobulina E
anti-IL:	anticuerpo contra la interleucina
anti-TNFα:	anticuerpo contra el factor de necrosis tumoral α
ARN:	ácido ribonucleico
BAL:	lavado broncoalveolar (<i>bronchoalveolar lavage</i>)
BALB/c:	cepa de ratón albino predispuesta genéticamente a desarrollar un fenotipo atópico
BHR:	broncoconstricción (<i>bronchial hyperreactivity</i> or <i>bronchial hyperresponsiveness</i>)
BMMC:	mastocitos de ratón derivados de la médula ósea (<i>bone marrow mast cell</i>)
BSA:	albúmina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
BSW17:	anticuerpo monoclonal anti-IgE
Buta:	butaprost (agonista selectivo del receptor EP2)
C57/C57.1:	línea celular de mastocitos de ratón C1.MC/C57.1
C57BL/6:	cepa de ratón <i>agouti</i> (más utilizada para manipulación genética)
CCD:	dispositivo de cámara acoplada
CD4:	tipo de linfocito T colaborador
cDNA:	ADN complementario
c-kit:	receptor del factor de células madre (<i>stem cell factor receptor</i>)
COX-1:	ciclooxigenasa-1
COX-2:	ciclooxigenasa-2

CP:	CP-533536 (agonista selectivo del receptor EP2)
CPA-3:	carboxipeptidasa A3
CT:	recuento de células total
CTMC:	mastocitos de tejido conjuntivo (<i>connective tissue mast cells</i>)
DC:	células dendríticas
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> (medio de cultivo celular)
DMSO:	dimetilsulfóxido
DNP:	dinitrofenil
DTT:	ditiotrietol
ECL:	sustrato quimioluminiscente (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
ELISA:	ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (<i>enzyme linked-immunosorbent assay</i>)
EP:	receptor prostanoide de la prostaglandina E2
EPR:	respuesta inmediata o temprana de la alergia (<i>early phase response</i>)
ERS:	Sociedad Europea de Enfermedades Respiratorias (<i>European Respiratory Society</i>)
FO:	fundadores
F1:	filial 1, primera generación
F2:	filial 2, segunda generación
Fc:	fracción constante
FcεRI/FCR1A:	receptor de ratón de alta afinidad de la IgE
FcεRI^{-/-}/hFcεRI⁺:	ratón transgénico que expresa la subunidad α del receptor humano de la IgE
FcεRI^{-/-}/hFcεRI⁻:	ratón transgénico que no expresa el receptor de ratón ni el humano de la IgE
Fyn:	proteína tirosina quinasa
GC:	glucocorticoides
GM-CSF:	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GINA:	Iniciativa Global por el Asma (<i>Global Initiative for Asthma</i>)
GPCR:	receptor asociado a proteína G
HDM:	ácaros del polvo (<i>house dust mite</i>)
h-SCF:	factor de células madre humano (<i>human stem cell factor</i>)
hFcεRI:	receptor humano de alta afinidad de la IgE
hIgE:	IgE humana
HindIII:	enzima de restricción de tipo II producida por <i>Haemophilus influenzae</i>

HLMC:	mastocitos humanos pulmonares (<i>human lung mast cell</i>)
hMCs:	mastocitos humanos derivados del cordón umbilical (<i>human mast cell derived from cord blood</i>)
HMC:	mastocitos humanos procedentes de progenitores sanguíneos periféricos adultos (<i>human mast cell from adult peripheral blood progenitors</i>)
HSA:	albúmina sérica humana (<i>human serum albumin</i>)
HuMC:	mastocitos humanos derivados de progenitores sanguíneos periféricos CD34+ (<i>human mast cell derived from peripheral blood progenitors CD34+</i>)
ICS:	corticosteroides inhalados (<i>inhaled corticosteroids</i>)
i.d.:	intradérmico
IgE:	inmunoglobulina E
IgG:	inmunoglobulina G
i.n.:	intranasal
i.p.:	intraperitoneal
i.t.:	intratraqueal
i.v.:	intravenoso
IL:	interleucina
KO:	ratón <i>knock out</i> , deficiente para un gen
L2, L3, L4:	líneas de ratones transgénicos 2, 3 y 4
LABA:	β_2 -agonistas de larga duración (<i>long acting β_2-agonists</i>)
LAD2:	línea de mastocitos LAD2, línea humana de mastocitos derivada de un paciente con sarcoma de mastocitos no tratado (<i>human leukemic MC line</i>)
LC-MS:	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LDS:	dodecil sulfato litio
LMC:	mastocitos pulmonares (<i>lung mast cells</i>)
LPR:	respuesta tardía de la alergia (<i>late phase response</i>)
LPS:	lipopolisacárido
MC:	mastocito (<i>mast cell</i>)
MC9:	línea celular de mastocitos de ratón
mDC:	célula dendrítica mielóide (<i>myeloid dendritic cell</i>)
MEM:	medio mínimo esencial (<i>minimal essential medium</i>)
MMC:	mastocitos de la mucosa (<i>mucosal mast cells</i>)
mMCP-1:	proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón (<i>mouse mast cell protease 1</i>)

mRNA:	RNA mensajero
NFAT:	factor nuclear de las células T activadas
NP:	hapteno nitrofenilacetil
NS:	no sensibilizado
NotI:	enzima de restricción tipo II producida por <i>Nocardia otitidis</i>
OD:	densidad óptica (<i>optic density</i>)
OMA:	omalizumab (Xolair®)
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPN:	osteopontina
OVA:	ovoalbúmina
PBS:	tampón salino fosfato (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCA:	anafilaxia cutánea pasiva (<i>passive cutaneous anaphylaxis</i>)
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
pDC:	célula dendrítica plasmacitoide (<i>plasmacytoid dendritic cell</i>)
PDMC:	mastocitos peritoneales de ratón (<i>peritoneum-derived mast cell</i>)
PG:	prostaglandina
PGD2:	prostaglandina D2
PGE2:	prostaglandina E2
PGI2:	prostaglandina I2
PKA:	proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNAG:	p-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosamida
PRA:	anafilaxia respiratoria pasiva (<i>passive respiratory anaphylaxis</i>)
PTGER2:	gen del receptor 2 de la PGE2 (subtipo 2)
RBL-SX38:	línea celular basofílica leucémica humanizada de rata (<i>rat basophilic leukemia cells</i>)
RMN-1H:	resonancia magnética nuclear
R_L:	resistencia pulmonar (<i>lung resistance</i>)
RPMI:	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> (medio de cultivo celular)
RS-ATL8:	subtipo celular de la línea RBL-SX38 transfectada con el gen NFAT de la luciferasa
RT-PCR:	PCR a tiempo real (real time PCR)
SA:	estreptavidina

s.c.:	subcutánea
SCG:	cromoglicato de sodio
SCF:	factor de células madre (<i>stem cell factor</i>)
SDS:	dodecil sulfato sódico
SEM:	error estándar de la media (<i>standard error of the mean</i>)
SF:	suero fisiológico
SFB:	suero fetal bovino
SFM:	medio libre de suero
shARN:	pequeña horquilla de ARN (<i>small hairpin RNA</i>)
SPMC:	mastocitos del bazo (<i>spleen mast cells</i>)
SV40PA:	virus 40 vacuolado del simio (poliomavirus oncogénico) unido a la señal de la cadena Poly-A
TG:	ratón transgénico (<i>transgenic mice</i>)
Th2:	linfocito T colaborador tipo 2 (<i>lymphocyte T helper type 2</i>)
Th9:	linfocito T colaborador tipo 9 (<i>lymphocyte T helper 9</i>)
TGF-β:	factor de crecimiento transformante β (<i>transforming growth factor β</i>)
TNF-α:	factor de necrosis tumoral α (<i>tumor necrosis factor α</i>)
Tween20:	polioxietilensorbitanmonolaurato
VEH:	vehículo
WB:	<i>western blot</i> , técnica analítica para detección de proteínas específicas
Wsh:	ratón deficiente de mastocitos
WT:	ratón <i>wild type</i> (sin modificación genética)

I. Resumen

I. RESUMEN

El asma es una enfermedad crónica de las vías respiratorias cuyo abordaje terapéutico actual no frena su progresión, y en ocasiones no revierte la sintomatología. El análisis de mecanismos endógenos de protección puede resultar en la identificación de nuevas dianas farmacológicas efectivas. Los estudios preclínicos realizados hasta ahora en nuestro laboratorio junto con evidencia clínica y básica de otros grupos, sugirieron la **hipótesis** de que *la activación selectiva del receptor prostanoide EP2 de la PGE2 inhibe la actividad mastocitaria, y consecuentemente reduce el proceso patológico respiratorio inducido en ratones por exposición a aeroalérgenos, lo cual puede suponer una estrategia terapéutica antiasmática sinérgica a la del bloqueo mastocitario por otros mecanismos*. Con el fin de verificarla, se planteó el primer objetivo: evaluar la función selectiva del receptor prostanoide EP2 en la modulación de la actividad mastocitaria, y en la reactividad respiratoria a aeroalérgenos. Se observó en poblaciones mastocitarias fenotípicamente diversas la inhibición de los mastocitos mediante dos agonistas EP2 químicamente distintos. Inhibición que también se demostró *in vivo* en un modelo de asma en ratón expuesto a aeroalérgenos de ácaros del polvo. El efecto inhibitorio sobre los mastocitos se acompañó de la prevención de la hiperreactividad bronquial, y apuntaba hacia un posible control del proceso inflamatorio broncovascular. La naturaleza protectora del agonismo EP2 se confirmó al administrar antagonistas en modelos *in vitro* e *in vivo*. Estos desencadenaron una sobreactividad de los mastocitos que agravó la alteración respiratoria. Todo ello sugiere que el efecto beneficioso de la PGE2 descrito en estudios clínicos experimentales, es consecuencia de la mediación del receptor EP2 mastocitario. El segundo objetivo planteado fue el desarrollo de un ratón transgénico que sobreexpresase el receptor EP2 específicamente en los mastocitos con el fin de disponer de una herramienta experimental para evaluar la relevancia relativa del receptor EP2 en la protección inducida por PGE2. Se logró con éxito insertar el gen de EP2 y sobreexpresarlo, demostrándose en algunos ensayos *in vitro* que los mastocitos aislados de los ratones transgénicos EP2 respondían con un incremento en el bloqueo. Sin embargo no se pudo confirmar *in vivo* el efecto beneficioso atribuible a la presencia de un mayor número de receptores EP2, probablemente debido a las fluctuaciones compensatorias en la expresión de otros genes relacionados. El desarrollo de la colonia transgénica de EP2 requiere de una caracterización más exhaustiva para investigar la importancia del EP2 mastocitario en la prevención de la alteración respiratoria. Finalmente, en un tercer objetivo se planteó evaluar comparativamente la efectividad preclínica de la inhibición mastocitaria mediante agonismo EP2 y bloqueo de la IgE con anticuerpos monoclonales, en modelos de alergia *in vivo* e *in vitro*. Se demostró en un modelo de anafilaxia cutánea *in vivo* y en poblaciones mastocitarias *in vitro* que el agonismo EP2 y la neutralización de la IgE ejercen un bloqueo de los mastocitos cuantitativamente equiparable. Para posteriores estudios de la potencial sinergia o complementariedad terapéutica entre ambos mecanismos en las vías

respiratorias de ratones sensibilizados, se desarrolló con éxito un innovador modelo de anafilaxia respiratoria pasiva (PRA) en ratones transgénicos que expresaban el receptor humano de la IgE. Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que la activación del eje “PGE2 - EP2 mastocitario – asma” supone un mecanismo endógeno de protección frente a la disfunción de las vías respiratorias inducida por aeroalérgenos. Los nuevos modelos experimentales *in vivo* desarrollados en este proyecto permitirán caracterizar el mecanismo antiasmático, y confirmar la condición de diana terapéutica del receptor EP2, o de otras moléculas que formen parte de ese eje.

I. SUMMARY

Asthma is a chronic disease of the airways whose therapeutic approach does stop progression, and occasionally does not revert the symptoms. Studying endogenous protective mechanisms may lead to the identification of newly effective pharmacological targets. Preclinical studies carried out in our laboratory together with clinical and basic evidence from other groups, suggested the following **hypothesis**: *selective activation of the EP2 prostanoid receptor of PGE2 inhibits mast cell activity, and consequently reduces the pathological respiratory process induced in mice exposed to aeroallergens, and this may arise as an antiasthmatic therapeutic strategy synergic to mast cell blockade through other mechanisms*. In order to check it, the first objective was to assess the selective function of the EP2 prostanoid receptor as a mast cell activity and aeroallergen-induced airways reactivity modulator. Phenotypically distinct mast cell populations were shown to be inhibited by means of chemically different agonists. Such inhibition was also seen *in vivo* in the asthma murine model induced through exposure to house dust mite aeroallergens. Mast cells inhibition was paralleled by a prevention of the airway hyperreactivity, and possibly a control of the bronchovascular inflammatory process. The protective nature of EP2 agonism was confirmed through the administration of antagonists in *in vitro* and *in vivo* models, where mast cells hyperreleasability and worsening of airways disorder were observed. All in all, this suggested that the described benefit of PGE2 in clinical experimental settings is mediated by the mast cells EP2 receptor. The second objective was to develop a transgenic mouse overexpressing the EP2 receptor specifically on the mast cells surface as an experimental tool to evaluate the relative relevance of EP2 in PGE2-driven protection. The EP2 gene was successfully inserted and overexpressed, owing to an increased blockade of the activity of mast cells isolated from transgenic mice. However, the beneficial effect attributable to a higher number of EP2 receptors could not be seen *in vivo*, possibly due to the compensatory fluctuation of related genes. The developed EP2 transgenic mice require a further characterization in order to investigate the role of mast cell EP2 in prevention of the respiratory dysfunction. Finally, the third objective was to compare the preclinical effectiveness of EP2 agonism *versus* anti-IgE using monoclonal antibodies, in allergy models *in vivo* and *in vitro*. Both, EP2 agonism and IgE neutralization exerted a quantitatively similar effect on mast cells population *in vitro* and in a model of cutaneous anaphylaxis *in vivo*. In order to further study the synergy or therapeutic complementarity between both mechanisms, an innovative model of passive respiratory anaphylaxis (PRA) was successfully established in transgenic mice expressing the human IgE receptor. The results of this thesis brought us to conclude that the “PGE2- mast cell EP2- asthma” axis is an endogenous protective mechanism against the airway dysfunction caused by aeroallergens. The new *in vivo* experimental models developed in this project, will allow to

characterize the antiasthmatic mechanism, and confirm the EP2, or other molecules along the axis, as therapeutic targets.

II. Introducción **General**

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. El Asma: una Lacre Sanitaria

El asma es una de las enfermedades respiratorias crónicas más comunes y la más frecuente en la infancia y adolescencia. Supone un problema grave de salud pública por su elevada prevalencia y sus índices de morbilidad y mortalidad (Bousquet et al., 2010; Eder et al., 2006; Gibson et al., 2013). El asma se caracteriza por una contracción espasmódica de los músculos bronquiales en respuesta a diversos factores desencadenantes. La disminución del calibre de los bronquios se puede producir como consecuencia de estímulos inespecíficos, la denominada hiperreactividad bronquial (AHR), pero a ella contribuyen también la inflamación crónica de las vías aéreas, el remodelado y la acumulación de moco (Bousquet et al., 2000). Todo ello provoca una sintomatología típica con disnea, sibilancias y tos, cuya frecuencia y grado de severidad varían de una persona a otra (*Global Initiative for Asthma*, GINA, 2015).

El asma es un problema de salud global que afecta entre un 1% y un 21% de la población (To et al., 2012). Se estima que alrededor de 300 millones de personas en el mundo tienen asma y que en 2025 esta cifra aumentará en 100 millones más (GINA, 2015). En los casos más graves puede llegar a causar la muerte del paciente (Lozano et al., 2012; *National Asthma Education and Prevention Program*, 2002). Además de ser ya hoy probablemente la causa de una de cada 250 muertes en el mundo (GINA, 2015), también se prevé que las muertes por ataques agudos de asma aumenten durante los próximos 10 años si no se toman medidas urgentes (Akinbami et al., 2011).

Según la Sociedad Europea de Enfermedades Respiratorias (*European Respiratory Society*, ERS) 78 millones de niños de entre 0 y 14 años son asmáticos y, entre ellos, hay 167.000 casos de hospitalizaciones anuales (Gibson et al., 2013). En España el asma es una de las enfermedades crónicas más frecuentes a partir de los 16 años con un índice de prevalencia del 4.3% (Encuesta Europea de Salud en España, 2009) y especialmente en la infancia afecta a 1 de cada 20 niños (Encuesta Nacional de Salud 2011-2012). Este incremento de la morbilidad se ha asociado con un aumento de la sensibilización atópica tanto en la población adulta como en los niños.

La etiología del asma es diversa. Las principales causas son el ejercicio, los antiinflamatorios no esteroideos, las infecciones virales y los alérgenos (GINA, 2015). El asma de origen alérgico, también llamada atópica o extrínseca, es la más frecuente. Por lo general empieza en la infancia y se asocia con otras enfermedades de naturaleza alérgica como eczema, rinitis alérgica o alergia a alimentos o medicamentos, probablemente debido a un componente genético. Se trata de una enfermedad de incidencia creciente en países desarrollados o emergentes (Borchers et al., 2005). En el 80 % de los niños y adolescentes afectados el asma es de origen alérgico y, en España, un

40% de los pacientes entre 20 y 44 años tiene un componente alérgico (Basagana et al., 2001; Martínez-Moratalla et al., 1999; Sobradillo et al., 1999). El asma alérgica se desencadena por un conjunto de reacciones inmunológicas producidas por la exposición continuada o intermitente a aeroalérgenos.

El asma supone por lo tanto por una parte un problema sanitario de primera magnitud (Martínez-Moragón et al., 2009; Vos et al., 2012) y, por otra un problema económico debido al absentismo laboral, gasto farmacéutico y disminución de la productividad (Braman, 2006; Plaza et al., 2003; Nieto et al., 2001). La gravedad del asma motivada por una sintomatología a menudo invalidante, las muertes que ocasiona y el incremento en su prevalencia, solo puede atenuarse mediante la identificación de tratamientos que frenen la progresión de la enfermedad. Recientemente ha habido progresos importantes en el conocimiento de los mecanismos patogénicos del asma. Los medicamentos actuales resultan eficaces en muchos casos, pero no son curativos y ciertos pacientes son refractarios al tratamiento, especialmente los que sufren de asma grave. Por lo tanto, es necesaria la identificación de dianas terapéuticas innovadoras que permitan no solo paliar los síntomas, si no también impedir o controlar la progresión de la enfermedad.

2. Necesidad de Nuevas Dianas Antiasmáticas

2.1. Complejidad Fisiopatológica del Asma

El asma bronquial se caracteriza por lo tanto por una alteración respiratoria causada por una obstrucción de los bronquios que se acompaña de una inflamación crónica de las vías respiratorias inferiores. La disminución del calibre de los bronquios (AHR) dificulta el paso de aire hacia los pulmones y, en consecuencia, genera disnea. En fase crónica, la obstrucción bronquial empeora por la alteración de la microestructura de las vías aéreas afectadas (remodelado).

El proceso inflamatorio característico del asma implica a un gran número de poblaciones celulares y moleculares. En los pacientes asmáticos la inflamación pulmonar se manifiesta por la infiltración de linfocitos T y eosinófilos en la mucosa bronquial y, también, por la presencia de mastocitos (Isenberg-Feig et al., 2003). En el asma alérgica se conoce parte de la secuencia de los mecanismos inmunobiológicos (Galli et al., 2008) (Figura 1). El primer contacto de un individuo atópico con el alérgeno lo “sensibiliza”, es decir, promueve la producción de IgE específicamente dirigida contra ese alérgeno. Esto ocurre mediante captación y procesamiento por parte de las células presentadoras de antígeno. La presentación de los péptidos resultantes a

los linfocitos T CD4+ provoca su activación y polarización hacia Th2, un subtipo celular normalmente asociado a procesos patológicos de origen alérgico, y a la generación de linfocitos T efectores y de memoria. Éstos últimos se caracterizan por liberar un abanico de citocinas, entre ellas las interleucinas IL-4, IL-5 y IL-13, responsables de la maduración y reclutamiento de eosinófilos hacia las vías respiratorias, así como de la generación prioritaria de la inmunoglobulina E (IgE) por los linfocitos B mediante *switching* de isotipo. La IgE, una molécula con un papel central en la patofisiología de la inflamación alérgica y del asma (Burrows et al., 1989; Samitas et al., 2015), se une a los mastocitos del aparato respiratorio (localizados en el parénquima pulmonar y en la mucosa de las vías respiratorias) y posiblemente a otras células que expresan receptores para esta inmunoglobulina.

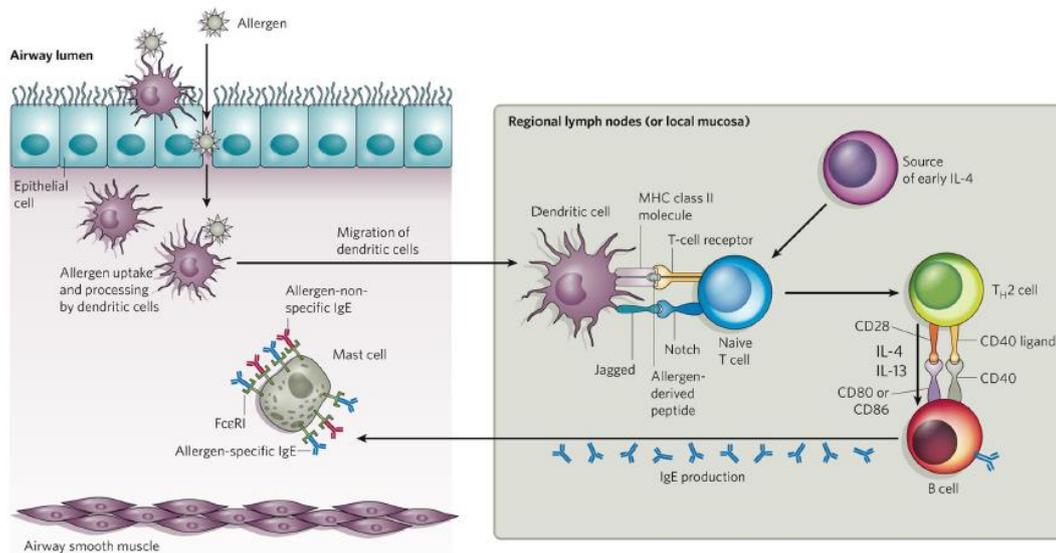


Figura 1. Esquema representativo de la sensibilización a alérgenos en las vías aéreas. Las células dendríticas captan y procesan el antígeno. Las células presentadoras de antígeno activadas y maduras migran hacia los nódulos linfoides (o mucosa) donde presentan los péptidos (derivados del antígeno) como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II a los linfocitos T. En presencia de IL-4, los linfocitos T se activan hacia linfocitos Th2. Los linfocitos Th2 producen IL-4 y IL-13 y, entonces, las células B producen IgE. La IgE se difunde y entra en los vasos linfáticos, a continuación en la sangre y se distribuye de manera sistémica. Cuando llega al líquido intersticial, la IgE específica y no específica de antígeno se une a su receptor de alta afinidad (FcεRI) en los mastocitos residentes en el tejido. Cuando el huésped vuelve a interactuar con el alérgeno (“challenge”) provocará una respuesta en los mastocitos sensibilizados. Célula T “naive” (linfocito T no diferenciado), célula Th2 (linfocito T colaborador tipo 2), FcεRI (receptor de alta afinidad de la IgE), IgE (inmunoglobulina E), IL-4 (interleucina 4), IL-13 (interleucina 13), MHC (*major histocompatibility complex*, complejo mayor de histocompatibilidad). (Galli et al., 2008).

La unión la IgE a los receptores situados en los mastocitos y su entrecruzamiento al interactuar con el alérgeno promueve la activación (“challenge”) de los mastocitos y la posterior

liberación de mediadores inflamatorios, dando lugar a la respuesta alérgica inmediata o temprana (*Early Phase Response*, EPR). El síntoma fundamental en la EPR es una obstrucción pulmonar súbita (o broncoespasmo) causada por la broncoconstricción, acompañada de un aumento de la permeabilidad vascular y una hipersecreción de moco. Al mismo tiempo las células Th2 efectoras y de memoria adquieren la capacidad de infiltrarse en las vías respiratorias donde se induce una respuesta tardía (*Late Phase Response*, LPR) manifestada por una obstrucción de flujo de aire prolongada, es decir, disnea asociada a la infiltración inflamatoria linfocitaria y eosinofílica, y también, a un aumento de la hiperreactividad bronquial.

Finalmente, la perpetuación del estímulo nocivo puede provocar un daño tisular irreversible: el remodelado de las vías respiratorias. Los eosinófilos reclutados y activados posiblemente son, en parte, los causantes de este, junto con los mastocitos y otras células efectoras activadas *in situ*, como los macrófagos pulmonares y las células epiteliales de la mucosa respiratoria mediante la liberación de múltiples mediadores (Lambrecht et al., 2003). La reestructuración tisular se produce como consecuencia de un proceso anómalo de reparación de los tejidos. El remodelado de las vías aéreas se caracteriza por una serie de cambios estructurales: hipertrofia/hiperplasia de células epiteliales, fibrosis subepitelial, hiperplasia de células caliciformes (productoras de moco) e hiperplasia de la musculatura lisa bronquial (Bousquet et al., 2010; Cohn et al., 2004). Todos estos cambios conducen a un engrosamiento de la pared de la mucosa que desencadenará en un estrechamiento irreversible de las vías respiratorias que pierden elasticidad. Esta alteración crónica de la función pulmonar agrava aún más la AHR (Busse et al., 1999) y complica notablemente el tratamiento.

Un conocimiento más preciso de los mecanismos implicados en el asma contribuirá a identificar dianas que participen en diversos de los procesos patogénicos conducentes al desarrollo del asma.

2.2. Tratamiento Actual del Asma y Nuevas Perspectivas

Como ya se ha señalado, la prevalencia del asma aumenta, particularmente en países desarrollados y emergentes. Ese crecimiento es probablemente multifactorial, pero se puede atribuir en parte a que no se dispone de un tratamiento curativo o preventivo eficaz. El coste resulta ya insostenible para los sistemas sanitarios. La complejidad de la patogenia del asma y el desconocimiento de muchos de los mecanismos sin duda dificulta el hallazgo de dianas efectivas. La industria biofarmacéutica reclama más conocimiento básico y traslacional para el desarrollo de medicamentos.

La dificultad en el control farmacológico estriba en que el tratamiento antiasmático de elección, basado en corticosteroides inhalados (*inhaled corticosteroids*, ICS) en monoterapia o asociados con β_2 -agonistas de larga duración (*long acting β_2 -agonists*, LABA), no resuelve la enfermedad y se encamina fundamentalmente a contrarrestar los episodios de broncoespasmo y a controlar la inflamación subyacente (Bateman et al., 2004; Erin et al., 2008; Peters et al., 2008). Sin embargo, aún se recomienda como primera terapia en pacientes con asma persistente, incluyendo los niños (Bateman et al., 2008). Por una parte, los glucocorticoides (GC) mejoran la función pulmonar al disminuir el riesgo de exacerbaciones (Barnes et al., 1998; Martínez et al., 2011; O'Byrne et al., 2006), y por otra, reducen la inflamación (Barnes, 2006, 2010; Bateman et al., 2004; Peters et al., 2006; Rhen & Cidlowski, 2005). En el asma limitan la inflamación subyacente mediante la activación de diversos genes antiinflamatorios y la represión de genes proinflamatorios (Barnes & Adcock, 2009). No obstante, además de los posibles efectos adversos asociados a la administración crónica de GC, entre un 5 y un 10 % de los pacientes con asma grave no responden adecuadamente a los tratamientos convencionales. Éstos pacientes tienen exacerbaciones frecuentes incluso con altas dosis de ICS con LABA o con corticoides orales y representan más del 50% del coste sanitario total del asma (Adcock et al., 2008; Adcock & Barnes, 2008; Barnes & Adcock, 2009).

Actualmente, el desarrollo de tratamientos antiasmáticos se basa primero en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad, luego en la identificación de posibles dianas terapéuticas, y finalmente, en el diseño y la selección de agentes farmacológicos que interaccionan con esas dianas específicas. A pesar de que sin duda ha habido avances, en la última década pocos fármacos son los que han conseguido salir al mercado. Ejemplos de ello son los antagonistas de los leucotrienos (Mullane, 2011; Polosa, 2007; Riccioni et al., 2007) y el anticuerpo monoclonal anti-IgE, omalizumab (Bang & Plosker, 2004; Buhl, 2005; Niven et al., 2008), el cual se describirá extensamente en el siguiente apartado. Sin embargo ninguna de estas dos estrategias antiasmáticas parece curativa, ni se utiliza como tratamiento único, si no que de forma complementaria en casos de asma moderada y grave. Además la utilización de un medicamento biotecnológico como es el omalizumab resulta particularmente costoso. Otras dianas terapéuticas como anticuerpos monoclonales o inhibidores de citocinas (anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-13) y enzimas represores de factores de transcripción (anti-TNF- α), pueden resultar prometedores pero aún están en fase de desarrollo (Borish et al., 2001; Hart et al., 2002; Yang et al., 2005). Por ejemplo, la eosinofilia en el esputo (Moore et al., 2010) y una propensión a las exacerbaciones de algunos pacientes asmáticos sugirió que probablemente los anticuerpos monoclonales anti-IL-5, la citocina más potente estimuladora de eosinófilos, podrían tener un papel en la prevención de dichas exacerbaciones. Un estudio reciente apoyó esta hipótesis, pacientes con al menos 12 años de asma grave y con evidencia directa o indirecta de inflamación

eosinofílica mostraron una disminución de exacerbaciones tras diversas dosis de mepolizumab, anti-IL-5 (Pavord et al., 2012), ahora bien no se observaron mejoras en otros síntomas asmáticos, como en la función pulmonar. Por otra parte, los anticuerpos anti-TNF- α , aunque mejoraron la inflamación (Brightling et al., 2008; Kim & Remick, 2007), también causaron efectos adversos e infecciones en algunos pacientes con asma grave (Wenzel et al., 2009).

Todos estos abordajes terapéuticos son ejemplos de productos en desarrollo o recientemente lanzados que sin duda han mejorado las expectativas de ciertos pacientes, pero sigue siendo una asignatura pendiente la de hallar tratamientos que frenen la progresión de la enfermedad y permitan la remisión de los síntomas. Un producto particularmente interesante es el omalizumab, un anticuerpo anti-IgE que ha demostrado tener una mayor eficiencia de la inicialmente esperada.

2.3 El Omalizumab: un Medicamento Biotecnológico Antiasmático

Su papel central en el proceso asmático alérgico ha convertido a la IgE en una diana terapéutica de máximo interés. La biología molecular y la biotecnología posibilitaron en su día el desarrollo de agentes selectivos que neutralizaran dicha molécula. De entre todos los candidatos impulsados hasta entrar en fase clínica, el omalizumab es el primer y, por el momento, único anticuerpo monoclonal disponible para el tratamiento del asma alérgica grave (Licari et al., 2015). La importancia de éste medicamento se debe a que los pacientes con asma grave refractaria no responden al tratamiento convencional y presentan frecuentes exacerbaciones de la enfermedad que motivan hospitalizaciones repetidas, causando de esta forma los mayores gastos en sanidad derivados del asma (GINA, 2015).

El omalizumab es un anticuerpo “humanizado”, con un 5% de componente de ratón, que reconoce a la IgE humana como molécula diana uniéndose a su fracción constante (Fc) (Vennera & Picado, 2012). El omalizumab se dirige, por lo tanto, hacia zonas con elevada concentración de esta IgE, es decir, probablemente zonas donde se acumulan células que expresan el receptor, como los mastocitos (Figura 2). Tiene la capacidad de unirse selectivamente a IgE libre en el suero sin tener en cuenta su especificidad antigénica (Haak-Frendscho et al., 1994). Asimismo, se ha demostrado que bloqueando la IgE libre disminuye la expresión de los receptores de alta afinidad de los mastocitos, basófilos, eosinófilos y células dendríticas (Beck et al., 2004; MacGlashan, 2004; Prussin et al., 2003). Tras ser neutralizada por el omalizumab, la IgE es incapaz de interactuar con el receptor Fc ϵ RI, y como consecuencia se previene la liberación de los mediadores inflamatorios mastocitarios (Chang, 2000), reduciendo la inflamación alérgica subyacente, y de este modo, impidiendo las exacerbaciones del asma.

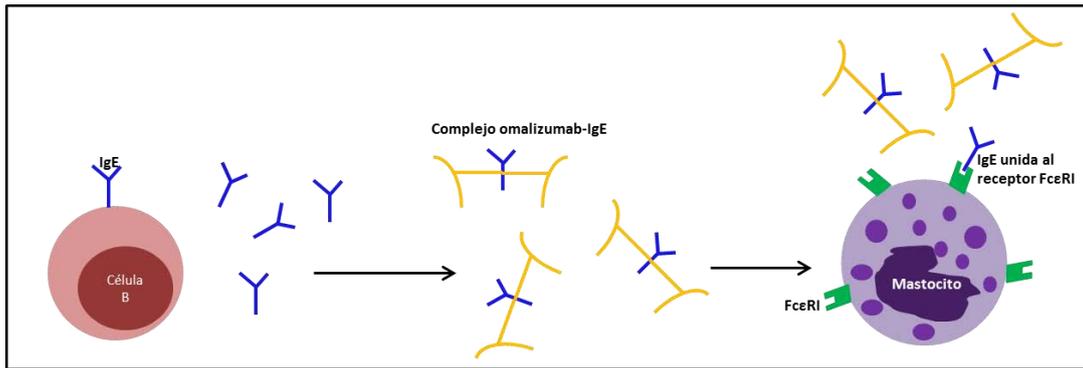


Figura 2. Esquema representativo del mecanismo de acción del omalizumab. Al unirse a la IgE libre previene que ésta interactúe con su receptor de alta afinidad, FcεRI, inhibiendo la degranulación mastocitaria. Además disminuye la expresión de los receptores FcεRI. FcεRI (receptor de alta afinidad de la IgE), IgE (inmunoglobulina E).

Los primeros ensayos clínicos con omalizumab en los que se investigaron los efectos bloqueantes de la IgE en pacientes con asma alérgica, demostraron una mejoría en la respuesta de las vías respiratorias, la AHR y el recuento de eosinófilos en el esputo disminuyeron (Boulet et al., 1997; Fahy et al., 1997; Milgrom et al., 1999). Recientemente, pacientes con asma moderado o grave tratados con omalizumab manifestaron un 30% menos de exacerbaciones (Busse et al., 2011; Hanania et al., 2011). El interés creciente que está recibiendo este fármaco en los últimos años se debe al seguimiento post-comercialización que demuestra que se trata de un medicamento muy bien tolerado (Corren et al., 2009; De Llano et al., 2013; Normansell et al., 2014; Rodrigo et al., 2011).

Por lo tanto, la estrategia de bloquear la IgE e indirectamente frenar la actividad mastocitaria, parece un abordaje terapéutico prometedor, particularmente en el tratamiento de los pacientes asmáticos que no responden a fármacos más tradicionales. El omalizumab, además de ejercer un efecto terapéutico *per se*, demostrando claramente la participación de los mastocitos tanto en la respuesta asmática temprana como tardía, también puede actuar como *carrier* de otros fármacos a los que transportaría hacia zonas de acumulación de IgE. Por estos motivos, en futuros tratamientos antiasmáticos sería interesante combinar el bloqueo mastocitario por parte del omalizumab con otras estrategias sinérgicas, es decir, con moléculas que actúen sobre receptores o vías de señalización protectoras propias de los mastocitos. La eficacia del bloqueo mastocitario puede explicarse en parte por el papel no solo efector de esta población celular, si no también regulador en fases tempranas y tardías del asma.

3. Los Mastocitos

Los mastocitos (MC) se identificaron en la segunda mitad del siglo XIX (Von Recklinghausen, 1863; Ehrlich, 1878) mediante técnicas básicas de tinción y se caracterizan principalmente por un denso contenido granular citoplasmático (Galli et al., 1999). Ehrlich los denominó “Mastzellen” (en alemán *Mast* significa “cebo”, “engorde” o “cebadura”) ya que al microscopio observó numerosos gránulos metacromáticos de gran tamaño en su citoplasma, que él interpretó como el resultado de un proceso de cebado por fagocitosis. Posteriormente, tras descubrir los mecanismos que provocan su activación y liberación de mediadores celulares, se consideraron células críticas en la patogenia de los procesos de hipersensibilidad de tipo I (Galli, 1993).

Los MC proceden de células progenitoras CD34+ de la médula ósea (Robbie-Ryan & Brown, 2002). Estas células precursoras se mantienen en la sangre en forma de progenitores inmaduros y se diferencian al llegar a los tejidos, donde se convierten en mastocitos maduros por la influencia de factores locales. Por ejemplo, el factor de células madre o *stem cell factor* (SCF) al receptor c-kit y otras citocinas como las interleucinas IL-3, IL-4, IL-9 y IL-10. Estas moléculas promueven la diferenciación y proliferación de mastocitos humanos y de ratón. El SCF también es un factor liberador de histamina y de triptasa, mediadores que juegan probablemente un papel en la respuesta alérgica.

En los vertebrados, los mastocitos están ampliamente distribuidos en tejidos vascularizados, sobre todo en zonas expuestas al ambiente como la piel, las vías respiratorias y el tracto digestivo, en la submucosa, donde forman parte del tejido conjuntivo y donde probablemente actúan como centinelas (Galli et al., 2005). Los MC en humanos, ratas y ratones, se dividen en subpoblaciones heterogéneas fenotípica y funcionalmente. En el ratón los MC se clasifican en mucosos (*mucosal mast cells*, MMCs) o de tejido conjuntivo (*connective tissue mast cells*, CTMCs) (Enerback, 1966). En estos y en humanos, se distinguen también por la composición en proteasas de sus gránulos y las distintas funciones que pueden desencadenar en el tejido (Oskeritzian et al., 2005; Schwartz et al., 1987).

Los mastocitos son granulocitos altamente especializados que desempeñan la mayoría de sus funciones liberando mediadores preformados o sintetizados *de novo* en respuesta a diferentes señales de activación. En los gránulos se almacenan citocinas, histamina, triptasa, proteasas, etc. Estos y otros mediadores pro-inflamatorios se liberan por exocitosis. La liberación se puede producir por: *a*) sustancias químicas como toxinas y venenos, *b*) moléculas endógenas como proteasas de tejido o proteínas derivadas de eosinófilos y neutrófilos, y *c*) mecanismos inmunológicos dependientes o no de IgE. Específicamente la activación dependiente de IgE

adquiere un papel vital en la patogenia de las reacciones alérgicas (Maurer et al., 1994; Owen, 2007; Sutton et al., 2000).

3.1 Población Celular Clave en el Asma

Tradicionalmente a los mastocitos se les ha considerado células efectoras en la patogenia de la fase temprana del asma (Saini, 2003). Sin embargo, hoy se conoce que los MC juegan un papel esencial tanto en las fases iniciales como en la cronificación del asma (Cruse & Bradding, 2015) (Figura 3). Las vías respiratorias de pacientes asmáticos presentan una gran cantidad de mastocitos, y se ha identificado un incremento en la concentración local de mediadores mastocitarios liberados tras la activación (Brightling et al., 2002; Koshino et al., 1996). Incluso se ha correlacionado la concentración de estos mediadores con un aumento de la broncoconstricción, la secreción de moco y el edema (Bradding et al., 2006; Bradding & Cruse, 2008; Brightling et al., 2003; Jarjour et al., 1991; Moiseeva & Bradding, 2011) y también, con la hiperreactividad bronquial (Brightling et al., 2002; Broide et al., 1991; Casale et al., 1987).

El incremento de compuestos derivados de la actividad mastocitaria también se ha observado en el lavado broncoalveolar (*bronchoalveolar lavage*, BAL) de pacientes asmáticos. Por ejemplo, histamina, leucotrienos, PGD2 y triptasa (Brightling et al., 2003; Boyce, 2003). La sensibilización de los mastocitos por IgE, la activación antigénica y la liberación de sus mediadores preformados (Liu et al., 1990), participan decisivamente en el broncoespasmo y en la respuesta temprana en pacientes asmáticos. Además, compuestos preformados y de nueva síntesis contribuyen a la respuesta tardía del asma por la capacidad que tienen de reclutar y activar diversas células inflamatorias como eosinófilos, macrófagos y linfocitos Th2 (Bentley et al., 1993; De Monchy et al., 1985; Díaz et al., 1989; Metzger et al., 1987; Montefort et al., 1994).

La exposición intranasal de ratones a ácaros del polvo (HDM) aumenta notablemente la cantidad de mMCP-1, proteasa liberada específicamente por los mastocitos activados de la mucosa (Li et al., 2013). Este aumento se ha visto también en la musculatura lisa bronquial de pacientes con asma crónica (Brightling et al., 2002; Brightling et al., 2003; Marone et al., 2005). Otras evidencias también apuntan a la participación de los mastocitos en la cronificación del asma. Por ejemplo, algunas de las moléculas liberadas por esta población celular ejercen efectos propios del proceso de remodelado (Okayama et al., 2007). Entre otras, la liberación de proteasas, como la triptasa y otros factores de crecimiento, provoca una hipertrofia de la musculatura lisa y una hipersecreción de moco en las vías aéreas (Amin et al., 2005). En modelos de asma crónica en ratón se ha descrito también la presencia de mastocitos en el epitelio de las vías aéreas (Yu et al., 2006).

Asimismo, los MC juegan un papel regulador en la respuesta inmunitaria (Schröder & Maurer, 2007), ya que pueden participar en la fase de sensibilización como células presentadoras de antígeno, promover la activación y la migración de células dendríticas, o bien desviar la respuesta inmunitaria hacia Th2.

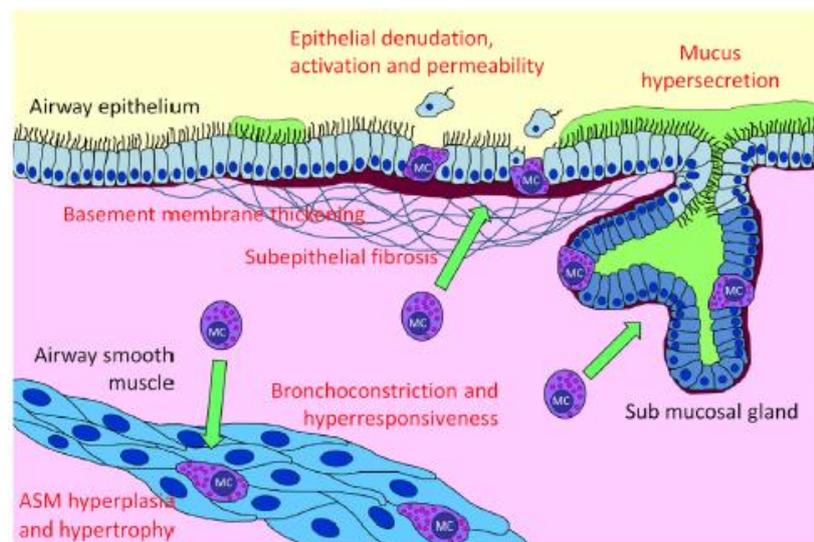


Figura 3. Esquema representativo de la infiltración mastocitaria en diversas estructuras importantes de las vías aéreas en el asma. Consecuencias funcionales inducidas por la liberación de diferentes mediadores preformados o sintetizados *de novo*. MC (mastocito, *mast cell*). (Cruse & Bradding, 2015).

El protagonismo del mastocito en el asma con un carácter multifuncional como posible instigador inmunitario, inductor de la inflamación, regulador del remodelado y causante, al menos parcial, de la AHR, son indicios claros que sustentan la función efectora y reguladora de estas células, y por lo tanto, que subrayan el interés por contemplarlos como una diana terapéutica antiasmática con el fin de ejercer un control de la enfermedad con un alto cociente beneficio/riesgo.

3.2 El Mastocito como Diana Terapéutica

Se han estudiado diversos posibles abordajes terapéuticos con el objetivo de modular o inhibir las funciones de los MC, o bien las acciones desarrolladas por sus mediadores liberados (Moon et al., 2010). Se conocen numerosos agentes que modulan a los mastocitos o que reducen las consecuencias de su actividad, incluyendo: *a*) antagonistas de mediadores mastocitarios (p. ej. antihistamínicos clásicos y antagonistas del receptor de los leucotrienos), *b*) inhibidores del desarrollo y supervivencia (p. ej. esteroides e inhibidores del receptor SCF), *c*) inhibidores de la

síntesis de mediadores mastocitarios (p. ej. AINE y esteroides) y *d*) inhibidores de la activación de los MC y liberación de mediadores: por ejemplo los estabilizadores de mastocitos, como las cromonas y los β_2 -agonistas. Sin embargo, las cromonas tienen una eficacia errática (Church & Hiroi, 1987). Particularmente, el cromoglicato de sodio fue utilizado en el pasado como estabilizador de los mastocitos (Patalano & Ruggieri, 1989), aunque también actúa sobre eosinófilos y neutrófilos (Moqbel et al., 1986) y no es efectivo en todas las poblaciones de MC de ratón y humanas (Befus et al., 1987; Pearce et al., 1982). Por otro lado, se ha descrito que en tratamientos continuados los β_2 -agonistas acaban ejerciendo un efecto estimulador mastocitario (Swystun et al., 2000). Se sabe en todo caso que el efecto antiasmático de estos productos estriba en su capacidad para inhibir el broncoespasmo al actuar directamente sobre la musculatura lisa respiratoria. Ciertos estudios indican que una administración prolongada induce tolerancia a sus efectos broncoprotectores (Cheung et al., 1992), lo cual podría explicar que su eficacia *in vivo* disminuya con el tiempo.

Sin duda los dos tratamientos más efectivos hoy en día, corticosteroides y los anticuerpos anti-IgE, como el omalizumab (Djukanović et al., 1992, 2004), guardan un estrecho vínculo funcional con la actividad de los mastocitos. Esto refuerza la conveniencia de explorar estrategias que actúen sobre moléculas o procesos relacionados con esta población celular. Los corticosteroides, como ya se ha dicho, son moléculas endógenas con una actividad pleiotrópica antiinflamatoria e inmunoreguladora sobre diferentes mecanismos implicados en la respuesta asmática. Se sabe además que los corticosteroides pueden bloquear la actividad mastocitaria en modelos animales e *in vitro* (Matsuda et al., 2005; Smith et al., 2002; Zhou et al., 2008). La efectividad de los GC remarca el interés y el potencial impacto terapéutico derivado del estudio de las moléculas o mecanismos endógenos reguladores de la respuesta asmática, como herramienta identificadora de posibles nuevas dianas farmacológicas.

A pesar de las dificultades para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas antiasmáticas, a causa de la complejidad de la patogenia, se sabe que pocas familias de mediadores pueden incidir tanto y de manera tan variada en la inducción y evolución de asma como las prostaglandinas. Estudios clásicos reforzados con experimentos nuestros y de nuestros colaboradores en el Hospital Clínic de Barcelona – Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer (IDIBAPS) sugieren que la prostaglandina E2 (PGE2), una molécula endógena, puede ejercer un efecto inhibitorio sobre la actividad mastocitaria. Dicho mecanismo puede estar implicado en la respuesta beneficiosa atribuible a la PGE2 en pacientes asmáticos. La PGE2 y las moléculas que intervienen en su posible efecto protector, pueden ser por lo tanto candidatas de interés a una modulación farmacológica que en última instancia podría ayudar a frenar la progresión del asma.

4. El Eje PGE2-Mastocito-Asma

4.1 Prostaglandinas: de Moléculas Proinflamatorias a Moléculas Antiinflamatorias. Un Cambio de Paradigma.

Las prostaglandinas (PG) son moléculas derivadas del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa (COX)-1 y 2. La COX y las PG se han asociado tradicionalmente a la inducción de la inflamación (Aoki & Narumiya, 2012). Por ello, con la finalidad de bloquear la actividad de la COX se han utilizado terapéuticamente fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (Williams, 1978). El asma, como se ha dicho, es una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias y parece un contrasentido proponer tratarla potenciando la vía de la COX. Sin embargo, ya en los años 70 se hablaba del efecto antiastmático de la PGE₂, producto endógeno de la COX-2, cuando se administraba a pacientes asmáticos (Smith et al., 1975; Szczeklik et al., 1977). La PGE₂ inhibía la actividad mastocitaria (Loeffler et al., 1971), células que ya en aquella época se consideraban perjudiciales para las vías respiratorias (Salvato, 1962). Aunque fue el descubrimiento de sus propiedades broncodilatadoras dos años más tarde lo que atribuyó a la PGE₂ un efecto antiastmático (Main, 1964).

Las PG son moléculas ubicuas multifuncionales. Poco después de su descubrimiento a finales de los años 60, se describieron las propiedades relajantes de la PGE₁ (Main, 1964) y de la PGE₂ (Sweatman & Collier, 1968) en preparaciones aisladas de la musculatura lisa. Más tarde se reconoció el potencial de la PGE₂ como relajante muscular en el asma (Cuthbert, 1969). Desde ese momento aparecieron algunas publicaciones sugiriendo el efecto preventivo broncodilatador de la PGE₂ (Manning et al., 1989; Pavord et al., 1991), en contraste directo con otras que la relacionaban estrechamente con el grado de severidad del asma (Aggarwal et al., 2010; Kontogianni et al., 2013; Profita et al., 2003). Durante mucho tiempo el efecto beneficioso de las PG o sus análogos no fue reconocido por la comunidad científica. Sí en cambio, el bloqueo de la vía de la COX con agentes más o menos selectivos fue esencial en los años 80. Diferentes productos de la COX ejercen una variedad de actividades en distintas patologías, dentro de diferentes órganos y posiblemente en diferentes fases de una determinada enfermedad. Es especialmente relevante en procesos patológicos la actividad de la COX-2, una enzima inducible cuya expresión aumenta por el efecto de estímulos proinflamatorios. La COX-2 da lugar a diferentes PG con efectos contrapuestos. Algunas inducen la inflamación y son, por lo tanto perjudiciales, y otras tienen efectos antiinflamatorios y beneficiosos. Por ejemplo, la PGD₂ induce la broncoconstricción y la AHR (Oguma et al., 2008), y en cambio, la PGI₂ se ha asociado con la prevención del desarrollo de la inflamación pulmonar en un modelo murino de asma (Jaffar et al., 2007).

Años después de las primeras observaciones del efecto antiasmático de la PGE2 se propuso que, por un lado dicha protección podría estar relacionada con otras propiedades además de su reconocido efecto relajante sobre la musculatura lisa (Feldsien et al., 1996; Szczeklik et al., 1996) y por otro, que tenía un valor terapéutico potencial independientemente del factor desencadenante del asma (alérgeno, aspirina, o ejercicio) (Melillo et al., 1994; Pavord et al., 1993; Robuschi et al., 1994). A pesar de estos importantes descubrimientos, se avanzó relativamente poco hasta principios del siglo XXI. Entonces, las cosas empezaron a cambiar como resultado de los primeros estudios preclínicos *in vivo*. Estos estudios preliminares parecían confirmar que la actividad de la COX podría, en parte, contribuir a la prevención en el desarrollo de los síntomas asmáticos. Desde entonces, se han hecho avances significativos a los que esperamos haber contribuido. Nuestros estudios sugieren que el potencial protector de la PGE2 en el asma alcanza más allá de la prevención de la contracción de la musculatura lisa. Acciones antiinflamatorias, antiremodelado y inmunoreguladoras podrían estar también involucradas. Por ello es importante destacar los datos conocidos sobre el efecto beneficioso de la PGE2 en diferentes fases del asma, el efecto directo de la PGE2 en la población mastocitaria y las implicaciones funcionales de la interacción PGE2-MC en la función de las vías respiratorias.

4.2 Beneficios de la PGE2 en el Asma

La PGE2 es el producto predominante de la COX-2. La PGE2 es producida mayoritariamente por macrófagos, células epiteliales y células musculares lisas de las vías respiratorias. Los primeros estudios mecanísticos sobre el efecto beneficioso de la PGE2 en el asma se realizaron en pólipos nasales y fibroblastos de pacientes asmáticos (Picado et al., 1999; Pierzchalska et al., 2003). Las células de los pacientes expresaban menos COX-2/PGE2 que los donantes sanos. Numerosas y variadas observaciones clínicas sugieren que la PGE2 limita la inflamación pulmonar y controla la reparación del tejido. En pacientes asmáticos se ha demostrado que la PGE2 inhalada antes de la exposición al alérgeno disminuye parcialmente las reacciones alérgicas en las fases tempranas y tardías (Bateman et al., 2004; Gauvreau et al., 1999; Pavord et al., 1993; Peters et al., 2006), y también reduce la broncoconstricción inducida por el ejercicio (Melillo et al., 1994; Sestini et al., 1996; Sin et al., 2004). La PGE2 inhalada bloquea completamente la broncoconstricción inducida por aspirina inhibiendo la liberación de los cisteinil leucotrienos (Riccioni et al., 2007). Además, se ha observado una disminución de la eosinofilia de las vías aéreas después de la exposición al alérgeno, en pacientes asmáticos tratados localmente con PGE2 (Gauvreau et al., 1999; Hartert et al., 2000). Otras observaciones sugieren que la producción de PGE2 se ve reducida en el asma, y particularmente en asmáticos sensibilizados a la aspirina (Bang et al., 2004; Niven et al., 2008; Polosa et al., 2007), y esto

posiblemente pueda conducir a inflamación y alteraciones en el proceso de reparación. En relación a todos estos efectos, también se ha descrito una disminución en la liberación de PGE2 por parte de las células epiteliales de las vías aéreas de pacientes asmáticos (Picado et al., 1999; Pierzchalska et al., 2003; Roca-Ferrer et al., 2011).

Inmunológicamente la PGE2 está involucrada en la regulación de la diferenciación y en el tráfico de los linfocitos T (Buhl, 2005) y también de la producción de distintas citocinas proinflamatorias como la IL-8 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Buhl, 2005; Kips et al., 2001; Leckie, 2003; Shardonofsky et al., 1999). Es interesante el hecho que la PGE2 estimula la liberación de la IL-10, una citocina con efectos antiinflamatorios, en los linfocitos T (Demeure et al., 1997), en macrófagos alveolares (Mackenzie et al., 2013) y en células dendríticas (Harizi et al., 2002). Recientemente se ha sugerido que la PGE2 inhibe la diferenciación celular hacia Th9 durante la inflamación pulmonar, un elemento clave en el asma y otras enfermedades alérgicas (Li et al., 2013). Incluso se ha atribuido a esta prostaglandina propiedades beneficiosas en el remodelado de las vías respiratorias en el asma crónica y en la fibrosis pulmonar. La PGE2 contribuye a la reparación del epitelio de las vías aéreas, lo cual a su vez facilita el restablecimiento de la integridad del tejido (Gauvreau et al., 1999; Pavord et al., 1993), inhibiendo la proliferación de fibroblastos y de células musculares lisas, la síntesis de colágeno y la transición de fibroblastos a miofibroblastos inducida por TGF- β (Burgess et al., 2004, 2006).

Estudios con modelos animales apoyan el papel beneficioso de la PGE2 en el asma. Experimentación básica *in vivo* muestra que inhibiendo la COX-1 y la COX-2 en ratones sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) se agrava la inflamación alérgica y/o la hiperreactividad bronquial (Gavett et al., 1999; Hashimoto et al., 2005; Torres et al., 2009). Además se ha podido observar, en ratones sensibilizados con extractos de ácaros del polvo (*house dust mite*, HDM), el efecto proinflamatorio de la reducción de la COX-2 utilizando un enfoque molecular: la administración de un oligonucleótido antisentido (Torres et al., 2008). Asimismo otros investigadores afirman que la PGE2 disminuye la inflamación inducida por alérgenos en ratas y ratones sensibilizados a OVA. Según Martín et al. (2002) la PGE2 administrada por vía intratraqueal reduce el broncoespasmo y la eosinofilia en ratas, mientras que De Campo & Henry (2005) demostraron que la PGE2 endógena tenía un efecto antiinflamatorio en ratones expuestos a OVA. Estudios de nuestro grupo de investigación confirmaron el efecto protector de la PGE2 sobre la actividad mastocitaria y la eosinofilia pulmonar (Figura 4) inducida en ratones sensibilizados a HDM (Herrerías et al., 2009a). Paralelamente a los estudios en pacientes anteriormente descritos, en modelos animales también se ha revelado por lo tanto el posible efecto preventivo de la PGE2 en el remodelado de las vías aéreas, es decir, en la fase crónica de la patología del asma (Moore et al., 2000; Ogushi et al., 1999).

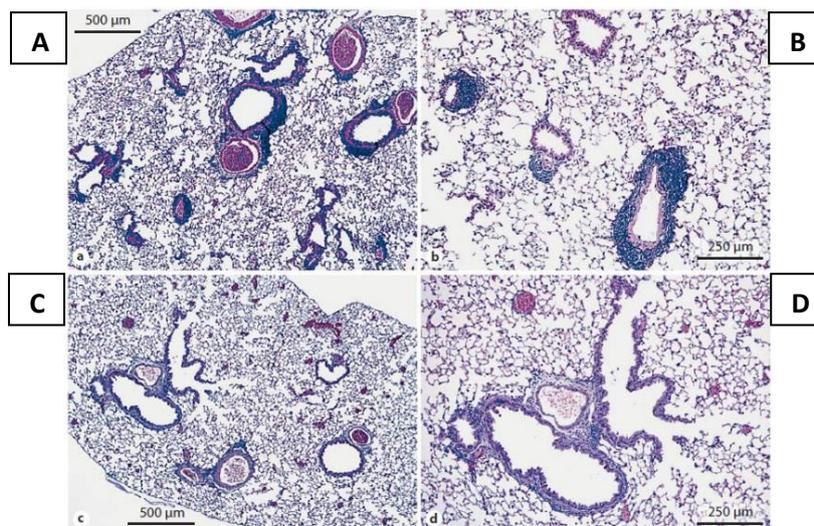


Figura 4. Imágenes representativas a diferente escala (500 μ m y 250 μ m) de la cantidad y tipo de infiltración eosinofílica en ratones sensibilizados a HDM sin tratamiento (A, B) y tratados con PGE2 (C, D). Recuento eosinofílico de secciones pulmonares teñidas con rojo de Congo. Se observa claramente el efecto de la prostaglandina E2 en el número y tamaño del foco inflamatorio. (Herrerias et al., 2009a).

En conjunto, el efecto protector de la prostaglandina E2 frente al asma se ha evidenciado en un amplio espectro de estudios clínicos y en modelos de asma experimental. Se le atribuyen a la PGE2 acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras, de tal forma que pudieran actuar sobre diversos mecanismos y células implicadas en la respuesta asmática. Los MC son una población diana potencial, de manera que conviene revisar lo que se conoce, de la interacción de la PGE2 con poblaciones mastocitarias.

4.3 Mastocitos y Receptores Prostanoides EP

En la inflamación y en el asma ha evolucionado tanto el conocimiento del papel de las PG como el de los MC. El descubrimiento de los receptores prostanoides de tipo E (EP) supuso un avance decisivo hacia un mayor conocimiento de los efectos pleiotrópicos de la PGE2 (Coleman et al., 1984; Narumiya et al., 1999), a menudo aparentemente contradictorios. Se han descrito 4 receptores de la PGE2 (EP1, EP2, EP3 y EP4). Son receptores asociados a proteína G (GPCR) (Funk et al., 1993; Nishigaki et al., 1995; Regan et al., 1994; Sugimoto et al., 1992) que inducen señales intracelulares diferentes y por ello tienen funciones distintas. La activación de los receptores EP1 y EP3 aumenta el calcio intracelular y disminuye AMP cíclico. En cambio, los receptores EP2 y EP4 se vinculan a un aumento de la concentración de AMP cíclico (Chung, 2005). Por lo tanto, la PGE2 tendrá actividades biológicas muy diferentes en función del

receptor con el que interactúe y según la célula que lo exprese. En la musculatura lisa cuando la PGE2 interacciona con los receptores EP1 y EP3, induce contracción, mientras que su acción sobre EP2 induce la relajación y por lo tanto la broncodilatación (Botella et al., 1993; Sheller et al., 2000; Tilley et al., 2003). El receptor EP4 localizado en las células de la musculatura lisa recientemente se ha propuesto como diana para reducir el broncoespasmo en el asma (Buckley et al., 2011). Por otro lado, el receptor EP3 expresado en las vías aéreas se ha identificado como el responsable de la tos inducida tras administrar PGE2 (Maher et al., 2009).

Tiene particular interés la capacidad moduladora de la actividad mastocitaria por parte de la PGE2. Es probable que la interacción de las PG con receptores EP de la superficie de los mastocitos pueda tener importantes implicaciones funcionales en el asma. Tres conjuntos de datos suscriben ese interés: *a*) como se ha dicho, los mastocitos son células efectoras y reguladoras centrales en el asma (Galli & Tsai, 2012), *b*) en 1970 ya se observó la capacidad de la PGE2 en la inhibición de la degranulación mastocitaria (Loeffler et al., 1971) y *c*) la expresión de estos receptores varía dependiendo del tipo de población y del origen humano o murino de los mastocitos (Serra-Pagès et al., 2012). Por una parte, la PGE2 aumenta la liberación de diversos mediadores mastocitarios, como histamina, β -hexosaminidasa, IL-6 y GM-CSF, en células inmunológicamente estimuladas, como mastocitos de ratón derivados de médula ósea (*bone marrow mast cells*, BMMC), cultivos primarios de ratón derivados de mastocitos peritoneales (*peritoneum-derived mast cells*, PDMC), la línea celular humana LAD2 y en algunas poblaciones mastocitarias humanas derivadas de progenitores sanguíneos periféricos CD34+ (*human mast cells*, huMC) (Gomi et al., 2000; Kuehn et al., 2011; Nguyen et al., 2002; Serra-Pagès et al., 2012; Wang & Lau, 2006; Weller et al., 2007) (Figura 5). Por el contrario, en algunas de esas y otras poblaciones mastocitarias, la PGE2 tiene un efecto inhibitorio. Por ejemplo, en mastocitos humanos derivados de células del cordón umbilical (hMCs) (Feng et al., 2006), progenitores sanguíneos periféricos adultos (*human mast cells*, HMC) (Serra-Pagès et al., 2012; Wang & Lau, 2006) o en cultivos de mastocitos humanos pulmonares (*human lung mast cell*, HLMC) (Kay et al., 2006), disminuye la liberación de cisteinil leucotrienos, TNF- α , histamina y/o β -hexosaminidasa (Figura 5).

Origen MC	MC humanos			MC de ratón			
	HLMC	huMC	LAD2	BMMCs	PDMCs	C57	MC9
Agonista							
PGE2	↓ histamina ⁶⁵	↑ IL-8 ⁶³ ↑ β-hexosaminidasa ⁶³ ↑ histamina ⁶⁴ ↓ TNF-α ⁶³ ↓ β-hexosaminidasa ⁶⁶	↑ IL-8 ⁶³ ↑ β-hexosaminidasa ^{66,63}	↑ β-hexosaminidasa ^{57,63} ↑ IL-6 ^{60,61} ↑ GM-CSF ⁶¹ ↑ IL-8 ⁶³	↑ β-hexosaminidasa ⁵⁸	↓ β-hexosaminidasa ⁵⁸	↑ β-hexosaminidasa ⁶¹ ↑ IL-6 ⁶¹
EP1							↑ β-hexosaminidasa ⁶¹ ↑ IL-6 ⁶¹
EP2	↓ histamina ⁶⁵ ↓ migración ⁵⁷	↓ TNF-α ⁶³ ↓ β-hexosaminidasa ⁶⁶			↓ β-hexosaminidasa ⁵⁸	↓ β-hexosaminidasa ⁵⁸	
EP3		↑ liberación IL-8 ⁶³ ↑ β-hexosaminidasa ⁶³ ↑ histamina ⁶⁴	↑ liberación IL-8 ⁶³ ↑ β-hexosaminidasa ⁶³	↑ IL-6 ⁶⁰ ↑ GM-CSF ⁶¹ ↑ IL-8 ⁶³ ↑ β-hexosaminidasa ⁶³			↑ β-hexosaminidasa ⁶¹ ↑ IL-6 ⁶¹
EP4	↓ histamina ⁶⁵	↓ TNF-α ⁶³					

Figura 5. Efecto de los agonistas PGE2/EP2 en la liberación mastocitaria dependiente de IgE de diferentes poblaciones de mastocitos humanos y de ratón. Mediadores mastocitarios incrementados (negro) asociados a EP1 y/o EP3. Mediadores mastocitarios disminuidos (rojo) asociados a EP2 y/o EP4. huMC tienen una reacción diferente a la PGE2 dependiendo del donante. HLMC (*human lung mast cells*, mastocitos humanos pulmonares), huMC (*human mast cells*, poblaciones mastocitarias humanas derivadas de progenitores sanguíneos periféricos CD34+), LAD2 (*laboratory allergic diseases 2*, línea celular leucémica de mastocitos humana), BMMCs (*bone-marrow derived mast cells*, mastocitos de ratón derivados de médula ósea), PDMCs (*peritoneum-derived mast cells*, mastocitos peritoneales), C57 (CLMC/C57.1, línea celular de mastocitos de ratón), MC9 (línea celular de mastocitos de ratón), EP1 (receptor prostanoide 1 de la PGE2), EP2 (receptor prostanoide 2 de la PGE2), EP3 (receptor prostanoide 3 de la PGE2), EP4 (receptor prostanoide 4 de la PGE2). (adaptado de Torres et al., 2015).

Por lo que hace referencia al patrón de expresión de los receptores EP, se ha descrito la presencia de los 4 subtipos en distinto grado, tanto en los mastocitos de origen humano como de ratón. En BMMC, huMC y la línea celular de mastocitos de ratón C57.1 predomina la expresión de EP2 y EP3. EP4 típicamente tiene una expresión baja y la expresión de EP1 es prácticamente nula. Hemos observado que la capacidad inhibitoria de la PGE2 en los mastocitos se correlaciona positivamente con una expresión elevada de EP2/EP3 tanto en mastocitos humanos como de ratón (Serra-Pagès et al., 2012). Aunque EP4 también tiene un efecto inhibitorio en los mastocitos, probablemente tendrá un papel minoritario debido a su baja expresión (Kay et al., 2013). Ahora bien cuando el receptor EP2 apenas se expresa, como en poblaciones mastocitarias de médula ósea, el receptor EP4 parece cobrar una mayor relevancia como inhibidor de la actividad mastocitaria (Brown et al., 2011). Se demuestra de esta forma la relación entre el efecto inhibitorio o inductor de la actividad mastocitaria por parte de la PGE2

dependiendo de los niveles de expresión de los receptores prostanoideos en la población celular diana.

Una gran variedad de estudios, incluidos los de nuestro grupo de investigación, sugieren que el receptor EP2 es el que está fundamentalmente implicado en el efecto inhibitorio de la PGE2. Tanto en células musculares como en mastocitos, el receptor EP2 está relacionado con una función preventiva de las acciones proinflamatorias, de la broncoconstricción y del remodelado en el asma.

4.4 Eje PGE2-MC-EP2-Asma: Candidato a Diana Terapéutica

El receptor prostanoide EP2 de la PGE2 se expresa en diferentes tejidos y células (retina, epidermis, células cancerígenas, cerebro, etc.). En el pulmón se encuentra en la musculatura lisa, células dendríticas, linfocitos T y eosinófilos, además de en los mastocitos. La estimulación con un agonista del receptor EP2 conlleva un aumento de los niveles de AMP cíclico. El AMPc actúa a través de la vía PKA (proteína quinasa A o proteína quinasa dependiente de AMP cíclico), ya que utilizando antagonistas de AMP cíclico o silenciando la PKA mediante shRNA las acciones inhibitorias del receptor EP2 sobre los mastocitos revierten. A continuación, EP2 suprime las señales a través de Fyn (proteína tirosina quinasa), muy importantes para la degranulación mastocitaria mediante el receptor de alta afinidad de la IgE, FcεRI (Serra-Pagès et al., 2012). No obstante, otros estudios *in vivo* atribuyen el efecto protector de la respuesta asmática al receptor EP3 (Kunikata et al., 2005), puesto que ratones *knock out* (KO) para el EP2 presentaban una respuesta inflamatoria mayor a OVA, en comparación con ratones *wild type* (WT). También observaron que el tratamiento con un agonista selectivo del receptor EP3 disminuyó la respuesta inflamatoria en ratones WT sensibilizados a OVA. Por el contrario, nosotros demostramos en animales sensibilizados a HDM, de una cepa de ratón diferente, que el agonismo selectivo sobre el receptor EP3 no ejercía ningún efecto protector *in vivo* (Herrerías et al., 2009a) y que la estimulación selectiva sobre el receptor EP2 prevenía la AHR e inflamación de las vías aéreas (Serra-Pagès et al., 2015; Torres et al., 2015) (Figura 6). Esta relevancia del receptor EP2 en la prevención de la inflamación de las vías aéreas *in vivo* se ha visto recientemente reforzada (Zaslona et al., 2013). Además observamos una sobreexpresión del receptor EP2 en ratones sensibilizados a HDM acompañada de un incremento de la PGE2 endógena. Ahora bien, administrando PGE2 exógena a estos ratones se mantiene el incremento EP2, pero la PGE2 endógena no aumenta (Herrerías et al., 2009b). Por lo tanto, el eje COX-2-PGE2-EP2 puede ser una vía donde la PGE2 actúa y éste eje se autorregula como estrategia compensatoria para contrarrestar la progresión de la enfermedad.

Con el objetivo de definir el papel del receptor EP2 en el asma, en parte de nuestros estudios previos el eje PGE2-EP2 fue estimulado exógenamente, en ratones sensibilizados a HDM bajo distintos protocolos experimentales. Se evaluó el impacto de diversos tratamientos en los mecanismos inmunoinflamatorios y en la actividad mastocitaria. La administración de PGE2 subcutánea o intranasal atenuó el daño de las vías respiratorias y disminuyó la actividad mastocitaria (Herrerias et al, 2009b; Torres et al., 2013) (Figura 6). De nuevo se demostró que la modulación por parte de la PGE2 en la respuesta de las vías aéreas a HDM desencadenó un efecto simultáneo modulador sobre los mastocitos. Además, coincidiendo con nuestro trabajo, otros autores han observado que fármacos como las cromonas, que bloquean la activación mastocitaria, tienen un efecto similar al de la PGE2 inhalada (Liu et al., 2012). En otros trabajos propios realizados *in vivo* de PGE2 observamos una correlación entre la concentración de mMCP-1 y el recuento de eosinófilos, sugiriendo que la reducción observada en la infiltración eosinofílica después del tratamiento con la PGE2 podría ser resultado de una disminución en la actividad mastocitaria (Herrerias et al., 2009a). Otros fenómenos inmunoinflamatorios, incluido el equilibrio entre las poblaciones pulmonares mieloides y plasmacitoides de células dendríticas, la respuesta Th2 y el incremento de osteopontina, también parecen relacionarse funcionalmente con el eje PGE2-EP2 (Torres et al., 2013) (Figura 6).

Sensibilización a HDM	↑ Actividad Mastocitaria	<u>Citoquinas Th2</u>	<u>Características asmáticas</u>	<u>Células dendríticas</u>
		↑ IL-4 ↑ IL-5 ↑ IL-13	↑ Eosinofilia ↑ AHR	mDC > pDC ↑ OPN
Tratamiento con PGE2 o agonistas EP2 + Sensibilización a HDM	↓ Actividad Mastocitaria	<u>Citoquinas Th2</u>	<u>Características asmáticas</u>	<u>Células dendríticas</u>
		↓ IL-4 ↓ IL-5 ↓ IL-13	↓ Eosinofilia ↓ AHR	mDC < pDC ↓ OPN

Figura 6. Efecto del eje PGE2-EP2 en la actividad mastocitaria y en la patología de las vías aéreas de ratones sensibilizados a HDM. El tratamiento con PGE2 y agonistas EP2 mejora la patología de las vías aéreas y disminuye la actividad mastocitaria. AHR (*airway hyperresponsiveness*, hiperreactividad bronquial), EP2 (receptor prostanoide 2 de la PGE2), HDM (*house dust mite*, ácaros del polvo), IL-4 (interleucina 4), IL-5 (interleucina 5), IL-13 (interleucina 13), mDC (*myeloid dendritic cells*, células dendríticas mieloides), OPN (osteopontina), pDC (*plasmacytoid dendritic cells*, células dendríticas plasmacitoides), PGE2 (prostaglandina E 2). (adaptado de Torres et al., 2015).

La gran diversidad de actividades biológicas asociadas a la PGE₂ que se ha demostrado en la investigación preclínica, apunta hacia el receptor EP₂ como el principal receptor prostanoide responsable del efecto protector de esta prostaglandina en la respuesta asmática.

Por lo tanto, la relación entre la PGE₂, los mastocitos y el asma se ha substanciado durante las últimas décadas. La relevancia de la PGE₂ en el asma se sustenta en dos pilares: *a*) en los estudios clínicos en los que se detectaron los primeros indicios de que la PGE₂ ejercía un efecto protector, como molécula antiinflamatoria y atenuadora de la hiperreactividad, a pesar de la percepción general de que las prostaglandinas eran mediadores proinflamatorios, y *b*) la identificación y el clonaje de los receptores EP (EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄) de la PGE₂. Sobre esta evidencia dual se construyó la hipótesis de que la PGE₂, o análogos de la PGE₂ capaces de activar selectivamente los receptores EP pueden representar una alternativa, o un complemento, a los tratamientos antiastmáticos actuales o aportar una herramienta para identificar nuevas dianas terapéuticas.

Asimismo, el mastocito es una célula efectora que participa en la mayoría de procesos en que la PGE₂ parece ejercer su efecto protector: *a*) la regulación de la actividad mastocitaria, *b*) la regulación de citocinas y quimiocinas, *c*) la activación y la diferenciación de células dendríticas, y *d*) la activación de linfocitos B y posterior producción de IgE. Todo ello sugiere que el efecto protector de la PGE₂ en el asma puede estar relacionado con la capacidad inhibitoria de los mastocitos.

Ha aumentado notablemente la cantidad de datos preclínicos sobre las propiedades antiinflamatorias, inmunoreguladoras y broncodilatadoras de la PGE₂ y se han añadido evidencias que sugieren que los mastocitos de las vías respiratorias y el receptor EP₂ son mediadores implicados en la protección por parte de la PGE₂ en el asma. No obstante, se requiere un conocimiento más detallado del mecanismo “PGE₂-MC-EP₂”. Por lo tanto, conviene abordar el estudio de la relevancia del receptor EP₂, tanto en poblaciones mastocitarias *in vitro*, como *in vivo* en modelos animales idóneos que permitan dilucidar los mecanismos precisos de las acciones protectoras en la respuesta asmática.

5. El Ratón: un Modelo Idóneo para Estudios Preclínicos de Alergia In Vivo

5.1 Modelos de Asma Alérgica en el Ratón

Los modelos animales han ayudado sustancialmente a la comprensión de la patofisiología del asma humano. La investigación clínica en pacientes asmáticos resulta fundamental para adquirir un conocimiento más amplio de la patogenia del asma, sin embargo existen obstáculos científicos y éticos que impiden revelar determinados aspectos de la enfermedad. Una comparación cuidadosa de las manifestaciones clínicas del asma revela que los modelos animales actuales reproducen gran parte de las características inflamatorias, estructurales y fisiológicas de la patología. Algunas especies desarrollan asma alérgica de forma espontánea y a otras se les induce experimentalmente (Torres et al., 2005). Por motivos fundamentalmente científicos, pero también económicos y de facilidad de uso, el animal universalmente utilizado como modelo de asma alérgica es el ratón, del que, con respecto a otras especies, cabe además destacar la posibilidad de su manipulación genética e inmunológica.

La mayoría de los modelos experimentales de asma alérgica se basan en una sensibilización sistémica y reexposición local del sistema respiratorio al alérgeno. Las diferencias se encuentran en el alérgeno utilizado, la vía de administración o de exposición, la cepa de ratón o la duración del proceso de inducción de asma (agudo o crónico). En función de la finalidad del estudio, la exposición al alérgeno será de corta o larga duración. Modelos de asma aguda ofrecen ventajas para el estudio del proceso inflamatorio y del broncoespasmo, mientras que modelos de asma crónica permiten la evaluación de cambios estructurales (remodelado) y la influencia de éstos en la obstrucción bronquial.

Según el alérgeno utilizado se pueden contemplar dos tipos de modelos: el modelo clásico de OVA y el de aeroalérgenos naturales. Hay estudios sobre el papel beneficioso de la COX-2 y la producción endógena de PGE2 en la inflamación y en la AHR inducida por OVA, o en su ausencia, el papel perjudicial sobre la respuesta asmática (Hashimoto et al., 2005; Nakata et al., 2005; Peebles et al., 2002; Torres et al., 2009). No obstante, la importancia de la estructura antigénica y la vía de inmunización en el tipo de respuesta decantan la investigación preclínica hacia el modelo de aeroalérgenos naturales. Los ácaros del polvo (HDM) son la causa más común de asma alérgica en las personas. El protocolo de inducción de asma por HDM mimetiza mejor la forma de exposición natural de los pacientes asmáticos a los alérgenos (contacto diario por vía aérea y sin adyuvantes) consiguiendo de esta forma un modelo más cercano a la inducción espontánea de asma aguda. Por estos motivos, en nuestro laboratorio se han

adoptado los modelos de asma aguda y crónica por exposición a HDM (Cates et al., 2004; Johnson et al., 2004).

En relación a los resultados que hemos obtenido mediante el modelo de asma aguda a HDM, se confirma la importancia de la COX-2, el efecto beneficioso de la PGE2, la relevancia de los mastocitos y el papel de los receptores EP en la respuesta asmática (Torres et al., 2015) (Figura 6). Pudimos demostrar por un lado, que el eje COX-2-PGE2-EP2 es fundamental para el efecto preventivo de la PGE2 exógena y endógena en la sensibilización a ácaros del polvo (Herrerías et al., 2009b) y, por otro, que los mastocitos juegan un papel importante tanto en el desarrollo del asma experimental como en el efecto inhibitorio de la PGE2 (Herrerías et al., 2009a; Serra-Pagès et al., 2012; Torres et al., 2013).

Los datos corroboran el especial interés de utilizar el modelo HDM para estudiar el efecto de la PGE2 y la relevancia del receptor EP2 mastocitario en la respuesta asmática. Para conocer más profundamente los mecanismos involucrados en el efecto beneficioso del agonismo EP2 es necesaria la creación de nuevas herramientas biológicas. Abordajes como la generación de ratones transgénicos con sobreexpresión del receptor EP2 en los mastocitos, ratones *knock out* para el receptor EP2 o ratones “humanizados” con genes, moléculas o receptores endógenos propios del sistema inmune humano ayudarán de manera sustancial en la validación de potenciales dianas terapéuticas antiasmáticas.

5.2 Ratón Transgénico: Herramienta Útil como Modelo de Estudio

Ratones modificados genéticamente se han utilizado para sobreexpresar o eliminar genes de interés, analizar promotores o potenciadores dirigidos específicamente a ser expresados en un tejido y generar modelos animales para el estudio de enfermedades humanas. Existen diferentes intervenciones genéticas que se pueden obtener mediante transgénesis: los ratones transgénicos convencionales y los modelos de mutagénesis dirigida del genoma (*knock out* y *knock in*). Los ratones portadores de un transgen (material genético externo) integrado en el genoma son generalmente modelos de “ganancia de función”, dado que conducen a la expresión de un nuevo gen o a la sobreexpresión de uno ya existente. Generalmente se utilizan construcciones transgénicas compuestas por un promotor eucariótico y la secuencia codificante para expresar dicho gen, o sobreexpresarlo, en todas las células del ratón (expresión ubicua) o en un tejido concreto (expresión específica de tejido) (Ortega, 2009; Skelton et al., 2013). Los ratones *knock out* permiten estudiar el fenotipo que resulta de la pérdida de la función de un gen específico, mientras que la sobreexpresión nos proporciona una herramienta útil para evaluar el efecto amplificado del gen de interés en todo el animal. De este modo, los ratones transgénicos son

modelos interesantes para investigar más extensamente la relevancia de diferentes moléculas y receptores celulares. El estudio de la función del receptor EP2 mastocitario en el asma, se beneficiaría de la disponibilidad de ratones en los que éste estuviera sobreexpresado o silenciado.

La manipulación genética permite también “humanizar” determinados procesos o mecanismos *in vivo* proporcionando un valioso conocimiento de cómo funciona el sistema inmune humano. Se ha conseguido, en parte, alterando ratones genéticamente, sustituyendo genes que codifican funciones inmunológicas importantes con sus homologas humanas. Disponer de ratones que expresan el receptor de la IgE humana, tiene un particular interés en el ámbito del estudio de procesos alérgicos. Especialmente estos animales presentan un gen endógeno que codifica para la subunidad α del receptor de alta afinidad de la IgE, Fc ϵ RI, el cual se ha inactivado y se ha sustituido por su homólogo humano (Dombrowicz et al., 1996). El Fc ϵ RI pertenece a la familia de receptores Fc (Ravetch & Kinet, 1991), tiene una estructura tetramérica compuesta por una subunidad α , una subunidad β y dos subunidades γ . La subunidad α es la que se une directamente a la IgE (Hakimi et al., 1990) mientras que las otras subunidades están relacionadas con la transducción de la señal (Jouvin et al., 1995). Los ratones que expresan el receptor “humanizado” de la IgE permitirán conocer los mecanismos moleculares subyacentes a la distribución específica del receptor en el tejido y, de esta manera, serán una poderosa herramienta para evaluar la efectividad de diferentes agentes terapéuticos destinados a intervenir en las reacciones alérgicas mediadas por la IgE humana, como los anticuerpos monoclonales anti-IgE.

En los últimos 20 años el crecimiento incesante de numerosos modelos de asma alérgica inducida en el ratón ha impulsado la investigación preclínica y ofrece sin duda un valor añadido a los estudios en pacientes asmáticos, a los estudios *in vivo* en otros modelos animales y a los experimentos *in vitro* y *ex vivo* (Torres et al., 2005). En especial el modelo de asma experimental a HDM y el interés de los ratones modificados genéticamente, son esenciales para estudiar los mecanismos implicados en el efecto beneficioso del eje PGE2-Mastocito-EP2 en la respuesta asmática.

III. Hipótesis & Objetivos

III. HIPÓTESIS & OBJETIVOS

1. Hipótesis

Basándonos en los antecedentes expuestos en la introducción, formulamos la hipótesis general de que *el agonismo sobre el receptor EP2 de los mastocitos ejerce un efecto protector en pacientes con asma alérgica.*

La hipótesis específica sobre la que se asienta este trabajo de Tesis Doctoral es la siguiente:

“La activación selectiva del receptor prostanoide EP2 de la PGE2 inhibe la actividad mastocitaria, y consecuentemente reduce el proceso respiratorio inducido en ratones por exposición a aeroalérgenos, lo cual puede suponer una estrategia terapéutica antiasmática sinérgica a la del bloqueo mastocitario por otros mecanismos”

2. Objetivos

Con el fin de verificar la hipótesis específica nos marcamos el objetivo de:

“Determinar preclínicamente la relevancia del receptor EP2 mastocitario como diana terapéutica idónea para el desarrollo de nuevos tratamientos antiasmáticos”

En este proyecto se establecieron los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1: Evaluar la función selectiva del receptor prostanoide EP2 en la modulación de la actividad mastocitaria y en la reactividad respiratoria a aeroalérgenos

- a) Evaluación *in vitro* del efecto agonista del receptor EP2 en poblaciones mastocitarias heterogéneas (fenotípicamente diversas), y comparación de 2 agonistas selectivos del receptor EP2 en una línea celular de mastocitos humanos, e *in vivo* en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón.
- b) Determinación del impacto del bloqueo del receptor EP2 en la actividad mastocitaria *in vitro* y en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón (*in vivo*).

Objetivo 2: Desarrollar un ratón transgénico de EP2 para evaluar la relevancia relativa del receptor EP2 en la protección inducida por PGE2

- a) Generación y selección de una población de ratones transgénicos que sobreexpresasen el receptor EP2 específicamente en los mastocitos.
- b) Evaluación preliminar del efecto de la sobreexpresión del EP2 mastocitario *in vitro* y en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón (*in vivo*).

Objetivo 3: Evaluar comparativamente la efectividad preclínica de la inhibición mastocitaria mediante agonismo EP2 y bloqueo de la IgE, *in vitro* y en modelos de alergia *in vivo*

- a) Determinación del efecto inhibitorio de la actividad mastocitaria *in vitro* en poblaciones celulares diversas que expresan el receptor humano de la IgE mediante agonismo EP2 y anti-IgE.
- b) Comparación del efecto del agonismo EP2 y de anti-IgE *in vivo* en un modelo de anafilaxia cutánea dependiente de mastocitos.
- c) Desarrollo de un modelo de anafilaxia respiratoria en ratones transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE (FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺) para evaluar el agonismo EP2 frente a la estrategia de inhibición anti-IgE.

IV. Subproyectos

IV. SUBPROYECTOS

Resumen del Planteamiento Experimental General

En esta sección IV se describen los procedimientos, los resultados y su interpretación, de los tres subproyectos que se corresponden con cada uno de los tres objetivos específicos planteados.

En el Subproyecto 1 se estudió el efecto de la modulación del receptor EP2 *in vitro* e *in vivo*. En poblaciones mastocitarias fenotípicamente diversas se evaluaron las diferencias entre un agonismo selectivo y no selectivo sobre el receptor EP2. Luego se compararon dos agonistas EP2 químicamente dispares con el fin de certificar el efecto EP2 sobre cultivos mastocitarios. Posteriormente, se estudió el efecto de un nuevo agonista EP2 en ratones sensibilizados a aeroalérgenos, en los que se evaluó la modulación de la actividad mastocitaria *in vivo*, la reactividad de las vías aéreas y el proceso inflamatorio. Para completar la valoración de las consecuencias de la interacción selectiva con EP2, se estudió el resultado de la inactividad del receptor EP2 mediante antagonistas *in vitro* e *in vivo*.

Una vez valoradas con exhaustividad las consecuencias del agonismo EP2, en mastocitos y vías respiratorias, en el Subproyecto 2 se planteó la conveniencia de generar ratones que sobreexpresasen el receptor EP2 selectivamente en los mastocitos para determinar la importancia funcional del receptor mastocitario en el beneficio atribuible a la PGE2 en el asma. Se crearon diversas colonias de ratones transgénicos para el receptor EP2 y se preseleccionaron algunas de ellas. Estos ratones transgénicos de EP2 se utilizaron para el análisis *in vitro* de agonistas y antagonistas del receptor EP2, e *in vivo* para evaluar no solo el impacto de la sobreexpresión, si no también el de la administración de PGE2, en la actividad mastocitaria, la inflamación y en la hiperreactividad bronquial.

Finalmente, ya substanciada la relevancia del receptor EP2 mastocitario, se utilizó una aproximación preclínica para determinar el potencial interés clínico de la activación de EP2 frente a otras estrategias antiasmáticas de bloqueo mastocitario. En el Subproyecto 3, por lo tanto, se comparó en poblaciones celulares diversas el efecto de un bloqueo mastocitario mediante dos mecanismos, agonismo EP2 y anticuerpos anti-IgE. Asimismo, se evaluaron los dos tratamientos en un modelo dependiente de mastocitos *in vivo* (anafilaxia cutánea pasiva, PCA). Por último, se desarrolló un modelo de alergia (anafilaxia respiratoria pasiva, PRA) que en futuros estudios permitirá comparar las consecuencias de bloquear IgE y/o activar EP2 en las vías respiratorias de ratones sensibilizados.

SUBPROYECTO 1

Efecto de la Modulación del Receptor EP2 Mastocitario

(Objetivo 1)

1. SUBPROYECTO 1: ABORDAJE EXPERIMENTAL DEL OBJETIVO 1

En el marco del **Objetivo 1**: “Evaluar la función selectiva del receptor prostanoide EP2 en la modulación de la actividad mastocitaria y en la reactividad respiratoria a aeroalérgenos” se diseñaron 2 grupos de experimentos.

Experimento 1: Evaluación in vitro del efecto agonista del receptor EP2 en poblaciones mastocitarias heterogéneas (fenotípicamente diversas), y comparación de 2 agonistas selectivos del receptor EP2 en una línea celular de mastocitos humanos, e in vivo en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón.

Se planteó evaluar si el efecto inhibitorio del agonismo EP2 sobre los mastocitos era reproducible y sólido. Para ello se decidió estudiar la respuesta a un agonista selectivo de EP2 transversalmente en mastocitos fenotípicamente diversos. Con el mismo objetivo comprobamos si dos agonistas químicamente distintos ejercían ese mismo bloqueo sobre los mastocitos. De esta manera pretendimos certificar que el efecto beneficioso recae sobre su capacidad de activar EP2 y que no era atribuible a posibles acciones colaterales inespecíficas. Esta batería de experimentos *in vitro* pretendía consolidar la hipótesis que relaciona la activación EP2 con el bloqueo mastocitario.

La capacidad inhibitoria observada *in vitro* se estudió *in vivo* con ambas moléculas agonistas, no solo respecto a la inhibición de los mastocitos pulmonares, sino que también se quiso confirmar con un segundo agonista que se prevenía la hiperreactividad bronquial y la inflamación pulmonar en el modelo en ratón sensibilizado a aeroalérgenos.

Experimento 2: Determinación del impacto del bloqueo del receptor EP2 en la actividad mastocitaria in vitro y en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón (in vivo).

Una manera de verificar el beneficio atribuible al agonismo EP2 es comprobar que el antagonismo ejerce un efecto opuesto (i.e. perjudicial). Se evaluó el efecto de antagonistas del receptor EP2 en una población de mastocitos pulmonares para luego comparar *in vivo* su efecto en la AHR e inflamación de las vías respiratorias. Ante la posibilidad de que el antagonista empeorara la patología respiratoria en el modelo en ratón, se administró un bloqueante de la actividad mastocitaria, para determinar el papel

de estas células *in vivo* en la resistencia pulmonar y la inflamación broncovascular. Finalmente también se utilizaron ratones modificados genéticamente, *knock out* para el receptor EP2, para analizar *in vivo* el efecto de la ausencia del receptor en la respuesta asmática tras el tratamiento con un agonista EP2.

Por tanto mediante diversos abordajes experimentales *in vitro* e *in vivo*, se determinará la relevancia del receptor EP2 de los MC en el efecto protector de la PGE2 para cumplir con el primer objetivo del proyecto de Tesis. A continuación se describe el material y métodos, y se discuten brevemente los resultados de cada experimento.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Estudio de la actividad mastocitaria en cultivos de origen humano y de ratón

En poblaciones mastocitarias heterogéneas de origen humano y de ratón se evaluó el efecto de agonistas y antagonistas del receptor EP2.

Los cultivos mastocitarios se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. Los medios de crecimiento celular se han especificado detalladamente para cada uno de los cultivos. Todos los experimentos relacionados con el cultivo celular se desarrollaron bajo condiciones estrictas de esterilidad y con el material autoclavado.

2.1.1. Evaluación de la respuesta mastocitaria en cultivos mastocitarios de ratón

En el siguiente apartado se explican las técnicas utilizadas para obtener cultivos primarios de mastocitos peritoneales y pulmonares, así como el mantenimiento de la línea celular de ratón C57.1. Finalmente se describe el ensayo utilizado para evaluar la actividad mastocitaria.

◆ Reactivos, citoquinas y fármacos

Todos los productos químicos utilizados para la obtención de mastocitos peritoneales y pulmonares, el mantenimiento de la línea celular de mastocitos de ratón y la determinación de la actividad mastocitaria fueron de la pureza adecuada para el análisis. El medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), el DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*), la penicilina-estreptomicina-glutamina, L-glutamina, la solución de aminoácidos no esenciales, la solución de piruvato sódico, el suero fetal bovino (SFB) y la anfotericina B provenían de Biowest (Nuaillé, Francia). El 2-mercaptoethanol era de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los factores de crecimiento como la interleucina-3 (IL-3) y el factor de células madre (SCF) se compraron en Prospec (Rehovot, Israel). El recuento de células totales se realizó mediante una tinción con azul de tripano de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para la solución de kimura se utilizó cloruro sódico (NaCl), metanol, etanol, bifosfato de sodio (NaH₂PO₄), azul de toluidina y saponina de Panreac Applichem (Barcelona, España).

La IgE-DNP específica de ratón (Inmunoglobulina E anti-DNP), producida como se ha descrito previamente (Liu et al., 1980), fue amablemente cedida por el Dr. Juan Rivera del NIH (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA). El antígeno DNP-HSA (dinitrofenil-albúmina

sérica humana) y el tampón fosfato salino (PBS) con el que se disolvió eran de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La Prostaglandina E2 (PGE₂) y el butaprost (agonista selectivo EP2) se compraron en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). El AH6809 (antagonista EP1/EP2) también provenía de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El butaprost y la PGE₂ se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) mientras que el antagonista AH6809 se disolvió en etanol de Panreac Applichem (Barcelona, España).

Los productos químicos del tampón HEPES para el ensayo de degranulación mastocitaria: HEPES (4- [2-hidroxietil] -1-piperazinetanosulfónico), cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), fosfato disódico heptahidratado (Na₂HPO₄·7H₂O), glucosa, cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂·2H₂O), sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O) se compraron en Panreac Applichem (Barcelona, España) y la albúmina sérica bovina en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El p-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosamide (PNAG) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) se disolvió en tampón citrato: ácido cítrico y fosfato disódico heptahidratado (Na₂HPO₄·7H₂O) de Panreac Applichem (Barcelona, España). Por último, para parar la reacción enzimática se utilizó glicina (Panreac Applichem, Barcelona, España) disuelta en agua destilada.

◆ Cultivos primarios de mastocitos pulmonares y peritoneales de ratón

A continuación se describe la procedencia de los ratones y las técnicas utilizadas para obtener cultivos mastocitarios peritoneales y pulmonares.

➤ **Animales de experimentación**

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c (Charles River, Calco, Italia) de 8 semanas de edad al inicio del estudio. Período de aclimatación durante una semana en racs ventilados de PANLAB (Barcelona, España) con un máximo de 6 animales por jaula.

Las condiciones ambientales de estabulación fueron las estándar: ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, temperatura de 22±2°C con una humedad relativa constante de 60±10%. El agua y pienso (SAFE-PANLAB, Barcelona, España) se suministraron *ad libitum*. También se controlaron diariamente la supervivencia, los signos de enfermedad y/o la pérdida de peso. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (España). El desarrollo de este proyecto se realizó de acuerdo con la legislación española del Real Decreto 53/2013 relativa a la “Protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”, y de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo.

➤ Obtención y cultivo de mastocitos peritoneales

Los mastocitos peritoneales (*peritoneum-derived mast cells*, PDMC) se obtuvieron a partir de un lavado de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c con 4ml de medio (Tabla 1) (ver anexo 1.1). En un mismo cultivo celular se juntaron los lavados de tres ratones.

Las células se cultivaron durante 3 semanas en presencia de IL-3 (20ng/ml) y SCF (20ng/ml) en medio completo RPMI con un 20% de suero fetal bovino (SFB) para conseguir una mayor cantidad de PDMC (Gomez et al., 2005). Mantenimiento del cultivo semanalmente y a partir de la semana 3 se realizaron recuentos de células total (dilución $1/2$ con azul de tripano), viabilidad y pureza de mastocitos (dilución $1/5$ con kimura, ver tabla 2).

Tabla 1. Medio de lavado para el cultivo de mastocitos peritoneales (PDMC). PBS (tampón fosfato salino), PDMC (mastocitos peritoneales de ratón), RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*).

Producto	Volumen
RPMI 1640 con L-Glutamina y 25mM Hepes	500ml
Penicilina-Estreptomicina-Glutamina 100X	6ml
Solución de aminoácidos no esenciales 100X	5ml
Solución de piruvato sódico 100mM	5ml
2- Mercaptoethanol 14.3 diluido 1:100 en PBS (Tampón fosfato salino) pH 7.4	174µl

Tabla 2. Solución de Kimura para recuento específico de mastocitos. Se prepara en un recipiente de 100ml, filtrando 50ml de solución **A**, 2.27ml de solución **B** y 22.7ml de solución **C**. NaCl (cloruro sódico), NaH₂PO₄ (bifosfato de sodio).

Solución Madre	Productos específicos
A) Azul de Toluidina 0.05%	NaCl 1.8%
	Metanol 11ml
	Azul de Toluidina 25mg
	Agua destilada 50ml
B) Saponina Saturada	Etanol 50ml
	Saponina 320mg
	Agua destilada 50ml
C) NaH ₂ PO ₄ 0.066M	NaH ₂ PO ₄ 0.79g
	Agua destilada 100ml

➤ **Obtención y cultivo de mastocitos pulmonares**

Los mastocitos pulmonares de ratón (*lung mast cells*, LMC) se obtuvieron a partir de una técnica de aislamiento y estimulación. Se extrajeron los pulmones, se trocearon (3mm) y se sumergieron en medio completo RPMI (Tabla 1) con un 20% de SFB en presencia de IL-3 (20ng/ml), SCF (20ng/ml) y anfotericina B (250ng/ml) durante 7 días. En un mismo cultivo celular se juntaron los pulmones troceados de tres ratones (ver anexo 1.2).

Mantenimiento celular durante 3 semanas para conseguir una mayor cantidad de LMC en presencia de IL-3 (20ng/ml) y SCF (20ng/ml), la primera semana también se añadió anfotericina B (125ng/ml). A partir de la tercera semana se realizaron recuentos de células total (dilución 1/2 con azul de tripano), viabilidad y pureza de mastocitos (dilución 1/5 con kimura, ver tabla 2).

◆ Cultivo de la línea celular C57.1 de mastocitos de ratón

La línea celular de mastocitos de ratón CIM/C57.1 (C57) fue amablemente cedida por el Dr. Stephen J. Galli (*Stanford University School of Medicine / Stanford University Medical Center*, Stanford, CA, USA) originalmente derivada de ratones de la cepa BALB/c (Tsai et al., 1996). Las células C57 son independientes de factores de crecimiento y se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) (Tabla 3) suplementado con un 10% de SFB inactivado a 56°C durante 30 minutos, 2mM de L-glutamina y 5·10⁻⁵M de 2-mercaptoethanol. Mantenimiento del cultivo semanalmente y se realizaron recuentos de células total mediante azul de tripano (dilución 1/2).

Tabla 3. Medio completo básico para la línea celular CIM/C57. DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*).

Producto	Volumen
DMEM High Glucosa with stable Glutamine	500ml
Penicilina-Estreptomicina 100X	5ml
L-Glutamina 200mM	5ml
5·10 ⁻³ M de 2- Mercaptoethanol	5ml

◆ Ensayo de activación mastocitaria: liberación de β-hexosaminidasa

Antes de empezar el ensayo de degranulación mastocitaria las PDMC y LMC se cultivaron durante 16 horas sin los factores de crecimiento específicos (IL-3 y SCF). Las C57, las PDMC y

las LMC fueron sensibilizadas con 1µg/ml de IgE-DNP específica de ratón durante dos horas. Después de la sensibilización, las células se lavaron y se resuspendieron en tampón HEPES (Tabla 4) con un 0.04% de BSA. Seguidamente se cultivaron 50.000 células de cada condición en un volumen final de 100µl en una placa de 96 pocillos en V (Thermo Scientific NUNC, Waltham, MA, USA). Las células se pre-incubaron con butaprost (10⁻⁵M), PGE2 (10⁻⁵M) o vehículo (PBS con 0.1% DMSO) durante 30 minutos o AH6809 (10⁻⁵M) durante 1 hora a 37°C con 5% v/v de CO₂. Las PDMC también se pre-incubaron con tres concentraciones crecientes de butaprost (10⁻⁶M, 3·10⁻⁶M y 3·10⁻⁵M).

En un segundo lugar los mastocitos se estimularon con 50ng/ml de antígeno (DNP-HSA) durante 30 minutos a 37°C con 5% v/v de CO₂. Específicamente las células C57.1 se estimularon con dos concentraciones, 25ng/ml y 50ng/ml, de DNP-HSA durante 15 y 30 minutos. La degranulación mastocitaria se paró con hielo. Las células se centrifugaron a 1500rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes en una placa de lectura (Thermo Scientific NUNC, Waltham, MA, USA). Los *pellets* de las células se lisaron mecánicamente homogeneizándolos con agua destilada. A continuación se sometieron a un período de 10 minutos de congelación a -80°C, seguido de 10 minutos de descongelación a 37°C. También se recogieron los lisados celulares en la placa de lectura de los sobrenadantes.

Tabla 4. *Tampón HEPES* (1 litro agua destilada, pH 7.4) *para el ensayo de degranulación mastocitaria.* CaCl₂·2H₂O (cloruro de calcio dihidratado), HEPES (4- [2-hidroxietil] -1-piperazinetanosulfónico), KCl (cloruro potásico), MgSO₄·7H₂O (sulfato de magnesio heptahidratado), NaCl (cloruro sódico), Na₂HPO₄·7H₂O (fosfato disódico heptahidratado).

Productos	Gramos	Molaridad	Peso molecular
HEPES	2.38g	10mM	238.31g/mol
NaCl	8.00g	137mM	58.44g/mol
KCl	0.2g	2.7mM	74.55g/mol
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.103g	0.4mM	268.07g/mol
Glucosa	1.008g	5.6mM	180.00g/mol
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.265g	1.8mM	147.02g/mol
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.32g	5.6mM	246.5g/mol

Finalmente se analizó la reacción enzimática del mediador mastocitario, β-hexosaminidasa, liberado al medio extracelular en los sobrenadantes y en los *pellets* de las células sensibilizadas con IgE-DNP y estimuladas con el antígeno DNP-HSA. Se determinó a partir de la liberación de p-nitrofenol mediante un ensayo fluorométrico con 3.5mg/ml de PNAG (P-nitrofenil N-

acetil- β -D-glucosamida) como sustrato disuelto en tampón citrato (Tabla 5). La reacción enzimática se paró con glicina (Tabla 6) después de 90 minutos de incubación a 37°C. Al terminar la incubación se utilizó un lector de placas Labsystems iEMS Reader MF (Thermo Labsystems, Beverly, MA, USA) para determinar la absorbancia, a 405nm con filtro de referencia a 620nm, de los *pellets* celulares y sobrenadantes. Cada condición se realizó por triplicado o cuadruplicado y la media se utilizó para analizar los porcentajes de liberación o inhibición mastocitaria.

Tabla 5. *Tampón Citrato 0.04M* (200ml de agua destilada, pH 4.5) *para el ensayo de degranulación mastocitaria.* Na₂HPO₄·7H₂O (fosfato disódico heptahidratado).

Productos	Gramos	Molaridad	Peso molecular
Ácido cítrico	1.6808g	0.04M	210.1g/mol
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1.0723g	0.02M	268.07g/mol

Tabla 6. *Glicina 0.4M* (500ml de agua destilada, pH 10.7) *para el ensayo de degranulación mastocitaria.*

Productos	Gramos	Molaridad	Peso molecular
Glicina	15.1g	0.4M	75.07g/mol

La degranulación mastocitaria de las diferentes condiciones experimentales se representó mediante el porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa teniendo en cuenta las absorbancias (*optic density*, OD) de los lisados celulares y sobrenadantes (Saitoh et al., 2000).

$$\% \text{ liberación } \beta - \text{hexosaminidasa} = 100 \times \frac{OD \text{ sobrenadante}}{(OD \text{ sobrenadante} + OD \text{ lisado celular})}$$

Asimismo, se calcularon los porcentajes de inhibición de los agonistas respecto a la activación celular total (IgE+/DNP+) sustrayendo los porcentajes de liberación basal (IgE+/DNP-).

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{(\% \text{ liberación agonista } X - \% \text{ liberación basal}) \times 100}{(\% \text{ liberación total} - \% \text{ liberación basal})}$$

2.1.2. Evaluación de la respuesta mastocitaria en cultivos mastocitarios humanos

A continuación se describe el cultivo de la línea celular humana LAD2, la síntesis del agonista EP2 de Pfizer, CP-533536, y el ensayo utilizado para evaluar la actividad mastocitaria *in vitro*.

◆ Reactivos, citoquinas y fármacos

Todos los productos químicos utilizados para el mantenimiento de la línea celular de mastocitos humana y para la determinación de la actividad mastocitaria fueron de la pureza adecuada para el análisis. Para el cultivo de la línea LAD2 se compró medio libre de suero StemPro 34-SFM (*serum free medium*) de Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), la penicilina, estreptomina y la L-glutamina de Biowest (Nuaille, Francia). El factor de células madre humano (h-SCF) provenía de Prospec (Rehovot, Israel). Para el recuento de células totales se utilizó azul de tripano de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

La IgE humana unida a Biotina (*Biotin anti-human IgE*) era de ABBIOTEC (San Diego, CA, USA) y la estreptavidina (SA, antígeno) se compró en BD Biosciences (San José, CA, USA). El butaprost de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El agonista selectivo EP2, CP-533536 de Pfizer (Nueva York, NY, USA) se sintetizó mediante colaboración con un grupo externo *Galchimia* (O Pino, A Coruña, España).

Los productos para el ensayo de degranulación mastocitaria: HEPES (4- [2-hidroxietil] -1-piperazinetanosulfónico), cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), fosfato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), glucosa, cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se compraron en Panreac Applichem (Barcelona, España) y la albúmina sérica bovina en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El p-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosamida (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) se disolvió en tampón citrato: ácido cítrico y fosfato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de Panreac Applichem (Barcelona, España). Por último, para parar la reacción enzimática se utilizó glicina (Panreac Applichem, Barcelona, España) disuelta en agua destilada.

◆ Cultivo de la línea celular LAD2

La línea celular de mastocitos humana LAD2 (*human leukemic mast cell line*), cedida amablemente por el Dr. Arnold Kirshernbaum y el Dr. Dean Metcalfe del NIAD-NIH (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases / National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA), deriva de un

paciente con sarcoma de mastocitos no tratado (Kirshenbaum et al., 2003). Las células LAD2 se cultivaron en medio libre de suero (StemPro-34 SFM), suplementado con 2mM L-glutamina, 100U/ml de penicilina, 50µg/ml de estreptomicina y 100ng/ml del factor de células madre humano (h-SCF). Mantenimiento del cultivo semanalmente y se realizaron recuentos de células total mediante azul de tripano (dilución 1/2).

◆ Síntesis del agonista EP2 CP-533536

Para dar solidez al efecto protector del agonismo EP2 independientemente del agente utilizado (recomendación de expertos) se utilizó más de un agonista selectivo del receptor EP2 de la PGE2.

Mediante colaboración con un grupo externo (*Galchimia*, A Coruña, España) se sintetizó químicamente el CP-533536 de Pfizer. Primero se analizó la mejor ruta de síntesis del compuesto y luego se cristalizó la sal sódica para una mejor disolución posterior. Mediante resonancia magnética nuclear (RMN-1H) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se comprobó la identidad y la pureza. El % de pureza del producto resultante fue de un 98.32%.

El CP-533536 es una 3-piridil sulfonamida con una excelente potencia *in vitro* contra EP2 (Cameron et al., 2009; Li et al., 2003). Las sulfonamidas (Figura 7A) se han identificado como agonistas EP2 altamente selectivos. Concretamente el CP-533536 es un potente y selectivo agonista EP2. Los derivados de los alcoholes bencílicos mejoraron la selectividad y potencia sobre EP2. Con el objetivo de conseguir un compuesto con una semivida sistémica corta, se eligió el grupo tert-butilo metabólicamente lábil para optimizar la sulfonamida (Figura 7B). La potencia funcional mejoró significativamente tras reemplazar la metil sulfonamida con un arilo.

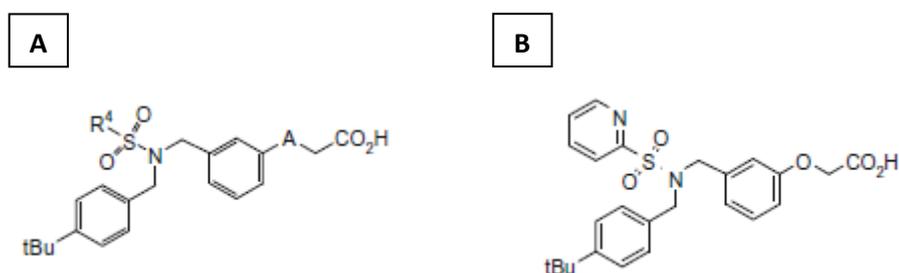


Figura 7. Estructura química de una sulfonamida (A) y del compuesto CP-533536 (B). (Cameron et al., 2009)

En la figura 8 se muestran las diferencias estructurales del agonista no selectivo PGE2 y los dos agonistas selectivos del receptor EP2 químicamente diferentes, el butaprost y el CP-533536.

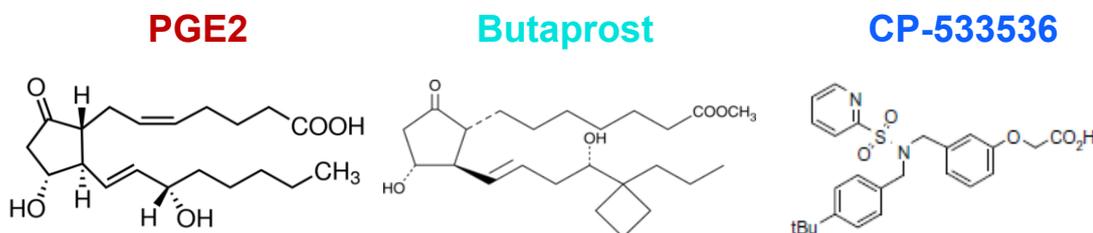


Figura 8. Estructura química de la Prostaglandina E2, del Butaprost y del CP-533536.

◆ Ensayo de activación mastocitaria: liberación de β -hexosaminidasa

Las LAD2 se cultivaron durante 16 horas sin la presencia del h-SCF antes del ensayo de degranulación mastocitaria. Las células se sensibilizaron con 100ng/ml de IgE humana biotinilada en medio libre de h-SCF durante 2 horas. Se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos (Thermo Scientific NUNC, Waltham, MA, USA) para cultivar 150.000 células en un volumen final de 300 μ l de tampón *HEPES* (Tabla 4). Las LAD2 se pre-incubaron 15 minutos antes de la sensibilización con concentraciones crecientes de butaprost y de CP-533536 (10^{-7} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M, $3 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) o vehículo (PBS con 0.1% DMSO) durante 2 horas y 15 minutos.

A continuación se traspasaron las LAD2 de las diferentes condiciones experimentales a placas de 96 pocillos en V (Thermo Scientific NUNC, Waltham, MA, USA) y se estimularon con 100ng/ml de antígeno estreptavidina (SA) durante 30 minutos a 37°C con 5% v/v de CO₂. La degranulación mastocitaria se paró con hielo. Las células se centrifugaron a 1500rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes en una placa de lectura. Los *pellets* de las células se lisaron mecánicamente homogeneizándolos con agua destilada. A continuación se sometieron a un período de 10 minutos de congelación a -80°C, seguido de 10 minutos de descongelación a 37°C. También se recogieron los lisados celulares en la placa de lectura de los sobrenadantes.

Finalmente se analizó la reacción enzimática del mediador mastocitario, β -hexosaminidasa, liberado al medio extracelular en los sobrenadantes y en los pellets de las células sensibilizadas con IgE humana y estimuladas con el antígeno SA. Se determinó a partir de la liberación de p-nitrofenol mediante un ensayo fluorométrico con 3.5mg/ml de PNAG (P-nitrofenil N-acetil- β -

D-glucosamida) como sustrato disuelto en tampón citrato (Tabla 5). La reacción enzimática se paró con glicina (Tabla 6) después de 90 minutos de incubación a 37°C. Al terminar la incubación se utilizó un lector de placas Labsystems iEMS Reader MF (Thermo Labsystems, Beverly, MA, USA) para determinar la absorbancia, a 405nm con filtro de referencia a 620nm, de los *pellets* celulares y los sobrenadantes. Cada condición se realizó por cuadruplicado y la media se utilizó para analizar los porcentajes de liberación o inhibición mastocitaria.

La degranulación mastocitaria de las diferentes condiciones experimentales se representó mediante el porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa teniendo en cuenta las absorbancias (*optic density*, OD) de los lisados celulares y sobrenadantes (Saitoh et al., 2000).

$$\% \text{ liberación } \beta - \text{ hexosaminidasa} = 100 \times \frac{OD \text{ sobrenadante}}{(OD \text{ sobrenadante} + OD \text{ lisado celular})}$$

Asimismo, se calcularon los porcentajes de inhibición de los agonistas respecto a la activación celular total (hIgE+/SA+) sustrayendo los porcentajes de liberación basal (hIgE+/SA-).

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{(\% \text{ liberación agonista } X - \% \text{ liberación basal}) \times 100}{(\% \text{ liberación total} - \% \text{ liberación basal})}$$

2.2. Efecto del agonismo y antagonismo EP2 en la respuesta de las vías respiratorias a aeroalérgenos in vivo

Se estudió el efecto de agonistas y antagonistas del receptor EP2 en la actividad mastocitaria, hiperreactividad bronquial e inflamación de las vías aéreas de ratones expuestos a aeroalérgenos por vía intranasal.

2.2.1. Procedimientos experimentales

Se describe la procedencia de los ratones utilizados en los diferentes abordajes experimentales, la metodología aplicada para la sensibilización a ácaros del polvo y los tratamientos con los agonistas y antagonistas EP2.

◆ Reactivos y fármacos

Todos los fármacos y productos químicos utilizados para la sensibilización y los tratamientos *in vivo* tenían la pureza y pH adecuados. Los ácaros del polvo (*house dust mite*, HDM) provenían de Alk-Abelló (Madrid, España) y se diluyeron en suero fisiológico salino (SF) de Braun (Melsungen, Alemania). Para la anestesia de gases se utilizó isoflurano de Esteve Veterinaria (Barcelona, España). El agonista selectivo EP2 (CP-533536 de Pfizer) se sintetizó mediante colaboración con un grupo externo *Galchimia* (O Pino, A Coruña, España) y el butaprost se compró en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Ambos agonistas EP2 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El cromoglicato de sodio (SCG) y el antagonista EP1/EP2 AH6809 se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y se disolvieron en agua miliQ y etanol de Panreac Applichem (Barcelona, España) respectivamente.

◆ Animales de experimentación

La mayoría de los experimentos descritos en el siguiente apartado se han realizado con ratones hembras de la cepa BALB/c (Charles River Laboratories, Calco, Italia) de 8 semanas de edad al inicio del estudio. En un experimento se utilizaron ratones EP2 *knock out* (KO EP2) entre 8-16 semanas de edad al inicio del estudio y sus hermanos de camada (*litter-mate*, WT) (cepa *background* C57BL/6) que se criaron en el Estabulario Central de la Universitat Autònoma de Barcelona a partir de dos pares de progenitores de Jackson Laboratories (ref. B6.129-PTGER2 tmBrey/J), (BarHarbor, ME, Estados Unidos). Período de aclimatación durante una semana en racs ventilados de PANLAB (Barcelona, España) con un máximo de 6 animales por jaula.

Las condiciones ambientales de estabulación, el control diario de los ratones y la legislación vigente aplicada para la protección de los animales utilizados en experimentación se han descrito en el apartado 2.1.1.

◆ Sensibilización a ácaros del polvo

Antes de la sensibilización de los ratones con ácaros del polvo, el animal debía estar correctamente anestesiado para evitar su movimiento cuando se le administraba el alérgeno (muy importante para asegurar que llegara a las vías respiratorias inferiores), y de esta forma lo respirara con normalidad. Por ello se anestesiaron los ratones a 2.5% de isoflurano y a 2% de

oxígeno hasta que se durmieron (máximo 2 minutos) (ver anexo 2.7). Posteriormente, para el mantenimiento se reguló el isoflurano al 2% y se empezaron las administraciones.

A continuación, los ratones se expusieron a un extracto purificado de HDM con un contenido bajo de polisacárido (LPS) (<0.5 EU/dosis, utilizando el *Endosafe Limulus Amebocyte Assay*, Charles River Laboratories, Wilmington, USA). El alérgeno se administró por vía intranasal (i.n.) (ver anexo 2.1) en una dosis de 25µg/ratón/día en un volumen de 35µl durante 10 días consecutivos (día 0 al día 9) (Cates et al., 2004) (Figuras 9, 10 y 11). Los grupos experimentales no sensibilizados fueron expuestos a las mismas condiciones de anestesia pero por vía i.n. recibieron 35µl de SF.

◆ Tratamientos con agonistas o antagonistas EP2

En ratones de la cepa BALB/c se realizaron dos experimentos; *a*) agonista EP2 (CP-533536), *b*) antagonista del receptor EP2 (AH6809). Para el último experimento se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6, *wild type* (WT EP2) y *knock out* EP2 (KO EP2) *c*) tratados con otro agonista EP2 (butaprost).

A continuación se describen los grupos y los tratamientos utilizados para cada uno de los experimentos.

a) Efecto del agonista CP-533536 en las vías aéreas

➤ Grupos experimentales

40 ratones hembra de la cepa BALB/c se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes 5 grupos experimentales (n=8):

Grupo 1: Ratones no sensibilizados (SF) y tratados con el vehículo (SF)

Grupo 2: Ratones sensibilizados con HDM y tratados con el vehículo (SF)

Grupo 3: Ratones no sensibilizados (SF) y tratados con CP-533536 (3mg/kg)

Grupo 4: Ratones sensibilizados con HDM y tratados con CP-533536 (0.3mg/kg)

Grupo 5: Ratones sensibilizados con HDM y tratados con CP-533536 (3mg/kg)

➤ Tratamiento con el agonista EP2 CP-533536

Antes del tratamiento de los ratones con CP-533536 el animal debía estar correctamente anestesiado para evitar su movimiento cuando se le administrara el compuesto y lo respirara con normalidad. Por ello, se anestesiaron mediante el protocolo descrito en el apartado 2.2.1.

La solución de CP-533536 se preparó diariamente en SF a partir de una solución stock 25mg/ml disuelta en 0.1% de DMSO almacenado a -20°C. El CP-533536 se administró por vía intranasal (ver anexo 2.1) en dos dosis, 0.3mg/kg y 3mg/kg, en un volumen de 35µl durante 6 días consecutivos (-1 al 4) 1 hora antes de la sensibilización con HDM (Figura 9). Este procedimiento se realizó a los grupos 3, 4 y 5. Los grupos 1 y 2 fueron expuestos a las mismas condiciones de anestesia pero por vía intranasal recibieron 35µl de DMSO 0.1% disuelto en SF 1 hora antes de la sensibilización con HDM, empezando un día antes de la sensibilización a HDM (día -1) hasta día 4.

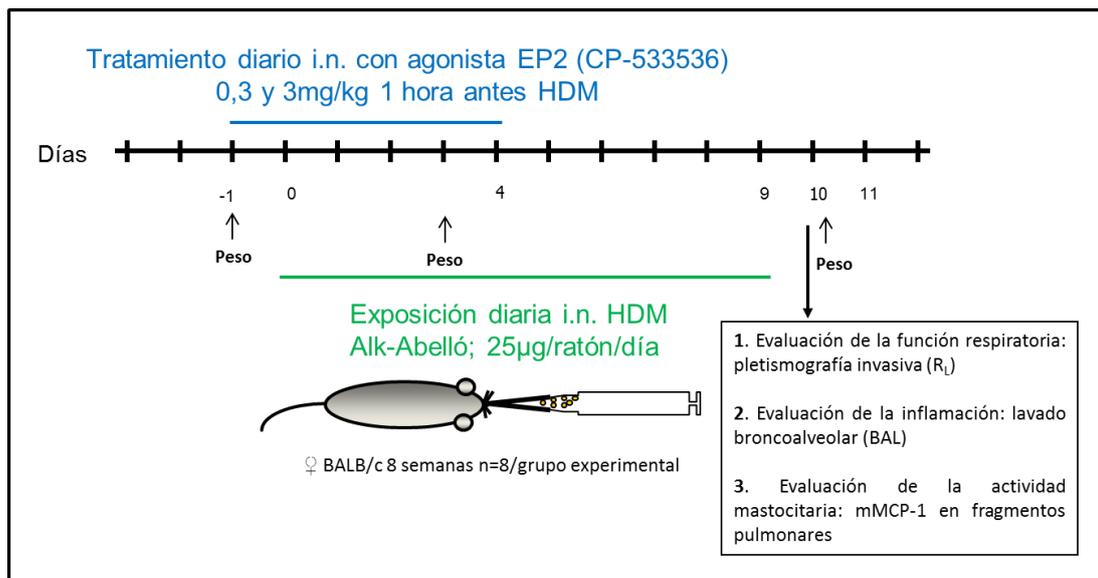


Figura 9. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto del agonista EP2, CP-533536, en las vías aéreas. BAL (lavado broncoalveolar), BALB/c (cepa de ratón albino), HDM (ácaros del polvo), i.n. (intranasal), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), CP-533536 (agonista del receptor prostanoide 2), R_L (resistencia pulmonar).

b) Efecto del antagonista EP1/EP2 AH6809 y del cromoglicato de sodio (SCG) en las vías aéreas

➤ Grupos experimentales

40 ratones hembra de la cepa BABL/c se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes 5 grupos experimentales (n=8):

Grupo 1: Ratones no sensibilizados (SF) y tratados con el vehículo (SF)

Grupo 2: Ratones sensibilizados con HDM y tratados con el vehículo (SF)

Grupo 3: Ratones sensibilizados con HDM y tratados con AH6809 (2.5mg/kg)

Grupo 4: Ratones sensibilizados con HDM y tratados con SCG (25mg/kg)

Grupo 5: Ratones sensibilizados con HDM y tratados con AH6809 (2.5mg/kg) y con SCG (25mg/kg)

➤ Tratamiento con el antagonista EP1/EP2 AH6809

La solución de AH6809 se preparó diariamente en SF a partir de una solución stock 2.5mg/ml disuelta en 20% de etanol (EtOH). El AH6809 se administró por vía intravenosa (ver anexo 2.2) en una dosis de 2.5mg/kg en un volumen de 100µl durante 10 días consecutivos (0 al 9) 1 hora antes de la sensibilización con HDM. Este procedimiento se realizó a los grupos 3 y 5 (Figura 10). Los grupos 1, 2 y 4 recibieron 100µl del vehículo (EtOH) 20% disuelto en SF 1 hora antes de la sensibilización con HDM durante 10 días consecutivos (0 al 9).

➤ Tratamiento con el SCG

La solución de SCG se preparó diariamente en SF a partir de una solución stock 50mg/ml disuelta en 10% de H₂O miliQ. El SCG se administró por vía intraperitoneal (ver anexo 2.3) en una dosis de 25mg/kg en un volumen de 100µl durante 10 días consecutivos (0 al 9) 1 hora antes de la administración de AH6809 y 2 horas antes de la sensibilización con HDM. Este procedimiento se realizó a los grupos 4 y 5 (Figura 10). Los grupos 1, 2 y 3 recibieron 100µl del vehículo, 10%H₂O miliQ disuelto en SF, 1 hora antes de la administración de AH6809 y 2 horas antes de la sensibilización con HDM durante 10 días consecutivos (0 al 9).

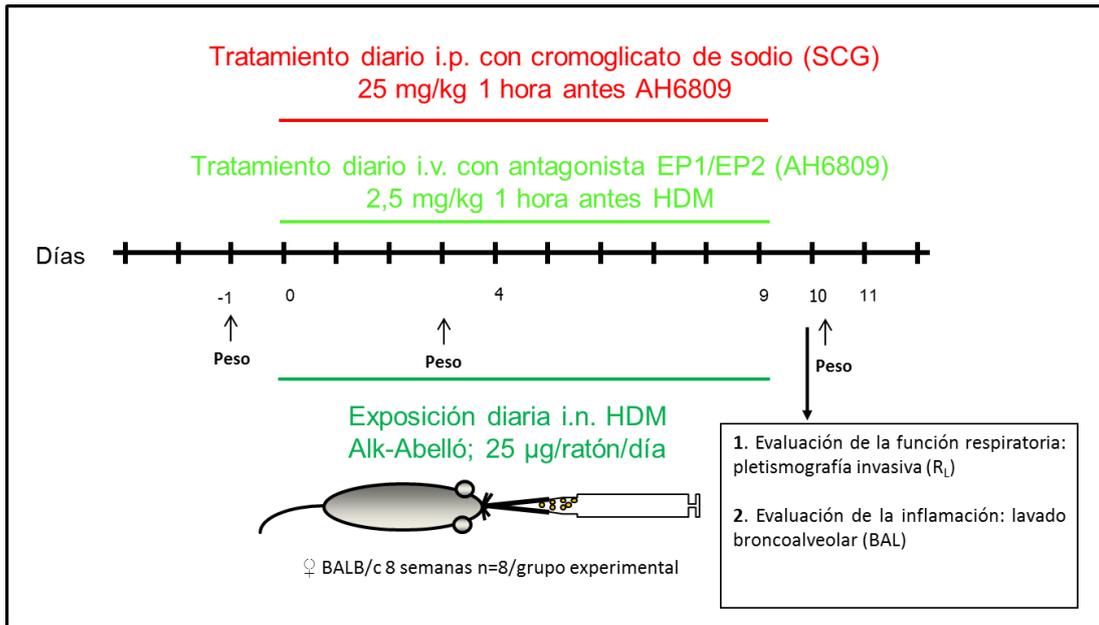


Figura 10. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto del antagonista EP1/EP2 (AH6809) y el cromoglicato de sodio (SCG) en las vías aéreas. AH6809 (antagonista EP1/EP2), BAL (lavado broncoalveolar), BALB/c (cepa de ratón albino), HDM (ácaros del polvo), i.p. (intraperitoneal), i.v. (intravenosa), R_L (resistencia pulmonar), SCG (cromoglicato de sodio).

c) Efecto del agonismo EP2 en las vías aéreas de ratones KO EP2

➤ Grupos experimentales

18 ratones KO EP2 y 18 ratones WT EP2 de la cepa C57BL/6 se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes 6 grupos experimentales (n=6):

- Grupo 1:** Ratones WT EP2 no sensibilizados (SF) y tratados con el vehículo (SF)
- Grupo 2:** Ratones WT EP2 sensibilizados con HDM y tratados con el vehículo (SF)
- Grupo 3:** Ratones WT EP2 sensibilizados con HDM y tratados con butaprost (0.3 mg/kg)
- Grupo 4:** Ratones EP2 KO no sensibilizados (SF) y tratados con el vehículo (SF)
- Grupo 5:** Ratones EP2 KO sensibilizados con HDM y tratados con el vehículo (SF)
- Grupo 6:** Ratones EP2 KO sensibilizados con HDM y tratados con butaprost (0.3 mg/kg)

➤ Tratamiento con el agonista EP2 Butaprost

Antes del tratamiento de los ratones con butaprost el animal debía estar correctamente anestesiado para evitar su movimiento cuando se le administrara el alérgeno y lo respirara con normalidad. Por ello, se anestesiaron mediante el protocolo descrito en el apartado 2.2.1.

La solución de butaprost se preparó diariamente en SF a partir de una solución stock 25mg/ml disuelta en 0.1% de DMSO. El butaprost se administró por vía intranasal (ver anexo 2.1) en una dosis de 0.3mg/kg en un volumen de 35µl durante 6 días consecutivos (-1 al 4) 1 hora antes de la sensibilización con HDM. Este procedimiento se realizó a los grupos 3 y 6 (Figura 11). Los grupos 1, 2, 4 y 5 fueron expuestos a las mismas condiciones de anestesia pero por vía intranasal recibieron 35µl de DMSO 0.1% disuelto en SF 1 hora antes de la sensibilización con HDM, empezando un día antes de la sensibilización a HDM (día -1) hasta día 4.

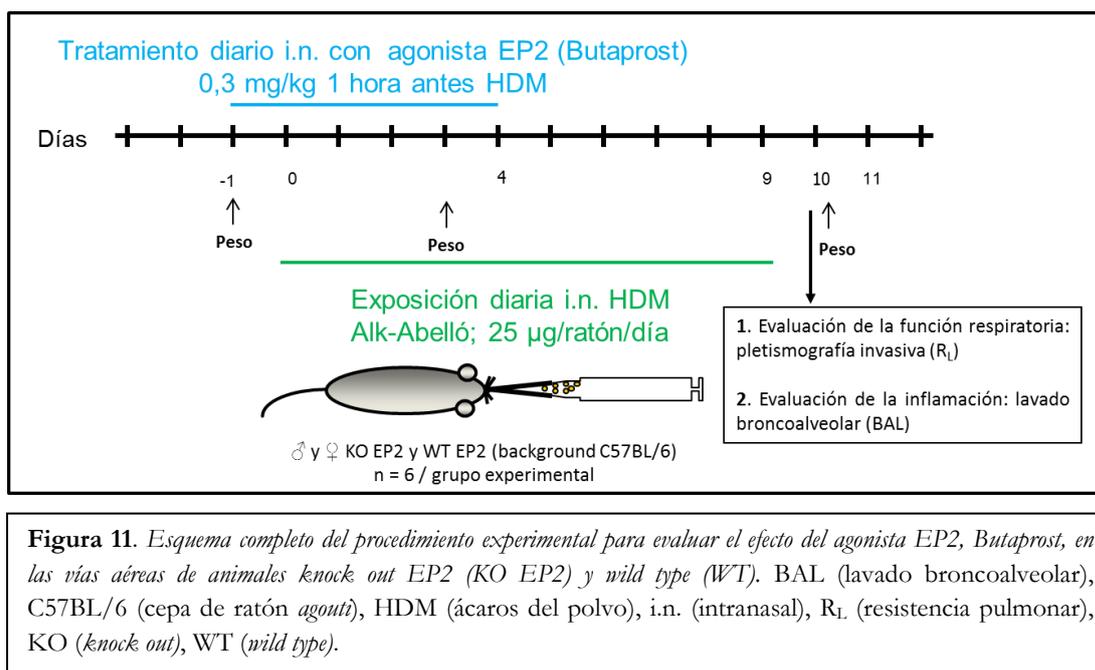


Figura 11. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto del agonista EP2, Butaprost, en las vías aéreas de animales *knock out* EP2 (KO EP2) y *wild type* (WT). BAL (lavado broncoalveolar), C57BL/6 (cepa de ratón *agouti*), HDM (ácaros del polvo), i.n. (intranasal), R_L (resistencia pulmonar), KO (*knock out*), WT (*wild type*).

2.2.2. Valoración del efecto de la sensibilización y de los tratamientos en la función respiratoria

A continuación se detallan los métodos utilizados para valorar los parámetros representativos de la función respiratoria de las vías aéreas, así como la inflamación broncovascular y la actividad mastocitaria.

◆ Reactivos y fármacos

Todos los fármacos y productos químicos utilizados para evaluar la respuesta asmática tenían la pureza y pH adecuados para los análisis *in vivo* y *ex vivo*. La metacolina y el tampón fosfato para disolverla (PBS) provenían de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La anestesia se preparó mezclando Ketamina de Imalgene (Merial, Lion, Francia) y Xilacina de Laboratorios Calier

(Barcelona, España) con suero fisiológico de B. Braun (Melsungen, Alemania). Para el lavado broncoalveolar se utilizó suero fetal bovino de Biowest (Nuaille, Francia) diluido en tampón fosfato (PBS).

Para la solución de Turk, el cristal violeta provenía de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y el ácido acético de Panreac Applichem (Barcelona, España). Las células inflamatorias del BAL se tiñeron con *Diff-Quick* que se compró en Siemens Healthcare (Erlangen, Alemania). El tampón de lisis con inhibidores de las proteasas (*Mini Complete Tablet*) de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) se mezcló con tampón HEPES de Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), con Tritón X-100 y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) disuelto con isopropanol de Panreac Applichem (Barcelona, España). Para la determinación de proteína total el *Lowry*, el *Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent Working Solution* y la *Protein Standard Solution* se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

◆ Valoración del peso y del estado general de los ratones

Se registró el peso de los ratones mediante 3 medidas por animal a lo largo del procedimiento experimental: un día antes de la primera sensibilización con HDM (o vehículo) (día -1), el día 3 coincidiendo con las sensibilizaciones y/o tratamientos, y 24 horas después de la última sensibilización (día 10), es decir, antes de la evaluación de la función pulmonar y la recogida de muestras.

Para controlar el bienestar de los animales, los síntomas clínicos asociados al proceso respiratorio y las posibles reacciones adversas atribuibles al tratamiento con los fármacos se evaluó, diariamente, el estado general de los ratones mediante un protocolo estandarizado y aprobado por el Comité de Ética de los Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Barcelona (España) que incluye una evaluación del comportamiento, síntomas de sufrimiento, aspecto del pelaje, secreciones, disnea, postura, etc.

◆ Evaluación de la hiperreactividad bronquial (AHR)

24 horas después de la última exposición al alérgeno (HDM) o al vehículo (SF) se evaluó la reactividad de las vías aéreas a concentraciones crecientes de metacolina (PBS, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20mg/ml). La resistencia pulmonar se determinó mediante un sistema de pletismografía invasiva de Buxco FinePointe (Buxco Europe LTd, Winchester, Reino Unido) en ratones

anestesiados por vía intraperitoneal con una combinación de Ketamina a una dosis de 100mg/kg y de Xilacina a una dosis de 10mg/kg. Este método consiste en intubar al animal con una cánula intratraqueal (ver anexo 3.1), con el fin de medir directamente, mediante el pletismógrafo, la resistencia broncopulmonar al paso del aire. La tráquea del ratón se canuló con una aguja de calibre 18 y los ratones fueron ventilados durante todo el procedimiento (volumen tidal: 12.5ml/kg; frecuencia: 120 respiraciones/min; presión positiva: 2.5-3.0cmH₂O) (ver anexo 3.2). Después de 1 min de nebulización intratraqueal de la metacolina (agonista colinérgico de los receptores muscarínicos, con efecto broncoconstrictor) se registraron los cambios en la resistencia pulmonar (cmH₂O·s/ml) desde el valor basal. El proceso tiene una duración aproximada de 50 minutos. Se trata de una técnica muy reproducible, que requiere de un número menor de animales que con una técnica de pletismografía no invasiva.

◆ Evaluación de la inflamación broncovascular

Después de la medición de la AHR con pletismografía invasiva los animales tratados y no tratados se sacrificaron mediante exsanguinación vía punción intracardiaca (ver anexo 3.3). Una vez sacrificados los ratones, se realizó el lavado broncoalveolar (BAL) inyectando lentamente 0.3ml de PBS + 2% SFB dos veces, y recuperándolo mediante una aspiración ligera (ver anexo 3.4). Se recogió un volumen de entre 350 y 550µl por aspiración. Para medir la intensidad del proceso inflamatorio, el BAL se tiñó con solución de Turk (0.01% de cristal violeta en 1% de ácido acético) y se realizó un conteo de células inflamatorias totales en la cámara de *Neubauer*. El *pellet* se resuspendió con PBS+2% de SFB de forma que la concentración final fue de 800.000 células en 1 ml. A continuación se obtuvieron muestras de las células inflamatorias de cada animal mediante una citocentrífuga (Shandon Cytospin, Thermo Electro Corporation, Cheshire, Reino Unido) y se realizó una tinción específica con *Diff-Quick* (ver anexo 4). Finalmente, se realizó un recuento diferencial de las poblaciones de células inflamatorias en las muestras contando 300 células por animal. Luego se determinó el porcentaje y el nombre relativo de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos en cada muestra. Por ejemplo, para los eosinófilos:

$$\% \text{ de eosinófilos} = \frac{\text{recuento de eosinófilos}}{\text{recuento total de células inflamatorias de la muestra } (\sim 300)} \times 100$$

$$\text{eosinófilos/ml} = \frac{\% \text{ de eosinófilos}}{\text{concentración celular total de la muestra (células/ml)}}$$

◆ Evaluación de la actividad mastocitaria

Con la finalidad de evaluar la cantidad de la proteasa específica de mastocitos de ratón mMCP-1 primero se realizó una extracción de proteína directamente del pulmón congelado del animal. Se cuantificó la cantidad de proteína total y se analizó la actividad mastocitaria con el ensayo de inmunoabsorción enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA).

➤ **Extracción de proteína total**

Para evaluar la actividad mastocitaria se obtuvo el lóbulo derecho del pulmón (ver anexo 3.5) congelado a -80°C . Se utilizó un tampón de lisis que contenía inhibidores de las proteasas (*Mini Complete Tablet*) para extraer la proteína total. Se añadieron 250 μl de tampón de lisis (Tabla 7) a las muestras de tejido y se homogenizaron las soluciones con el politrón (*dispersing tool, DRIVE T8 12-18V, power supply unit 230V 50/60 Hz, IKA®-WERKE GmbH & Co, Staufen, Alemania*) durante 30-45 segundos en hielo. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 20 minutos. A continuación, el homogenado se centrifugó a 14000rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogieron los sobrenadantes con el extracto proteico en un nuevo tubo, eliminando el *pellet* con las restas celulares. El sobrenadante se mantuvo congelado a -80°C hasta el momento de analizar la concentración proteica.

Tabla 7. *Tampón de lisis HEPES para la extracción de proteínas* (estabilidad 24 horas). HEPES (4- [2-hidroxietil] -1-piperazinetanosulfónico), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo).

Producto	Cantidad
Mini Complete Tablet	1 comprimido
Tampón HEPES 1M	1ml
Tritón X-100	10 μl
PMSF 100mM disuelto en isopropanol	125 μl
Agua destilada	19ml

➤ **Determinación de la concentración de proteína total**

Para cargar la misma cantidad de proteína en el ELISA posterior, la concentración de proteína presente se cuantificó utilizando el método de *Lowry*. Esta técnica permite medir la concentración de proteína total presente en la muestra utilizando concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Las concentraciones de la curva estándar se prepararon diluyendo *Protein Standard Solution* en agua destilada hasta obtener un volumen final de 250µl. A partir de la concentración máxima de 400µg/ml se hicieron diluciones seriadas hasta obtener una concentración mínima de 50µg/ml. El blanco se preparó con 250µl de agua destilada. Las muestras se analizaron en una dilución $1/200$ en agua destilada.

Primero se añadió el reactivo *Lowry*, se mezclaron las muestras durante 30 segundos por el vórtex y se dejaron incubar durante 20 minutos. A continuación, se añadió el reactivo *Folin & Ciocaltean's Phenol Reagent Working Solution*, se mezclaron las muestras durante 30 segundos por el vórtex nuevamente y se incubaron durante 30 minutos, tiempo necesario para la reacción colorimétrica. El contenido de cada tubo se transfirió a una placa de lectura de 96 pocillos (Thermo Fisher NUNC, Waltham, MA, USA) y todas las muestras se analizaron por duplicado. La absorbancia se determinó a 620nm por espectrofotometría utilizando el lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF, ThermoLabsystems, Beverly, MA, USA).

➤ **Ensayo específico de mMCP-1 de ratón**

Se recuperaron los sobrenadantes para analizar los niveles de la proteasa 1 específica de los mastocitos en el ratón (*mouse mast cell protease 1*, mMCP-1) utilizando un ensayo específico (*Mouse MCPT-1, mMCP-1, ELISA Ready-SET-Go*, BD ebioscience, San José, CA, USA). Los resultados se normalizaron por la concentración de proteína total en cada una de las muestras analizadas.

$$\text{pg de mMCP} - 1 / \mu\text{g de proteína total} = \frac{\text{concentración de mMCP} - 1 (\text{pg/ml})}{\text{concentración de proteína total } (\mu\text{g/ml})}$$

2.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante la prueba T-Student con el Sigma-Plot versión 10.0 (Systat Software Inc., San José, CA, USA) y el test de ANOVA con el Prism versión 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Las diferencias observadas en los ensayos funcionales de los cultivos celulares, respecto a la degranulación mastocitaria de β -hexosaminidasa, y también entre los grupos experimentales *in*

in vivo, en el recuento diferencial, en la inflamación pulmonar total y en la concentración de mMCP-1 (actividad mastocitaria) se compararon con la T-Student (*2-tailed Student's t test*). Para los parámetros mecánicos de hiperreactividad bronquial se realizaron las pruebas ANOVA de dos factores con la corrección posterior de la prueba de Bonferroni (test *Post Hoc* de comparaciones múltiples). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

Las representaciones gráficas de los resultados, tanto en formato curva como en diagrama de barras incluidas en la sección de resultados, recogen la media y el error estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM) de todos los valores obtenidos.

3. RESULTADOS COMENTADOS

3.1. Efecto de la activación del receptor EP2 mastocitario

3.1.1. Comparación del efecto de agonistas del receptor EP2 en poblaciones mastocitarias heterogéneas (fenotípicamente diversas)

Se evaluó el efecto de una estimulación selectiva (butaprost) y no selectiva (PGE2) del receptor EP2 en diversas poblaciones mastocitarias de ratón.

a) Efecto del agonista EP2 butaprost y de la PGE2 en cultivos de mastocitos primarios de ratón

Se utilizaron cultivos primarios peritoneales y pulmonares de mastocitos de ratón (cepa BALB/c) para evaluar la capacidad inhibitoria de agonistas selectivos y no selectivos del receptor EP2 mastocitario.

En la figura 12 se representa el efecto de la activación del receptor EP2 utilizando concentraciones crecientes de butaprost (Buta) en células peritoneales de ratón (*peritoneum-derived mast cells*, PDMC). La sensibilización mediada por la inmunoglobulina E y su antígeno específico DNP induce una liberación del 64.5% de β -hexosaminidasa. Tras la activación selectiva del receptor EP2 se reduce la degranulación mastocitaria inducida por Fc ϵ RI de manera concentración-dependiente alcanzando una inhibición de >65% con una dosis de 10^{-5} M de butaprost.

Las figuras 13 y 14 muestran la comparación entre el efecto de una activación por parte de butaprost y de PGE2 en la degranulación inmunológica de cultivos primarios peritoneales (PDMC) y pulmonares (*lung mast cells*, LMC) de ratón. En la figura 13 se compara el efecto del butaprost y de la PGE2 en PDMC tras la activación con dos concentraciones de DNP-HSA (25ng/ml y 50ng/ml). El % de degranulación mastocitaria tras la sensibilización con IgE y el antígeno es de ~40%. Al compararlo con la liberación de β -hexosaminidasa en la curva concentración-respuesta (Figura 12) se observa que el mantenimiento semanal de las PDMC afecta a los % de activación celular disminuyéndolos con el tiempo. El agonismo EP2 (10^{-5} M) inhibió la liberación de β -hexosaminidasa en un 25.15% con 50ng/ml de DNP-HSA en comparación a un 3.75% con 25ng/ml.

Además con el fin de trabajar con mastocitos pulmonares (LMC) de ratón se desarrolló la técnica de aislamiento y estimulación mastocitaria con los factores específicos de crecimiento, SCF y IL-3. El cultivo se monitorizó semanalmente mediante un recuento de células total,

porcentajes de viabilidad y pureza de mastocitos (Tabla 8), y a partir de la tercera semana las células ya se pudieron utilizar para ensayos funcionales. En cultivos primarios pulmonares de ratón (LMC) el butaprost inhibió hasta en un 40.60% la degranulación mastocitaria (Figura 14).

La incubación con PGE2 desencadenó la degranulación en ambos cultivos mastocitarios. En las PDMC causó un aumento de ~15% y en LMC de ~10%. Por lo tanto, el receptor EP2 es el responsable de la inhibición de la degranulación mastocitaria en las poblaciones mastocitarias de ratón evaluadas.

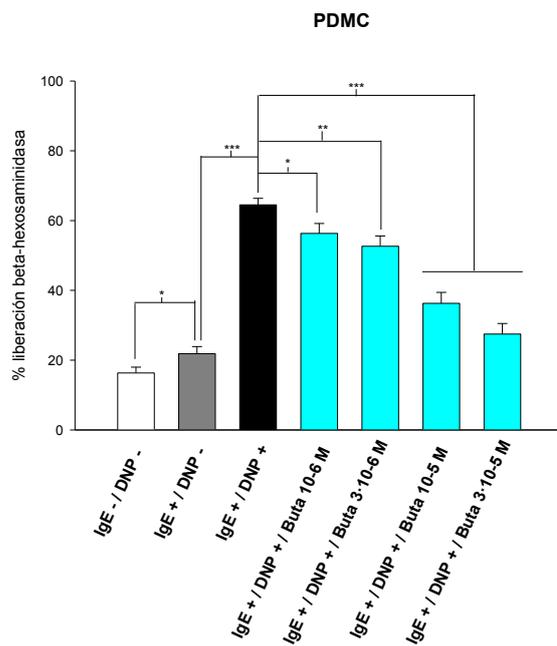


Figura 12. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratón. Se observa el efecto de concentraciones crecientes de butaprost, pre-incubadas durante 30 minutos, en la liberación de β-hexosaminidasa. Los resultados representan 4 experimentos hechos por triplicado. Se expresa la media ± SEM. (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). Buta (butaprost), DNP (dinitrofenol), IgE (inmunoglobulina E), PDMC (mastocitos peritoneales de ratón), SEM (error estándar de la media).

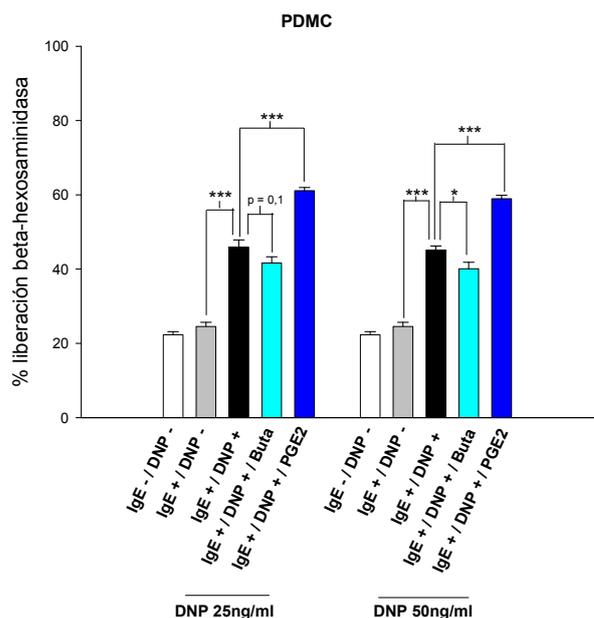


Figura 13. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratón. Se observa el efecto del butaprost y de la PGE2 pre-incubados durante 30 minutos en la liberación de β-hexosaminidasa. Los resultados representan 3 experimentos hechos por triplicado y 3 experimentos hechos por cuadruplicado. Se expresa la media ± SEM. (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). Buta (butaprost), DNP (dinitrofenol), IgE (inmunoglobulina E), PDMC (mastocitos peritoneales de ratón), PGE2 (prostaglandina E2), SEM (error estándar de la media).

Tabla 8. La tabla resume el recuento de células total, el recuento de mastocitos, porcentaje de viabilidad y porcentaje de pureza en cultivos primarios de mastocitos pulmonares (LMC). Una vez por semana a partir de la tercera semana de cultivo con SCF y IL-3 se realiza un recuento de células total (azul de tripano) y de mastocitos (kimura) con la cámara de Neubauer. Cálculos de los porcentajes de viabilidad y de pureza de mastocitos. Se expresa la media \pm SEM (n=6). IL-3 (interleucina 3), LMC (mastocitos pulmonares de ratón), SCF (factor de células madre), SEM (error estándar de la media).

	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
Recuento de células total	3.20E+06 (\pm 3.60E+05)	4.85E+06 (\pm 6.11E+05)	5.20E+06 (\pm 3.62E+05)	4.25E+06 (\pm 4.9E+05)
% Viabilidad	90.66 (\pm 1.46)	86.7 (\pm 2.74)	70.66 (\pm 2.36)	66.3 (\pm 5.09)
Recuento de Mastocitos	2.80E+06 (\pm 3.46E+05)	3.63E+06 (\pm 5.31E+05)	4.28E+06 (\pm 2.76E+05)	3.52E+06 (\pm 3.40E+05)
% Pureza	87.08 (\pm 2.83)	73.93 (\pm 2.71)	82.6 (\pm 1.63)	81.6 (\pm 4.56)

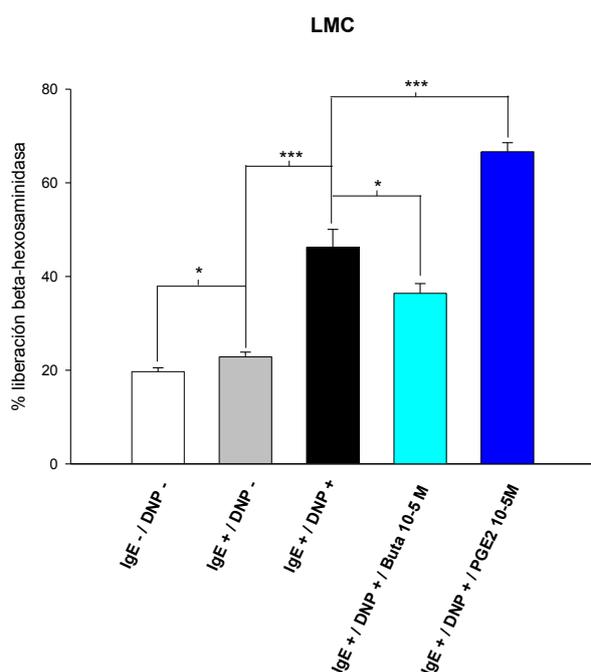


Figura 14. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por Fc ϵ RI en cultivos primarios de mastocitos pulmonares (LMC) de ratón. En la figura se observa el efecto del butaprost y la PGE2 pre-incubados durante 30 minutos en la liberación de β -hexosaminidasa. Los resultados representan 2 experimentos hechos por triplicado. Se expresa la media \pm SEM. (*Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). Buta (butaprost), DNP (dinitrofenol), IgE (inmunoglobulina E), LMC (mastocitos pulmonares de ratón), PGE2 (prostaglandina E2), SEM (error estándar de la media).

El estudio de concentración-respuesta con butaprost (agonista selectivo EP2) en PDMC permitió por un lado atribuir al efecto EP2 la inhibición observada, y por otro seleccionar una concentración inhibitoria eficaz para posteriores estudios. En mastocitos peritoneales y pulmonares maduros (fenotípicamente distintos), se observó que la acción selectiva sobre EP2 inhibía la actividad sensiblemente en ambas poblaciones, fenómeno no observado con PGE2.

Probablemente la acción simultánea de PGE2 sobre otros receptores EP (fundamentalmente EP3) explica que incluso produjera un efecto activador mastocitario. Otros grupos de investigación han descrito que una estimulación de los receptores prostanoides EP por PGE2 aumenta la degranulación mastocitaria mediada por el receptor FcεRI a través del receptor EP3 (Feng et al., 2006). Las poblaciones pulmonares y peritoneales de mastocitos de ratón expresan por lo tanto receptores EP2 funcionales y estos ejercen una función de bloqueo, tal y como se ha visto en las poblaciones mastocitarias pulmonares humanas donde la actividad y la migración de HuMC disminuye (Duffy et al., 2008; Kay et al., 2006).

b) Efecto del agonista EP2 butaprost y de la PGE2 en la línea celular de mastocitos de ratón C57.1

Se determinó el efecto de agonistas selectivos y no selectivos del receptor EP2 en la línea celular de mastocitos de ratón CLM/C57.1 (C57).

Se realizaron varias pruebas para determinar las concentraciones óptimas de IgE, DNP, butaprost y PGE2 sobre la degranulación mastocitaria en las células C57. En la figura 15 se compara el efecto del butaprost y de la PGE2, pre-incubados durante 15 (Figura 15A) o 30 minutos (Figura 15B), en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI tras una activación inmunológica mediada con IgE-DNP y 25ng/ml o 50ng/ml de antígeno específico, DNP-HSA. La IgE-DNP induce una liberación de β-hexosaminidasa basal de ~45%. La incubación con 25ng/ml y 50ng/ml de DNP-BSA durante 15 (Figura 15A) o 30 minutos (Figura 15B) aumenta los % de liberación >65% en todas las condiciones experimentales.

Asimismo se confirmó de nuevo el efecto inhibitorio del receptor EP2 en la degranulación mastocitaria. El butaprost inhibió entre un 15 y un 45% la liberación de β-hexosaminidasa dependiendo de las condiciones experimentales evaluadas, en referencia a los tiempos de pre-incubación y a las concentraciones de antígeno. Sin embargo, la PGE2 disminuyó la degranulación entre un 3 y un 22% en las células C57, contrariamente a lo observado en PDMC (Figura 13) y LMC (Figura 14). Se alcanza por lo tanto una mayor inhibición por parte del butaprost, 43.24%, pre-incubado durante 30 minutos y con 50ng/ml de DNP-HSA, que con PGE2 que inhibe un 22.35% (Figura 15B).

Por consiguiente, nuestros resultados en las C57 indican que la activación selectiva del receptor EP2 puede mediar la respuesta inhibitoria sobre los mastocitos y la PGE2 también reprime, pero en menor cantidad, la degranulación.

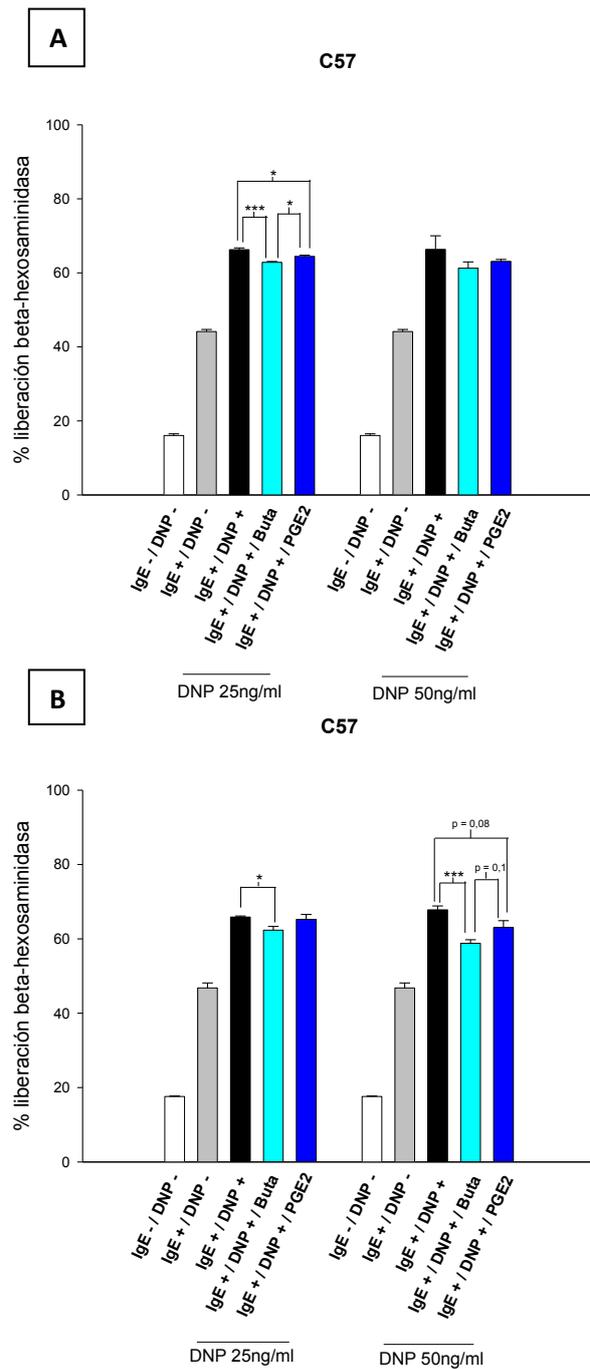


Figura 15. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en la línea celular de mastocitos de ratón C57. Se observa el efecto del butaprost y de la PGE2 preincubados durante 15 minutos (A) o 30 minutos (B) en la liberación de β-hexosaminidasa. Los resultados representan 2 experimentos hechos por triplicado. Se expresa la media±SEM. (*Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). Buta (butaprost), C57 (línea celular de mastocitos de ratón C1.MC/C57.1), DNP (dinitrofenol), IgE (inmunoglobulina E), PGE2 (prostaglandina E2), SEM (error estándar de la media).

En el siguiente estudio primero se puso a punto la técnica de degranulación en una línea celular de mastocitos de ratón, C57, utilizando dos concentraciones de antígeno y de butaprost. Por lo que respecta a los porcentajes de liberación mastocitaria, la PGE2 disminuye la liberación de β -hexosaminidasa, contrariamente a lo observado en las PDMC y LMC. Probablemente debido al efecto que ejerce la PGE2 sobre el receptor EP2, ya que la expresión de EP2 es mayor en las C57 que en otras poblaciones mastocitarias como las HuMC (Serra-Pagès et al., 2012). Otros autores utilizando cultivos de mastocitos humanos, han observado que la unión de la PGE2 induce un aumento de ciertos mediadores mastocitarios, como la PGD2 y el TNF, disminuye la expresión de la COX (Feng et al., 2006) y también reduce la actividad y la migración de HuMC (Duffy et al., 2008; Kay et al., 2006). Por lo que respecta a la activación selectiva del receptor EP2 con el agonista butaprost, la degranulación mastocitaria también se inhibe en la línea celular evaluada coincidiendo con otros estudios *in vitro* de nuestro grupo de investigación (Serra-Pagès et al., 2012). Esto consolida la hipótesis del efecto inhibitorio sobre los mastocitos de la activación EP2 y refuerza su potencial interés terapéutico.

e) Efecto del butaprost y del CP-533536 en la línea celular de mastocitos humana LAD2

En la línea celular LAD2 también se evaluó el efecto de una estimulación selectiva del receptor EP2. Con relación a los resultados obtenidos con butaprost en poblaciones mastocitarias de ratón (Figuras 12, 13, 14 y 15), en la figura 16 se representa el efecto de los dos agonistas EP2 CP-533536 y butaprost, sobre la degranulación mastocitaria en la línea celular de mastocitos humana, LAD2.

Tras la estimulación inmunológica mediada por IgE-SA la liberación de β -hexosaminidasa se inhibió de manera concentración-dependiente al incubar las células LAD2 con CP-533536 (Figura 16A) y con butaprost (Figura 16B). CP-533536 no inhibió >10% la actividad mastocitaria hasta 10^{-4} M, mientras que butaprost inhibió un 10.7% con una concentración de 10^{-5} M. Comparando una de las concentraciones más elevadas, 10^{-4} M, el butaprost ejerció más de un doble de inhibición que el CP-533536 (36% versus 16.5%), y con la de $3 \cdot 10^{-4}$ M más de un 10% (50.8% versus 37.2%). Por lo tanto, se podría concluir a la luz de estos datos que butaprost ejerce un efecto más potente sobre la actividad mastocitaria en LAD2.

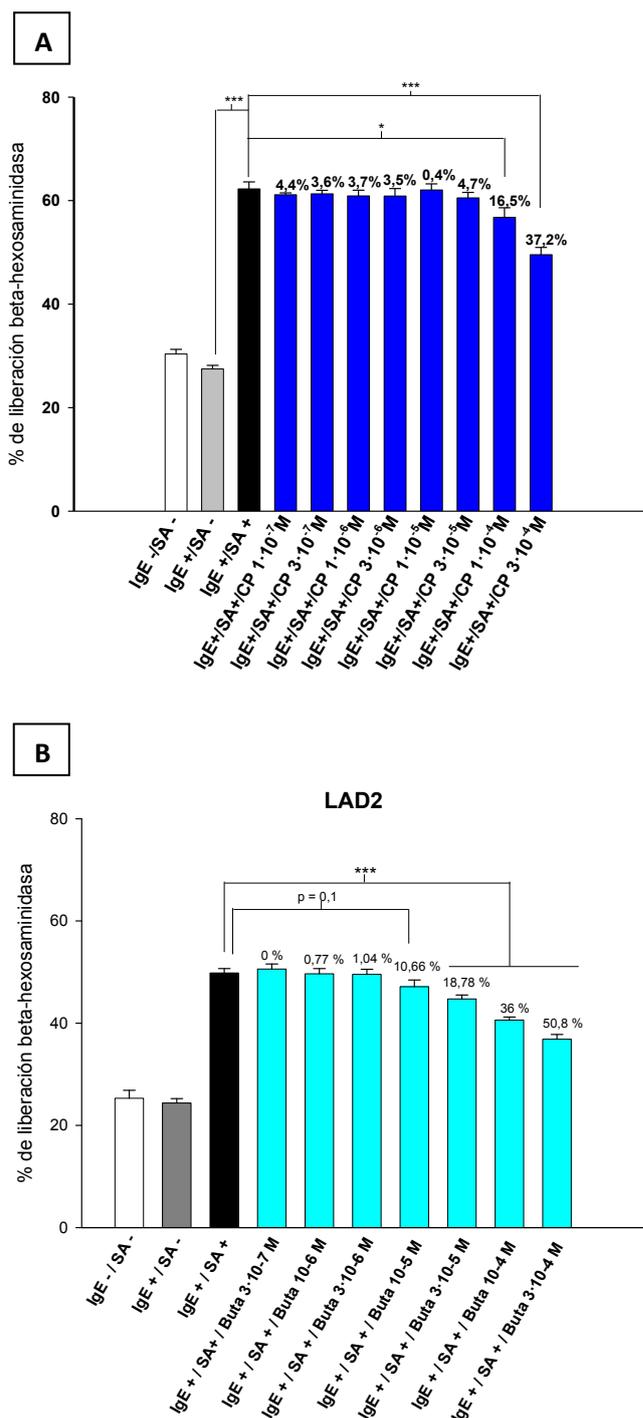


Figura 16. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) CP-533536 y del (B) butaprost en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en la línea celular humana de mastocitos LAD2. Se observa el efecto de concentraciones crecientes de CP-533536 y butaprost, pre-incubadas durante 2 horas, en la liberación de β-hexosaminidasa. Los % de inhibición del CP-533536 y del butaprost se especifican en las columnas pertinentes. Los resultados representan 2 experimentos hechos por cuadruplicado. Se expresa la media±SEM. (*Pvalor<0.05; ***Pvalor<0.001). Buta (butaprost), CP (CP-533536), IgE (inmunoglobulina E), LAD2 (línea leucémica de mastocitos humana), SA (estreptavidina), SEM (error estándar de la media).

En la línea de mastocitos humana LAD2 hemos comparado el efecto inhibitorio de dos agonistas selectivos EP2 de naturaleza químicamente distinta (Figura 8). En ambos hemos observado que es necesaria una elevada concentración para inducir una inhibición mayor al 10%, probablemente debido a que en esta población celular la expresión de receptor EP2 es menor en comparación con otros receptores como EP3 (Serra-Pagès et al., 2012), por ello, el efecto inhibitorio solamente se observa a concentraciones altas. Comparando los dos agonistas selectivos EP2 se observa que el butaprost parece tener mayor potencia, pero el hecho de que en ambos casos se observe una reducción de la actividad mastocitaria refuerza el más que probable efecto inhibitorio atribuible específicamente al agonismo EP2.

La coincidencia de los resultados observados mediante la utilización de dos agonistas en poblaciones mastocitarias humanas y del butaprost en cultivos de ratón fenotípicamente dispares, parece demostrar fehacientemente el efecto inhibitorio sobre los mastocitos de la activación del receptor EP2.

3.1.2. Efecto del agonista EP2 CP-533536 en la respuesta de las vías aéreas respiratorias a aeroalérgenos in vivo

Se utilizó un modelo animal de sensibilización aguda a ácaros del polvo (Figura 9). En los ratones expuestos intranasalmente a aeroalérgenos se evaluó el efecto del agonista selectivo EP2, CP-533536, en la respuesta asmática, es decir, en la actividad mastocitaria y en el desarrollo de AHR y de inflamación.

a) Efecto del agonista EP2 CP-533536 en la actividad mastocitaria

Para evaluar la actividad mastocitaria *in vivo*, la producción del mediador específico de mastocitos de ratón mMCP-1 se analizó en fragmentos de parénquima pulmonar.

La figura 17 refleja la concentración de mMCP-1 respecto a la cantidad de proteína total en tejido pulmonar de ratones sensibilizados a aeroalérgenos de la cepa BALB/c. La actividad mastocitaria en el pulmón se evaluó y se comparó (T-Student) cuantificando la producción de mMCP-1 en las vías aéreas y normalizando los valores por la concentración de proteína total. La expresión local de mMCP-1 aumentó significativamente en los ratones expuestos a HDM respecto a los no sensibilizados (incremento de 5.4 veces, de 255.44 ± 28.28 pg mMCP-1/ μ g proteína total [n=8] a 1370.66 ± 419.33 pg mMCP-1/ μ g proteína total [n=8]; $p < 0.05$). Aunque en el experimento de asma experimental *in vivo*, cuyos ratones se trataron con una dosis de

0.3mg/kg de butaprost, se observó que la actividad mastocitaria disminuía un 40% (Serra-Pagès et al., 2015), el tratamiento con la misma dosis de CP-533536 no mostró cambios significativos en la producción de mMCP-1. No obstante, el CP-533536 administrado por vía intranasal a una dosis de 3mg/kg tiende a atenuar la actividad mastocitaria un 48.7% (1370.66 ± 419.33 pg mMCP-1/ μ g proteína total [n=8] versus 702.97 ± 105.87 pg mMCP-1/ μ g proteína total [n=8]; $p=0.13$). Así pues, para observar dicha tendencia en la respuesta mastocitaria *in vivo* por parte del agonista selectivo EP2, CP-533536, se necesita una dosis 10 veces mayor que con el butaprost.

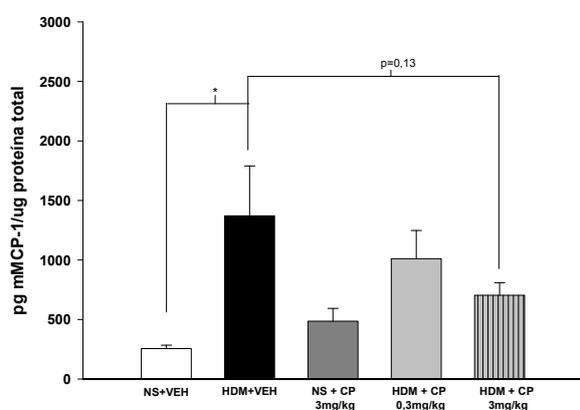


Figura 17. Efecto del agonista selectivo EP2 CP-533536 en la actividad mastocitaria pulmonar en un modelo murino de asma por exposición a ácaros del polvo (HDM). Determinación de la producción local de la proteína específica de mastocitos, mMCP-1, en pulmones de ratones sensibilizados, no tratados y tratados con dos dosis del agonista selectivo EP2, CP-533536. Se expresa la media \pm SEM (n=8/grupo experimental). (*Pvalor<0.05). CP (CP-533536), HDM (ácaros del polvo), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), NS (no sensibilizado), SEM (error estándar de la media), VEH (vehículo).

Podíamos anticipar el efecto del agonismo EP2 en la actividad mastocitaria pulmonar *in vivo* por nuestros datos consistentes *in vitro* donde butaprost y CP-533536 inhiben la actividad mastocitaria (Figura 16) (Serra-Pagès et al., 2012). Asimismo, el efecto menos potente del CP-533536 *in vitro* al compararlo con butaprost, también se refleja *in vivo*, donde solamente la dosis alta tiende a reducir la liberación de la proteasa mastocitaria mMCP-1. Además, conocemos que los mastocitos humanos de las vías aéreas expresan receptores EP y es la activación del EP2 el que se ha descrito como “el receptor inhibitorio”, sin atribuirle a EP3 ninguna acción inhibitoria (Duffy et al., 2008; Feng et al., 2006; Kay et al., 2006). Estos datos sugieren por lo tanto que se puede producir *in vivo* el efecto preventivo del agonismo EP2 sobre la actividad mastocitaria. La presencia de otras poblaciones celulares no incide, o incide poco, en la capacidad inhibitoria del agonismo EP2 observada *in vitro*.

b) Efecto del agonista EP2 CP-533536 en la inflamación broncovascular

24 horas después de la última sensibilización a ácaros del polvo, el ratón se sacrificó y se realizó el BAL a las vías aéreas. A continuación primero se contaron las células totales (Figura 18A) y posteriormente, mediante una tinción específica (*Diff-Quick*) en los citospins resultantes del BAL se realizó un recuento diferencial de las células inflamatorias (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos) (Figura 18B).

La figura 18A refleja un aumento significativo de las células inflamatorias totales en los animales expuestos a HDM respecto a los no sensibilizados, mientras que el tratamiento con el agonista no induce ningún efecto significativo. Los porcentajes de eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos se muestran en la figura 18B donde se puede diferenciar el efecto de la sensibilización a aeroalérgenos y los tratamientos con las dos dosis de CP-533536. Los eosinófilos aumentan un 45% tras la exposición a ácaros del polvo (Figura 18B), ahora bien con el tratamiento no se reducen dichos valores. Se realizó un recuento diferencial de células inflamatorias en ratones expuestos a HDM y tratados con CP-533536. Sin embargo, según el análisis estadístico realizado (T-Student), aunque se administraron dos dosis de CP-533536, no disminuyó la inflamación por la exposición a ácaros del polvo.

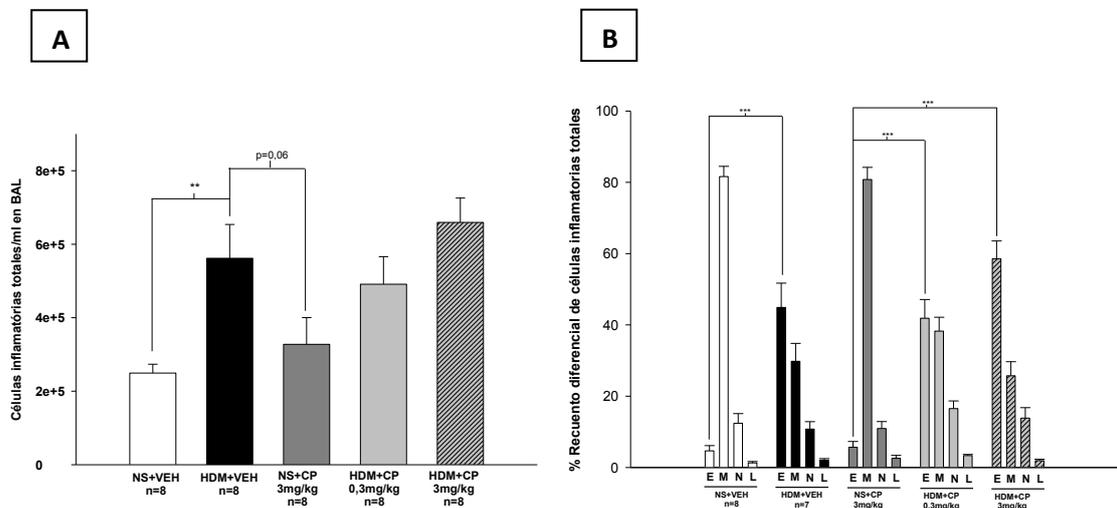


Figura 18. Células inflamatorias totales (A) y recuento diferencial en % (B) en ratones expuestos a HDM y tratados con CP-533536. Recuento de células que provienen de lavado broncoalveolar (BAL) teñidas con *diff-quick*. La cantidad de células inflamatorias totales se determina del conteo de al menos 300 células (E-eosinófilos, M-macrófagos, N-neutrófilos y L-linfocitos). Se expresa la media ± SEM (n=7-8/grupo experimental). (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01***Pvalor<0.001). CP (CP-533536), HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), SEM (error estándar de la media), VEH (vehículo).

La inflamación de las vías aéreas está presente en ratones expuestos a HDM como placas inflamatorias que contienen, sobretodo, eosinófilos (Herrerias et al., 2009b) y en el lavado broncoalveolar (*bronchoalveolar lavage*, BAL) aumenta el recuento de eosinófilos (Torres et al., 2013; Serra-Pagès et al., 2015). Aunque no se muestra ningún efecto por parte del CP-533536, el reclutamiento de eosinófilos disminuyó significativamente con la activación selectiva del receptor EP2 *in vivo* mediante butaprost (Serra-Pagès et al., 2015). Datos parecidos a los de Sturm et al. (2008) donde PGE2 endógena a través del receptor EP2 redujo un 50% la eosinofilia. El escaso efecto del CP-533536 en la inflamación pulmonar probablemente sea debido a su menor potencia, como también se ha mostrado en la actividad mastocitaria *in vitro* e *in vivo*.

c) Efecto del agonista CP-533536 en la hiperreactividad de las vías aéreas

La reactividad de las vías aéreas *in vivo* a concentraciones crecientes de metacolina nebulizada (*baseline*, PBS, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20mg/ml) se evaluó 24 horas después de la última exposición a ácaros del polvo, en ratones tratados y no tratados con agonista EP2, mediante una técnica de pletismografía invasiva.

En la figura 19 se representa la resistencia pulmonar a la metacolina en ratones sensibilizados a ácaros del polvo y tratados con el agonista selectivo EP2 CP533536 por vía intranasal. Se observa que los animales expuestos al HDM reaccionaron con un claro y significativo aumento de la resistencia de las vías aéreas a dosis crecientes de metacolina, cuando se comparaban con los animales no sensibilizados ($2.591 \pm 0.161 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{s/ml}$ versus $3.627 \pm 0.426 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{s/ml}$; $p < 0.001$ en la concentración de 20mg/ml de metacolina). A la misma dosis de butaprost, 0.3mg/kg, la administración local del agonista EP2 CP-533536 también disminuyó un ~50% la AHR (ANOVA de dos factores, $p < 0.01$). Mientras que la dosis alta de CP-533536, 3 mg/kg, no mostró el mismo efecto sobre la resistencia pulmonar al someter a los ratones a las concentraciones de 10 y 20mg/ml de metacolina nebulizada.

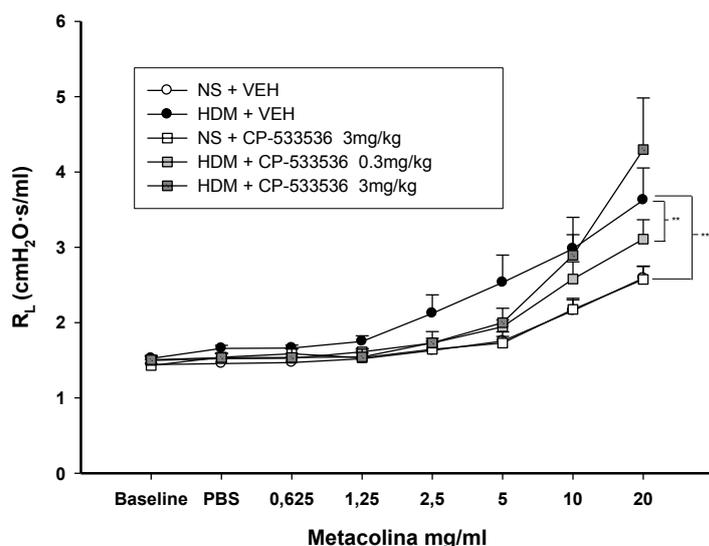


Figura 19. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones expuestos a HDM y tratados con un agonista selectivo EP2. El CP-533536 se administra por vía intranasal 1 hora antes de la sensibilización a HDM durante 6 días consecutivos (de día -1 a 4) en ratones BALB/c. 24 horas después de la última sensibilización se analiza la AHR mediante un método de pletismografía invasiva. Se expresa la media \pm SEM (n=8/grupo experimental). (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), R_L (resistencia pulmonar), SEM (error estándar de la media), VEH (vehículo).

Mediante dos agonistas de naturaleza química distinta hemos confirmado que el agonismo selectivo EP2 reduce significativamente la AHR en ratones sensibilizados a ácaros del polvo (Figura 19) (Serra-Pagès et al., 2015). Al evaluar la reactividad de las vías aéreas a metacolina mediante un procedimiento invasivo de pletismografía, ambos agonistas EP2 han permitido substanciar el papel protector que ejercen sobre la resistencia pulmonar. Los datos sobre mastocitos *in vivo* e *in vitro*, el efecto de butaprost sobre la inflamación eosinofílica (Serra-Pagès et al., 2015) y el efecto inhibitorio de ambos agonistas en la AHR acercan la hipótesis de un potencial interés terapéutico antiasmático atribuible a la activación del receptor EP2.

3.2 Determinar el impacto del bloqueo del receptor EP2 en la actividad mastocitaria in vitro y en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón

En una fase posterior del Subproyecto 1 se evaluó *in vitro* el efecto de antagonizar el receptor EP2 en mastocitos de ratón. Luego se analizó *in vivo*, en ratones expuestos a HDM no modificados genéticamente, en qué medida el antagonismo junto a un estabilizador de

mastocitos afectaba a la respuesta asmática. Por último, se compararon los resultados con el efecto del butaprost en ratones *knock out* para el receptor EP2 sensibilizados a ácaros del polvo.

3.2.1. Efecto del antagonismo EP2 en cultivos de mastocitos pulmonares de ratón (LMC)

Se utilizaron cultivos primarios de mastocitos pulmonares (LMC) para evaluar el efecto de un antagonista del receptor EP2, AH6809, en la respuesta mastocitaria inmediata mediante una sensibilización inducida por inmunoglobulina E y su antígeno específico (DNP).

En la figura 20 se representa el efecto del antagonista AH6809, sobre la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en LMC. La IgE induce una liberación basal de β-hexosaminidasa del 25.1%. La pre-incubación específica con el antagonista (10^{-5} M) aumentó la liberación hasta un 41.1% en LMC, un 7.5% más que con el DNP-HSA. Efecto contrario al observado en LMC con el agonista selectivo EP2, butaprost (10^{-5} M) (Figura 14). Por lo tanto, mientras que el agonismo disminuye la degranulación, el antagonismo sobre el receptor EP2 aumenta de manera significativa la actividad mastocitaria en LMC.

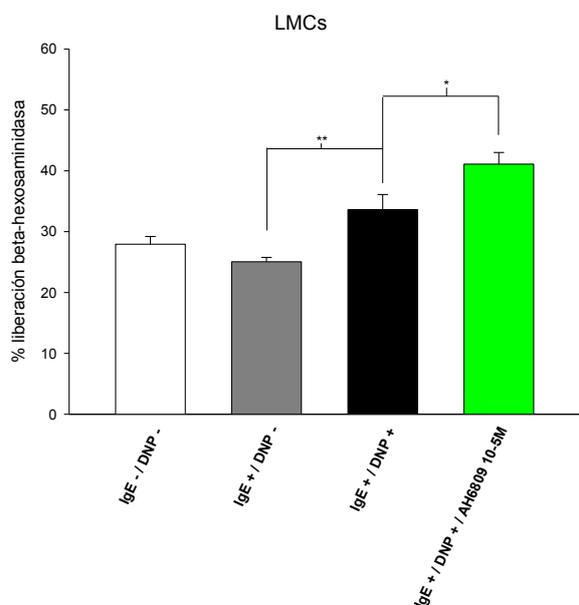


Figura 20. Efecto del antagonista EP1/EP2, AH6809, en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos pulmonares (LMC) de ratón. Se observa el efecto del AH6809 pre-incubado durante 30 minutos en la liberación de β-hexosaminidasa. Los resultados representan 2 experimentos hechos por cuadruplicado. Se expresa la media±SEM. (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01). AH6809 (antagonista EP1/EP2), DNP (dinitrofenol), IgE (inmunoglobulina E), LMC (mastocitos pulmonares), SEM (error estándar de la media).

A pesar de que AH6809 tiene un efecto antagonista débil del receptor EP1, se ha descrito que EP1 no se expresa de manera funcional en diversas poblaciones mastocitarias (Duffy et al., 2008; Kay et al., 2013; Serra-Pagès et al., 2012). Por lo tanto, el antagonista probablemente está ejerciendo su efecto sobre EP2. Por ello, la inhibición del receptor EP2 en mastocitos pulmonares aumenta la degranulación, efecto contrario a la activación selectiva del receptor mediante agonismo EP2. Algo esperable a la luz de los estudios con agonistas y que suscribe que el receptor EP2 tiene un efecto protector. Su actividad impide que los mastocitos sobreactúen causando un mayor daño a las vías respiratorias al ya ocasionado por la exposición a alérgenos.

3.2.2. Efecto del antagonismo EP2 y del SCG en la respuesta de las vías aéreas de ratones sensibilizados a aeroalérgenos

Por un lado, se bloqueó la vía endógena de la PGE2 en ratones sensibilizados a aeroalérgenos administrando un antagonista EP1/EP2 y por otro, se administró cromoglicato de sodio, un conocido estabilizador mastocitario con el objetivo de evaluar el efecto en la respuesta asmática en el modelo de asma experimental (HDM) inducido en ratones de la cepa BALB/c. Por último, en ratones *knock out* para el receptor EP2 expuestos a ácaros del polvo también se evaluó el efecto del agonista selectivo EP2, butaprost.

a) Efecto del antagonista AH6809 y del SCG en la inflamación broncovascular

El efecto del antagonista EP1/EP2, AH6809, en presencia del SCG en la respuesta inflamatoria inducida en ratones expuestos a ácaros del polvo por vía intranasal, se representa en la figura 21. Se muestra el reclutamiento de células inflamatorias en ratones sensibilizados a HDM y tratados no sólo con el SCG, si no también con el antagonista AH6809. La exposición a HDM en ratones de la cepa BALB/c incrementa las células inflamatorias totales (Figuras 21A: $2.275 \cdot 10^5 \pm 2.6776 \cdot 10^4$ células/ml versus $3.7625 \cdot 10^5 \pm 4.2676 \cdot 10^4$ células/ml; $p < 0.05$ [n=8]) y la eosinofilia pulmonar en $\sim 30\%$ (Figura 21B: $2.545 \pm 0.618\%$ versus $31.029 \pm 6.451\%$ [n=8]; $p < 0.001$).

El antagonista AH6809 tiende a aumentar la inflamación, en cambio, con una dosis de 10mg/kg de SCG por vía intraperitoneal se observa una tendencia a re-establecer niveles normales de eosinófilos (Figura 21C). Recientemente hemos visto que una dosis de 100mg/kg de SCG previene dicho empeoramiento de manera significativa (no se muestran datos).

Finalmente también evaluamos el efecto del butaprost en ratones modificados genéticamente, *knock out* para el receptor EP2. A diferencia de lo previamente descrito en BALB/c, el agonismo EP2 no mostró ningún efecto en ratones WT EP2 de la cepa C57BL/6. Contrariamente a lo esperado cuando se trataron KO EP2 con butaprost se observó una disminución de la inflamación (no se muestran datos).

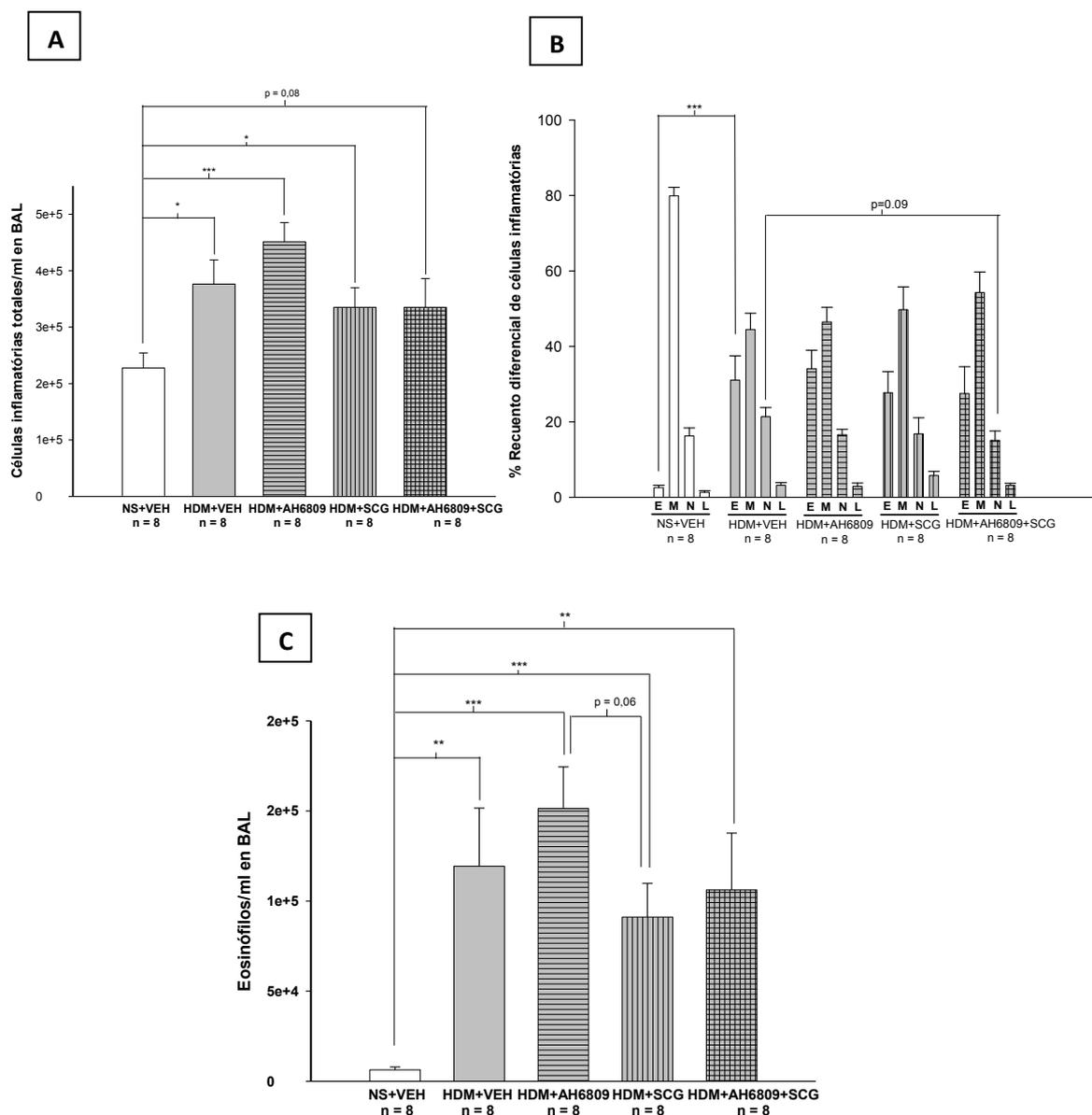


Figura 21. Células inflamatorias totales (A), % del recuento diferencial (B) y eosinofilia pulmonar (C) en ratones BALB/c expuestos a HDM y tratados con AH6809 y SCG. Recuento de células que provienen de lavado broncoalveolar (BAL) teñidas con *diff-quick*. La cantidad de células inflamatorias totales se determina del conteo de al menos 300 células (E-eosinófilos, M-macrófagos, N-neutrófilos y L-linfocitos). Se expresa la media \pm SEM (n=8/grupo experimental). (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). AH6809 (antagonista EP1/EP2), HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), S (sensibilizado), SCG (cromoglicato de sodio), SEM (error estándar de la media), VEH (vehículo).

Con la finalidad de evaluar la relevancia de los mastocitos como mediadores del efecto protector de la PGE2 y para elucidar el papel del receptor EP2 se administró el antagonista AH6809 a ratones expuestos a HDM en presencia de un estabilizador de mastocitos, el cromoglicato de sodio (SCG). La inhibición de la vía endógena PGE2-EP2 en ratones sensibilizados a HDM por sí misma tiende a empeorar la inflamación pulmonar. Las cromonas, como el SCG, son capaces de prevenir la liberación de los mediadores mastocitarios (Zhang et al., 2015). SCG también inhibe la anafilaxia cutánea pasiva (*passive cutaneous anaphylaxis*, PCA) en modelos animales y la liberación de histamina en cultivos peritoneales *in vitro* (Orr et al., 1971). El daño inducido por la exposición a ácaros del polvo se neutralizó significativamente con el estabilizador de mastocitos SCG. Finalmente en los ratones *knock out* para el receptor EP2 (*background* C57BL/6) no se observó el efecto esperado con butaprost, ahora bien, en publicaciones recientes de nuestro grupo de investigación también hemos demostrado que la PGE2 no protege en ratones de la cepa C57BL/6 expuestos a HDM (Serra-Pagès et al., 2015).

Es claro por lo tanto por un lado que la PGE2 endógena ejerce una función compensatoria natural/espontánea y que probablemente cuando esta molécula endógena no actúa adecuadamente, el agravamiento de la inflamación observado es atribuible a la hiperactividad mastocitaria. Se cierra de esta forma el círculo y se puede afirmar que en nuestro modelo la administración de un agonista selectivo EP2 está reteniendo la actividad mastocitaria, lo cual previene el desarrollo de un proceso inflamatorio más intenso.

b) Efecto del antagonista AH6809 y del SCG en la AHR

Mediante una técnica de pletismografía invasiva se evaluó el efecto del antagonista EP2, AH6809, y del estabilizador de mastocitos, SCG, en ratones de la cepa BALB/c sensibilizados a aeroalérgenos.

Como se muestra en la figura 22, la exposición a ácaros del polvo induce un incremento de la resistencia de las vías aéreas a concentraciones crecientes de metacolina (*baseline*, PBS, 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10mg/ml) al compararse con los ratones no sensibilizados. El AH6809 tendía a empeorar la AHR ($p=0.08$; ANOVA de dos factores), cuyo aumento fue significativo específicamente con la concentración de 10mg/ml de metacolina (HDM+VEH: 2.516 ± 0.134 cmH₂O·s/ml [n=8] versus HDM+AH6809: 3.193 ± 0.341 cmH₂O·s/ml [n=8]; $p<0.05$, test *Post Hoc* Bonferroni de comparaciones múltiples). En cambio, el SCG revirtió completamente el daño inducido en las vías aéreas ~95% (HDM+AH6809: 3.193 ± 0.341 cmH₂O·s/ml [n=8] versus HDM+AH6809+SCG: 2.5524 ± 0.151 cmH₂O·s/ml [n=8]; $p<0.005$), y por sí solo fue

capaz de reducir de manera significativa (>40%) la AHR inducida por la sensibilización a ácaros del polvo con una dosis de 10mg/kg de SCG.

En referencia a la hiperreactividad bronquial los resultados también varían dependiendo de la cepa de ratón, ya que en ratones WT EP2 de la cepa C57BL/6 el butaprost no ejerció ningún efecto y en ratones KO EP2 disminuyó la AHR (no se muestran datos).

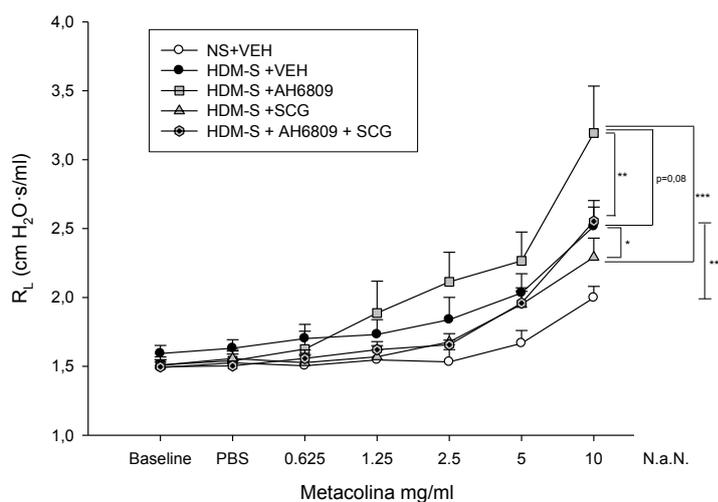


Figura 22. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones BALB/c expuestos a HDM y tratados con el AH6809 y el SCG. El SCG se administra por vía i.p. y el AH6809 se administra por vía i.v. 2 y 1 hora antes de la sensibilización a HDM respectivamente. 24 horas después de la última sensibilización se analiza la AHR mediante un método de pletismografía invasiva. Se expresa la media \pm SEM (n=8/ grupo experimental). (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). AH6809 (antagonista EP1/EP2), HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), S (Sensibilizado), SCG (cromoglicato de sodio), R_L (resistencia pulmonar), SEM (error estándar de la media), VEH (vehículo).

La hiperreactividad bronquial empeora al inhibir la vía endógena de la PGE2-EP2 en ratones expuestos a aeroalérgenos. Esta información, junto a los resultados respecto a la inflamación broncovascular, sugiere que la sensibilización a HDM podría desencadenar de manera espontánea un mecanismo compensatorio endógeno mediado por la PGE2 para atenuar la patología de las vías aéreas inducida por aeroalérgenos. De este modo se refuerza la hipótesis por la cual una deficiencia en la regulación del eje COX2-PGE2 podría ser un factor que coadyuva a la progresión del asma. El hecho de que la alteración inducida por bloqueo de la vía PGE2-EP2 revierta en presencia de un estabilizador de mastocitos refleja la relevancia del receptor mastocitario en el efecto beneficioso atribuible a la PGE2. Estos datos demuestran que

es el desbloqueo de la actividad mastocitaria lo que explica el empeoramiento de la AHR y la inflamación inducida por inhibición del estímulo PGE₂-EP2. Existe un claro eje EP2-MC-Asma cuyo control tiene consecuencias en la aparición de signos y manifestaciones del asma en el modelo en ratón.

SUBPROYECTO 2

**Ratón Transgénico con Sobreexpresión del Receptor EP2 en
Mastocitos**

(Objetivo 2)

1. SUBPROYECTO 2: ABORDAJE EXPERIMENTAL DEL OBJETIVO 2

En el marco del **Objetivo 2**: “Desarrollar un ratón transgénico de EP2 para evaluar la relevancia relativa del receptor EP2 en la protección inducida por PGE2”, se contemplaron 2 etapas experimentales:

Etapas 1: Generación y selección de una población de ratones transgénicos que sobreexpresen el receptor EP2 específicamente en los mastocitos

En paralelo a la evaluación del efecto de la modulación del receptor EP2 mediante agonistas y antagonistas, se generaron ratones que sobreexpresen EP2 en los mastocitos para determinar la importancia del receptor en el efecto protector de la PGE2 en el asma. Se creó el constructo transgénico, se microinyectó el transgen para obtener los ratones fundadores y luego se generaron las primeras líneas de transgénicos en colaboración con el CBATEG.

A continuación, se preseleccionaron algunas de las líneas que habían incorporado el transgen y se retrocruzaron estos animales con ratones de la cepa BALB/c. Finalmente se compararon los niveles de expresión proteica del receptor EP2 entre ratones WT y TG.

Etapas 2: Evaluación preliminar del efecto de la sobreexpresión del EP2 mastocitario in vitro y en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón (in vivo)

Se utilizaron ratones transgénicos EP2 de las líneas preseleccionadas para los análisis *in vitro* e *in vivo*. En poblaciones mastocitarias peritoneales y pulmonares aisladas de ratones WT y TG se determinó el efecto de la sobreexpresión en la modulación del receptor EP2 con agonistas y antagonistas. Luego se estudió el impacto de dicha sobreexpresión *in vivo* en la actividad mastocitaria, la inflamación y la hiperreactividad bronquial de ratones sensibilizados a aeroalérgenos sin tratar y tratados intranasalmente con PGE2 exógena.

De este modo los ratones transgénicos generados permitirán realizar una valoración preliminar, mediante ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*, del impacto que conlleva una sobreexpresión del receptor EP2 selectivamente en los mastocitos con el fin de corroborar la relevancia de este en un posible abordaje terapéutico antiasmático. A continuación se describe el material y métodos, y se discuten brevemente los resultados de cada experimento.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Generación de ratones transgénicos con sobreexpresión del receptor EP2

Se explican las técnicas utilizadas para generar los ratones transgénicos (*transgenic mice*, TG) con sobreexpresión EP2 en los mastocitos y el análisis mediante *Western Blot* de la expresión proteica del receptor EP2 entre ratones WT y TG.

2.1.1. Fases del desarrollo del ratón transgénico EP2

Con la finalidad de obtener ratones transgénicos que sobreexpresasen el receptor EP2 en los mastocitos, primero se creó el constructo transgénico, y luego se microinyectó en los progenitores para generar una colonia EP2 con varias líneas de TG. Posteriormente se preseleccionaron las líneas que sobreexpresaban el transgen y se retrocruzaron los ratones (*background* C57BL/6) a la cepa de interés, BALB/c.

◆ Síntesis y creación del constructo transgénico

Creación del constructo transgénico (Figura 23), mediante colaboración con el CBATEG (Centro de Biotecnología Animal y de Terapia Génica, Barcelona, España), donde la región promotora del gen Alpha-Chymase se obtuvo a partir de un plásmido cedido por el Dr. Thomas Hehlhans (*Institut für Immunologie, Universität Regensburg, Alemania*). Dicha región contiene una diana de restricción HindIII en el extremo 5', de forma que permite clonar secuencias para ser expresadas bajo su dirección. “GeneART™ Gene Synthesis” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sintetizó la secuencia correspondiente al cDNA del gen EP2 junto a la señal Poly-A del SV-40 (virus 40 vacuolado del simio, poliomavirus oncogénico). Para clonar el transgen se digirió el plásmido receptor (Alpha-Chymase) con el enzima de restricción HindIII. El plásmido lineal resultante se desfosforiló para evitar que se uniese nuevamente. La inserción (cDNA EP2 + Poly-A) se obtuvo a partir del plásmido enviado por la empresa “GeneART™ Gene Synthesis” digerido también por la enzima HindIII. Seguidamente, los dos fragmentos se comprobaron en geles de agarosa y se purificaron. Con los fragmentos resultantes se realizaron diversos ligamientos que permitieron obtener varios clones con el plásmido que había incorporado el promotor Alpha-Chymase con el cDNA del gen EP2 y la secuencia de Poly-A SV40. El plásmido resultante se identificó con diferentes enzimas de restricción para garantizar

la correcta estructura del transgen y se optimizaron los codones para aumentar la expresión. Se introdujeron dianas de restricción HindIII en los extremos para facilitar el clonaje en el vector que tenía el promotor Alpha-Chymase y adicionalmente se introdujeron otras dianas para comprobar *a posteriori* la correcta inserción del fragmento en el vector receptor. El plásmido se amplificó a gran escala para obtener la cantidad necesaria para la microinyección. Finalmente, el transgen se escindió del vector mediante una digestión con la enzima NotI. De esta forma el fragmento final únicamente contenía las secuencias de interés sin ningún resto del plásmido bacteriano.

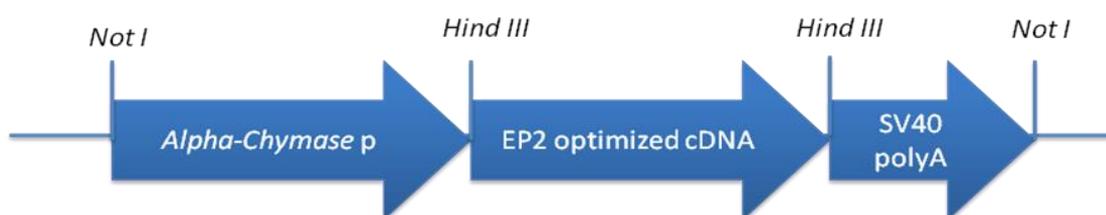


Figura 23. Esquema de la construcción transgénica *Alpha-Chymase-EP2-SV40PA* para la generación de ratones con sobreexpresión del receptor EP2 en mastocitos. El constructo entero consta de tres partes: (1) región promotora de la Alpha-Chymase, (2) cDNA del gen EP2 murino y (3) la secuencia de Poly-A SV-40. La región promotora contiene una diana de restricción HindIII en su región 5' y se introdujeron otras dianas de restricción (HindIII y NotI) en los extremos de la secuencia que corresponde al cDNA del gen EP2 con la señal Poly-A del SV-40 para comprobar la correcta inserción del fragmento en el vector receptor. cDNA (ADN complementario), Hind III (enzima de restricción de tipo II producida por *Haemophilus influenzae*), NotI (enzima de restricción tipo II producida por *Nocardia otitidis*), SV40 (virus 40 vacuolado del simio).

◆ Microinyección del transgen, transferencia de embriones a las madres fundadoras y preselección de las líneas transgénicas

Los ratones transgénicos se generaron mediante microinyección de constructos de ADN “exógeno” en los pronúcleos (Skelton et al., 2013), en colaboración con el CBATEG. El transgen de ADN o plásmido, se microinyectó en los cigotos de ratones justo después de la fertilización. Los embriones con el transgen se implantaron en madres fundadoras y la descendencia resultante se analizó mediante técnicas de biología molecular para confirmar que se había insertado el transgen. Por lo tanto, la técnica se basa en:

- a) la preparación del ratón y la recolección de embriones para la microinyección
- b) la preparación del ADN “exógeno” o transgen
- c) la microinyección del transgen
- d) la transferencia quirúrgica de los embriones a las madres fundadoras

El constructo transgénico definitivo se microinyectó en embriones que posteriormente se transfirieron a hembras semipreñadas (recientemente apareadas con un macho vasectomizado). Las hembras (cepa C57BL/6) actuaron como nodrizas permitiendo llevar a cabo la gestación y se generaron los ratones fundadores (F0).

Inicialmente se obtuvieron varias líneas F0 y F1. Para determinar que animales habían incorporado el transgen se realizaron *Southern Blots* de la F0 y de F1 (colaboración con el CBATEG). A continuación se comprobó la expresión de EP2 en diversos animales y se seleccionaron aquellos que sobreexpresaban el transgen. Se preseleccionaron tres líneas de transgénicos (L2, L3 y L4) y se iniciaron los retrocruzamientos con BALB/c para conseguir un *background* genético de al menos un 95%. La presencia del transgen EP2 en las diferentes generaciones de cada línea se monitorizó mediante pruebas genéticas, RT-PCR, en la empresa “Transnetyx Inc.” (Cordova, TN, USA).

2.1.2. Análisis de la sobreexpresión EP2 mediante Western Blot

La expresión proteica del receptor EP2 se evaluó en cultivos primarios (PDMC y LMC) y directamente en fragmentos pulmonares de ratones WT y TG que habían incorporado el transgen.

◆ Reactivos y anticuerpos

Todos los productos químicos utilizados para los cultivos mastocitarios, la extracción y la determinación de proteína total, así como, el *Western Blot* fueron de la pureza adecuada para el análisis. El medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), el DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*), la penicilina-estreptomicina-glutamina, L-glutamina, la solución de aminoácidos no esenciales, la solución de piruvato sódico, el suero fetal bovino (SFB) y la anfotericina B provenían de Biowest (Nuaille, Francia). El 2-mercaptoethanol se compró en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los factores de crecimiento como la interleuquina-3 (IL-3) y el factor de células madre (SCF) provenían de Prospec (Rehovot, Israel). El recuento de células total se realizó mediante azul de tripano de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para la solución de kimura se utilizó cloruro sódico (NaCl), metanol, etanol, bifosfato de sodio (NaH₂PO₄), azul de toluidina y saponina de Panreac Applichem (Barcelona, España).

Los componentes del tampón *RIPA*: TrisHCl, NaCl, NP40 [Igepal], dodecil sulfato sódico (SDS), leupeptina, aprotinina Na₃VO₄, NaF, DTT, PMSF y desoxicolato sódico se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para la determinación de proteína total se utilizó *Lowry*,

el *Folin & Ciocaltean's Phenol Reagent Working Solution* y la *Protein Standard Solution* también de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

En la electroforesis de proteínas se utilizó: tampón de carga (*NuPage lithium dodecyl sulfate (LDS) sample Buffer*), agente reductor NuPAGE con ditioneitol (DTT), antioxidante (NuPAGE) y sustrato quimioluminiscente (ECL) *Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate* que provenían de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Los geles de Tris-Acetato, el SDS-Tampón de electroforesis (*Novex TRIS-Acetate SDS Running Buffer 20X*), el marcador de peso molecular conocido (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard*) y el sistema de transferencia en seco (*iBlot® Dry Blotting System*) eran de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Para bloquear las uniones inespecíficas, el tampón fosfato (PBS) y el Tween 20 se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Las reacciones inmunológicas se realizaron mediante la utilización de los siguientes anticuerpos específicos:

- **Anticuerpos primarios:** *a)* el anticuerpo monoclonal de ratón anti β -actina de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), *b)* el anticuerpo policlonal de conejo anti-PTGER2 de Origene (Rockville, MD, USA) y *c)* el anticuerpo policlonal de conejo anti-carboxipeptidasa A3 de Abbiotec (San Diego, CA, USA).

- **Anticuerpos secundarios:** *a)* el anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (*goat anti-mouse IgG – horseradish peroxidase labeled*) y *b)* el anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (*goat anti-rabbit IgG –horseradish peroxidase labeled*), ambos de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA).

◆ Cultivos primarios de mastocitos peritoneales y pulmonares de ratón

A continuación se especifican las técnicas para obtener cultivos mastocitarios primarios peritoneales y pulmonares, así como, la procedencia de los ratones.

Las PDMC y LMC se cultivaron a 37°C en una atmosfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. Los medios de crecimiento celular se detallan para cada uno de los cultivos. Todos los experimentos relacionados con el cultivo celular se desarrollaron bajo condiciones estrictas de esterilidad y con el material autoclavado.

➤ Animales de experimentación

Se utilizaron ratones transgénicos que sobreexpresaban el receptor EP2 en los mastocitos y sus hermanos de camada WT. Concretamente de las líneas preseleccionadas (L2, L3 y L4), entre los retrocruzamientos 7 y 9 con la cepa BALB/c. *In vitro* se diferenciaron los cultivos procedentes de ratones *wild type* (WT) y transgénicos (TG) entre 8 y 16 semanas de edad en el momento de la obtención de los mastocitos pulmonares y peritoneales.

Las condiciones ambientales de estabulación fueron las estándar: ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ con una humedad relativa constante de $60\pm 10\%$. El agua y pienso (SAFE-PANLAB, Barcelona, España) se suministraron *ad libitum*. También se controló diariamente la supervivencia, los signos de enfermedad y/o la pérdida de peso. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (España). El desarrollo de este proyecto se realizó de acuerdo con la legislación española del Real Decreto 53/2013 relativa a la “Protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”, y de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo.

➤ Obtención y cultivo de mastocitos peritoneales

Los mastocitos peritoneales (*peritoneum-derived mast cells*, PDMC) se obtuvieron a partir de un lavado de la cavidad peritoneal de ratones TG y WT con 4ml de medio (Tabla 1) (ver anexo 1.1). En un mismo cultivo celular se juntaron los lavados de tres ratones.

Las células se cultivaron durante 3 semanas en presencia de IL-3 (20ng/ml) y SCF (20ng/ml) en medio completo RPMI con un 20% de SFB para conseguir una mayor cantidad de PDMC (Gomez et al., 2005). Mantenimiento semanal del cultivo y a partir de la semana 3 se realizó un recuento de células total (dilución $1/2$ con azul de tripano), viabilidad y pureza de mastocitos (dilución $1/5$ con kimura, ver tabla 2).

➤ Obtención y cultivo de mastocitos pulmonares

Los mastocitos pulmonares de ratón (*lung mast cells*, LMC) se obtuvieron a partir de una técnica de aislamiento y estimulación. Se extrajeron los pulmones, se trocearon (3mm) y se sumergieron en medio completo PRMI (Tabla 1) con un 20% de SFB en presencia de IL-3 (20ng/ml), SCF (20ng/ml) y anfotericina B (250ng/ml) durante 7 días. En un mismo cultivo celular se juntaron los pulmones troceados de tres ratones (ver anexo 1.2).

Mantenimiento celular durante 3 semanas para conseguir una mayor cantidad de LMC en presencia de IL-3 (20ng/ml) y SCF (20ng/ml), la primera semana también se añadió anfotericina B (125ng/ml). A partir de la tercera semana se realizaron recuentos de células total (dilución $1/2$ con azul de tripano), viabilidad y pureza de mastocitos (dilución $1/5$ con kimura, ver tabla 2).

◆ Extracción de proteínas

Se obtuvo el lóbulo derecho del pulmón para la extracción de proteína total de los ratones transgénicos (*transgenic mice*; TG) y sus hermanos de camada sin sobreexpresión (*wild type*, WT), y se congeló a -80°C . Asimismo, a partir de cultivos primarios pulmonares y peritoneales se congelaron también *pellets* de 2 millones de células a -80°C .

Para conseguir el extracto proteico del pulmón congelado y de los *pellets* celulares se añadieron 200 μl de tampón RIPA (Tabla 9), mantenido en frío inmediatamente antes de la lisis. Los lisados se mantuvieron 3 minutos en hielo y posteriormente se sonicaron las muestras con dos pulsos de 30-45 segundos en frío (*Branson Sonifier 250*, Danbury, CT, USA). Los homogenados se centrifugaron inmediatamente a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C y se recogieron los sobrenadantes con el extracto proteico en un nuevo tubo, eliminando los *pellets* con las restas celulares. Los sobrenadantes se mantuvieron congelados a -80°C hasta el momento de analizar la concentración de proteína total

Tabla 9. Tampón de lisis RIPA para la extracción de proteínas. DTT (ditiotreitól), NaCl (cloruro sódico), NaF (fluoruro sódico), Na_3VO_4 (ortovanadato de sodio), NP40 (nonilfenoxi polietoxietanol), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), SDS (dodecil sulfato sódico, TrisHCl (hidrocloruro de tri (hidroximetil) aminometano).

Producto	Concentración
TrisHCl [pH 7.4]	50mM
NaCl	150ml
NP40 [Igepal],	1%
SDS	0.1%
Leupeptina	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Aprotinina	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Na_3VO_4	0.1mM
NaF	1mM
DTT	1mM
PMSF	0.5mg/ml
Desoxicolato sódico	5mg/ml

◆ Determinación de la concentración de proteínas

Para cargar la misma cantidad de proteína en el ensayo del *Western Blot*, la concentración de proteína presente en las muestras (*pellets* celulares y fragmentos de pulmón) se cuantificó utilizando el método de *Lowry*. Esta técnica permite medir la concentración de proteína total presente en la muestra utilizando concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Las concentraciones de la curva estándar se prepararon diluyendo *Protein Standard Solution* en agua destilada hasta obtener un volumen final de 250µl. A partir de la concentración máxima de 400µg/ml se hicieron diluciones seriadas hasta obtener una concentración mínima de 50µg/ml. El blanco se preparó con 250µl de agua destilada. Las muestras se analizaron en una dilución $1/250$ (fragmentos pulmonares) y $1/15$ (*pellets* celulares) en agua destilada.

Primero se añadió el reactivo *Lowry*, se mezclaron las muestras durante 30 segundos por el vórtex y se dejaron incubar durante 20 minutos. A continuación, se añadió el reactivo *Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent Working Solution*, se mezclaron las muestras durante 30 segundos por el vórtex nuevamente y se incubaron durante 30 minutos, tiempo necesario para la reacción colorimétrica. El contenido de cada tubo se transfirió a una placa de lectura de 96 pocillos (Thermo Fisher NUNC, Waltham, MA, USA) y todas las muestras se analizaron por duplicado. La absorbancia se determinó a 620nm por espectrofotometría utilizando el lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF, ThermoLabsystems, Beverly, MA, USA).

◆ Electroforesis de proteínas

En condiciones desnaturalizantes, las proteínas se separan según su tamaño en geles de acrilamida. Debido a que la migración de las proteínas con similares pesos moleculares puede variar según las diferencias en su estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, se utilizó dodecil sulfato sódico (SDS), un detergente aniónico, para reducir las proteínas a su estructura primaria, obteniendo una carga negativa prácticamente uniforme a lo largo de todo el polipéptido. El voltaje aplicado durante la electroforesis permite la migración de los aniones y las proteínas se separan por su peso molecular.

Se desnaturalizaron 25µg (*pellets* celulares) o 80µg (fragmentos pulmonares) de proteína total de cada muestra en un termociclador (MJ Research PTC-100, GMI, Ramsey, MN, Estados Unidos) (100°C durante 5 minutos) en presencia de tampón de carga (NuPage *lithium dodecyl sulfate (LDS) sample Buffer*) (ratio 1:4) y el agente reductor NuPAGE (ratio 1:10), que contiene ditiotreitól (DTT). A continuación, las muestras se cargaron en geles de TRIS-Acetato (7%) en tampón de

SDS (*Novex TRIS-Acetato SDS running buffer 20x*) y se colocaron en una cámara de electroforesis vertical, *Novex XCell II Mini-Cell* (Invitrogen, Madrid, España). Para mantener las proteínas en estado reducido durante la electroforesis del gel se añadieron 500µl de un antioxidante (NuPAGE) con N,N-dimetilformamida al tampón de electroforesis.

El marcador de peso molecular conocido, *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard*, se cargó en el gel como referencia. Este marcador facilitó la identificación de la banda, ya que indica el peso molecular en kilodaltons (kDa) de las proteínas y a su vez permite una valoración rápida de la eficiencia de la transferencia. Las proteínas se separaron según su peso molecular, la electroforesis se llevó a cabo durante 90 minutos a 125V utilizando una fuente de alimentación *BioRad Power Pac 1000* (BioRad Laboratories Ltd., Hemel Hemstead, Reino Unido).

◆ Transferencia a la membrana

Las proteínas se transfirieron utilizando un sistema de transferencia en seco (*iBlot® Dry Blotting System*, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Este sistema transfiere las proteínas desde los geles de poliacrilamida en 7 minutos sin necesidad de tampones adicionales. El *iBlot* incluye una membrana de nitrocelulosa de 0.2µm integrada, donde se transfirieron las proteínas. El orden de las capas en el sistema de transferencia fue de arriba a abajo: ánodo con la temperatura de nitrocelulosa incorporada, gel de poliacrilamida, papel de filtro, cátodo y finalmente una esponja.

◆ Bloqueo de las uniones inespecíficas

Después de la transferencia, con el objetivo de bloquear los sitios de unión inespecíficos de las membranas, se colocaron en un tampón de bloqueo con un 5% de leche en polvo y 0.1% Tween 20 en 10nmol/l de PBS durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave (*Stuart Scientific SO3 Orbital Shaker*, Stone, Staffordshire, Reino Unido).

◆ Inmunodetección proteica y análisis densitométrico

Durante toda la noche a 4°C y en agitación suave, las membranas se incubaron en tampón de bloqueo con los anticuerpos primarios siguientes:

- a) Anticuerpo policlonal de conejo Anti-PTGER2; ≈53 kDa; dilución 1:1000
- b) Anticuerpo policlonal de conejo Anti-Carboxipeptidasa A3; ≈50 kDa; dilución 1:1000
- c) Anticuerpo monoclonal de ratón Anti- β-actina; ≈42 kDa; dilución 1:10.000

Las membranas se lavaron con PBS-Tween20 al 0.1% para eliminar los anticuerpos primarios sueltos. A continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario (*horseradish peroxidase labeled*) dirigido a una porción específica de especie del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios específicos de EP2 y CPA3 se diluyeron 1:3000 en tampón de bloqueo y se incubaron con la membrana aproximadamente durante 2 horas a temperatura ambiente. En el caso de la β -actina, la dilución del secundario fue 1:10000.

Finalmente, las membranas se lavaron de nuevo y se incubaron con ECL (*Enhanced Chemiluminiscent Substrate*) (*Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate*, Rockford, IL, USA) durante 5 minutos. Las emisiones quimioluminiscentes se detectaron con el CCD cámara System LAS 3000 (Fujifilm, Tokio, Japón).

Las densitometrías se cuantificaron utilizando el software Fujifilm Image Gauge v.4.0 (Fujifilm, Tokio, Japón). La intensidad de las bandas proteicas pertenecientes a los anticuerpos anti-EP2 y anti-CPA3 se analizaron en comparación con la intensidad del control β -actina (proteína constitutiva) evaluado en la misma muestra. Posteriormente se normalizaron también los resultados de EP2 respecto a CPA3 (marcador específico de mastocitos).

$$\text{Ratio EP2/CPA3} = \frac{(\text{Intensidad de banda EP2}/\text{Intensidad de banda } \beta - \text{actina})}{(\text{Intensidad de banda CPA3}/\text{Intensidad de banda } \beta - \text{actina})}$$

2.2. Evaluación del efecto de la sobreexpresión del EP2 mastocitario in vitro

Se utilizaron los ratones transgénicos como modelo para evaluar preclínicamente el impacto de la sobreexpresión del receptor EP2 en cultivos mastocitarios de ratones WT y TG.

Todos los experimentos relacionados con el cultivo celular se desarrollaron bajo condiciones estrictas de esterilidad y con el material autoclavado.

2.2.1. Cultivos celulares

Cultivos de mastocitos peritoneales y pulmonares de ratones WT y TG EP2. Todas las células se cultivaron a 37°C en una atmosfera humidificada que contenía CO₂ al 5%.

◆ Reactivos, citoquinas y fármacos

Todos los productos químicos utilizados para la obtención de mastocitos peritoneales y pulmonares se han descrito en el apartado 2.1.2.

◆ Cultivos primarios de mastocitos pulmonares y peritoneales de ratón

Las técnicas para obtener cultivos mastocitarios primarios peritoneales y pulmonares a partir de los ratones WT y TG EP2 se han descrito en el apartado 2.1.2.

2.2.2. Evaluación de la respuesta mastocitaria mediante liberación de β -hexosaminidasa

En el siguiente subapartado se explica la técnica *in vitro* utilizada para evaluar la actividad mastocitaria después de una preincubación con agonistas y antagonistas del receptor EP2.

◆ Reactivos, citoquinas y fármacos

Todos los productos químicos utilizados para la determinación de la actividad mastocitaria fueron de la pureza adecuada para el análisis. La IgE-DNP específica de ratón (Inmunoglobulina E anti DNP), amablemente cedida por el Dr. Juan Rivera del NIH (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA), fue producida como se ha descrito previamente (Liu et al., 1980). El DNP-HSA (dinitrofenil-albúmina sérica humana; antígeno; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se disolvió en tampón fosfato salino (PBS; Sigma-Aldrich). La Prostaglandina E2 (PGE2) y el butaprost (agonista selectivo EP2) eran de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). El AH6809 (antagonista EP1/EP2) provenía de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El butaprost y la PGE2 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich mientras que el antagonista AH6809 se disolvió en etanol de Panreac Applichem (Barcelona, España).

Los productos químicos en el tampón HEPES del ensayo de degranulación mastocitaria: HEPES (4- [2-hidroxietil] -1-piperazinetanosulfónico), cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), fosfato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), glucosa, cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se compraron en Panreac Applichem (Barcelona, España) y la albúmina sérica bovina en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El p-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosamide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) se disolvió en tampón citrato: ácido cítrico y fosfato disódico

heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de Panreac Applichem (Barcelona, España). Por último, para parar la reacción enzimática se utilizó glicina (Panreac Applichem, Barcelona, España) disuelta en agua destilada.

◆ Ensayo de activación mastocitaria: liberación de β -hexosaminidasa

Las células se cultivaron durante 16 horas sin los factores de crecimiento específicos (SCF y IL-3) antes de empezar el ensayo de degranulación mastocitaria. Las PDMC y LMC fueron sensibilizadas con $1\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgE-DNP específica de ratón durante dos horas. Después de la sensibilización, las células se lavaron y se resuspendieron en tampón HEPES (Tabla 4) con un 0.04% de BSA. Seguidamente se cultivaron 50.000 células de cada condición en un volumen final de $100\mu\text{l}$ en una placa de 96 pocillos en V (Thermo Scientific NUNC, Waltham, MA, USA). Las células se pre-incubaron con butaprost (10^{-5}M), PGE2 (10^{-5}M) o vehículo (PBS con 0.1% DMSO) durante 30 minutos o AH6809 (10^{-5}M) durante 1 hora a 37°C con 5% v/v de CO_2 . Las PDMC también se pre-incubaron con tres concentraciones crecientes de butaprost (10^{-6}M , $3 \cdot 10^{-6}\text{M}$ y $3 \cdot 10^{-5}\text{M}$).

En un segundo lugar los mastocitos se estimularon con $50\text{ng}/\text{ml}$ de antígeno (DNP-HSA) durante 30 minutos a 37°C con 5% v/v de CO_2 . La degranulación mastocitaria se paró con hielo. Las células se centrifugaron a 1500rpm durante 10 min a 4°C . Se recogieron los sobrenadantes en una placa de lectura (Thermo Scientific NUNC, Waltham, MA, USA). Los *pellets* de las células se lisaron mecánicamente homogeneizándolos con agua destilada. A continuación se sometieron a un período de 10 minutos de congelación a -80°C , seguido de 10 minutos de descongelación a 37°C . También se recogieron los lisados celulares en la placa de lectura de los sobrenadantes.

Finalmente se analizó la reacción enzimática del mediador mastocitario, β -hexosaminidasa, liberado al medio extracelular en los sobrenadantes y en los *pellets* de las células sensibilizadas con IgE-DNP y estimuladas con el antígeno DNP-HSA. Se determinó a partir de la liberación de p-nitrofenol mediante un ensayo fluorométrico con $3.5\text{mg}/\text{ml}$ de PNAG (P-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamida) como sustrato disuelto en tampón citrato (Tabla 5). La reacción enzimática se paró con glicina (Tabla 6) después de 90 minutos de incubación a 37°C . Al terminar la incubación la placa con los *pellets* y los sobrenadantes se leyó en un lector de placas Labsystems iEMS Reader MF (Thermo Labsystems, Beverly, MA, USA), para determinar la absorbancia a 405nm con filtro de referencia a 620nm. Cada condición se realizó por triplicado y la media se utilizó para analizar los porcentajes de liberación o inhibición mastocitaria.

La degranulación mastocitaria de las diferentes condiciones experimentales se representa mediante el porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa teniendo en cuenta las absorbancias (*optic density*, OD) de los lisados celulares y sobrenadantes (Saitoh et al., 2000).

$$\% \text{ liberación } \beta - \text{ hexosaminidasa} = 100 \times \frac{OD \text{ sobrenadante}}{(OD \text{ sobrenadante} + OD \text{ lisado celular})}$$

Asimismo, se calcularon los porcentajes de inhibición de los agonistas y el antagonista respecto a la activación celular total (IgE+/DNP+) sustrayendo los porcentajes de liberación basal (IgE+/DNP-).

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{(\% \text{ liberación tratamiento } X - \% \text{ liberación basal}) \times 100}{(\% \text{ liberación total} - \% \text{ liberación basal})}$$

2.3. Evaluación del efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario en ratones sensibilizados a aeroalérgenos

Después de los experimentos *in vitro* también se evaluó el efecto de la sobreexpresión EP2 en la respuesta asmática de ratones expuestos a aeroalérgenos por vía intranasal, en presencia y ausencia de PGE2 exógena.

2.3.1. Procedimientos experimentales

Se describe la metodología aplicada para la sensibilización a ácaros del polvo y los tratamientos de los ratones TG EP2 y WT EP2.

◆ Reactivos y fármacos

Todos los fármacos y productos químicos utilizados para la sensibilización y tratamientos *in vivo* tenían la pureza y pH adecuados. Los ácaros del polvo (HDM) provenían de Alk-Abelló (Madrid, España) y se disolvieron en suero fisiológico salino de B. Braun (Melsungen, Alemania). Para la anestesia de gases se utilizó isoflurano de Esteve Veterinaria (Barcelona,

España). Finalmente se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) para disolver la prostaglandina E2 de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

◆ Animales de experimentación

Todos los experimentos definidos a continuación se han realizado con los ratones WT y TG EP2 generados mediante colaboración con el CBATEG descritos en el apartado 2.1.1. Los animales transgénicos (retrocruzamientos 10 y 11 a BALB/c) y *wild type* tenían entre 8 y 16 semanas de edad al inicio del estudio. Período de aclimatación durante una semana en racs ventilados de PANLAB (Barcelona, España) con un máximo de 6 animales por jaula.

Las condiciones ambientales de estabulación, el control diario y la legislación vigente aplicada para la protección de los animales utilizados en experimentación se han descrito en el apartado 2.1.2.

◆ Sensibilización a ácaros del polvo

Antes de la sensibilización de los ratones con ácaros del polvo el animal debía estar correctamente anestesiado para evitar su movimiento cuando se le administraba el alérgeno (muy importante para asegurar que llegara a vías respiratorias inferiores) y lo respirara con normalidad. Por ello se anestesiaron los ratones al 2.5% de isoflurano y al 2% de oxígeno hasta que se durmieron (máximo 2 minutos) (ver anexo 2.7). Posteriormente, para el mantenimiento se reguló el isoflurano al 2% y se empezaron las administraciones.

A continuación, los ratones se expusieron a un extracto purificado de HDM con un contenido bajo de polisacárido (LPS) (<0.5 EU/dosis, utilizando el *Endosafe Limulus Amebocyte Assay*, Charles River Laboratories, Wilmington, Estados Unidos). El alérgeno se administró por vía intranasal (i.n.) (ver anexo 2.1) en una dosis de 25µg/ratón/día en un volumen de 35µl durante 10 días consecutivos (día 0 al día 9) (Cates et al., 2004) (Figuras 24 y 25). Los grupos experimentales no sensibilizados fueron expuestos a las mismas condiciones de anestesia pero por vía i.n. recibieron 35µl de suero fisiológico salino.

◆ Tratamientos en ausencia y presencia de PGE2

Se realizaron dos experimentos en ratones sensibilizados a HDM para valorar por el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 y el tratamiento con PGE2 exógena.

a) Efecto de la sobreexpresión EP2 sin PGE2

Se evaluó el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 tras la sensibilización a ácaros del polvo en ratones WT y TG de las tres líneas preseleccionadas.

➤ Grupos experimentales

92 ratones transgénicos EP2 (*background* BABL/c) de las líneas L2, L3 y L4 distribuidos aleatoriamente en los siguientes 4 grupos experimentales (n=5-10) (Figura 24):

Línea L2

Grupo 1: Ratones WT L2 no sensibilizados (SF) (n=9)

Grupo 2: Ratones WT L2 sensibilizados con HDM (n=9)

Grupo 3: Ratones TG L2 no sensibilizados (SF) (n=6)

Grupo 4: Ratones TG L2 sensibilizados con HDM (n=6)

Línea L3

Grupo 1: Ratones WT L3 no sensibilizados (SF) (n=7)

Grupo 2: Ratones WT L3 sensibilizados con HDM (n=8)

Grupo 3: Ratones TG L3 no sensibilizados (SF) (n=5)

Grupo 4: Ratones TG L3 sensibilizados con HDM (n=6)

Línea L4

Grupo 1: Ratones WT L4 no sensibilizados (SF) (n=9)

Grupo 2: Ratones WT L4 sensibilizados con HDM (n=10)

Grupo 3: Ratones TG L4 no sensibilizados (SF) (n=8)

Grupo 4: Ratones TG L4 sensibilizados con HDM (n=9)

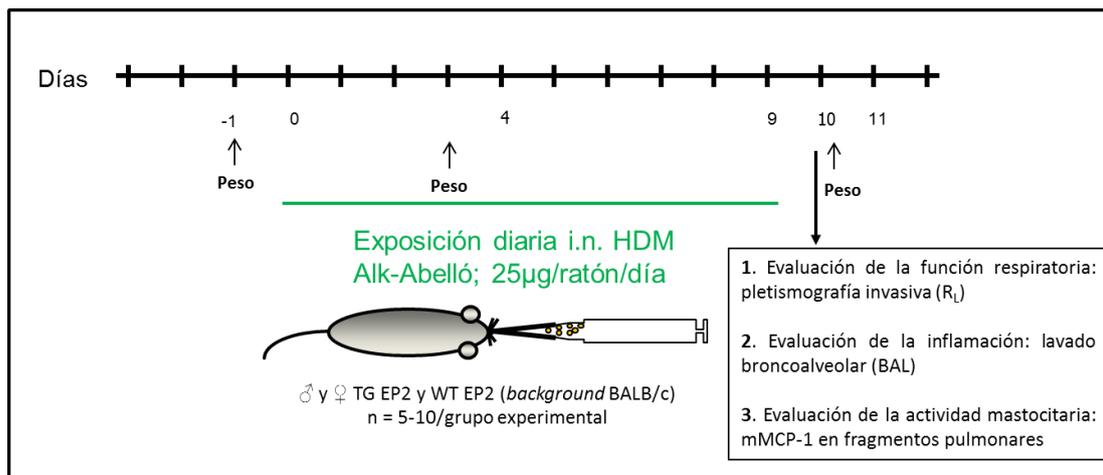


Figura 24. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario en las vías aéreas de animales transgénicos EP2 y wild type EP2. BAL (lavado broncoalveolar), BALB/c (cepa de ratón albino), HDM (ácaros del polvo), i.n. (intranasal), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), R_L (resistencia pulmonar), TG (*transgenic mice*), WT (*wild type*).

b) Efecto de la sobreexpresión EP2 con PGE2

El efecto del tratamiento con PGE2 exógena se evaluó en ratones WT y TG EP2 expuestos a aeroalérgenos.

➤ Grupos experimentales

35 ratones transgénicos EP2 (*background* BALB/c) de las líneas L3 y L4 distribuidos aleatoriamente en los siguientes 5 y 6 grupos experimentales (n=2-5) (Figura 25):

Línea L3

Grupo 1: Ratones WT L3 no sensibilizados (SF) y tratados con el vehículo (PBS) (n=5)

Grupo 2: Ratones WT L3 sensibilizados con HDM y tratados con el vehículo (PBS) (n=5)

Grupo 3: Ratones WT L3 sensibilizados con HDM y tratados con PGE2 (0.3mg/kg) (n=5)

Grupo 4: Ratones TG L3 no sensibilizados (SF) y tratados con el vehículo (PBS) (n=5)

Grupo 5: Ratones TG L3 sensibilizados con HDM y tratados con el vehículo (PBS) (n=5)

Grupo 6: Ratones TG L3 sensibilizados con HDM y tratados con PGE2 (0.3mg/kg) (n=5)

Línea L4

Grupo 1: Ratones WT L3 sensibilizados con HDM y tratados con el vehículo (PBS) (n=2)

Grupo 2: Ratones WT L3 sensibilizados con HDM y tratados con PGE2 (0.3mg/kg) (n=3)

Grupo 3: Ratones TG L3 no sensibilizados (SF) y tratados con el vehículo (PBS) (n=4)

Grupo 4: Ratones TG L3 sensibilizados con HDM y tratados con el vehículo (PBS) (n=4)

Grupo 5: Ratones TG L3 sensibilizados con HDM y tratados con PGE2 (0.3mg/kg) (n=4)

En el momento de la realización del experimento no se disponía de suficientes ratones WT L4 para repartirlos en todos los grupos experimentales, por ello, se repartieron 5 animales entre el grupo 1 (n=2) y grupo 2 (n=3). El grupo control de ratones no sensibilizados (SF) y tratados con vehículo (PBS) se descartó por falta de más ratones *wild type*.

➤ Tratamiento con PGE2 exógena

Antes del tratamiento de los ratones con PGE2 el animal debía estar correctamente anestesiado para evitar su movimiento cuando se le administraba el compuesto y lo respirara con normalidad. Por ello se anestesiaron los animales mediante el mismo protocolo que durante la “Sensibilización a ácaros del polvo”.

La solución de PGE2 se preparó diariamente en SF a partir de una solución stock 100mg/ml disuelta en 0.1% de DMSO. La PGE2 se administró por vía intranasal (ver anexo 2.1) en una dosis de 0.3mg/kg en un volumen de 35µl durante 6 días consecutivos (-1 al 4) 1 hora antes de la sensibilización con HDM. Este procedimiento se realizó a los grupos experimentales 3 y 6 (línea L3), y 2 y 5 (línea L4) (Figura 25). Los grupos 1, 2, 4 y 5 (línea L3) y 1, 3 y 4 (línea L4) fueron expuestos a las mismas condiciones de anestesia pero por vía intranasal recibieron 35µl de DMSO 0.1% disuelto en PBS 1 hora antes de la sensibilización con HDM, empezando un día antes de la sensibilización a HDM (día -1) hasta día 4 (Figura 25).

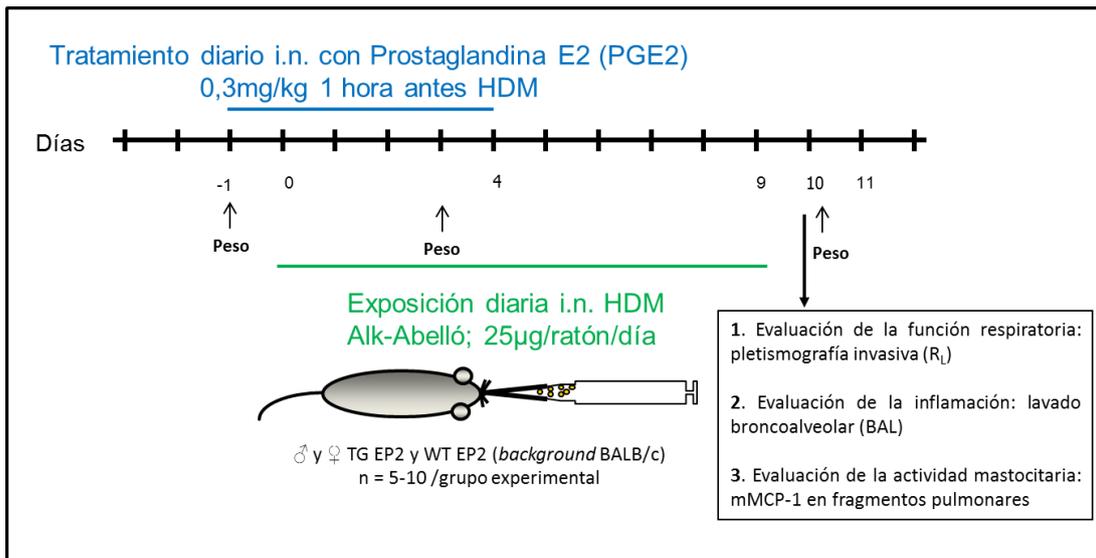


Figura 25. Esquema completo del procedimiento experimental para evaluar el efecto de la prostaglandina E₂ en las vías aéreas de animales transgénicos EP2 y wild type EP2. BAL (lavado broncoalveolar), BALB/c (cepa de ratón albino), HDM (ácaros del polvo), i.n. (intranasal), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), PGE₂ (prostaglandina E₂), R_L (resistencia pulmonar), TG (transgenic mice), WT (wild type).

2.3.2. Valoración del efecto de la sensibilización y de los tratamientos en la función respiratoria

A continuación se describen los métodos utilizados para valorar los parámetros representativos de la función respiratoria de las vías aéreas, así como la inflamación broncovascular y la actividad mastocitaria.

◆ Reactivos y fármacos

Todos los fármacos y productos químicos utilizados para evaluar la respuesta asmática (hiperreactividad bronquial, lavado broncoalveolar y actividad mastocitaria) tenían la pureza y pH adecuados para el análisis *in vivo* y *ex vivo*. La metacolina y el tampón fosfato para disolverla (PBS) provenían de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La anestesia se preparó mezclando Ketamina de Imalgene (Merial, Lion, Francia) y Xilacina de Laboratorios Calier (Barcelona, España) con suero fisiológico de B. Braun (Melsungen, Alemania). Para el lavado broncoalveolar se utilizó suero fetal bovino de Biowest (Nuaille, Francia) diluido en tampón fosfato (PBS; Sigma-Aldrich).

Para la solución de Turk el cristal violeta se compró en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y el ácido acético en Panreac Applichem (Barcelona, España). Las células inflamatorias del BAL se tiñeron con *Diff-Quick* se compró en Siemens Healthcare (Erlangen, Alemania). Tampón de lisis con inhibidores de las proteasas (*Mini Complete Tablet*) de Roche Diagnostics (Barcelona, España) mezclado con tampón HEPES de Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), con Tritón X-100 y fluoruro de fenilmetilfulfonilo (*phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) disuelto con isopropanol de Panreac Applichem (Barcelona, España). Para la determinación de proteína total el *Lowry*, el *Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent Working Solution* y la *Protein Standard Solution* se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

◆ Valoración del peso y del estado general de los ratones

Se registró el peso de los ratones mediante 3 medidas por animal a lo largo del procedimiento experimental: un día antes de la primera sensibilización con HDM (o vehículo), el día 3 coincidiendo con el periodo de sensibilizaciones y/o tratamiento con PGE2, y 24 horas después de la última sensibilización (día 10), es decir, antes de la evaluación de la función pulmonar y la recogida de muestras.

Para controlar el bienestar de los animales, los síntomas clínicos asociados al proceso respiratorio y las posibles reacciones adversas atribuibles al tratamiento con los fármacos se evaluó, diariamente, el estado general de los ratones mediante un protocolo estandarizado y aprobado por el Comité de Ética de los Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Barcelona (España) que incluye una evaluación del comportamiento, síntomas de sufrimiento, aspecto del pelaje, secreciones, disnea, postura, etc.

◆ Evaluación de la hiperreactividad bronquial (AHR)

24 horas después de la última exposición al alérgeno (HDM) o al vehículo (SF) se evaluó la reactividad de las vías aéreas a dosis crecientes de metacolina (PBS, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40mg/ml). La resistencia pulmonar se evaluó con un sistema de pletismografía invasiva de Buxco FinePointe (Buxco Europe LTd, Winchester, Reino Unido) en ratones anestesiados por vía intraperitoneal con una combinación de Ketamina a una dosis de 100mg/kg y de Xilacina a una dosis de 10mg/kg. Este método consiste en intubar al animal con una cánula intratraqueal (ver anexo 3.1), con el fin de medir directamente, mediante el pletismógrafo, la resistencia broncopulmonar al paso del aire. La tráquea del ratón se canuló con una aguja de calibre 18 y los

ratones fueron ventilados durante todo el procedimiento (volumen tidal: 12.5ml/kg; frecuencia: 120respiraciones/min; presión positiva: 2.5-3.0cm H₂O) (ver anexo 3.2). Después de 1 min de nebulización intratraqueal de la metacolina (agonista colinérgico con efecto broncoconstrictor) se registraron los cambios en la resistencia pulmonar (cmH₂O·s/ml) desde el valor basal. El proceso tiene una duración aproximada de 50 minutos.

◆ Evaluación de la inflamación broncovascular

Después de la medición de la AHR con pletismografía invasiva los animales tratados y no tratados se sacrificaron mediante exsanguinación vía punción intracardiaca (ver anexo 3.3). Una vez sacrificados los ratones, se realizó el lavado broncoalveolar (BAL) inyectando lentamente 0.3ml de PBS+2% SFB dos veces, y recuperándolo mediante una aspiración ligera (ver anexo 3.4). Se recogió un volumen de entre 350 y 550µl por aspiración. Para medir la intensidad del proceso inflamatorio, el BAL se tiñó con solución de Turk (0.01% de cristal violeta en 1% de ácido acético) y se realizó un conteo de células inflamatorias totales en la cámara de *Neubauer*. El *pellet* se resuspendió con PBS+2% de suero fetal bovino (SFB) de manera que la concentración final fue de 800.000 células en 1 ml. A continuación se obtuvieron muestras de las células inflamatorias de cada animal mediante una citocentrífuga (Shandon Cytospin, Thermo Electro Corporation, Cheshire, Reino Unido) y se realizó una tinción específica con *Diff-Quick* (ver anexo 4). Finalmente, se realizó un recuento diferencial de las poblaciones de células inflamatorias en las muestras contando 300 células por animal. Luego se determinó el porcentaje y el nombre relativo de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos en cada muestra. Por ejemplo, para los eosinófilos:

$$\% \text{ de eosinófilos} = \frac{\text{recuento de eosinófilos}}{\text{recuento total de células inflamatorias de la muestra } (\sim 300)} \times 100$$

$$\text{eosinófilos/ml} = \frac{\% \text{ de eosinófilos}}{\text{concentración celular total de la muestra (células/ml)}}$$

◆ Evaluación de la actividad mastocitaria

Con la finalidad de evaluar la cantidad de la proteasa específica de mastocitos de ratón mMCP-1 primero se realizó una extracción de proteína directamente del pulmón congelado del ratón. Se cuantificó la concentración de proteína total y se analizó la actividad mastocitaria con el ensayo de inmunoabsorción enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA).

➤ **Extracción de proteína total**

Para evaluar la actividad mastocitaria se obtuvo el lóbulo derecho del pulmón (ver anexo 3.5), de los ratones WT y TG EP2, congelado a -80°C. Se utilizó un tampón de lisis que contenía inhibidores de las proteasas (*Mini Complete Tablet*). Se añadieron 250µl de tampón de lisis (Tabla 7) a las muestras de tejido y se homogenizaron las soluciones con el politrón (*dispersing tool, DRIVE T8 12-18V, power supply unit 230V 50/60 Hz*, IKA®-WERKE GmbH & Co, Staufen, Alemania) durante 30-45 segundos en hielo. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 20 minutos. A continuación, el homogenado se centrifugó a 14.000rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogieron los sobrenadantes con el extracto proteico en un nuevo tubo, eliminando el *pellet* con las restas celulares. El sobrenadante se mantuvo congelado a -80°C hasta el momento de analizar la concentración proteica.

➤ **Determinación de la concentración de proteína total**

Para cargar la misma cantidad de proteína en el ELISA posterior, la concentración de proteína total presente en los extractos pulmonares se cuantificó utilizando el método de *Lowry* (ver apartado 2.1.2). Las muestras se analizaron en una dilución $1/200$ en agua destilada.

➤ **Ensayo específico de mMCP-1 de ratón**

Se recuperaron los sobrenadantes para analizar los niveles de la proteasa 1 específica de los mastocitos en el ratón (*mouse mast cell protease 1*, mMCP-1) utilizando un ensayo específico (*Mouse MCPT-1, mMCP-1, ELISA Ready-SET-Go*, BD ebioscience, San José, CA, USA). Los resultados se normalizaron por la concentración de proteína total en cada una de las muestras analizadas.

$$\text{pg de mMCP} - 1 / \mu\text{g de proteína total} = \frac{\text{concentración de mMCP} - 1 \text{ (pg/ml)}}{\text{concentración de proteína total (}\mu\text{g/ml)}}$$

2.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante la prueba T-Student con el Sigma-Plot versión 10.0 (Systat Software Inc., San José, CA, USA) y el test de ANOVA y el de Mann-Whitney con el Prism versión 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Las diferencias observadas en los ensayos funcionales de los cultivos celulares, respecto a la degranulación mastocitaria de β -hexosaminidasa, y también entre los grupos experimentales *in vivo*, en el recuento diferencial, en la inflamación pulmonar total y en la cantidad de mMCP-1 (actividad mastocitaria) se compararon con la T-Student (*2-tailed Student's t test*). Para los parámetros mecánicos de hiperreactividad bronquial se realizaron las pruebas ANOVA de dos factores con la corrección posterior de la prueba de Bonferroni (test *Post Hoc* de comparaciones múltiples). Las diferencias en la expresión proteica se evaluaron mediante el test estadístico no paramétrico Mann-Whitney U entre los ratones WT y TG. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

Los resultados de la expresión proteica se representan como la mediana y los percentiles de 25 a 75. Las representaciones gráficas de los resultados, tanto en formato curva como en diagrama de barras incluidas en la sección de resultados, recogen la media y el error estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM) de todos los valores obtenidos.

3. RESULTADOS COMENTADOS

3.1. Desarrollo de ratones transgénicos con sobreexpresión EP2

3.1.1. Generación de los ratones transgénicos EP2

Se generaron ratones transgénicos que sobreexpresasen el receptor EP2 selectivamente en los mastocitos. Se creó el constructo transgénico (Figura 23) (ver apartado 2.1.2) con la secuencia correspondiente al cDNA del gen EP2 junto a la señal Poly-A del SV-40. Se optimizaron los codones para aumentar la expresión. Seguidamente, se microinyectó el constructo en las hembras y se generaron los ratones fundadores (F0).

Se obtuvieron diversas líneas F0 y F1. Para determinar qué animales habían incorporado el transgen se realizaron *Southern Blots* de la F0 y de F1. La figura 26 representa las imágenes de autorradiografías tras la hibridación de la sonda radiactiva sobre la membrana de ensayo del *Southern* en los fundadores (F0) (Figura 26A) y la primera generación (F1) (Figura 26B). A partir del análisis de expresión del ADN diana se preseleccionaron los ratones que sobreexpresaban el transgen de EP2. Esto permitió la selección de las líneas L2, L3, L4.

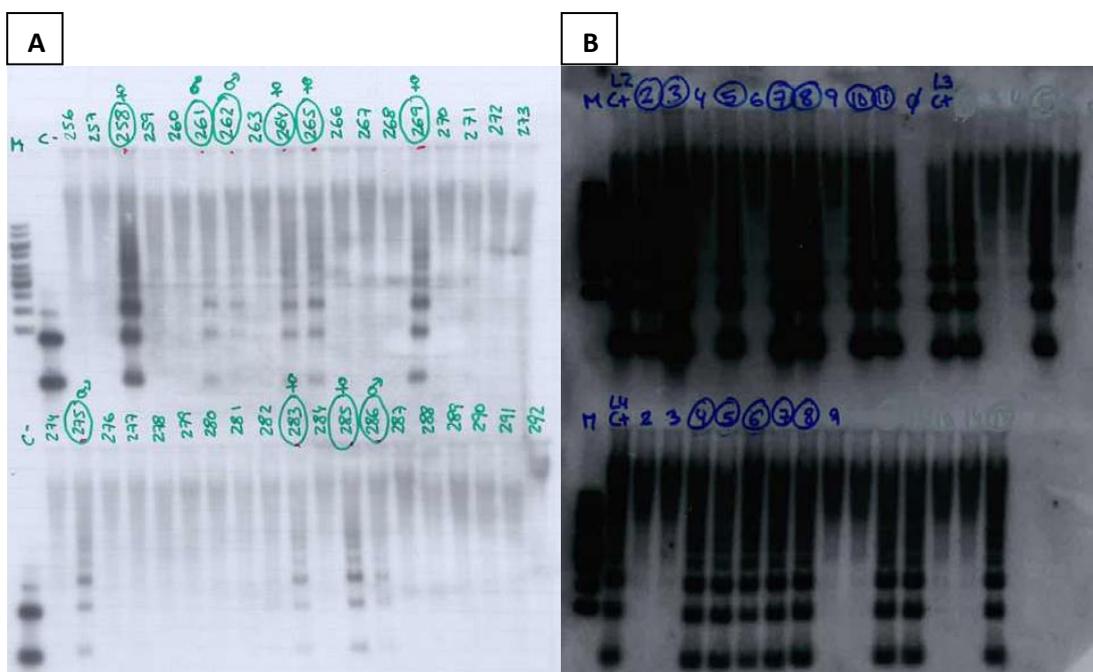


Figura 26. Imagen de la autorradiografía obtenida de la hibridación de la sonda radioactiva sobre la membrana del ensayo de Southern Blot en la F0 (A) y en F1 (B). Se extrae ADN de los ratones y se digiere con una endonucleasa de restricción específica (Hind III), los fragmentos de ADN restantes se separaron según su tamaño mediante una electroforesis en gel de agarosa, hibridación del fragmento de restricción concreto del ADN con la sonda que contiene el constructo transgénico y detección de la hibridación de la sonda radioactiva sobre la membrana del Southern Blot. F0 (fundadores), F1 (filial 1 o primera generación).

Mediante una PCR específica en la F1 de las líneas escogidas (L2, L3 y L4) se analizó nuevamente la sobreexpresión del transgen (no se muestran los datos). Los resultados de la PCR y del *Southern Blot* coincidieron.

Se iniciaron los retrocruzamientos con BALB/c para conseguir un *background* genético de al menos un 95% de esta cepa. La cepa BALB/c es la más indicada para el estudio del asma alérgica debido a la predisposición genética a presentar un fenotipo atópico y a la capacidad de desarrollar una respuesta de hipersensibilidad tipo I. Los ratones BALB/c sensibilizados desarrollan una mayor hiperreactividad bronquial (Brewer et al., 1999; Herz et al., 1998), generan 4 veces más IgE total e IgE específica (Herz et al., 1998) y contienen más células y una mayor concentración de citocinas en el BAL (Brewer et al., 1999; Herz et al., 1998) que los ratones C57BL/6 (cepa *background* de los ratones modificados genéticamente). Por lo tanto se lograron generar varias líneas de ratones que sobreexpresaban el receptor EP2 (cepa BALB/c), un sistema biológico muy útil para posibles estudios del mecanismo protector. Sin embargo, había que determinar el impacto funcional de dicha sobreexpresión.

3.1.2. Selección de los ratones transgénicos que sobreexpresan EP2

Después de 7 retrocruzamientos a BALB/c se analizó, mediante técnicas específicas de detección, la sobreexpresión del receptor EP2. Los ratones WT y TG de las tres líneas preseleccionadas se utilizaron para evaluar no sólo *in vitro*, si no también *in vivo* el impacto del transgen en el desarrollo de la patología respiratoria.

La sobreexpresión de EP2 se analizó en cultivos primarios (PDMC y LMC) y directamente en tejido pulmonar de ratón.

a) Análisis de la expresión de EP2 en LMC y PDMC

Se cultivaron mastocitos pulmonares y peritoneales de ratones WT y TG de las líneas L2, L3 y L4 durante 3 semanas con los factores de crecimiento específicos (SCF y IL-3). Primero se analizó la concentración de proteína total en LMC y PDMC. En las tablas 10 y 11 se representa el recuento de células total, el % de viabilidad, el % de mastocitos y la concentración de proteína total de cada cultivo de LMC (Tabla 10) y PDMC (Tabla 11). Mientras que la viabilidad y la pureza en mastocitos pulmonares fue de $86.94 \pm 2.523\%$ y $92.88 \pm 2.479\%$ [n=10] respectivamente, en mastocitos peritoneales fue de $73.67 \pm 7.75\%$ y $78.1 \pm 9.96\%$ [n=3]. Al comparar el % de pureza de mastocitos entre cultivos que provienen de ratones WT y TG no se encontraron diferencias en LMC. Finalmente, aunque la cantidad de células total en LMC era de $3.99 \cdot 10^6 \pm 6.03 \cdot 10^5$ CT y en PDMC de $2.767 \cdot 10^6 \pm 7.173 \cdot 10^5$ CT, la concentración de proteína total

fue insuficiente (LMC: 2493.535 ± 533.165 pg/ml [n=10] y PDMC: 2556.917 ± 987.267 pg/ml [n=3]) para la detección posterior de EP2 mediante *Western Blot* (no se muestran resultados). Por lo tanto, decidimos detectar expresión de EP2 directamente a partir de tejido pulmonar de ratones WT o TG.

Tabla 10. La tabla resume el recuento de células total, porcentaje de viabilidad, porcentaje de pureza de mastocitos y concentración de proteína total en cultivos de mastocitos pulmonares (LMC) en la cuarta semana de cultivo de las líneas transgénicas L2, L3 y L4. Recuento de células total (azul de tripano) y de mastocitos (kimura) con la cámara de Neubauer. Cálculos de los porcentajes de viabilidad y de pureza de mastocitos. Determinación de la concentración de proteína total por el método *Lowry* y *Folin&Ciocalteu's*. Se expresa la media \pm SEM. CT (células total), LMC (mastocitos pulmonares de ratón), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), WT (*wild type*).

Muestra	Recuento de células totales (CT)	% Viabilidad	% Pureza de Mastocitos	Proteína total [pg/ml]
LMC L2 WT	$3.3 \cdot 10^6$ CT	71.6%	100%	3565.56 pg/ml
LMC L2 TG	$2.3 \cdot 10^6$ CT	74.2%	100%	4481.64 pg/ml
LMC L3 WT	$2.8 \cdot 10^6$ CT	96%	94%	2371.76 pg/ml
LMC L3 WT	$4.8 \cdot 10^6$ CT	84%	75%	1440.16 pg/ml
LMC L3 TG	$5.8 \cdot 10^6$ CT	90%	86%	3026.7 pg/ml
LMC L3 TG	$1.4 \cdot 10^6$ CT	91.3%	92%	1855.56 pg/ml
LMC L3 TG	$4.7 \cdot 10^6$ CT	90.1%	97%	1314.27 pg/ml
LMC L4 WT	$6 \cdot 10^6$ CT	89%	98%	1090.49 pg/ml
LMC L4 TG	$1.9 \cdot 10^6$ CT	92.2%	89%	1960.37 pg/ml
LMC L4 TG	$6.9 \cdot 10^6$ CT	91%	97.8%	1614.92 pg/ml
Media \pm SEM	$3.99 \cdot 10^6 \pm 6.03 \cdot 10^5$	86.94 ± 2.523	92.88 ± 2.479	2493.535 ± 533.165

Tabla 11. La tabla resume el recuento de células total, porcentaje de viabilidad, porcentaje de pureza de mastocitos y concentración de proteína total en cultivos de mastocitos peritoneales (PDMC) en la cuarta semana de cultivo de las líneas transgénicas L2 y L3. Recuento de células total (azul de tripano) y de mastocitos (kimura) con la cámara de Neubauer. Cálculos de los porcentajes de viabilidad y de pureza de mastocitos. Determinación de la concentración de proteína total por el método *Lowry* y *Folin&Ciocaltean's*. Se expresa la media±SEM. CT (células total), PDMC (mastocitos peritoneales de ratón), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), WT (*wild type*).

Muestra	Recuento de células totales (CT)	% Viabilidad	% Pureza de Mastocitos	Proteína total [pg/ml]
PDMC L2 WT	4.2·10 ⁶ CT	68%	61%	4531.38pg/ml
PDMC L3 WT	2.1·10 ⁶ CT	89%	77.8%	1584.19pg/ml
PDMC L3 TG	2·10 ⁶ CT	64%	95.5%	1555.17pg/ml
Media±SEM	2.767·10 ⁶ ±7.173·10 ⁵	73.67±7.75	78.10 ± 9.96	2556.917±987.267

b) Análisis de la expresión de EP2 en tejido pulmonar

A causa de la dificultad para detectar EP2 en cultivos celulares primarios, se decidió detectar expresión basal directamente a partir de tejido pulmonar.

Se realizaron tres experimentos por separado con muestras de pulmones de ratones *wild type* y transgénicos EP2 de la línea L3 y L4. La tabla 12 representa la concentración de proteína total directamente en tejido pulmonar de ratones WT y TG, cuya cantidad proteica es mayor al compararse con LMC y PDMC (66157.562±5814.722pg/ml [n=28] versus 2493.535±533.165pg/ml [n=10], p<0.05 y 66157.562±5814.722pg/ml [n=28] versus 2556.917±987.267pg/ml [n=3], p<0.01) (Tabla 12 versus tablas 10 y 11).

Tabla 12. La tabla resume la concentración de proteína total en fragmentos de tejido pulmonar de las líneas de ratones transgénicos L2 y L3. Determinación de la concentración de proteína total por el método *Lowry* y *Folin&Ciocalteu's*. La tabla muestra tres experimentos hechos por separado, experimento 1 [n=8], experimento 2 [n=8] y experimento 3 [n=12]. Se expresa la media±SEM. SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*) WT (*wild type*).

Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
Muestra	Proteína total [pg/ml]	Muestra	Proteína total [pg/ml]	Muestra	Proteína total [pg/ml]
L3 WT 1	14181.16	L4 WT 1	42058.16	L3 WT 5	98378.15
L3 WT 2	25371.64	L4 WT 2	50922.11	L3 WT 6	103787.20
L3 WT 3	23648.10	L4 WT 3	75192.85	L3 WT 7	27187.74
L3 WT 4	16048.03	L4 WT 4	65305.46	L3 WT 8	106317.60
				L3 WT 9	31000.71
				L3 WT10	73477.25
L3 TG 1	26703.66	L4 TG 1	67513.39	L3 TG 5	42692.37
L3 TG 2	57210.57	L4 TG 2	88696.36	L3 TG 6	79545.21
L3 TG 3	70105.54	L4 TG 3	78731.76	L3 TG 7	89620.98
L3 TG 4	79120.42	L4 TG 4	51704.78	L3 TG 8	108357.97
				L3 TG 9	3780.51
				L3 TG10	87752.07
Media±SEM [n=28]			60157.52±5814.722pg/ml		

Se determinó entonces la expresión de EP2 mediante *Western Blot* (WB), donde las proteínas de los fragmentos que procedían del tejido pulmonar se detectaron por unión con anticuerpos específicos. La figura 27 muestra una imagen representativa del WB del receptor prostanoide 2 de la PGE2 (EP2) (Figura 27A), de la carboxipeptidasa A3 (CPA3) (Figura 27B) y de la β -actina (Figura 27C).

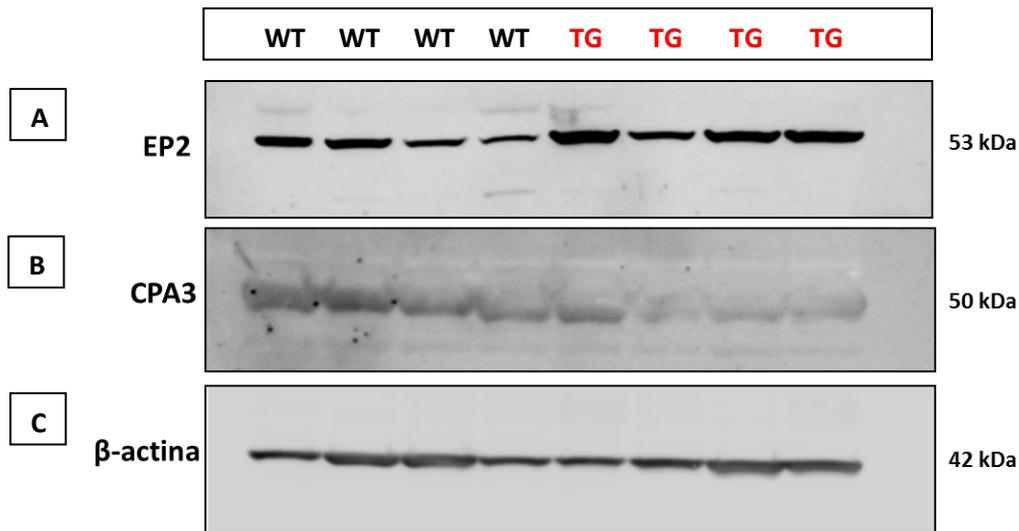


Figura 27. Expresión basal del receptor EP2 de la PGE₂, de la CPA3 y de β -actina en fragmentos pulmonares de ratones WT y TG de la línea L3. Imagen representativa de un Western Blot específico con anti-EP2, anti-carboxipeptidasa A y anti- β -actina. **(A)** Rabbit polyclonal Antibody EP2, **(B)** Rabbit polyclonal Anti-CPA3 y **(C)** Mouse monoclonal Anti- β -Actin incubados ON a 4°C. Incubación con anticuerpo secundario *anti-rabbit* o *anti-mouse* durante 2 horas a temperatura ambiente. La banda quimioluminiscente se visualizó utilizando el kit comercial *Supersignal West Pico* y se detectó con la cámara *System LAS 3000*. La imagen representa muestras de ratones WT (n=4) y TG (n=4). CPA3 (carboxipeptidasa A3), EP2 (receptor prostanoide 2 de la prostaglandina E2), TG (*transgenic mice*), WT (*wild type*).

Por último en la figura 28 se representa la expresión de EP2 como el ratio respecto a CPA3. Tanto el EP2 como el CPA3 se normalizaron antes por la expresión de β -actina detectada en cada muestra. La expresión de EP2 en ratones TG fue significativamente mayor respecto a los WT en dos experimentos independientes (Figura 28A y 28B). En cambio, en el tercer experimento no se observaron diferencias en la expresión basal de EP2 (Figura 28C).

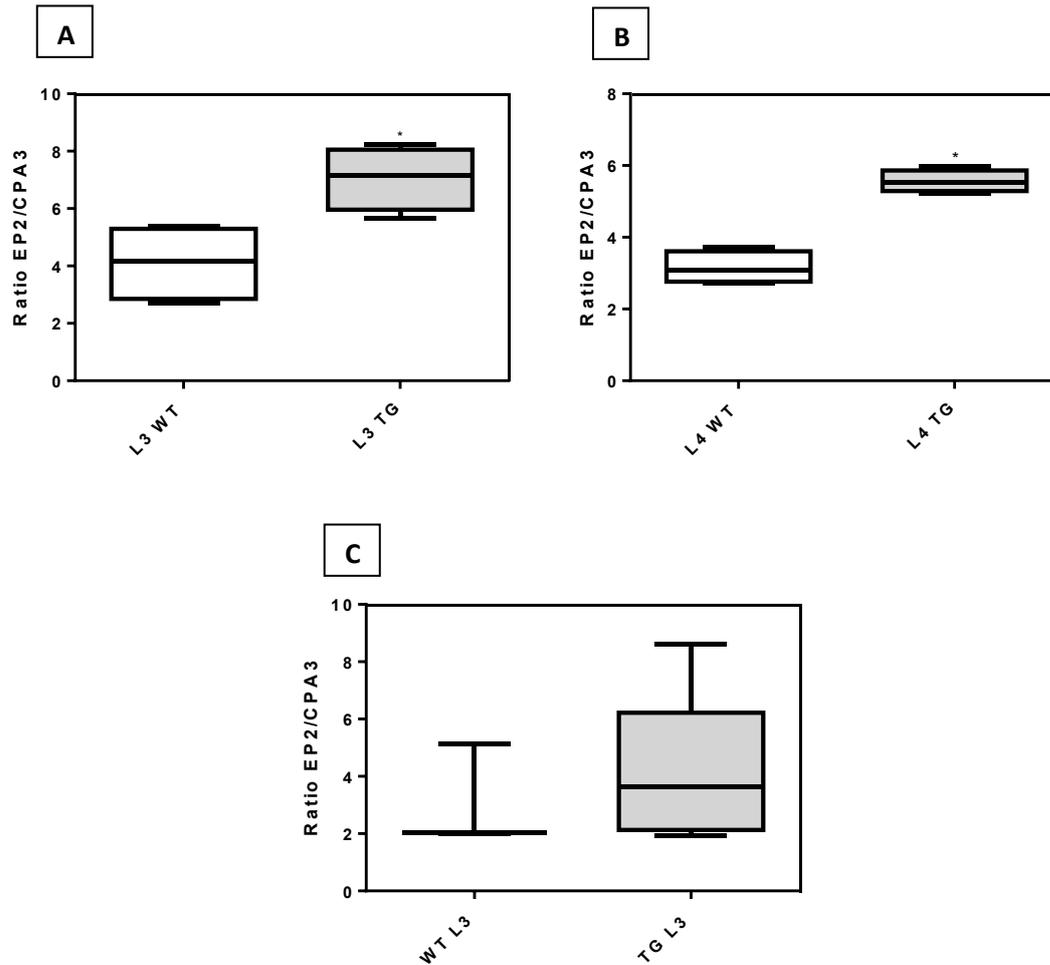


Figura 28. Expresión basal del receptor EP2 de la PGE2 en fragmentos pulmonares de ratones WT y TG. Análisis densitométrico de la expresión de EP2 respecto a CPA3, ambos normalizados por la proteína constitutiva β -actina en muestras pulmonares de ratones de la línea L3 (A), de la línea L4 (B) y de nuevo en L3 (C). Cuantificación de la intensidad de las bandas con el *Fujifilm Image Gauge v 4.0 Software*. Se expresa la mediana y los percentiles de 25 a 75 del ratio EP2/CPA3 (A: n=4 WT, n=4 TG; B: n=4 WT, n=4 TG, C: n=3 WT, n=5 TG). (*Pvalor<0.05). CPA3 (carboxipeptidasa A3), EP2 (receptor prostanoid 2 de la prostaglandina E2), TG (*transgenic mice*), WT (*wild type*).

En los cultivos primarios de mastocitos pulmonares y peritoneales de ratones WT y TG no pudimos detectar diferencias en la expresión basal de EP2 mediante WB específico, probablemente debido a la baja cantidad de proteína total cargada en los *Western Blot*. Luego se decidió detectar EP2 directamente en fragmentos pulmonares. Se realizaron tres experimentos por separado con ratones de la línea L3 y L4 y se observó una mayor expresión de EP2 en los ratones TG en dos de ellos. Los resultados obtenidos se normalizaron por la proteína constitutiva β -actina que se utilizó como control positivo, y también por la proteasa específica de mastocitos, carboxipeptidasa A3. CPA3 se encuentra en los gránulos citoplasmáticos y se

libera tras la activación mastocitaria mediante la unión de la IgE al alérgeno u otros estímulos (Caughey, 2007; Pejler et al., 2007). Por lo tanto, nos permite determinar la expresión relativa de EP2 específicamente en los mastocitos.

La confirmación de la generación de los transgénicos de EP2 en mastocitos requiere de nuevos estudios, no solo, en más animales de las tres líneas preseleccionadas, si no también en otros órganos donde se exprese EP2 (p. ej. intestino, riñón, cerebro). Sin embargo, éstos primeros resultados nos muestran, en parte, lo esperado. Se trata de un procedimiento complejo que obligará al aislamiento de la población pulmonar de los mastocitos en cantidad suficiente, y al análisis de otros receptores prostanoideos para determinar el impacto que puede tener la inserción del transgen en los embriones. A pesar de la necesidad de aportar pruebas genéticas más sólidas se decidió realizar estudios funcionales preliminares.

3.2. Evaluar preliminarmente el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario in vitro

Se evaluó la modulación del receptor EP2 mediante agonistas y antagonistas en cultivos mastocitarios *in vitro* procedentes de ratones con y sin sobreexpresión EP2.

3.2.1. Efecto del agonista EP2 butaprost y de la PGE2 en cultivos primarios peritoneales de ratones WT y TG

En el siguiente abordaje experimental *in vitro* se determinó el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 en la degranulación mastocitaria de PDMC pre-incubadas con concentraciones crecientes de butaprost. Se comparó también el efecto del butaprost con una estimulación no selectiva mediante PGE2 entre cultivos TG y WT.

En retrocruzamiento 7 se cultivaron PDMC de ratones WT y TG a partir de lavados peritoneales. La figura 29 representa el efecto sobre la actividad mastocitaria de concentraciones crecientes de butaprost en un cultivo de ratones WT y otro de TG de la línea L2. En PDMC procedentes de ratones WT se observa una inhibición dosis dependiente por parte del butaprost (10^{-6} M: 24.19%, $3 \cdot 10^{-6}$ M: 44.98%, 10^{-5} M: 78.22, $3 \cdot 10^{-5}$ M: 86.36%) mientras que en PDMC de ratones TG se inhibe la degranulación mastocitaria a partir de una dosis de 10^{-5} M (72.17%). Por ello, se necesita una concentración 10 veces mayor de agonista EP2 para observar una inhibición en el cultivo primario de mastocitos con sobreexpresión EP2. Sin embargo, la degranulación se

inhibió completamente (100%) con la dosis más alta evaluada ($3 \cdot 10^{-5}M$) en TG, mientras que en cultivos de ratones WT se alcanzó un 86.36%.

Puesto que las concentraciones de $10^{-6}M$ y $3 \cdot 10^{-6}M$ de butaprost no afectaron a la degranulación en PDMC de ratones TG, se utilizó una concentración de $10^{-5}M$ de butaprost y PGE2 en el siguiente ensayo de liberación de β -hexosaminidasa realizado en cultivos primarios de mastocitos peritoneales de ratones con y sin sobreexpresión EP2 de la línea L2. El efecto inhibitorio de butaprost ($10^{-5}M$) fue similar en ambos cultivos (78.22% en WT versus 72.17% en TG) (Figura 29).

En la figura 30 se muestra el efecto del butaprost y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria. Por un lado el agonismo selectivo EP2 en PDMC WT tiende a disminuir la liberación de β -hexosaminidasa $\sim 30\%$, mientras que en PDMC TG disminuye significativamente más $\sim 60\%$. En cambio, la PGE2 aumenta la liberación en ambos cultivos (WT: 258.56% y TG: 167.25%), lo cual puede ser atribuible a modificaciones en la expresión relativa de los otros receptores prostanoideos (EP) al incorporar el transgen de EP2. Por lo que el efecto inhibitorio del butaprost es el doble en los mastocitos que sobreexpresan EP2.

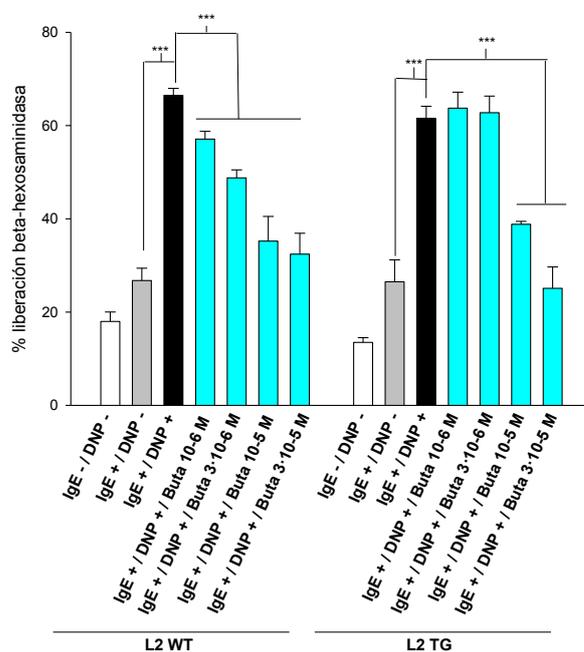


Figura 29. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratón de la línea L2. Se observa el efecto de concentraciones crecientes de butaprost, pre-incubadas durante 30 minutos, en la liberación de β -hexosaminidasa. Los resultados representan 2 experimentos hechos por triplicado. Se expresa la media \pm SEM. (***)Pvalor < 0.001. Buta (butaprost), DNP (dinitrofenil), IgE (inmunoglobulina E), PDMC (mastocitos peritoneales de ratón), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), WT (*wild type*).

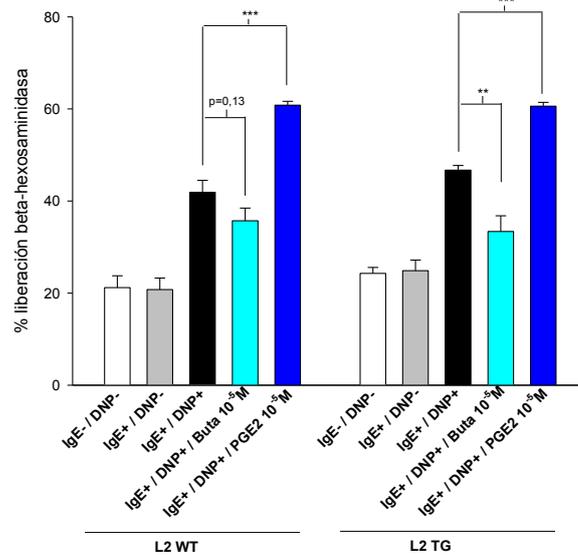


Figura 30. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratón de la línea L2. En la figura se observa el efecto del butaprost y de la PGE2, pre-incubados durante 30 minutos, en la liberación de β-hexosaminidasa. Los resultados representan 2 experimentos hechos por triplicado. Se expresa la media ± SEM. (**Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). Buta (butaprost), DNP (dinitrofenil), IgE (inmunoglobulina E), PDMC (mastocitos peritoneales de ratón), PGE2 (prostaglandina E2), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), WT (*wild type*).

Estos datos preliminares no permiten sacar conclusiones respecto al efecto de la sobreexpresión de EP2. A alguna concentración se podría apuntar hacia un impacto funcional resultante de la sobreexpresión del EP2 mastocitario, pero se requiere de nuevos experimentos.

3.2.2. Efecto del agonista EP2 butaprost, del antagonista AH6809 y de la PGE2 en cultivos primarios pulmonares de ratones WT y TG

Asimismo se utilizaron cultivos primarios pulmonares (LMC) para evaluar no sólo el efecto de dicha sobreexpresión en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI, si no también el agonismo y antagonismo sobre el receptor EP2.

En la figura 31 se representa el efecto del butaprost, del AH6809 y de la PGE2, en LMC de ratones WT y TG de dos líneas preseleccionadas L2 y L3 de ratones que sobreexpresaban EP2. La estimulación inmunológica mediada por IgE desencadenó una liberación de β-hexosaminidasa distinta entre los WT y los TG. En las dos líneas L2 y L3, las LMC que procedían de ratones TG mostraron una activación menor (L2: 28.94% y L3: 24.93%) al

compararlas con WT (L2: 38.04% y L3: 40.74%). Tras la incubación con butaprost en el cultivo L2 TG la degranulación mastocitaria se inhibió un 100%, en cambio, en L2 WT la inhibición fue solamente de un 30.68%. Por lo que respecta a la línea L3, una estimulación selectiva sobre el receptor EP2 no mostró ningún efecto sobre la degranulación mastocitaria en ninguno de los dos cultivos. Al evaluar la acción del antagonista AH6809, no se observó un efecto significativo en ninguno de los cultivos, exceptuando una tendencia a disminuir la liberación de β -hexosaminidasa en las LMC de ratones WT de la L2 (30.68%, $p=0.08$). Por último, la PGE2 aumentó la degranulación mastocitaria de manera significativa en LMC de L2 TG, L3 WT y L3 TG (L2WT: 255.6%; L3 TG: 237.80%; L3TG: 627.34%), mientras que en L2 TG se observó una tendencia (235.83%, $p=0.06$).

De forma que, en los cultivos pulmonares procedentes de ratones transgénicos la actividad mastocitaria es menor tras la estimulación inmunológica mediada por la IgE. Por lo que respecta al agonismo EP2, butaprost ejerce un efecto inhibitorio mayor en los cultivos de mastocitos pulmonares que provienen de ratones con sobreexpresión EP2 (Línea L2). En cuanto al antagonista, no se muestran diferencias significativas en ninguno de los cultivos evaluados, mientras que la PGE2 aumenta la degranulación >200% en todos ellos.

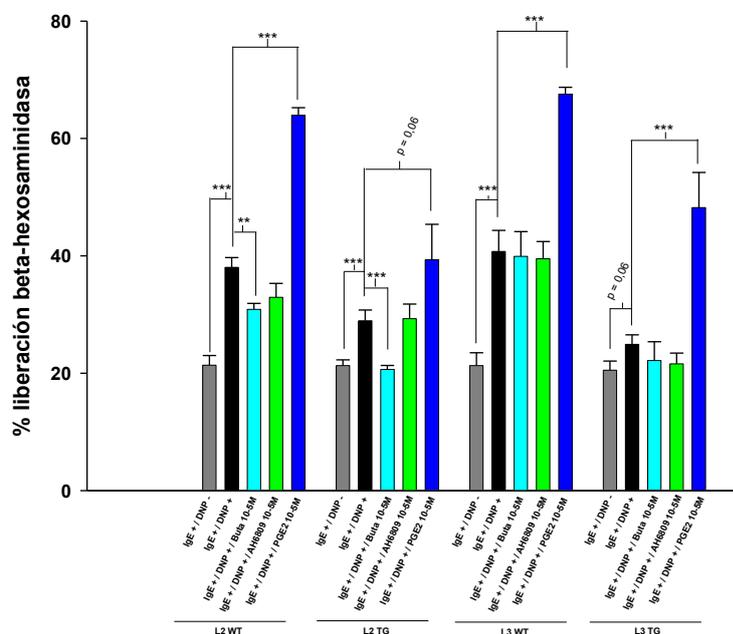


Figura 31. Efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, del antagonista EP1/EP2 AH6809 y de la PGE2 en la degranulación mastocitaria inducida por Fc ϵ RI en LMC de ratón de las líneas L2 y L3. En la figura se observa el efecto del butaprost, AH6809 y la PGE2, pre-incubados durante 30 minutos o 1 hora, en la liberación de β -hexosaminidasa. Los resultados representan 2 experimentos hechos por triplicado. Se expresa la media \pm SEM. (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). AH6809 (antagonista EP1/EP2), Buta (butaprost), DNP (dinitrofenil), IgE (inmunoglobulina E), LMC (mastocitos pulmonares de ratón), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), WT (*wild type*).

El estudio con concentraciones crecientes del agonista selectivo EP2 en cultivos peritoneales de tanto ratones WT como TG permitió también seleccionar una concentración eficaz de butaprost en ambos cultivos para los estudios posteriores. En los siguientes experimentos *in vitro* se observó una inhibición por parte del agonismo EP2 en ambas poblaciones mastocitarias, resultados que también se observaron en ratones de la cepa BALB/c no modificados genéticamente del Subproyecto 1 (Figura 13 y 14). Analizando el efecto de PGE₂, agonista no selectivo de los receptores EP, vimos que la activación mastocitaria aumentó, como ya se ha comentado probablemente debido a su acción sobre receptores EP3. Ahora bien, a diferencia de lo observado con el antagonista AH6809 en LMC de ratones BALB/c (Figura 20), en los ensayos funcionales *in vitro* de ratones WT y TG EP2 una concentración de 10⁻⁵M no aumentó de manera significativa la degranulación en ningún cultivo. Por lo tanto, aunque para confirmar diferencias serán necesarios experimentos adicionales *in vitro* con concentraciones crecientes de agonistas y antagonistas, y también, cultivos mastocitarios procedentes de ratones en retrocruzamientos más avanzados con BALB/c, se observan indicios (en PDMC) de una disminución de la actividad mastocitaria ante una sobreexpresión del EP2.

3.3. Evaluar preliminarmente el efecto de la sobreexpresión del EP2 mastocitario en la reactividad respiratoria en un modelo de asma en ratón

Finalmente, en modelos de exposición a aeroalérgenos, no solo se estudió el efecto de la sobreexpresión EP2 en la patología asmática, si no también la influencia de la administración de PGE₂ exógena.

3.3.1. Efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 en la respuesta de las vías aéreas de ratones expuestos a HDM

En los ratones expuestos intranasalmente a aeroalérgenos (Figura 24) se evaluó el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario en el desarrollo de las características del asma tras una sensibilización a ácaros del polvo.

a) Efecto de la sobreexpresión EP2 en la actividad mastocitaria

Se determinó como afectaba la exposición a HDM en la actividad mastocitaria. En la figura 32 se representa la producción local de mMCP-1 en tejido pulmonar respecto a la concentración de

proteína total en ratones WT y TG con sobreexpresión EP2. La sensibilización a ácaros del polvo incrementó significativamente la actividad mastocitaria más de 9 veces en los animales WT (*L3*: incremento de 9.6 veces; *L4*: incremento de 11.3 veces) y en los TG (*L3*: incremento de 14.8 veces; *L4*: incremento de 10.9 veces).

No se detectó una menor actividad mastocitaria atribuible a la presencia de más receptores EP2 tras sensibilizar los ratones a ácaros del polvo. Es posible que el efecto protector de la PGE2 endógena sea ya máximo en los WT. Por lo cual, se estudiaron también las consecuencias de la exposición a PGE2 exógena.

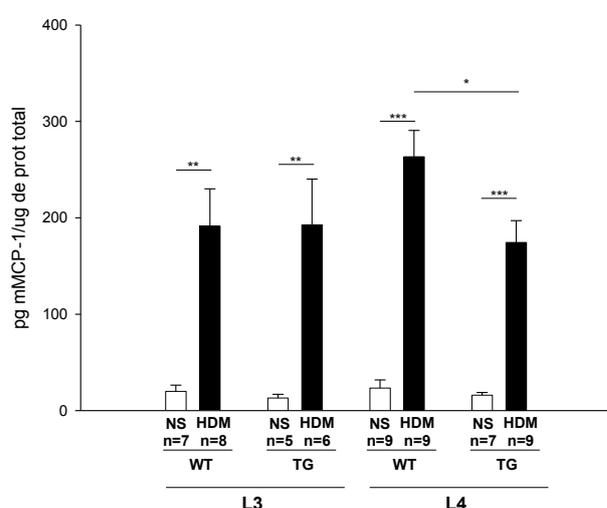


Figura 32. Actividad mastocitaria en ratones WT y TG con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM de la línea L3 y L4. Determinación de la producción local de la proteína mMCP-1 en pulmones de ratones sensibilizados y no sensibilizados a HDM. Los resultados se normalizaron por la concentración de proteína total en las muestras de pulmón. Se expresa la media \pm SEM (n=6-9/grupo experimental). (*Pvalor<0.05; ***Pvalor<0.001). HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), WT (*wild type*).

b) Efecto de la sobreexpresión EP2 en la inflamación broncovascular

A continuación se evaluó el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 en la inflamación broncovascular. 24 horas después de la última sensibilización a ácaros del polvo se realizó el BAL tanto a los ratones WT como a los TG y se compararon los resultados.

En la figura 33 se muestra el recuento diferencial de eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en las vías aéreas. Como es esperable la sensibilización a ácaros del polvo incrementó el reclutamiento de eosinófilos en los ratones WT. El aumento fue aproximadamente de 40 veces en la L2 (Figura 33A), más de 60 veces en la L3 (Figura 33B) y 20 veces en la L4 (Figura

33C). En los ratones TG que sobreexpresaban EP2 se observó también un aumento de la eosinofilia de 30 veces en la L2 (Figura 33A), 6 veces en la L3 (Figura 33B) y 25 veces en la L4 (Figura 33C) tras la exposición a HDM. Esta sobreexpresión de eosinófilos solo fue claramente menor a los WT en caso de la L3, por lo tanto, solamente en la L3 parece que pudiera existir un efecto endógeno protector debido a la posible sobreexpresión de EP2 en los mastocitos.

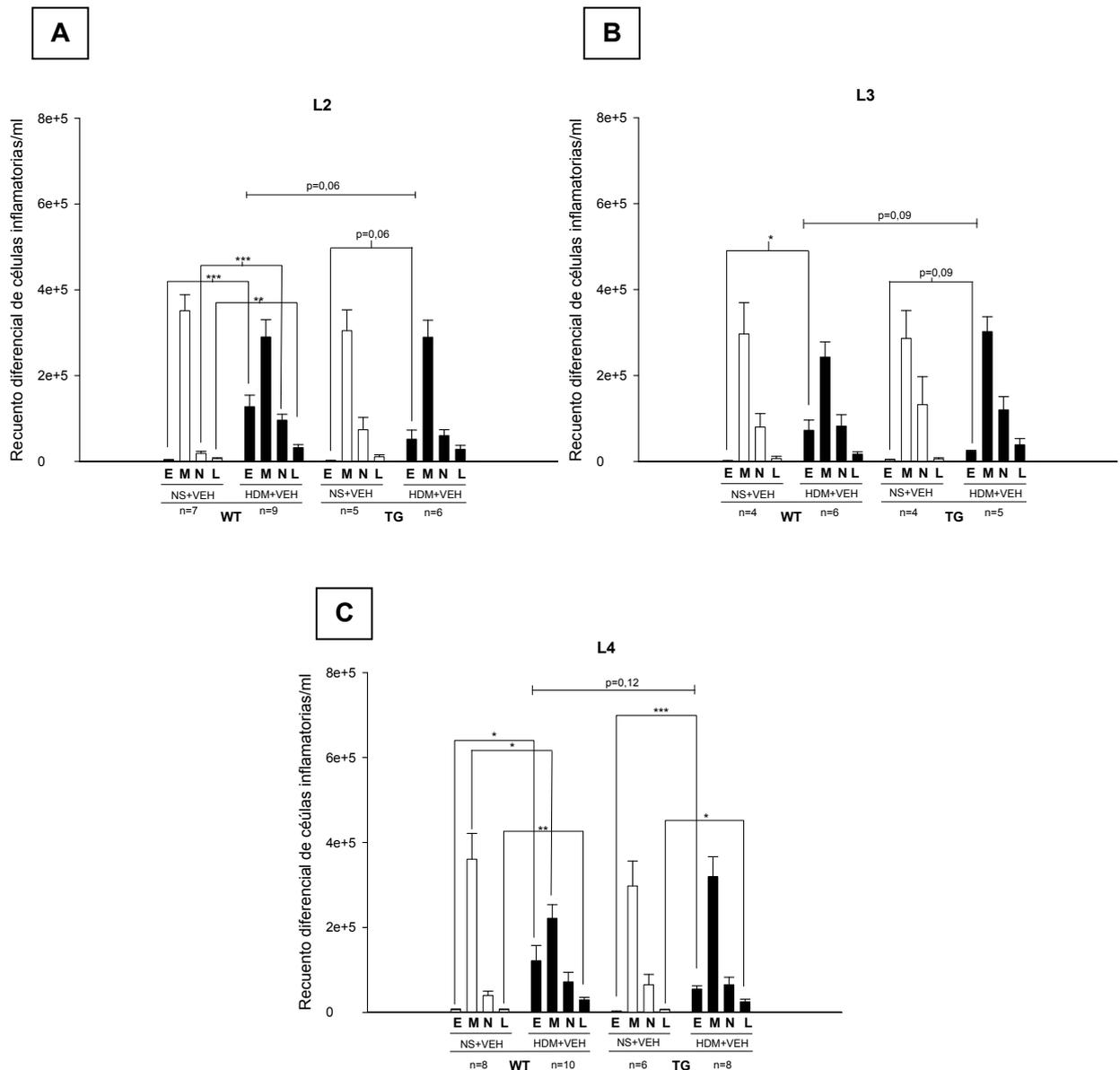


Figura 33. Recuento diferencial de células inflamatoria totales en ratones WT y TG con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM de la línea L2 (A), línea L3 (B) y línea L4 (C). Recuento de células que provienen de lavado broncoalveolar (BAL) teñidas con *diff-quick*. La cantidad de células inflamatorias totales se determina del conteo de al menos 300 células (E-eosinófilos, M-macrófagos, N-neutrófilos y L-linfocitos). Se expresa la media±SEM (n=4-10/grupo experimental). (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01***Pvalor<0.001). HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), VEH (vehículo), WT (*wild type*).

c) Efecto de la sobreexpresión EP2 en la hiperreactividad bronquial

Finalmente también se evaluó el efecto de la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario en la AHR en ratones expuestos a HDM de cada línea de transgénicos.

La respuesta de las vías aéreas a concentraciones crecientes de metacolina de los ratones transgénicos EP2 se representa en la figura 34. Por una parte, tras la sensibilización a aeroalérgenos la resistencia pulmonar aumentó en los ratones WT L4 ($p < 0.001$, ANOVA dos factores) y en los WT L3 (datos no significativos; $p = 0.07$, ANOVA dos factores) (Figura 34B y 34C). Por lo que se refiere a los ratones TG, en la L3 se observó un incremento de 1.4 veces en la concentración de 20mg/ml de metacolina mientras que en los WT aumentó 1.1 veces (figura 34B). En cambio, en la L4 el aumento en los TG fue de 1.1 veces y en los WT de 1.6 veces, comparando la concentración de 20mg/ml de metacolina (figura 34C). En la línea L2 no se observaron diferencias significativas tras la sensibilización a HDM (Figura 34A). Por lo tanto, la exposición a aeroalérgenos aumenta o tiende a aumentar la AHR en las líneas L3 y L4, es decir, no afecta por igual a los animales WT y TG dependiendo de la línea.

Comparando los ratones TG con sobreexpresión EP2 con los WT después de la exposición a HDM, únicamente en la línea L4 fue menor el daño inducido en las vías aéreas de los ratones TG tras la sensibilización a ácaros del polvo.

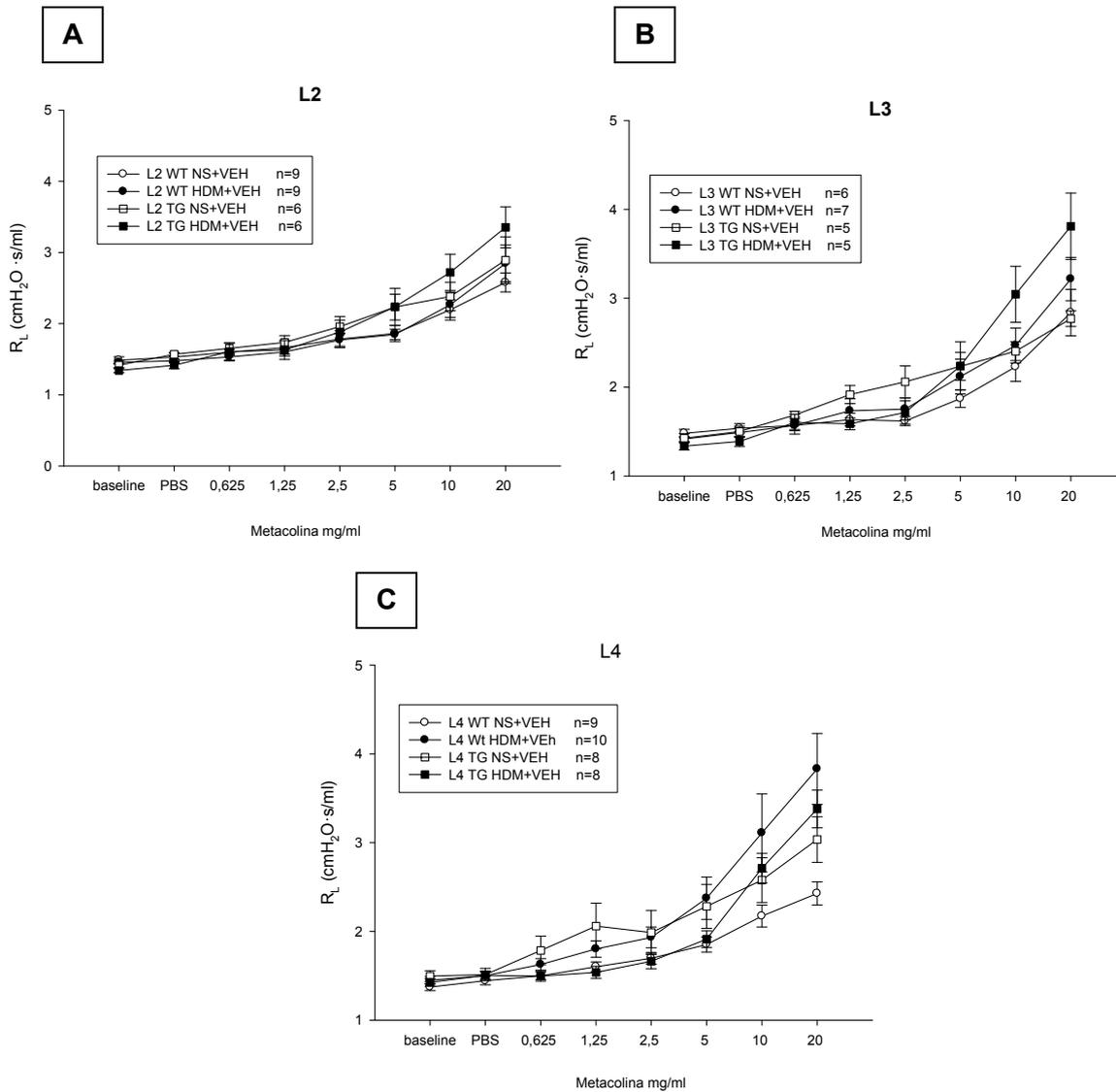


Figura 34. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones WT y TG con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM de la línea L2 (A), línea L3 (B) y línea L4 (C). Exposición a ácaros del polvo por vía intranasal durante 10 días consecutivos (de 0 a 9). 24 horas después de la última sensibilización se analiza la AHR mediante un método de pletismografía invasiva. Se expresa la media \pm SEM ($n=5-9$ /grupo experimental). (*Pvalor <0.05 , ***Pvalor <0.001). HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), R_L (resistencia pulmonar), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), VEH (vehículo), WT (*wild type*).

La exposición a aeroalérgenos aumenta, como era esperable, la liberación de la proteasa específica de mastocitos mMCP-1, el recuento de eosinófilos y la resistencia pulmonar a dosis crecientes de metacolina tanto en ratones WT como TG, ya demostrado en ratones de la cepa BALB/c no modificados genéticamente. La sobreexpresión del receptor EP2 en los mastocitos disminuye el reclutamiento de eosinófilos tras la sensibilización a aeroalérgenos en la línea L3. Mientras que la AHR disminuye en la L4. Por lo que, dependiendo de la línea transgénica,

probablemente el receptor EP2 sobreexpresado por si solo ejerce un efecto protector frente a la hiperreactividad bronquial e inflamación broncovascular sin la presencia de agonistas que lo estimulen. Por lo tanto, el modelo desarrollado en los ratones transgénicos nos proporciona resultados muy preliminares sobre el efecto de la sensibilización, pero para poder seleccionar una línea transgénica definitiva y determinar si la sobreexpresión EP2 beneficia el daño pulmonar por exposición a aeroalérgenos serán necesarios, como ya se ha comentado, nuevos experimentos *in vivo* en retrocruzamiento 12 o 13 con BALB/c y/o utilizando agonistas o antagonistas del receptor EP2.

3.3.2. Efecto de la PGE2 en la respuesta de las vías aéreas de ratones con sobreexpresión del receptor EP2 expuestos a HDM

En el siguiente procedimiento experimental se evaluó el efecto de la PGE2 junto a la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario (Figura 25), en la respuesta de las vías aéreas tras una sensibilización a aeroalérgenos.

a) Efecto de la PGE2 en la actividad mastocitaria de ratones que sobreexpresan EP2

Después de la sensibilización a ácaros del polvo y el tratamiento con la PGE2 se analizó la producción de la proteasa específica de mastocitos de ratón mMCP-1 en fragmentos de parénquima pulmonar procedentes de ratones WT y TG.

La figura 35 muestra el efecto de la PGE2 en la actividad mastocitaria de ratones que sobreexpresan y no el receptor EP2. En la línea L3 la exposición a aeroalérgenos aumentó clara y significativamente la cantidad de mMCP-1 en los ratones WT (incremento de 11.5 veces) y en TG (incremento de 19.3 veces), mientras que en los animales TG L4 se observó una tendencia (incremento de 22.2 veces). Cuando se realizó el experimento se disponía solamente de 5 animales WT de la L4 que se repartieron en dos grupos experimentales expuestos a ácaros del polvo (HDM+VEH y HDM+PGE2), por ello, no se muestran datos del grupo NS+VEH. Por lo que se refiere al efecto de la sobreexpresión EP2, la concentración de mMCP-1 producida por la exposición a HDM no disminuyó en ratones TG respecto a los WT.

El tratamiento con PGE2 únicamente mostró una tendencia a disminuir la producción de mMCP-1 en animales TG L3 sensibilizados a ácaros del polvo (~30%). En cambio, no se observó el efecto esperado de la PGE2 en la línea L4. Finalmente, comparando los tratamientos

con PGE2 entre ratones WT y TG de la misma línea expuestos a ácaros del polvo no se mostraron diferencias significativas. Por lo tanto, la PGE2 solamente disminuyó la actividad mastocitaria en los animales transgénicos de la L3 (datos no significativos; $p=0.08$, T-Student).

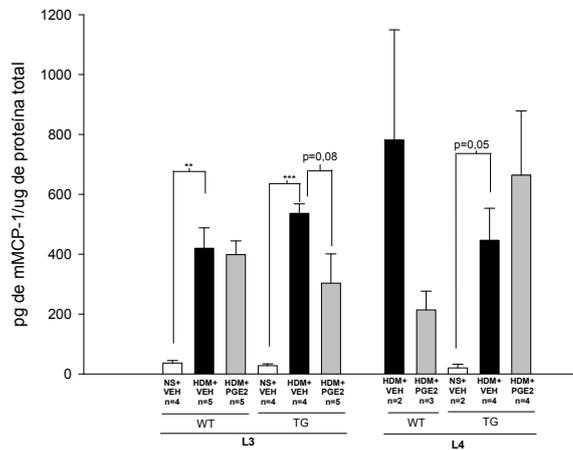


Figura 35. Actividad mastocitaria en ratones WT y TG que sobreexpresan el receptor EP2 expuestos a HDM y tratados con PGE2. Determinación de la producción local de la proteína mMCP-1 en fragmentos de parénquima pulmonar de ratones sensibilizados a HDM y tratados con PGE2. Se expresa la media \pm SEM ($n=2-5$ /grupo experimental). (*Pvalor <0.05 , **Pvalor <0.01 , ***Pvalor <0.001). HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), PGE2 (prostaglandina E2), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), VEH (vehículo), WT (*wild type*).

b) Efecto de la PGE2 en la inflamación broncovascular de ratones que sobreexpresan EP2

Se evaluó también el efecto de la PGE2 en la respuesta inflamatoria inducida en ratones expuestos a aeroalérgenos por vía intranasal con y sin sobreexpresión EP2 en los mastocitos.

En la figura 36 se representa el efecto de la administración intranasal de PGE2 exógena en la inflamación broncovascular de ratones WT y TG que sobreexpresan el receptor EP2 tras la sensibilización a HDM. La exposición a aeroalérgenos aumentó significativamente el reclutamiento de células inflamatorias en la línea L3 y en los ratones TG L4. Analizando la L3 se observó un incremento de 20 veces en los WT mientras que tan solo 12 veces en los ratones TG, en cambio el aumento en los TG L4 fue de unas 20 veces. Tal y como se ha comentado anteriormente no se evaluó el efecto en WT L4 por falta de datos en el grupo control de ratones no sensibilizados a ácaros del polvo. Por lo tanto, en la L3, la sobreexpresión del receptor EP2 ejerció un efecto protector en la inflamación broncovascular.

La PGE2 disminuyó aproximadamente un 60% la eosinofilia pulmonar en la línea L3, significativamente en ratones WT mientras que se observó una tendencia en ratones TG (Figura 36A). En los ratones TG L4 la eosinofilia disminuyó más ~75% tras el tratamiento con PGE2 (Figura 36B) que en los ratones WT L4 donde fue de ~60% (no significativo). Con todos estos resultados observamos el efecto protector de la PGE2 en la eosinofilia pulmonar causada por la exposición a HDM. Al combinar la administración de PGE2 exógena con la sobreexpresión EP2 únicamente en la L4 mejoró la inflamación pulmonar.

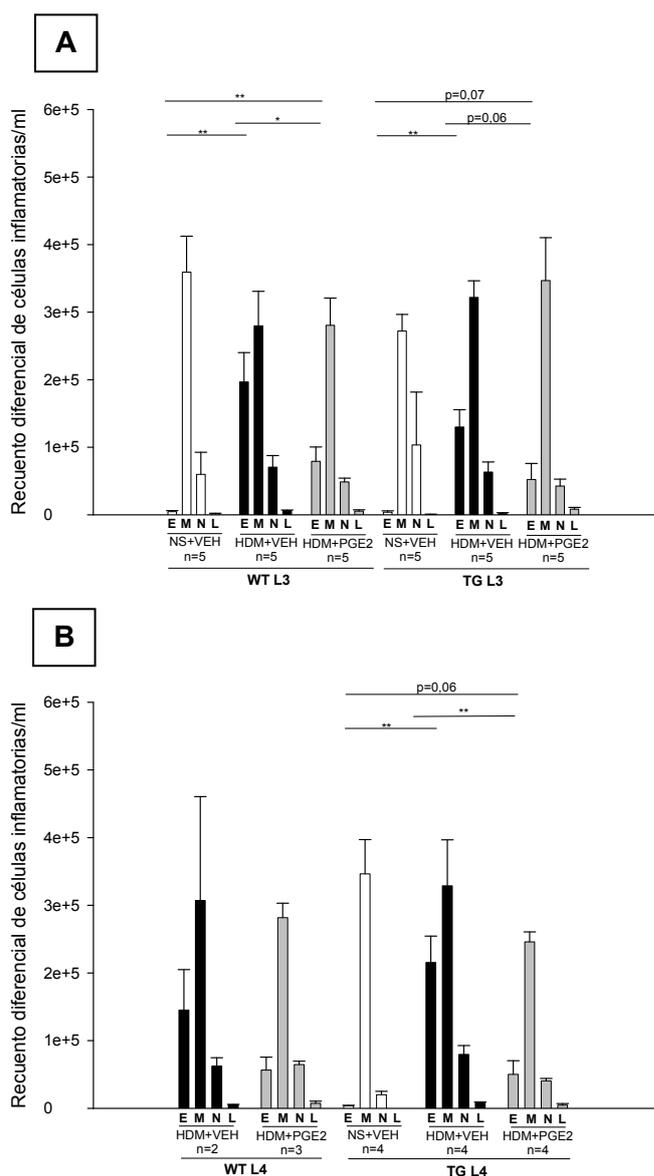


Figura 36. Recuento diferencial de células inflamatoria totales en ratones WT y TG con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM y tratados con PGE2 de la línea L3 (A) y línea L4 (B). Recuento de células que provienen de lavado broncoalveolar (BAL) teñidas con *diff-quick*. La cantidad de células inflamatorias totales se determina del conteo de al menos 300 células (E-eosinófilos, M-macrófagos, N-neutrófilos y L-linfocitos) Se expresa la media \pm SEM (n=2-5/grupo experimental). (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), PGE2 (prostaglandina E2), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), VEH (vehículo), WT (*wild type*).

c) Efecto de la PGE2 en la hiperreactividad bronquial de ratones que sobreexpresan EP2

Por último se evaluó el efecto de la PGE2 en la AHR de ratones sensibilizados a ácaros del polvo con sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario.

En las figura 37 y 38 se representa la respuesta de las vías aéreas a concentraciones crecientes de metacolina (*baseline*, PBS, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40mg/ml) en ratones WT y TG EP2 de las líneas L3 y L4. Por un lado, la exposición a HDM aumentó significativamente la resistencia en los ratones WT L3 y TG L3 (Figura 37). El aumento en los WT fue casi el doble (incremento de 1.8 veces) en la concentración más alta de metacolina, mientras que en los TG no aumentó (incremento de <1). En los ratones TG L4 no se observó dicho aumento tras la sensibilización a aeroalérgenos (Figura 38B). En este caso tampoco disponíamos de ratones WT L4 no expuestos a ácaros del polvo.

El tratamiento con PGE2 disminuyó ~30% la resistencia de las vías aéreas a concentraciones crecientes de metacolina en ratones WT de la línea L3 respecto a los ratones sensibilizados a HDM (datos no significativos; $p=0.09$, ANOVA dos factores) (Figura 37A). Por el contrario no se observó dicho efecto protector en WT L4 (Figura 38A). El efecto de la PGE2 junto con la sobreexpresión EP2 fue diferente dependiendo de la línea, mientras que en la línea L3 la AHR aumentó (Figura 37A y 37B), en la línea L4 se mantuvo por debajo de los ratones no sensibilizados (Figura 38A y 38B).

En resumen, la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario disminuyó la AHR en la línea L3. La PGE2 atenuó significativamente el aumento de la resistencia pulmonar tras la sensibilización a HDM en los ratones WT L3. Finalmente, el tratamiento con PGE2 en ratones TG EP2 mostró un efecto contrario dependiendo de la línea, aumentó la AHR en la L3 y disminuyó en la L4.

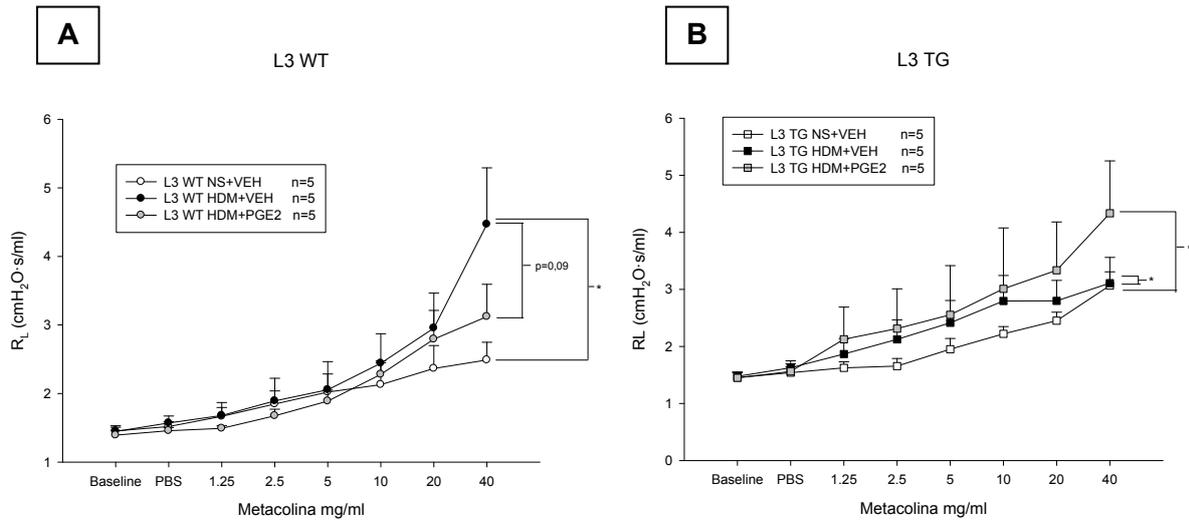


Figura 37. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones WT (A) y TG (B) con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM y tratados con PGE2 de la línea L3. Exposición a ácaros del polvo por vía intranasal durante 10 días consecutivos (de 0 a 9) y tratamiento con PGE2 de día -1 a día 4. 24 horas después de la última sensibilización se analiza la AHR mediante un método de pletismografía invasiva. Se expresa la media \pm SEM (n=5/grupo experimental). (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01***Pvalor<0.001). HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizados), PGE2 (prostaglandina E2), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), VEH (vehículo), WT (*wild type*).

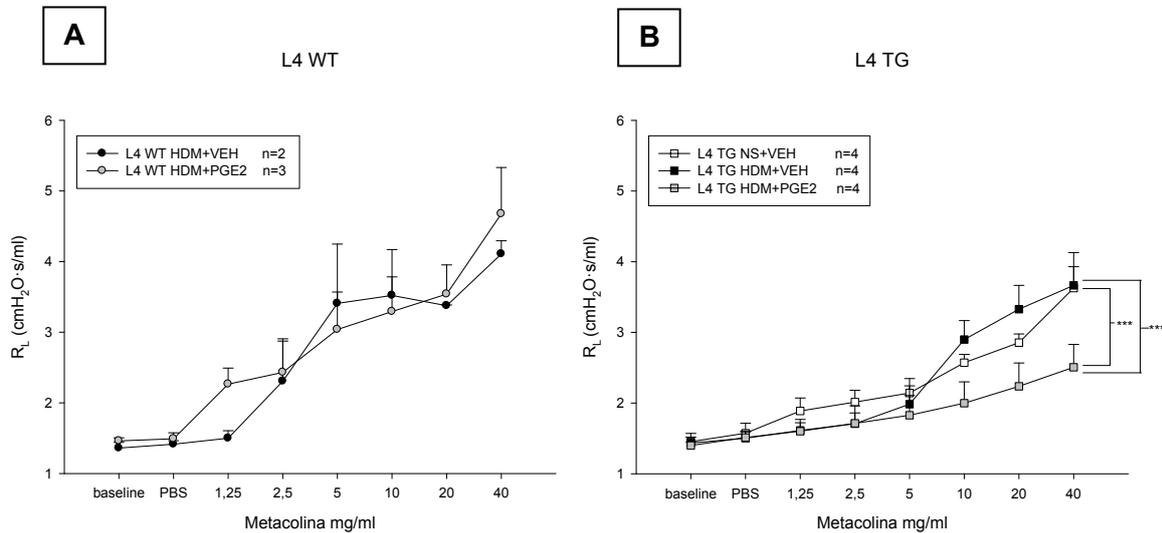


Figura 38. Hiperreactividad bronquial (AHR) en ratones WT (A) y TG (B) con sobreexpresión EP2 expuestos a HDM y tratados con PGE2 de la línea L4. Exposición a ácaros del polvo por vía intranasal durante 10 días consecutivos (de 0 a 9) y tratamiento con PGE2 de día -1 a día 4. 24 horas después de la última sensibilización se analiza la AHR mediante un método de pletismografía invasiva. Se expresa la media \pm SEM (n=2-4/ grupo experimental). (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01***Pvalor<0.001). HDM (ácaros del polvo), NS (no sensibilizado), PGE2 (prostaglandina E2), SEM (error estándar de la media), TG (*transgenic mice*), VEH (vehículo), WT (*wild type*).

El tratamiento con PGE2 en los ratones transgénicos EP2 tiene un efecto diferente que en ratones no modificados genéticamente. En experimentos anteriores sugerimos que la PGE2 prevenía la respuesta asmática inducida por HDM actuando a través del receptor EP2, cuyo efecto parecía estar relacionado con una inhibición de la actividad mastocitaria (Herrerias et al., 2009b; Torres et al., 2013). Tras la exposición a aeroalérgenos vimos que posiblemente el efecto protector que ejercía la PGE2 endógena era ya máximo en los ratones *wild type*, por ello, se propuso estudiar las consecuencias de una administración de PGE2 exógena. Ahora bien, los resultados respecto a la reactividad de las vías aéreas tras la sensibilización a HDM y el tratamiento con PGE2 son muy dispares. Solamente se han visto algunos indicios, en eosinofilia pulmonar, del efecto protector de la PGE2 junto con la sobreexpresión EP2 en la línea L4.

En general podemos valorar que el efecto del tratamiento con PGE2 tras la sensibilización a HDM muestra tendencias en AHR, inflamación y/o actividad mastocitaria dependiendo de la línea, pero no son datos suficientemente contundentes como para poder seleccionar una de las tres líneas transgénicas. No ha sido posible mediante la exposición a PGE2 exógena corroborar el efecto protector del EP2 de los mastocitos. Es probable que deba atribuirse a la complejidad genética del modelo inducido en el que probablemente se ha producido una redistribución de la expresión de receptores en mastocitos y en otras poblaciones celulares. Se ha logrado por lo tanto la sobreexpresión del receptor EP2 en vías aéreas, se ha conseguido obtener un ratón transgénico en *background* BABL/c, pero no se ha podido certificar que la sobreexpresión fuera selectiva en mastocitos ni se ha estudiado la expresión del resto de receptores. Para poder utilizar el modelo en estudios *in vitro* e *in vivo* de protección de EP2 deberán caracterizarse más a fondo las consecuencias de la inserción del transgen.

SUBPROYECTO 3

**Inhibición Mastocitaria mediante Agonismo EP2 y Bloqueo
de la IgE**

(Objetivo 3)

1. SUBPROYECTO 3: ABORDAJE EXPERIMENTAL DEL OBJETIVO 3

En el marco del **Objetivo 3**: “Evaluar comparativamente la efectividad preclínica de la inhibición mastocitaria mediante agonismo EP2 y bloqueo de la IgE, *in vitro* y en modelos de alergia *in vivo*” se realizaron 3 experimentos:

Experimento 1: *Determinación del efecto inhibitorio de la actividad mastocitaria in vitro en poblaciones celulares diversas que expresen el receptor humano de la IgE mediante agonismo EP2 y anti-IgE*

Se propuso comparar el efecto de la estimulación específica del receptor EP2 frente a otra estrategia antiasmática de bloqueo mastocitario, anticuerpos monoclonales anti-IgE. *In vitro* se planteó estudiar la modulación mastocitaria mediante dos agonistas EP2 y dos anticuerpos anti-IgE en líneas celulares humanas, y en cultivos primarios mastocitarios procedentes de ratones “humanizados”, FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺.

Experimento 2: *Comparación del efecto del agonismo EP2 y de anti-IgE in vivo en un modelo de anafilaxia cutánea dependiente de mastocitos*

Después de analizar *in vitro* los dos mecanismos de bloqueo mastocitario, se planteó utilizar un modelo de anafilaxia completamente dependiente de mastocitos para determinar el papel específico que juegan estas células en la protección mediada por el eje PGE2-EP2. Se comparó de nuevo con el efecto anti-IgE.

Experimento 3: *Desarrollo de un modelo de anafilaxia respiratoria en ratones transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE (FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺) para evaluar el agonismo EP2 frente a la estrategia de inhibición anti-IgE.*

Finalmente con los datos preclínicos obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* se desarrolló un modelo de alergia en ratones “humanizados” que expresan el receptor humano de la IgE, FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺, con la finalidad de crear una

herramienta útil que permitirá evaluar *in vivo* el efecto del agonismo EP2 y la inhibición anti-IgE sobre los mastocitos y las vías aéreas.

Por lo tanto, mediante tres abordajes experimentales se comparará preclínicamente *in vitro* e *in vivo* la inhibición de la actividad mastocitaria por parte de dos mecanismos de bloqueo, agonismo EP2 y anti-IgE. Esto permitirá evaluar preclínicamente el posible interés terapéutico del agonismo EP2. Además, el alcance de este objetivo permitirá generar un modelo de alergia respiratoria para posteriores comparaciones de ambas estrategias terapéuticas. A continuación se describe el material y métodos conjuntos, y se discuten brevemente los resultados de cada experimento.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Evaluación del efecto de agonistas EP2 y anti-IgE sobre la actividad mastocitaria in vitro

En poblaciones mastocitarias heterogéneas se evaluó el efecto de agonistas del receptor EP2, así como el de anticuerpos anti-IgE.

Todos los experimentos relacionados con el cultivo celular se desarrollaron bajo condiciones estrictas de esterilidad y con el material autoclavado.

2.1.1. Cultivos celulares

Se describe el cultivo de la línea celular humana LAD2, de la línea celular basofílica leucémica humanizada de rata RS-ATL8 y la obtención de mastocitos peritoneales de ratones “humanizados”, FcεRI^{-/-} hFcεRI⁺. Todas las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%.

◆ Reactivos y citoquinas

Todos los productos químicos utilizados para el mantenimiento semanal de los diferentes cultivos celulares fueron de la pureza adecuada para el análisis. Las LAD2 se cultivaron con medio libre de suero StemPro 34-SFM (*serum free medium*) de Life Technologies (Madrid, España), penicilina, estreptomycin y L-glutamina de Biowest (Nuaille, Francia). El factor de células madre humano (h-SCF) provenía de Prospec (Rehovot, Israel) y el azul de tripano para el recuento de células total se compró en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

La línea RS-ATL8 se cultivó en medio de cultivo mínimo esencial (*minimal esencial medium*, MEM), penicilina-estreptomycin, suero fetal bovino y glutamina estable de Biowest (Nuaille, Francia). La Geneticina se compró en Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y la Higromicina en Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

El cultivo de las PDMC de ratones FcεRI^{-/-} FcεRI⁺ necesitaba medio RPMI 1640, penicilina-estreptomycin-glutamina, solución de aminoácidos no esenciales, solución de piruvato sódico y suero fetal bovino (SFB) de Biowest (Nuaille, Francia). El 2-mercaptoethanol se compró en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los factores de crecimiento como la interleucina 3 (IL-3) y el factor de células madre (SCF) provenían de Prospec (Rehovot, Israel). Para el recuento de

mastocitos se preparó una solución de kimura con cloruro sódico (NaCl), metanol, etanol, bifosfato de sodio (NaH₂PO₄), azul de toluidina y saponina de Panreac Applichem (Barcelona, España).

◆ Cultivo de la línea celular LAD2

La línea celular de mastocitos humana LAD2 (*human leukemic mast cell line*), cedida amablemente por Dr. Arnold Kirshenbaum y el Dr. Dean Metcalfe del NIAD-NIH (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases / National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA), deriva de un paciente con sarcoma de mastocitos no tratado (Kirshenbaum et al., 2003). Las células LAD2 se cultivaron semanalmente con medio libre de suero (StemPro-34 SFM), suplementado con 2mM L-glutamina, 100U/ml de penicilina, 50µg/ml de estreptomina y 100ng/ml del factor de células madre humano (h-FCM). Recuento semanal de la viabilidad celular mediante azul de tripano (dilución 1/2).

◆ Cultivo de la línea celular RS-ATL8

La línea celular basofílica leucémica humanizada de rata RS-ATL8 expresa el receptor humano FcεRI (α, β y γ) y fue cedida por el Dr. Ryosuke Nakamura del *National Institute of Health Sciences* (Tokio, Japón) (Nakamura et al., 2010). Procede de basófilos de rata, pero fenotípicamente reproduce las características de los mastocitos. Además de ser un subtipo de la línea celular RBL-SX38 (*rat basophilic leukemia cells*), las células RS-ATL8 fueron transfectadas de manera estable con el clone 8 del gen reportero de la luciferasa NFAT (factor nuclear de las células T activadas) (Nakamura et al., 2012; Wan et al., 2014). Mantenimiento semanal en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado a 56°C durante 30 minutos, 1% de penicilina y estreptomina, 1.2mg/ml de geneticina y 200µg/ml de higromicina. Recuento semanal de la viabilidad celular mediante azul de tripano (dilución 1/2).

◆ Cultivos primarios de mastocitos peritoneales de ratones “humanizados”

A continuación se especifican las técnicas para obtener cultivos mastocitarios primarios peritoneales, así como, la procedencia de los ratones.

➤ Animales de experimentación

Los cultivos peritoneales de ratones transgénicos que expresan el receptor humano FcεRI α , (FcεRI⁻/hFcεRI⁺), *background* BALB/c, se obtuvieron a partir de ratones entre 12-16 semanas de edad en el momento del lavado peritoneal. Período de aclimatación durante una semana en racs ventilados de PANLAB (Barcelona, España) con un máximo de 6 animales por jaula.

Los ratones transgénicos presentan una doble mutación ya que expresan el fragmento humano del receptor de alta afinidad de la IgE (FCER1A), bajo el control del promotor humano FCER1A y llevan la mutación *Fcer1a^{tm1Knt}* (Dombrowicz et al., 1996). Los ratones “humanizados” hemicigotos para el transgen y homocigotos para la mutación diana (FcεRI⁻) se criaron en el Estabulario Central de la Universitat Autònoma de Barcelona a partir de dos pares de progenitores cedidos por el Dr. Jean-Pierre Kinet del *Beth Israel Deaconess Medical Center of Harvard* (Boston, MA, USA).

Las condiciones ambientales de estabulación fueron las estándar: ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, temperatura de 22±2°C con una humedad relativa constante de 60±10%. El agua y pienso (SAFE-PANLAB, Barcelona, España) se suministraron *ad libitum*. También se controló diariamente la supervivencia, los signos de enfermedad y/o la pérdida de peso. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (España). El desarrollo de este proyecto se realizó de acuerdo con la legislación española del Real Decreto 53/2013 relativa a la “Protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”, y de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo.

➤ Obtención y cultivo de mastocitos peritoneales

Las PDMC se obtuvieron a partir de un lavado de la cavidad peritoneal de ratones FcεRI⁻/hFcεRI⁺ (BALB/c *background*) con 4ml de medio (Tabla 1) (ver anexo 1.1). En un mismo cultivo celular se juntaron los lavados de tres ratones.

Las células se cultivan durante 3 semanas en presencia de IL-3 (20ng/ml) y SCF (20ng/ml) en medio completo RPMI con un 20% de suero fetal bovino, para conseguir una mayor cantidad de PDMC (Gomez et al., 2005). Mantenimiento del cultivo semanalmente y a partir de la semana 3 se realizaron recuentos de células total (dilución 1/2 con azul de tripano), viabilidad y pureza de mastocitos (dilución 1/5 con kimura, ver tabla 2).

2.1.2. Evaluación de la respuesta mastocitaria mediante la liberación de β -hexosaminidasa

En el siguiente subapartado se explica la técnica *in vitro* utilizada para evaluar la actividad mastocitaria después de una preincubación con agonistas selectivos del receptor EP2 o con anticuerpos monoclonales anti-IgE.

◆ Reactivos, citoquinas y fármacos

Todos los productos químicos utilizados para la determinación de la actividad mastocitaria fueron de la pureza adecuada para el análisis. La IgE humana unida a Biotina (*Biotin anti-human IgE*) era de ABBIOTEC (San Diego, CA, USA) y la estreptavidina (SA, antígeno) se compró en BD Biosciences (San José, CA, USA). El butaprost era de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) y se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El agonista selectivo EP2, CP-533536 de Pfizer se sintetizó mediante colaboración con un grupo externo *Galchimia* (O Pino, A Coruña, España) (ver apartado 2.1.2 en el Subproyecto 1) y se disolvió con DMSO. Los anticuerpos monoclonales anti IgE, omalizumab y BSW17, provenían de Novartis (Xolair®, Basilea, Suiza) y NBS-C Bioscience (Viena, Austria) respectivamente. Para los ensayos funcionales con los cultivos de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratones $Fc\epsilon RI^{-/-}$ $hFc\epsilon RI^{+}$ se utilizó Chimeric Human IgE anti-NP (AbD Serotec, Kidlington, Reino Unido) y NP (4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl hapteno) unido a albúmina sérica bovina (NP-BSA, antígeno, Biosearch Technologies, Petaluma, CA, USA) que se disolvió en tampón fosfato (*phosphate buffer saline*, PBS) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Los productos para el ensayo de degranulación mastocitaria: HEPES, cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), fosfato disódico heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), glucosa, cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) provienen de Merck (Madrid, España) y la albúmina sérica bovina eran de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El p-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosamide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) se disolvió en tampón citrato: ácido cítrico y fosfato disódico heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) de Panreac Applichem (Barcelona, España). Por último, para parar la reacción enzimática se utilizó glicina (Panreac Applichem, Barcelona, España) disuelta en agua destilada.

◆ Ensayo de activación mastocitaria: liberación de β -hexosaminidasa

Las PDMC y las LAD2 se incubaron durante 16 horas sin la presencia de los factores de crecimiento específicos antes del ensayo de degranulación mastocitaria. La línea celular de mastocitos humana LAD2 se sensibilizó con 100ng/ml de IgE humana biotinilada en medio libre de h-SCF durante 2 horas. La línea basofílica de leucemia de rata RS-ATL8 se sensibilizó con 500ng/ml de IgE humana biotinilada durante 16 horas. Las PDMC de ratones Fc ϵ RI^{-/-}hFc ϵ RI⁺ se sensibilizaron con 100ng/ml de Chimeric Human IgE anti-NP durante 16 horas. Se utilizaron placas de 96 pocillos (Thermo Scientific NUNC, Waltham, MA, USA) para cultivar 150.000 células en un volumen final de 300 μ l (LAD2) o 200.000 células en un volumen final de 320 μ l (PDMC). En el caso de las RS-ATL8 dos días antes del ensayo de liberación se cultivaron 50.000 células en un volumen final de 100 μ l en placas de 96 pocillos para tener 100.000 células adheridas en la placa de cultivo el día del ensayo funcional.

Todas las células se pre-incubaron 15 minutos antes de la sensibilización con concentraciones crecientes de omalizumab y BSW17 (10, 30, 100 y 300ng/ml; 1, 3, 10 y 30 μ g/ml) o con el vehículo (tampón *HEPES*, tabla 4) durante 2 h y 15 min (LAD2) o durante toda la noche (RS-ATL8 y PDMC) a 37°C con 5% v/v de CO₂. En paralelo, las células también se trataron con concentraciones crecientes de butaprost y de CP-5533536 (10⁻⁷M, 3·10⁻⁷M, 10⁻⁶M, 3·10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 3·10⁻⁵M, 10⁻⁴M, 3·10⁻⁴M) o vehículo (PBS con 0.1% DMSO) durante 2 horas y 15 minutos. En las PDMC y RS-ATL8 la pre-incubación con los agonistas EP2 coincidió con las dos últimas horas de pre-incubación con los anticuerpos anti-IgE. En las figuras 42, 43, 44, 45 y 46 se especifican las concentraciones que se han evaluado durante el ensayo funcional.

Seguidamente se traspasaron las células de las diferentes condiciones experimentales a placas de 96 pocillos en V (Thermo Scientific NUNC, Waltham, MA, USA) y se estimularon con 100ng/ml (LAD2) o 1000ng/ml (RS-ATL8) de antígeno estreptavidina (SA), mientras que las PDMC de Fc ϵ RI^{-/-}hFc ϵ RI⁺ con 50ng/ml de NP-BSA, durante 30 minutos a 37°C con 5% v/v de CO₂. La degranulación mastocitaria se paró con hielo. Las células se centrifugaron a 1500rpm durante 10 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes en una placa de lectura (Thermo Scientific NUNC, Waltham, MA, USA). Los *pellets* de las células se lisaron mecánicamente homogeneizándolos con agua destilada. A continuación un período de 10 minutos de congelación a -80°C, seguido de 10 minutos de descongelación a 37°C. También se recogieron los lisados en la placa de lectura de los sobrenadantes.

Finalmente se analizó la reacción enzimática del mediador mastocitario, β -hexosaminidasa, liberado al medio extracelular en los sobrenadantes y en los *pellets* de las células sensibilizadas con IgE humana y estimuladas con el antígeno específico. Se determinó a partir de la liberación de p-nitrofenol mediante un ensayo fluorométrico con 3.5mg/ml de PNAG (P-nitrofenil N-

acetil-β-D-glucosamida) como sustrato disuelto en tampón citrato (Tabla 5). La reacción enzimática se paró con glicina (Tabla 6) después de 90 minutos de incubación a 37°C. Al terminar la incubación la placa de *pellets* y sobrenadantes se leyó en un lector de placas Labsystems iEMS Reader MF (Thermo Labsystems, Beverly, MA, USA) para determinar la absorbancia, a 405nm con filtro de referencia a 620nm, de los *pellets* celulares y sobrenadantes. Cada condición se realizó por triplicado o cuadruplicado y la media se utilizó para analizar los porcentajes de liberación o inhibición mastocitaria.

La degranulación mastocitaria de las diferentes condiciones experimentales se representa mediante el porcentaje de liberación de β-hexosaminidasa teniendo en cuenta las absorbancias (*optic density*, OD) de los lisados celulares y sobrenadantes (Saitoh et al., 2000).

$$\% \text{ liberación } \beta - \text{ hexosaminidasa} = 100 \times \frac{OD \text{ sobrenadante}}{(OD \text{ sobrenadante} + OD \text{ lisado celular})}$$

Asimismo, se calcularon los porcentajes de inhibición de los agonistas EP2 y anti-IgE respecto a la activación celular total (hIgE+/SA+) o (hIgE+/NP+) sustrayendo los porcentajes de liberación basal (hIgE+/SA-) o (hIgE+/NP-).

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{(\% \text{ liberación tratamiento } X - \% \text{ liberación basal}) \times 100}{(\% \text{ liberación total} - \% \text{ liberación basal})}$$

2.2. Modelos de anafilaxia dependientes de mastocitos

Se describen dos modelos de anafilaxia pasiva dependientes de mastocitos (PCA y PRA). En ambos, se utilizaron ratones transgénicos con el receptor humano de la IgE, FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺.

2.2.1. PCA (anafilaxia cutánea pasiva)

Se detalla el procedimiento llevado a cabo para desarrollar experimentalmente el modelo de anafilaxia cutánea pasiva en ratones FcεRI^{-/-} hFcεRI⁺.

◆ Reactivos y fármacos

Todos los fármacos y productos químicos utilizados para la sensibilización y tratamientos *in vivo*, así como para evaluar la reacción de hipersensibilidad tenían la pureza y pH adecuados. La Chimeric Human IgE anti-NP (AbD Serotec, Kidlington, Reino Unido) y el NP-Bovine Serum Albumin (BSA) (Biosearch Technologies, Petaluma, CA, USA) se disolvieron en tampón fosfato (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El suero fisiológico salino se compró en B. Braun (Melsungen, Alemania) y el azul de ébano (*Evans blue Dye*) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) también se disolvió en PBS. El omalizumab provenía de Novartis (Xolair®, Basilea, Suiza). El butaprost de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) se disolvió en DMSO de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para la sedación mediante anestesia de gases se utilizó isoflurano de Esteve Veterinaria (Barcelona, España). Finalmente la formamida se compró en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

◆ Animales de experimentación

Ratones de la cepa $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$ de 8 a 12 semanas de edad al inicio del estudio. El fenotipo de los ratones transgénicos, las condiciones ambientales de estabulación, el control diario y la legislación vigente aplicada para la protección de los animales utilizados en experimentación se han descrito en el apartado 2.1.1.

◆ Administración de la IgE y del antígeno específico

Previamente a la sensibilización con Chimeric human IgE anti-NP y a la administración del antígeno, NP-BSA, se sometió a los ratones a un proceso de sedación mediante anestesia de gases, para el que se utilizó isoflurano, con un tiempo de exposición de 2 minutos al 3% de isoflurano seguido de 5 minutos al 2% (ver anexo 2.7). Pasado este tiempo, los animales adquirieron el plano anestésico suficiente para realizar la administración intradérmica.

Los ratones $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$ fueron sensibilizados pasivamente con una inyección intradérmica (ver anexo 2.4) de 20 μ l de Chimeric human IgE anti-NP (20, 80, 300 y 320ng) en la oreja derecha. En la oreja izquierda se inyectan 20 μ l de SF como control negativo (Figura 39).

24 horas después de la sensibilización los ratones se trataron mediante una inyección intravenosa por el seno retroorbital (anexo 2.5) de 100 μ l de una dosis de 200 μ g del antígeno (NP-BSA) en PBS con un 1% de azul de ébano (Figura 39).

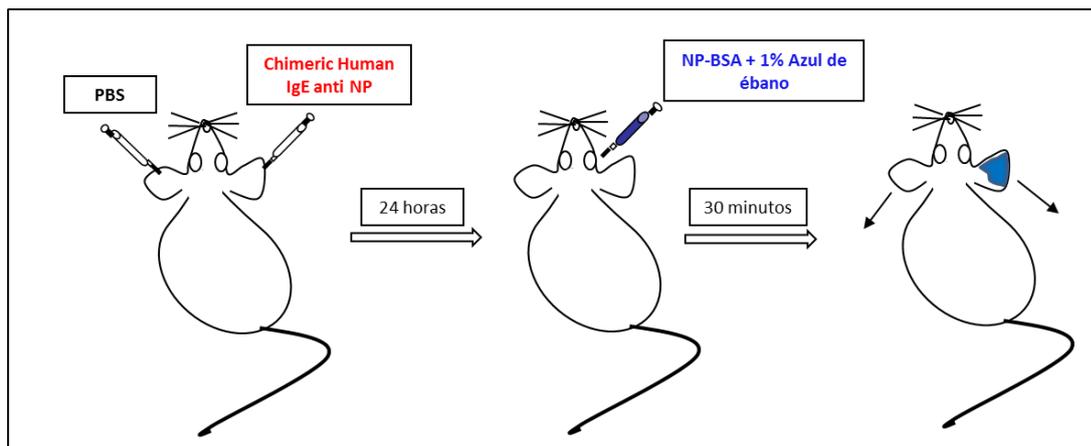


Figura 39. Modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) en ratones $Fc\epsilon RI^{-1}hFc\epsilon RI^{+}$ (background BALB/c). BALB/c (cepa de ratón albino), BSA (albúmina sérica bovina), $Fc\epsilon RI$ (receptor del ratón de alta afinidad de la IgE), $hFc\epsilon RI$ (receptor humano de alta afinidad de la IgE), IgE (inmunoglobulina E), NP (nitrofenol), PBS (tampón fosfato salino).

◆ Tratamiento con omalizumab y butaprost

El agonista EP2 o el anticuerpo monoclonal anti-IgE se administraron 2 veces en total. En un primer momento durante la sensibilización con Chimeric Human IgE anti-NP por vía intradérmica (Butaprost: 4, 6 y 12 μ g; Omalizumab: 100, 200 y 300ng; y 1, 30, 100, 300, 500 y 1500 μ g) (ver anexo 2.4), pre-incubación previa durante 20 minutos con la IgE humana. 23 horas después se administraron otra vez mediante inyección intravenosa por la cola (ver anexo 2.2) 1 hora antes de la activación de los mastocitos con el antígeno NP-BSA (Figura 40).

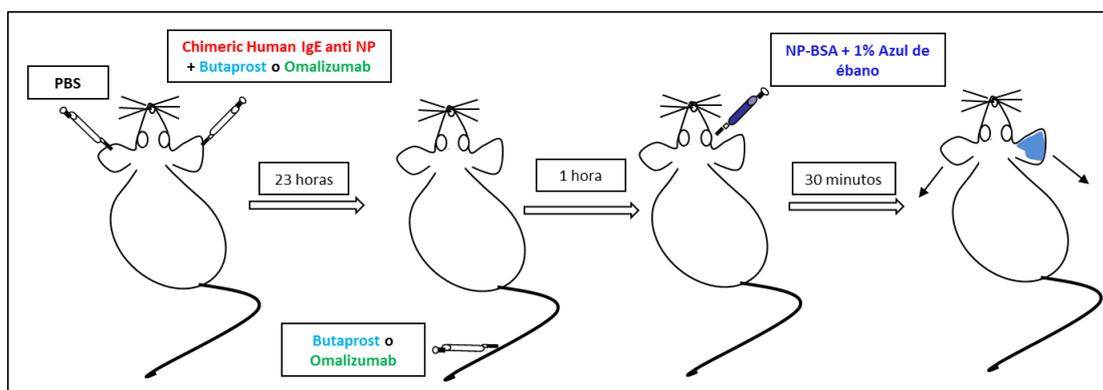


Figura 40. Tratamiento con el agonista EP2, butaprost, y el anticuerpo monoclonal anti-IgE, omalizumab, en un modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) en ratones $Fc\epsilon RI^{-1}hFc\epsilon RI^{+}$ (background BALB/c). BALB/c (cepa de ratón albino), BSA (albúmina sérica bovina), $Fc\epsilon RI$ (receptor del ratón de alta afinidad de la IgE), $hFc\epsilon RI$ (receptor humano de alta afinidad de la IgE), IgE (inmunoglobulina E), NP (nitrofenol), PBS (tampón fosfato).

◆ Grupos experimentales

En total se realizaron 4 experimentos (*a, b, c, d*) con el modelo de PCA. Primero se analizó la respuesta a dosis crecientes de Chimeric human IgE anti-NP y luego se comparó el efecto entre machos y hembras. Finalmente, se evaluó el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-IgE y un agonista EP2 frente a la extravasación de azul de ébano inducida por la IgE y el antígeno específico.

a) Efecto de dosis crecientes de IgE humana

Se distribuyeron aleatoriamente 12 ratones de la cepa $Fc\epsilon RI^{-}/hFc\epsilon RI^{+}$ en los siguientes 3 grupos experimentales:

Grupo 1: 20ng Chimeric Human IgE anti-NP + 200 μ g NP-BSA (n=4)

Grupo 2: 80ng Chimeric Human IgE anti-NP + 200 μ g NP-BSA (n=4)

Grupo 3: 320ng Chimeric Human IgE anti-NP + 200 μ g NP-BSA (n=4)

b) Comparación del efecto entre machos y hembras

Se comparó el efecto de la sensibilización a Chimeric human IgE entre machos y hembras de la cepa $Fc\epsilon RI^{-}/hFc\epsilon RI^{+}$ distribuidos aleatoriamente en los siguientes 2 grupos experimentales:

Grupo 1 ♂: 300ng Chimeric Human IgE anti-NP + 200 μ g NP-BSA (n=10)

Grupo 2 ♀: 300ng Chimeric Human IgE anti-NP + 200 μ g NP-BSA (n=14)

c) Efecto del omalizumab

Se realizaron 7 experimentos con dosis crecientes de omalizumab. Un total de 60 ratones de la cepa $Fc\epsilon RI^{-}/hFc\epsilon RI^{+}$ se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes 10 grupos experimentales:

Grupo 1: 300ng Chimeric Human IgE + vehículo (SF) + 200 μ g NP-BSA (n=21)

Grupo 2: 300ng Chimeric Human IgE + 100ng omalizumab + 200 μ g NP-BSA (n=13)

Grupo 3: 300ng Chimeric Human IgE + 200ng omalizumab + 200 μ g NP-BSA (n=4)

Grupo 4: 300ng Chimeric Human IgE + 300ng omalizumab + 200 μ g NP-BSA (n=4)

Grupo 5: 300ng Chimeric Human IgE + 1µg omalizumab + 200µg NP-BSA (n=3)

Grupo 6: 300ng Chimeric Human IgE + 30µg omalizumab + 200µg NP-BSA (n=3)

Grupo 7: 300ng Chimeric Human IgE + 100µg omalizumab + 200µg NP-BSA (n=3)

Grupo 8: 300ng Chimeric Human IgE + 300µg omalizumab + 200µg NP-BSA (n=3)

Grupo 9: 300ng Chimeric Human IgE + 500µg omalizumab + 200µg NP-BSA (n=3)

Grupo 10: 300ng Chimeric Human IgE + 1500µg omalizumab + 200µg NP-BSA (n=3)

d) Efecto del butaprost

Se realizaron 4 experimentos con dosis crecientes de butaprost. Un total de 42 ratones de la cepa FcεRI⁻/hFcεRI⁺ se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes 4 grupos experimentales:

Grupo 1: 300ng Chimeric Human IgE + vehículo (SF) + 200µg NP-BSA (n=15)

Grupo 2: 300ng Chimeric Human IgE + 4µg butaprost + 200µg NP-BSA (n=4)

Grupo 3: 300ng Chimeric Human IgE + 6µg butaprost + 200µg NP-BSA (n=18)

Grupo 4: 300ng Chimeric Human IgE + 12µg de butaprost + 200µg NP-BSA (n=5)

A continuación se realizó también un último experimento con 6µg de butaprost en 5 hembras de la cepa FcεRI⁻/hFcεRI⁺ distribuidas aleatoriamente en los siguientes 2 grupos experimentales:

Grupo 1: 300ng Chimeric Human IgE + vehículo (SF) + 200µg NP-BSA (n=2)

Grupo 2: 300ng Chimeric Human IgE + 4µg butaprost + 200µg NP-BSA (n=3)

◆ Evaluación de la reacción de hipersensibilidad en la piel

30 minutos después de la inyección del antígeno (NP-BSA) los animales se sacrificaron con CO₂ (Figuras 39 y 40). Se recogieron las orejas, se trocearon y se procedió a la extracción del colorante (azul de ébano, ver anexo 2.5) mediante 700µl de formamida a 55°C durante 2 horas. A continuación se centrifugaron las muestras a 14000rpm durante 10 minutos RT y se recogieron 200µl de sobrenadante en placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La absorbancia del azul de ébano en las muestras de tejido se determinó a 620nm con un espectrofotómetro (Labsystems iEMS Reader MF, ThermoLabsystems, Beverly, MA, USA).

2.2.2. PRA (anafilaxia respiratoria pasiva)

Puesta a punto del modelo de anafilaxia respiratoria pasiva en ratones “humanizados”, FcεRI^{-/-} FcεRI⁺, mediante una sensibilización local con IgE humana y su antígeno específico.

◆ Reactivos y fármacos

Todos los fármacos y productos químicos utilizados para la sensibilización y tratamientos *in vivo*, así como para evaluar la reacción de anafilaxia respiratoria, tenían la pureza y pH adecuados. La Chimeric Human IgE anti-NP se compró en AbD Serotec (Kidlington, Reino Unido) y el medio RPMI con glutamina estable, la Gentamicina y la Kanamicina provienen de Biowest (Nuallé, Francia). El antígeno NP-Bovine Serum Albumin (BSA) de Biosearch Technologies (Petaluma, CA, USA) se disolvió con PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La metacolina también se compró en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para anestesiarse a los animales se utilizó Ketamina de Imalgene (Merial, Lion, Francia) y la Xilacina de Laboratorios Calier (Barcelona, España), ambas diluidas en suero fisiológico salino de B. Braun (Melsungen, Alemania). Para la sedación mediante anestesia de gases se utilizó isoflurano que provenía de Esteve Veterinaria (Barcelona, España).

El tampón de lisis con inhibidores de las proteasas (*Mini Complete Tablet*) de Roche Diagnostics (Barcelona, España) se mezcló con tampón HEPES de Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), con Tritón X-100 y fluoruro de fenilmetilfulfonilo (*phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) disuelto con isopropanol de Panreac Applichem (Barcelona, España). Para la determinación de proteína total se utilizó *Lowry*, el *Folin & Ciocaltean's Phenol Reagent Working Solution* y la *Protein Standard Solution* de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

◆ Animales de experimentación

Ratones de la cepa FcεRI^{-/-}/hFcεRI⁺ de 8 a 12 semanas de edad al inicio del estudio. El fenotipo de los ratones transgénicos, las condiciones ambientales de estabulación, el control diario y la legislación vigente aplicada para la protección de los animales utilizados en experimentación se han descrito en el apartado 2.1.1.

◆ Sensibilización con Chimeric Human IgE anti-NP

Antes de la sensibilización con IgE humana los ratones $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$ o $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{-}$ fueron anestesiados en una cámara con un 3% de isoflurano, administrado en un período de 5 minutos en un 2.5% de oxígeno (ver anexo 2.7). Pasado este tiempo, los animales adquirieron el plano anestésico suficiente para realizar la administración intratraqueal.

La Chimeric human IgE-anti-NP (~3 μ g) se administró por vía intratraqueal aerosolizada (*Microsprayer Aerosolizer*, Penn-Century, Wyndmoor, USA) (ver anexo 2.6) en un volumen de 75 μ l durante 3 días alternos (día 0, 2 y 6) (Figura 41). Para la administración intratraqueal el animal anestesiado se colocó en posición supina. Con unas pinzas se mantuvo la lengua fuera y con otras se taparon las fosas nasales. Con la ayuda de una luz, la cánula (*Microsprayer, model LA-1C, mice size, from Penn Century*) se introdujo a través de la laringe y quedó posicionada justo encima de la carina de la tráquea, entonces se aerosolizaron 75 μ l de IgE humana directamente a la tráquea. Los ratones control recibieron (en aerosol con el *Microsprayer*) 75 μ l del medio de cultivo sin Chimeric Human IgE anti-NP (RPMI Glutamina estable al 5% de SFB con 0.025g/l de Gentamicina y 0.1g/l de Kanamicina) durante 3 días alternos (día 0, 2 y 6).

◆ Tratamiento con el antígeno específico NP-BSA

Se administraron 200 μ g de NP-BSA por vía intranasal (ver anexo 2.1) en un volumen de 35 μ l durante 3 días alternos (día 0, 2 y 6). Esta administración se realizó 3 horas después de administrar la Chimeric human IgE anti-NP por vía intratraqueal con el *Microsprayer Aerosolizer* (Penn-Century, Wyndmoor, Estados Unidos) (Figura 41). Los ratones control recibieron 35 μ l de PBS por vía intranasal durante 3 días alternos (día 0, 2 y 6). Antes del tratamiento con NP-BSA por vía intranasal el animal debe estar correctamente anestesiado para evitar su movimiento cuando se le administra el antígeno y lo respire con normalidad. Por ello se anestesiaron los ratones con un 2.5% de isoflurano durante un período de dos minutos y en un 2% de oxígeno (ver anexo 2.7).

Durante el resto de días (1, 3 y 7) se administraron 200 μ g de NP-HSA por vía intratraqueal aerosolizada (*Microsprayer Aerosolizer*, Penn-Century) (ver anexo 2.6) en un volumen de 50 μ l (Figura 41). Antes del tratamiento con NP-BSA por vía intratraqueal los ratones fueron anestesiados en una cámara con un 3% de isoflurano, administrado en un período de 5 minutos en un 2.5% de oxígeno (el % de isoflurano y el período de anestesia aumenta en comparación a la administración intranasal). Los ratones control recibieron 50 μ l de PBS por vía intratraqueal (en aerosol con el *Microsprayer Aerosolizer*) durante 3 días alternos (día 1, 3 y 7).

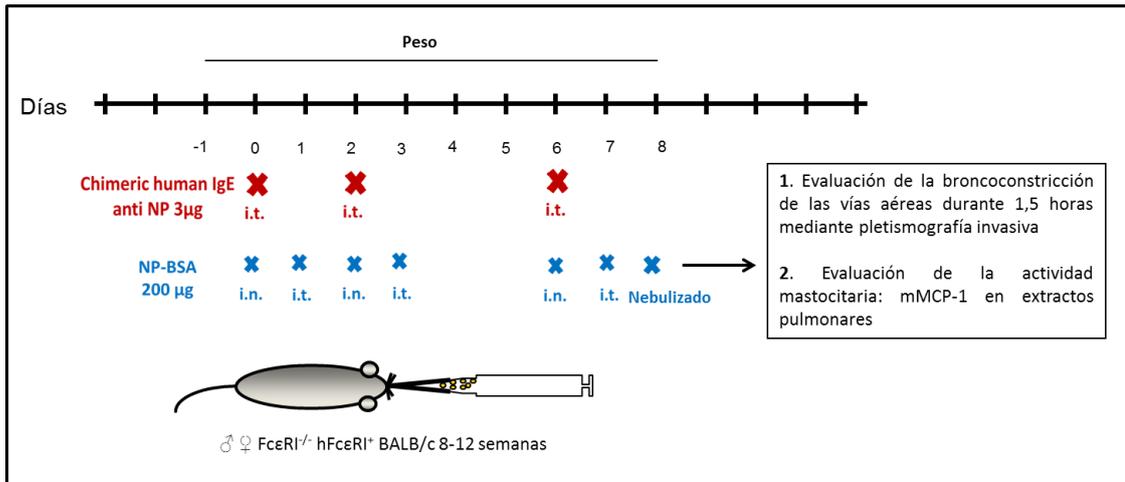


Figura 41. Modelo de anafilaxia respiratoria pasiva (PRA) en ratones $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$ (background BALB/c). BALB/c (cepa de ratón albino), BSA (albúmina sérica bovina), $Fc\epsilon RI$ (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), $hFc\epsilon RI$ (receptor humano de alta afinidad de la IgE), IgE (inmunoglobulina E), i.n. (intranasal), i.t. (intratraqueal), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), NP (nitrofenol).

◆ Grupos experimentales

Se evaluó el efecto de la sensibilización a Chimeric human IgE anti-NP en la actividad mastocitaria *a)* y en la broncoconstricción de las vías aéreas *b)*.

a) Efecto de la IgE humana y del antígeno NP en la actividad mastocitaria

La concentración de mMCP-1 se analizó mediante 3 experimentos diferentes. Se utilizaron ratones de la cepa $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$ y ratones de la cepa $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{-}$ (*knock out* para el receptor de la IgE del ratón y sin presencia del transgen para el receptor humano de la IgE) distribuidos en los siguientes grupos experimentales.

➤ 26 ratones de la cepa $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$

Se realizaron dos experimentos independientes (n=13), los ratones se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales:

Grupo 1: medio cultivo hIgE + 200µg NP-BSA (n=6)

Grupo 2: ~3µg Chimeric Human IgE anti-NP + 200µg NP-BSA (n=7)

- 13 ratones de la cepa **FcεRI^{-/-} hFcεRI⁺**

Para complementar el experimento anterior, 13 ratones adicionales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos control:

Grupo 3: medio cultivo hIgE + vehículo (PBS) (n=6)

Grupo 4: ~3μg Chimeric Human IgE anti-NP + vehículo (PBS) (n=7)

- 11 ratones de la cepa **FcεRI^{-/-} hFcεRI⁻**

Finalmente en ratones que no expresan ni el receptor humano de la IgE ni el receptor de ratón también se evaluó el efecto de la sensibilización con IgE humana y antígeno NP:

Grupo 1: medio cultivo hIgE + vehículo (PBS) (n=2)

Grupo 2: medio de cultivo hIgE + 200μg NP-BSA (n=3)

Grupo 3: ~3μg Chimeric Human IgE anti-NP + vehículo (PBS) (n=3)

Grupo 4: ~3μg Chimeric Human IgE anti-NP + 200μg NP-BSA (n=3)

b) Efecto de la IgE humana y del antígeno NP en la broncoconstricción de las vías aéreas

26 ratones de la cepa FcεRI^{-/-} hFcεRI⁺ se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes 2 grupos experimentales:

Grupo 1: medio cultivo IgE + 200μg NP-BSA (n=12)

Grupo 2: ~3μg Chimeric Human IgE anti-NP + 200μg NP-BSA (n=14)

◆ Valoración del peso y del estado general de los ratones

Se registró el peso de los ratones durante 10 días (de día -1 a día 8) para comprobar que no perdían peso debido a la manipulación y al tratamiento invasivo que representa la administración intratraqueal.

Para controlar el bienestar de los animales, los síntomas clínicos asociados al proceso respiratorio y las posibles reacciones adversas atribuibles al tratamiento con los fármacos se evaluó, diariamente, el estado general de los ratones mediante un protocolo estandarizado y

aprobado por el Comité de Ética de los Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Barcelona (España) que incluye una evaluación del comportamiento, síntomas de sufrimiento, aspecto del pelaje, secreciones, disnea, postura, etc.

◆ Evaluación de la actividad mastocitaria

Después de los tratamientos los animales anestesiados de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron mediante exsanguinación vía punción intracardiaca (ver anexo 3.3). A continuación, se guardaron los pulmones a -80°C (ver anexo 3.4). Finalmente se evaluó la concentración de la proteasa específica de mastocitos de ratón mMCP-1. Primero se realizó una extracción de proteína directamente del pulmón congelado del ratón. Se cuantificó la concentración de proteína total y se analizó la actividad mastocitaria con el ensayo de inmunoabsorción enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA).

➤ **Extracción de proteína total**

Se recogió todo el pulmón de los ratones $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{-}/\text{hFc}\epsilon\text{RI}^{+}$ y $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{-}/\text{hFc}\epsilon\text{RI}^{-}$ para la extracción la proteína total utilizando un tampón de lisis que contenía inhibidores de las proteasas (*Mini Complete Table*). Se añadieron 250 μl de tampón de lisis (Tabla 7) a las muestras de tejido y se homogenizaron las soluciones con el politrón (*dispersing tool, DRIVE T8 12-18V, power supply unit 230V 50/60 Hz*, IKA®-WERKE GmbH & Co, Staufen, Alemania) durante 30-45 segundos en hielo. El homogenado se centrifugó inmediatamente a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogieron el sobrenadante con el extracto proteico en un nuevo tubo, eliminando el *pellet* con las restas celulares. El sobrenadante se mantuvo congelado a -80°C hasta el momento de analizar la concentración proteica.

➤ **Determinación de la concentración de proteína total**

Para cargar la misma cantidad de proteína en el ELISA posterior, la concentración de proteína presente en las muestras se cuantificó utilizando el método de *Lowry*. Esta técnica permite medir la concentración de proteína total presente en la muestra utilizando concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Las concentraciones de la curva estándar se prepararon diluyendo *Protein Standard Solution* en agua destilada hasta obtener un volumen final de 250 μl . A partir de la concentración máxima de

400µg/ml se hicieron diluciones seriadas hasta obtener una concentración mínima de 50µg/ml. El blanco se preparó con 250µl de agua destilada. Las muestras se analizaron en una dilución $1/200$ en agua destilada.

Primero se añadió el reactivo *Lowry*, se pasaron las muestras durante 30 segundos por el vórtex y se dejaron incubar durante 20 minutos. A continuación, se añadió el reactivo *Folin & Ciocaltean's Phenol Reagent Working Solution*, se pasaron las muestras durante 30 segundos por el vórtex nuevamente y se incubaron durante 30 minutos, tiempo necesario para que se produzca la reacción colorimétrica. El contenido de cada tubo se transfirió a una placa de 96 pocillos (Thermo Fisher NUNC; Waltham, MA, USA) y todas las muestras se evaluaron por duplicado. La absorbancia se determinó a 620nm por espectrofotometría utilizando el lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF, ThermoLabsystems, Beverly, MA, USA).

➤ **Ensayo específico de mMCP-1 de ratón**

Se recuperaron los sobrenadantes para analizar los niveles de la proteasa 1 específica de los mastocitos en el ratón (*mouse mast cell protease 1*, mMCP-1) utilizando un ensayo específico (*Mouse MCPT-1, mMCP-1, ELISA Ready-SET-Go*, BD Bioscience, San José, CA, USA). Los resultados se normalizaron por la concentración de proteína total en cada una de las muestras analizadas.

$$\text{pg de mMCP} - 1/\mu\text{g de proteína total} = \frac{\text{concentración de mMCP} - 1 (\text{pg/ml})}{\text{concentración de proteína total } (\mu\text{g/ml})}$$

◆ Evaluación de la broncoconstricción

24 horas después de la última exposición por vía intratraqueal al antígeno (NP-BSA) o al vehículo (PBS) se evaluó la broncoconstricción de las vías aéreas al nebulizar 200µg de NP-BSA. La resistencia pulmonar se evaluó con un sistema de pletismografía invasiva de Buxco FinePointe (Buxco Europe LTD, Winchester, Reino Unido) en ratones anestesiados por vía intraperitoneal con una combinación de Ketamina a una dosis de 100mg/kg y de Xilacina a una dosis de 10mg/kg. La tráquea del ratón se canuló con una aguja de calibre 18 (ver anexo 3.1) y los ratones fueron ventilados durante todo el procedimiento (volumen tidal: 12.5ml/kg; frecuencia, 120respiraciones/min; presión positiva: 2.5-3.0cm H₂O) (ver anexo 3.2). Después de 1 min de nebulización intratraqueal del NP-BSA se registraron los cambios en la resistencia pulmonar (cmH₂O·s/ml) desde el valor basal durante 1 hora y 30 minutos.

2.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante la prueba T-Student con el Sigma-Plot versión 10.0 (Systat Software Inc., San José, CA, Estados Unidos) y el test de ANOVA con el Prism versión 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos).

Las diferencias observadas en los ensayos funcionales de los cultivos celulares, respecto a la degranulación mastocitaria de β -hexosaminidasa, y también entre los grupos experimentales *in vivo*, en la extravasación de azul de ébano (PCA) y la cantidad de mMCP-1 (actividad mastocitaria) se compararon con la T-Student (*2-tailed Student's t test*). Para los parámetros mecánicos de la resistencia pulmonar (broncoconstricción) se realizaron las pruebas ANOVA de dos factores con la corrección posterior de la prueba de Bonferroni (test *Post Hoc* de comparaciones múltiples). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

Las representaciones gráficas de los resultados, tanto en formato curva como en diagrama de barras incluidas en la sección de resultados, recogen la media y el error estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM) de todos los valores obtenidos.

3. RESULTADOS COMENTADOS

3.1. Evaluación preclínica comparativa de la efectividad de la inhibición mastocitaria mediante agonismo EP2 y bloqueo de la IgE in vitro e in vivo

Se comparó el efecto de agonistas EP2 y de anticuerpos monoclonales anti-IgE en poblaciones mastocitarias diversas y en un modelo *in vivo* dependiente de mastocitos.

3.1.1. Determinar el efecto inhibitorio del agonismo EP2 y anti-IgE in vitro en poblaciones mastocitarias que expresan el receptor humano de la IgE

Se evaluó *in vitro* el efecto de dos mecanismos responsables de inhibir o prevenir la degranulación mastocitaria, como son el agonismo EP2 y el bloqueo de la IgE. Para ello experimentalmente se utilizaron líneas humanas de mastocitos y cultivos primarios de ratones “humanizados”.

a) Modulación de la degranulación mastocitaria mediante agonismo EP2 y bloqueo de la IgE en LAD2

En la línea celular de mastocitos humanos LAD2 se comparó el efecto del agonismo EP2 frente al bloqueo de la actividad mastocitaria mediante anticuerpos monoclonales anti-IgE.

En las figuras 42, 43 y 44 se representa el efecto *in vitro* sobre la degranulación mastocitaria, tras una estimulación inmunológica mediada por IgE, de dos agonistas selectivos del receptor EP2 (butaprost y CP-533536) y de dos anticuerpos anti-IgE (omalizumab y BSW17) en poblaciones celulares diversas que expresan el receptor humano de la IgE. Los mastocitos se sensibilizaron con IgE humana (IgE-SA) y se activaron con el antígeno específico (SA), antes de la activación se pre-incubaron durante un período de dos horas con concentraciones crecientes de agonistas selectivos EP2 o de anti-IgE.

La figura 42 muestra el efecto del butaprost y del omalizumab en la línea celular de mastocitos humana LAD2. La sensibilización mediada por la inmunoglobulina E y su antígeno específico SA inducen ~20% de liberación de β -hexosaminidasa. Si se comparan los porcentajes de liberación con los observados en el Subproyecto 1, la degranulación ha disminuido de ~50% a ~20% (ver apartado 3.1.2 del Subproyecto 1). Puesto que las células tenían más de 8 meses de

mantenimiento, se realizaron pruebas de activación mastocitaria junto con células descongeladas de nuevo (Figuras 56 y 57; ver anexo 5). Se observó una relación indirecta entre el tiempo de mantenimiento celular y la degranulación. A pesar de la mínima activación, en la figura 42 se observa como el anticuerpo monoclonal anti-IgE inhibió la degranulación mastocitaria de forma concentración dependiente a partir de 30ng/ml, inhibiendo más del 90% con 30µg/ml. Un efecto similar se alcanzó con el agonista selectivo EP2 desde una concentración de $3 \cdot 10^{-5}$ M hasta 10^{-3} M.

Posteriormente se descongelaron LAD2 y se cultivaron durante un mes antes de la prueba de activación (Figura 57; ver anexo 5) y se observó alrededor de un 60% de degranulación. A continuación también se analizó el efecto resultante del bloqueo de la IgE con otro anticuerpo, el BSW17 (Figura 43), y se observó una inhibición sobre la liberación de β -hexosaminidasa concentración dependiente alcanzando >80% con 3µg/ml. Con la finalidad de comparar el efecto de los tratamientos en paralelo se cultivaron las células con concentraciones crecientes de butaprost, un $3 \cdot 10^{-4}$ M inhibió ~50% (Figura 43).

Finalmente, en la figura 44 se observó de nuevo el efecto inhibitorio del OMA en la degranulación mastocitaria mediada por Fc ϵ RI, donde la concentración más alta (30µg/ml) inhibió un 100% la liberación. Por lo que respecta al agonista selectivo EP2, CP-533536, aunque no alcanzó el 50% del efecto inhibitorio observado con butaprost, la liberación de β -hexosaminidasa disminuyó de forma concentración dependiente a partir de $3 \cdot 10^{-5}$ M.

A la vista de estos datos tanto el agonismo EP2 como el anti-IgE en LAD2 ejercen un efecto inhibitorio sobre la degranulación mastocitaria. Por lo que hace referencia a los agonistas, una concentración de $3 \cdot 10^{-4}$ M de butaprost inhibió ~50% la liberación de β -hexosaminidasa (en LAD2 de un mes u ocho meses de mantenimiento), mientras que el CP-533536 inhibió un ~37%. Respecto a los anticuerpos monoclonales anti-IgE, tanto OMA como BSW17 disminuyeron en torno a un 40% la degranulación a una concentración de 1µg/ml (10:1) (LAD2 de 1 mes de mantenimiento), salvo el omalizumab, que en LAD2 de 8 meses de cultivo, inhibió el doble (~80%) la liberación del mediador mastocitario.

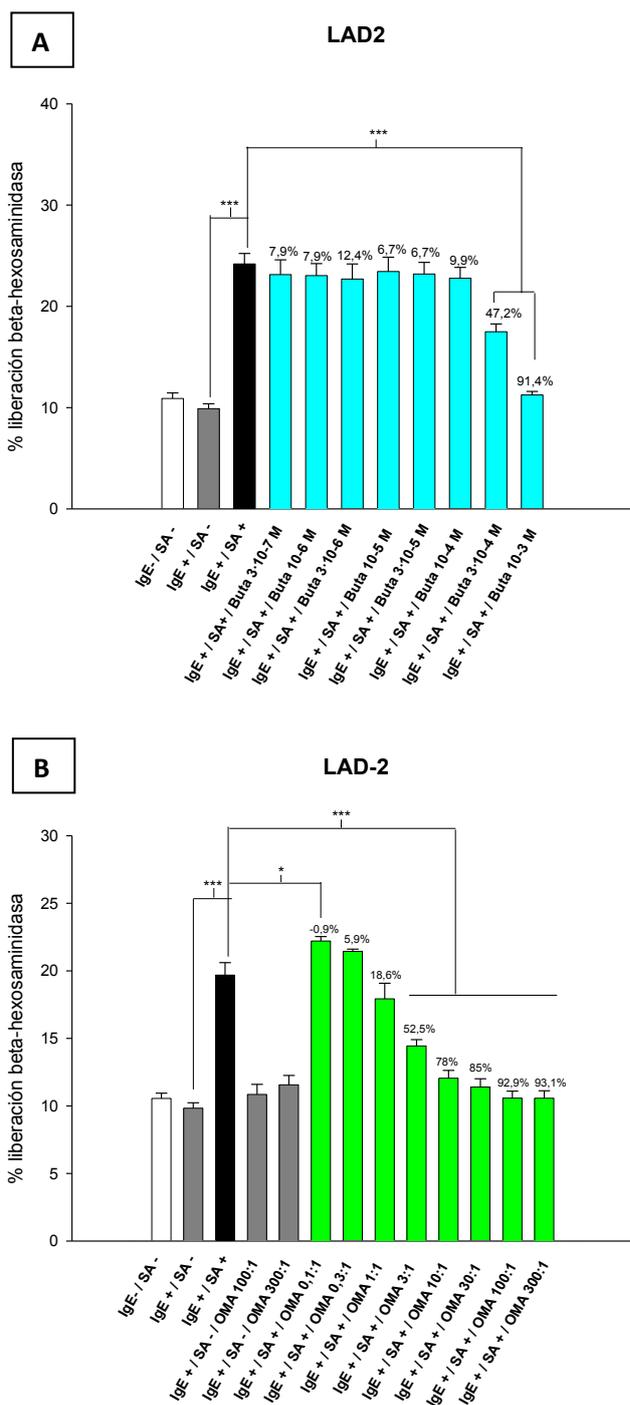


Figura 42. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) *butaprost* y del anticuerpo monoclonal anti-IgE (B) *omalizumab* en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en la línea celular humana de mastocitos LAD2. Las células se sensibilizan con 100ng/ml de IgE humana, las concentraciones de OMA se especifican respecto a la IgE (p. ej. OMA 1:1 indica 100ng/ml de OMA por 100ng/ml de IgE humana). Se observa el efecto de concentraciones crecientes de butaprost y omalizumab, preincubadas durante 2 horas, en la liberación de β-hexosaminidasa. Los % de inhibición del butaprost y del omalizumab se especifican en las columnas pertinentes. Se calculan respecto al control positivo (IgE+/SA+) sustrayendo la liberación basal (IgE-/SA+). Los resultados representan 2 experimentos hechos por cuadruplicado. Se expresa la media±SEM. (*Pvalor<0.05, ***Pvalor<0.001). Buta (butaprost), IgE (inmunoglobulina E), LAD2 (línea de mastocitos humana), OMA (omalizumab), SA (estreptavidina), SEM (error estándar de la media).

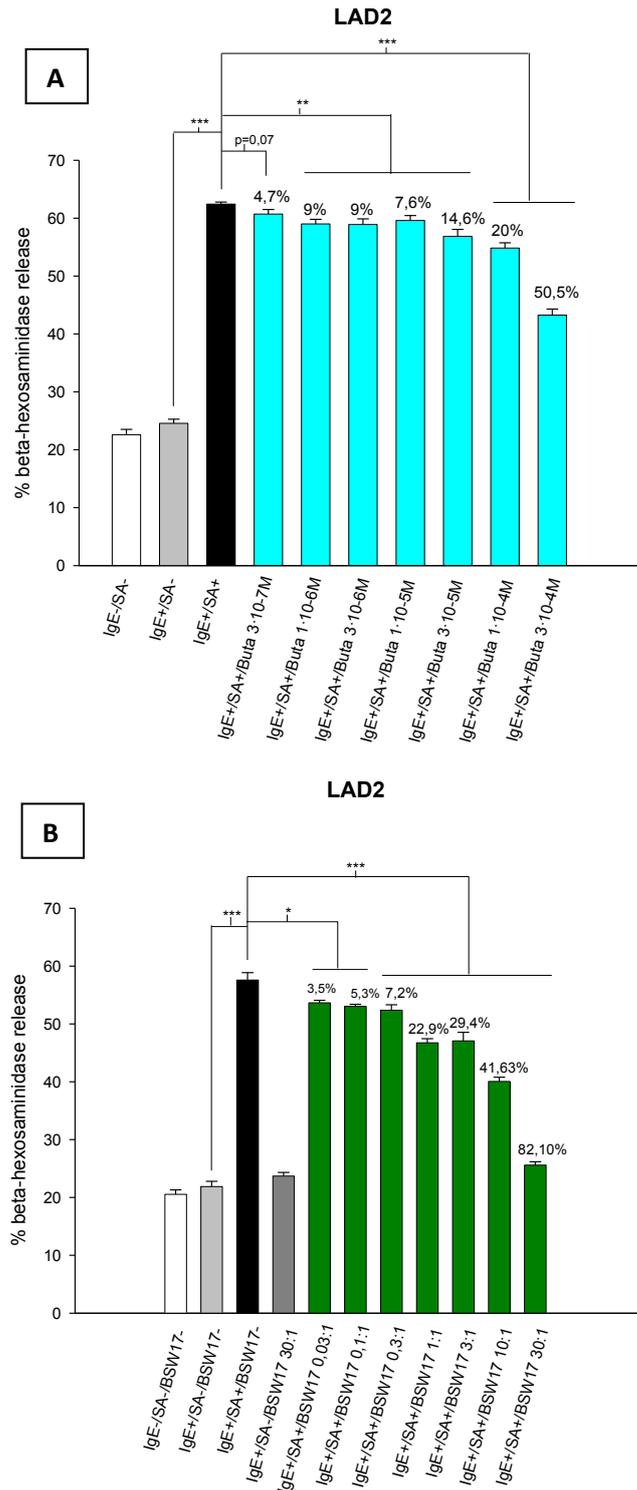


Figura 43. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) *butaprost* y del anticuerpo monoclonal anti-IgE (B) *BSW17* en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en la línea celular humana de mastocitos LAD2. Las células se sensibilizan con 100ng/ml de IgE humana, las concentraciones de BSW17 se especifican respecto a la IgE (p. ej. BSW17 1:1 indica 100ng/ml de BSW17 por 100ng/ml de IgE humana). Se observa el efecto de concentraciones crecientes de butaprost y BSW17, pre-incubadas durante 2 horas, en la liberación de β-hexosaminidasa. Los % de inhibición del butaprost y del BSW17 se especifican en las columnas pertinentes. Se calculan respecto al control positivo (IgE+/SA+) sustrayendo la liberación basal (IgE-/SA+). Los resultados representan 2 experimentos hechos por cuadruplicado. Se expresa la media±SEM. (*Pvalor<0.05, ***Pvalor<0.001). Buta (butaprost), BSW17 (anticuerpo anti-IgE), IgE (inmunoglobulina E), LAD2 (línea de mastocitos humana), SA (estreptavidina), SEM (error estándar de la media).

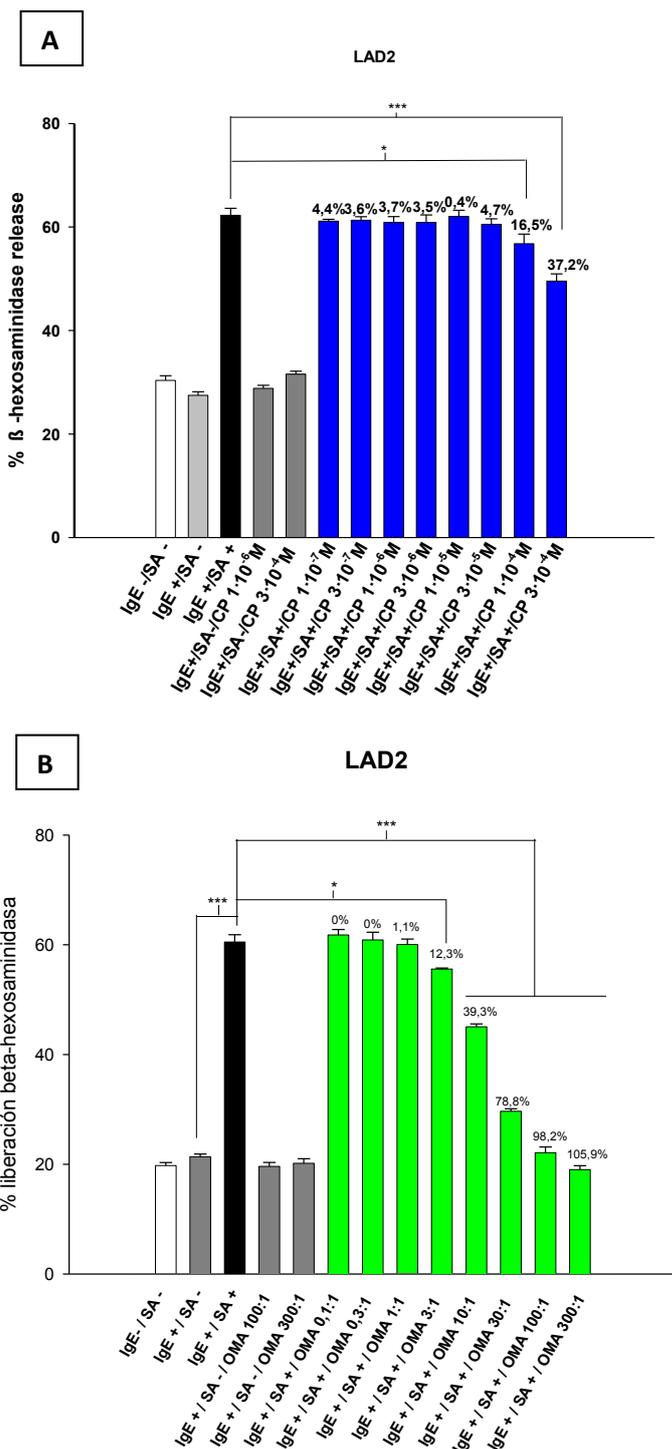


Figura 44. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) CP-533536 y del anticuerpo monoclonal anti-IgE (B) omalizumab en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en la línea celular humana de mastocitos LAD2. Las células se sensibilizan con 100ng/ml de IgE humana, las concentraciones de OMA se especifican respecto a la IgE (p. ej. OMA 1:1 indica 100ng/ml de OMA por 100ng/ml de IgE humana). Se observa el efecto de concentraciones crecientes de butaprost y omalizumab, pre-incubadas durante 2 horas, en la liberación de β -hexosaminidasa. Los % de inhibición del butaprost y del omalizumab se especifican en las columnas pertinentes. Se calculan respecto al control positivo (IgE+/SA+) sustrayendo la liberación basal (IgE-/SA+). Los resultados representan 2 experimentos hechos por cuadruplicado. Se expresa la media \pm SEM. (*Pvalor<0.05, ***Pvalor<0.001). CP (CP-533536), IgE (inmunoglobulina E), LAD2 (línea de mastocitos humana), OMA (omalizumab), SA (estreptavidina), SEM (error estándar de la media).

Los estudios de concentración-respuesta realizados en la línea de mastocitos humana LAD2 confirman el efecto inhibitorio mediante ambas estrategias de bloqueo. El tiempo de mantenimiento celular de las LAD2 es importante para la capacidad de activación mastocitaria mediante una estimulación inmunológica mediada por el receptor FcεRI, influyendo también en la capacidad inhibitoria de ambos mecanismos. Tanto el agonismo selectivo del receptor EP2 como el bloqueo con anticuerpos anti-IgE disminuyeron la degranulación mastocitaria. Por lo tanto, se trata de dos mecanismos potencialmente sinérgicos.

b) Modulación de la degranulación mastocitaria mediante agonismo EP2 y bloqueo de la IgE en RS-ATL8

Asimismo se utilizó una línea celular basofílica leucémica humanizada de rata RS-ATL8 y se comparó el efecto de ambas estrategias de bloqueo. Se realizaron ensayos funcionales preliminares *in vitro* con las células RS-ATL8 y se evaluó el efecto del CP-533536 y del omalizumab tras una estimulación inmunológica mediada por IgE-SA.

La figura 45 muestra la liberación del mediador β-hexosaminidasa (~20%) tras la activación celular mediante el receptor FcεRI. Una pre-incubación con omalizumab disminuyó la liberación de β-hexosaminidasa >10% a partir de una concentración de 100ng/ml. Sin embargo, al analizar el efecto del agonista EP2 se observó una inhibición dependiente pre-incubando las RS-ATL8 con las concentraciones de 10⁻¹²M (1.4%) hasta 10⁻⁸M (46%). Concentraciones más elevadas de CP-533536 no redujeron la degranulación mastocitaria de forma dependiente. Por ello, para poder confirmar el efecto concentración dependiente del agonismo EP2 y del anticuerpo anti-IgE en las células RS-ATL8, serán necesarios más ensayos funcionales *in vitro* de liberación pre-incubando con concentraciones crecientes de los mismos, CP-533536 y OMA, u otros compuestos. No obstante, se ha observado preliminarmente una inhibición mastocitaria por parte de ambos mecanismos de bloqueo en esta línea de mastocitos “humanizada”.

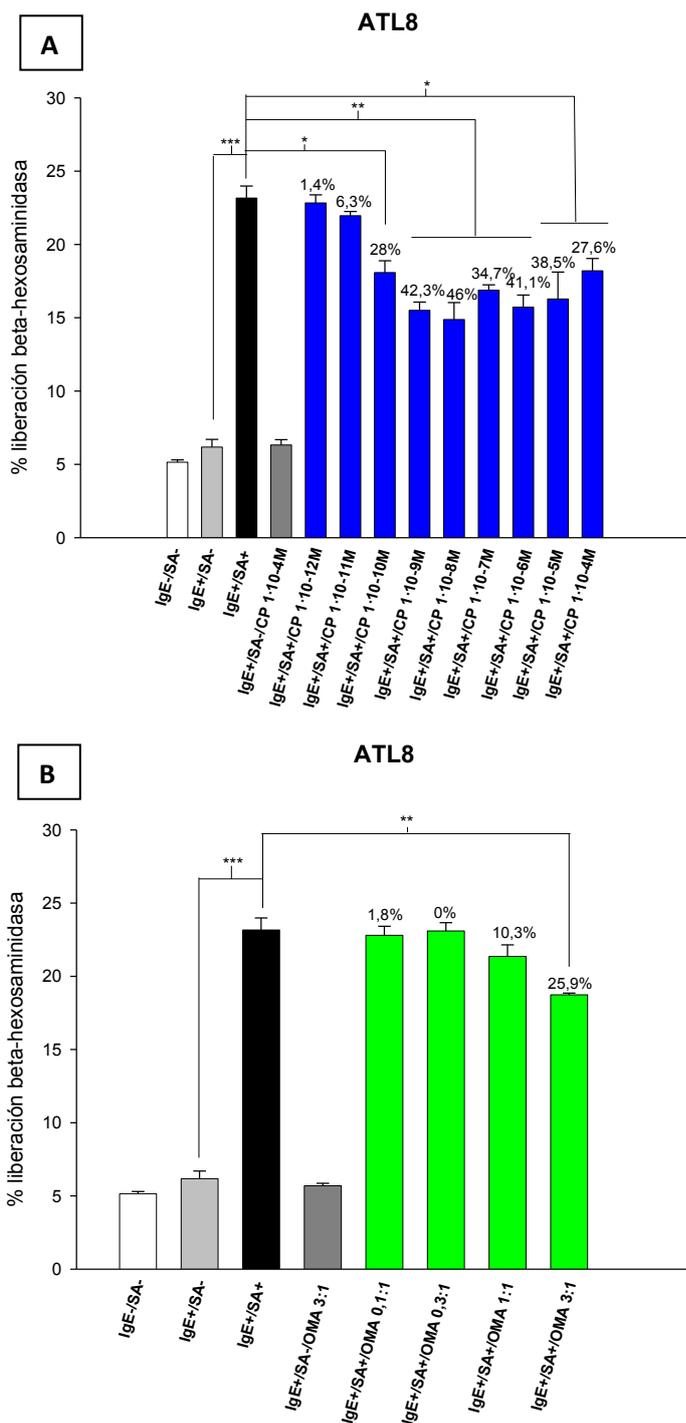


Figura 45. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) CP-533536 y del anticuerpo monoclonal anti-IgE (B) omalizumab en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en la línea celular basofílica leucémica humanizada de rata RS-ATL8. Las células se sensibilizan con 100ng/ml de IgE humana, las concentraciones de OMA se especifican respecto a la IgE (p. ej. OMA 1:1 indica 100ng/ml de OMA por 100ng/ml de IgE humana). Se observa el efecto de concentraciones crecientes de CP-533536, pre-incubadas durante 2 horas, y de omalizumab, pre-incubadas durante 16 horas, en la liberación de β-hexosaminidasa. Los % de inhibición del CP-533536 y del omalizumab se especifican en las columnas pertinentes. Se calculan respecto al control positivo (IgE+/SA+) sustrayendo la liberación basal (IgE-/SA+). Los resultados representan 1 experimento hecho por triplicado. Se expresa la media±SEM. (*Pvalor<0.05, **Pvalor0. 01, ***Pvalor<0.001). CP (CP-533536), IgE (inmunoglobulina E), OMA (omalizumab), SA (estreptavidina), RS-ATL8 (línea celular basofílica humanizada), SEM (error estándar de la media).

Recientemente se ha establecido una nueva línea celular “humanizada” RBL-SX38 que expresa el receptor FcεRI (Nakamura et al., 2010, 2012) y fenotípicamente reproduce las características de los mastocitos. Específicamente en la RS-ATL8 (Wan et al., 2014), subtipo celular de las RBL-SX38, se ha integrado el factor nuclear (NFAT) de las células T activadas que responde al gen de la enzima luciferasa de luciérnagas. Las RBL-SX38 expresan de manera estable las cadenas α , β y γ del receptor humano de alta afinidad de la IgE, FcεRI (Wiegand et al., 1996), se unen a IgE y se activan de manera específica detectando pequeñas cantidades de antígeno. De esta manera, se ha podido demostrar de forma preliminar el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-IgE sobre la degranulación mastocitaria, al impedir la unión de la IgE humana a su receptor de alta afinidad, FcεRI. Asimismo, en las RS-ATL8 el agonista selectivo EP2, CP-533536, ejerce un mayor efecto inhibitorio sobre los mastocitos con una concentración menor que en las LAD2 (10^{-8} M versus $3 \cdot 10^{-4}$ M). Por lo tanto, comparando los dos mecanismos de bloqueo mastocitario en las RS-ATL8 los datos nos indican que el agonismo EP2 es más eficaz, probablemente debido a que expresa más receptor EP2 (aunque hasta el momento no se ha caracterizado la expresión de dicho receptor). Por ello sería interesante evaluar el patrón de expresión de los receptores prostanoideos en este subtipo celular de las RBL-SX38. A pesar de ello, con los datos preliminares obtenidos se ha demostrado una inhibición similar tanto por el anticuerpo anti-IgE como vía receptor EP2.

c) Efecto del agonista EP2 butaprost y del anti-IgE omalizumab en PDMC de ratones FcεRI⁻/hFcεRI⁺

Se utilizaron ratones transgénicos que expresan el receptor humano de IgE, FcεRI⁻/hFcεRI⁺. Se realizó un lavado peritoneal con la finalidad de obtener un cultivo de mastocitos peritoneales (PDMC). Se cultivaron las células con factores de crecimiento específicos (SCF y IL-3) y al cabo de 3 semanas se realizaron estudios funcionales con las PDMC.

La figura 46 muestra el efecto del agonismo EP2 y del anticuerpo anti-IgE sobre la degranulación mastocitaria en cultivos primarios de PDMC procedentes de ratones transgénicos FcεRI⁻/hFcεRI⁺. En el ensayo funcional de β -hexosaminidasa, la liberación del mediador incrementó en un $\sim 30\%$ tras la activación mastocitaria con Chimeric Human IgE anti-NP. Se observó una inhibición de la degranulación dependiente de la concentración por cualquiera de los dos mecanismos inhibitorios. El butaprost inhibió hasta un 66.5% (10^{-5} M) y omalizumab hasta un 76.2% (300ng/ml) con las concentraciones pre-incubadas en ésta primera prueba. Ahora bien, con concentraciones más altas de ambos compuestos podríamos confirmar si efectivamente el efecto inhibitorio aumenta.

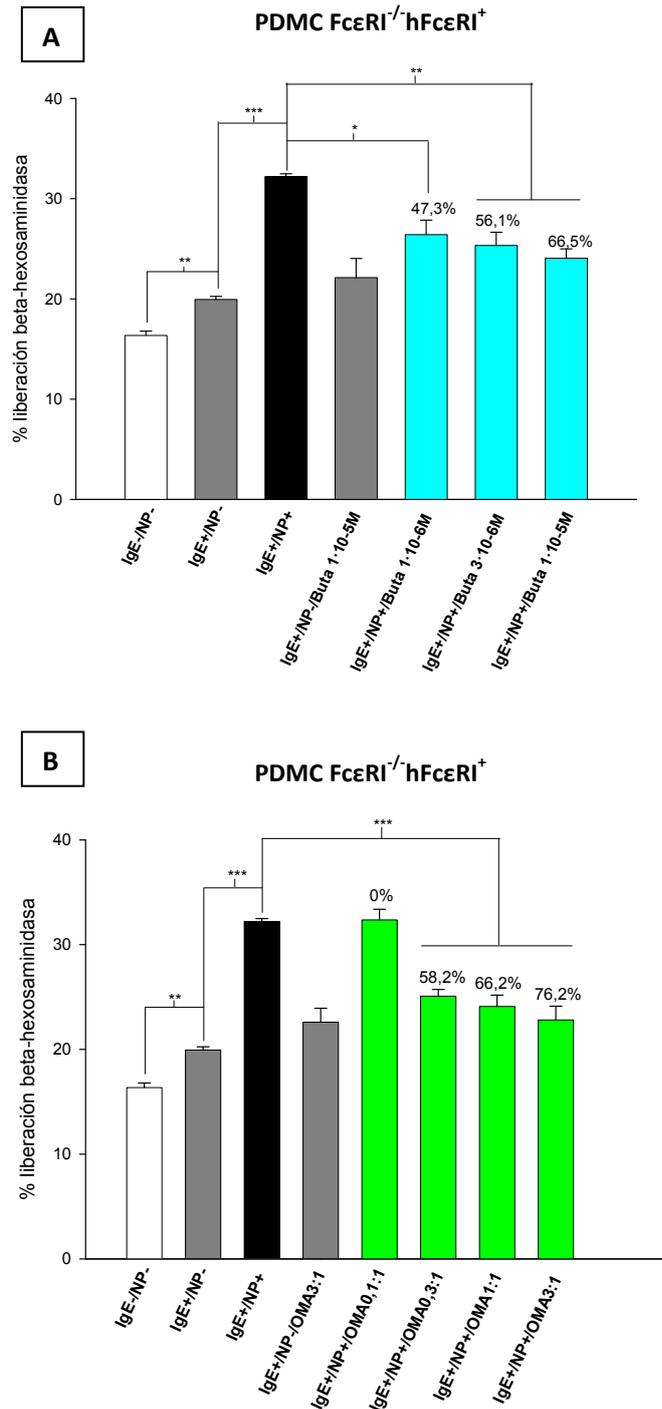


Figura 46. Efecto del agonista selectivo EP2 (A) *butaprost* y del anticuerpo monoclonal anti IgE (B) *omalizumab* en la degranulación mastocitaria inducida por FcεRI en cultivos primarios de mastocitos peritoneales (PDMC) de ratones FcεRI^{-/-}/hFcεRI⁺. Las células se sensibilizan con 100ng/ml de IgE humana, las concentraciones de OMA se especifican respecto a la IgE (p. ej. OMA 1:1 indica 100ng/ml de OMA por 100ng/ml de IgE humana). Se observa el efecto de concentraciones crecientes de butaprost y omalizumab, pre-incubadas durante 2 horas, en la liberación de β-hexosaminidasa. Se calculan respecto al control positivo (IgE⁺/NP⁺) sustrayendo la liberación basal (IgE⁻/NP⁻). Los % de inhibición del butaprost y del omalizumab se especifican en las columnas pertinentes. Los resultados representan 2 experimentos hechos por triplicado. Se expresa la media±SEM. (*Pvalor<0.05, **Pvalor<0.01, ***Pvalor<0.001). Buta (butaprost), FcεRI (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), hFcεRI (receptor humano de alta afinidad de la IgE), IgE (inmunoglobulina E), OMA (omalizumab), SA (estreptavidina), PDMC (mastocitos peritoneales de ratón), NP (nitrofenol), SEM (error estándar de la media).

Especialmente los ratones $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$ presentan un gen endógeno que codifica para la subunidad α del receptor de alta afinidad de la IgE, $Fc\epsilon RI$, el cual se ha inactivado y se ha sustituido por su homólogo humano (Dombrowicz et al., 1996). Por lo tanto, las PDMC expresan el receptor humano de la IgE, $hFc\epsilon RI$. Sensibilizando las células con IgE humana y el antígeno específico se desencadenó la degranulación mastocitaria. Ambos tratamientos inhibieron la liberación de β -hexosaminidasa a medida que aumentaba la concentración. Sin embargo, para conseguir una inhibición similar se necesitó una concentración más alta de butaprost que de omalizumab.

Por lo tanto, se ha confirmado en dos líneas celulares humanas y en cultivos primarios peritoneales de ratones “humanizados” el bloqueo mastocitario mediante ambas estrategias. Hemos detectado dos mecanismos de inhibición potencialmente sinérgicos, cuyo efecto individual se valoró también *in vivo*.

3.1.2. Comparación del efecto del agonismo EP2 y de anti-IgE in vivo en un modelo de anafilaxia cutánea dependiente de mastocitos

En el modelo de PCA se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de IgE humana en la respuesta de hipersensibilidad de la piel. Se comparó la intensidad de la reacción anafiláctica entre machos y hembras de la colonia de ratones transgénicos $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$. Finalmente, se analizó cómo dos mecanismos de bloqueo mastocitario afectaban a la extravasación de azul de ébano.

a) Efecto de la sensibilización local con IgE in vivo en un modelo de anafilaxia cutánea pasiva en ratones transgénicos $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$

Preliminarmente se evaluó el efecto de la sensibilización local con IgE humana (Chimeric human IgE anti-NP) en la oreja y una posterior estimulación con NP. En la figura 47 se representa el efecto de dosis crecientes de IgE humana (20, 80 y 320ng) en la extravasación sistémica de azul de ébano. Las primeras pruebas con el modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) mostraron un incremento significativo en la permeabilidad vascular, debido a la liberación de mediadores vasoactivos de los mastocitos, después de sensibilizar localmente a los ratones con las dosis de 80 y 320ng de IgE humana.

En la figura 48 se comparó el efecto de una dosis de 300ng de IgE humana entre machos y hembras que expresan el receptor humano de la IgE. La sensibilización local con IgE humana y

NP mostró un marcado incremento de la permeabilidad vascular, el cuádruple en machos y el quintuple en hembras. Se observó que las hembras presentaban una reacción de hipersensibilidad mayor en la piel (datos no significativos; $p=0.056$, T-Student).

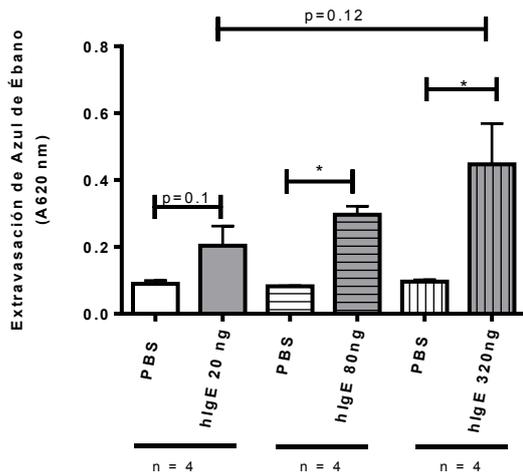


Figura 47. Efecto de dosis crecientes de Chimeric human IgE anti-NP en la respuesta mastocitaria in vivo inducida por FcεRI en ratones FcεRI⁻/hFcεRI⁺. Se observa la absorbancia a través de la extravasación de azul de ébano en las orejas, la cual representa la reacción de hipersensibilidad en la piel debido a la sensibilización local con IgE humana y NP (anafilaxia cutánea pasiva, PCA) de ratones FcεRI⁻/hFcεRI⁺. Se expresa la media±SEM (n=4/grupo experimental). (*Pvalor<0.05). FcεRI (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), hFcεRI (receptor humano de alta afinidad de la IgE), hIgE (inmunoglobulina E humana), NP (nitrofenol), SEM (error estándar de la media).

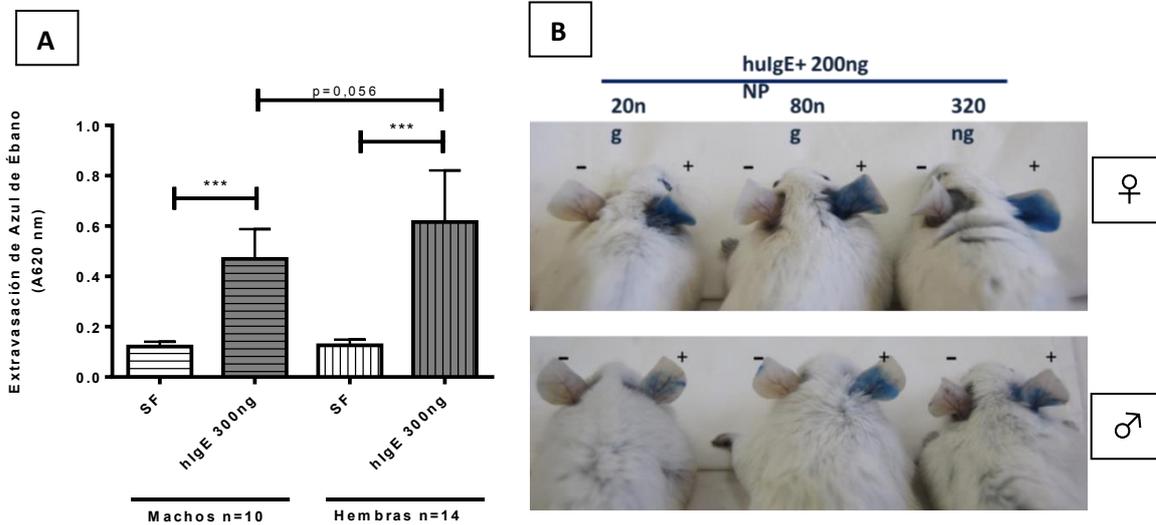


Figura 48. Efecto de Chimeric human IgE anti-NP en la respuesta mastocitaria in vivo inducida por FcεRI en machos y hembras FcεRI⁻/hFcεRI⁺ (A) y imagen de tres machos y 3 hembras donde se observa la reacción anafiláctica (B). Se observa la absorbancia a través de la extravasación de azul de ébano en las orejas, la cual representa la reacción de hipersensibilidad en la piel debido a la sensibilización local con IgE humana y NP (anafilaxia cutánea pasiva, PCA) de ratones FcεRI⁻/hFcεRI⁺. Se expresa la media±SEM. (***)Pvalor<0.001). FcεRI (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), hFcεRI (receptor humano de alta afinidad de la IgE), hIgE (inmunoglobulina E humana), NP (nitrofenol), SEM (error estándar de la media).

La respuesta dérmica inmediata a la interacción de la IgE con el antígeno se ha señalado anteriormente en modelos de anafilaxia cutánea pasiva en el ratón (Galli et al., 2012). Se basa en una reacción anafiláctica transferida pasivamente mediante IgE que también se ha podido generar en los ratones que expresan el receptor humano de la IgE. Los ratones $Fc\epsilon RI^{-}/hFc\epsilon RI^{+}$ se sensibilizaron con Chimeric human IgE anti-NP y después de un período de latencia se les inyectó por vía intravenosa el antígeno específico (NP-BSA) unido a azul de ébano. La reacción del antígeno con el anticuerpo unido a la piel causó la liberación de histamina, la cual aumentó la permeabilidad vascular, permitiendo la liberación del colorante unido a la albúmina (BSA) y produciendo visualmente una mancha azul en el sitio de la inyección intradérmica (Figura 48B). De este modo, extrayendo el colorante se pudo cuantificar la reacción, significativamente mayor en hembras que en machos. Se trata de un modelo cuyo efecto es atribuible exclusivamente a los MC y por lo tanto sirve para concluir acerca de la función *in vivo* de esta población celular.

b) Efecto del omalizumab y del butaprost en la reactividad cutánea mediada por mastocitos *in vivo* en un modelo murino de anafilaxia cutánea pasiva en ratones transgénicos $Fc\epsilon RI^{-}/hFc\epsilon RI^{+}$

Se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de omalizumab y butaprost en la permeabilidad vascular en un modelo de PCA en ratones transgénicos $Fc\epsilon RI^{-}/hFc\epsilon RI^{+}$.

El tratamiento con omalizumab disminuyó de forma dosis-dependiente la activación local de los mastocitos mediada por la sensibilización local con IgE humana y el antígeno específico NP (Figura 49). En las orejas no sensibilizadas no se observaron diferencias significativas. La exposición local (vía intradérmica, anexo 2.4) y sistémica (vía intravenosa, anexo 2.2) a omalizumab disminuyó significativamente la extravasación de azul de ébano (200ng: 66.72%; 300ng: 62.03%; 1 μ g: 91.21%). Al administrar más de 1 μ g de OMA, la inhibición fue de ~100%. De este modo se demostró el potente efecto del anticuerpo anti-IgE en la respuesta anafiláctica.

En la figura 50 se representa el efecto del tratamiento con el agonista selectivo EP2 en la reacción de hipersensibilidad de la piel en el mismo modelo de anafilaxia cutánea *in vivo*. Solamente después de administrar 4 μ g de butaprost se observó una tendencia a disminuir la activación local de los mastocitos y la extravasación de azul de ébano que conlleva (41.44%, $p=0.14$). El efecto inhibitorio sobre la reacción anafiláctica se evaluó de nuevo en un segundo experimento solamente en hembras sensibilizadas localmente a IgE humana y antígeno NP. Como se muestra en la figura 51 el butaprost inhibió significativamente (~50%) la reacción de hipersensibilidad generada como consecuencia de la PCA. Por lo tanto, el efecto del butaprost,

en el modelo de anafilaxia cutánea pasiva, muestra el papel del receptor EP2 en el posible efecto supresor *in vivo*.

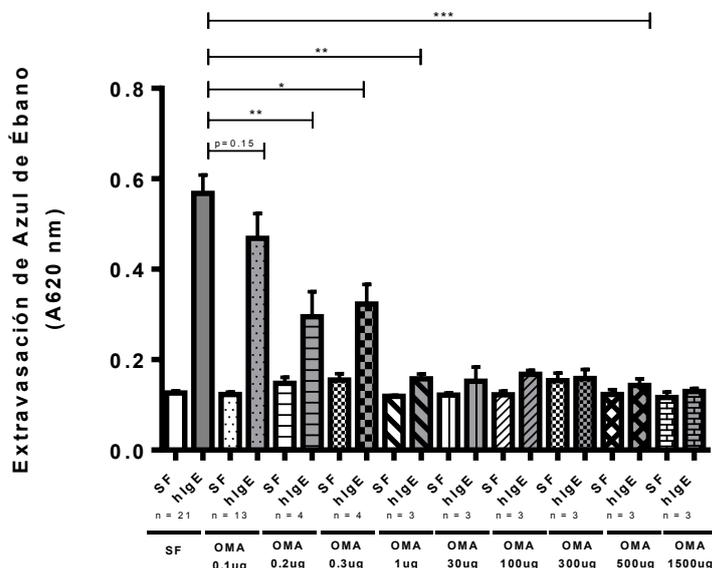


Figura 49. Efecto del anticuerpo monoclonal anti-IgE (omalizumab) en la respuesta mastocitaria *in vivo* inducida por FcεRI en ratones FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺. Se observa la absorbancia a través de la extravasación de azul de ébano en las orejas, la cual representa la reacción de hipersensibilidad en la piel debido a la sensibilización local con IgE humana y NP (anafilaxia cutánea pasiva, PCA) de ratones FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺. Se expresa la media ± SEM. (*Pvalor < 0.05; **Pvalor < 0.01; ***Pvalor < 0.001). FcεRI (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), hFcεRI (receptor humano de alta afinidad de la IgE), hIgE (inmunoglobulina E humana), NP (nitrofenol), OMA (omalizumab), SEM (error estándar de la media).

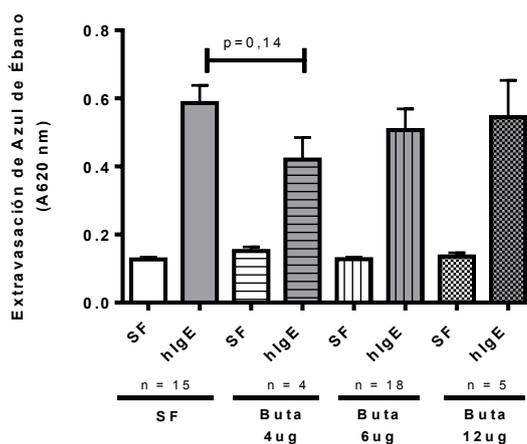


Figura 50. Efecto del agonista selectivo EP2 (butaprost) en la respuesta mastocitaria *in vivo* inducida por FcεRI en ratones FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺. Se observa la absorbancia a través de la extravasación de azul de ébano en las orejas, la cual representa la reacción de hipersensibilidad en la piel debido a la sensibilización local con IgE humana y NP (anafilaxia cutánea pasiva, PCA) de ratones FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺. Buta (butaprost), FcεRI (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), hFcεRI (receptor humano de alta afinidad de la IgE), hIgE (inmunoglobulina E humana), NP (nitrofenol), SEM (error estándar de la media).

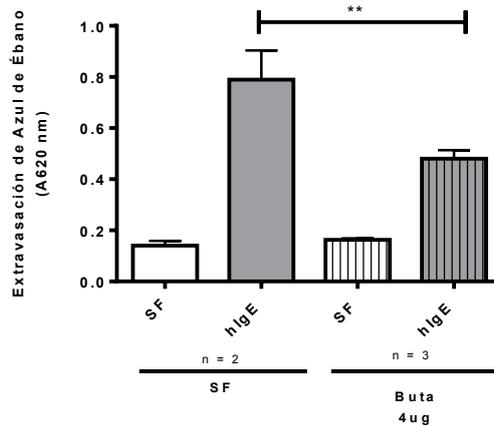


Figura 51. Efecto del agonista selectivo EP2 (butaprost) en la respuesta mastocitaria *in vivo* inducida por FcεRI en hembras FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺. Se observa la absorbancia a través de la extravasación de azul de ébano en las orejas, la cual representa la reacción de hipersensibilidad en la piel debido a la sensibilización local con IgE humana y NP (anafilaxia cutánea pasiva, PCA) de ratones FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺. Se expresa la media ± SEM. (**Pvalor < 0.01). Buta (butaprost), FcεRI (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), hFcεRI (receptor humano de alta afinidad de la IgE), hIgE (inmunoglobulina E humana), NP (nitrofenol), SEM (error estándar de la media).

En relación al efecto inhibitorio sobre la degranulación mastocitaria que habíamos observado *in vitro* por parte del omalizumab y butaprost, en el siguiente abordaje experimental se evaluó *in vivo* el efecto supresor sobre una reacción anafiláctica cutánea pasiva. Para ello se utilizó el modelo de PCA ya que detecta una respuesta dependiente de mastocitos localizada y fácilmente medible por el aumento de la permeabilidad vascular en el lugar del estímulo. Por un lado, el omalizumab es capaz de inhibir completamente la respuesta anafiláctica. Por otro, la inhibición por parte del butaprost en la reacción de hipersensibilidad, también se ha confirmado recientemente en otros estudios *in vivo* de nuestro grupo de investigación (Serra-Pagès et al., 2015; Serra-Pagès et al., 2012). Respecto a las dos estrategias de bloqueo mastocitario el anticuerpo anti-IgE tiene una eficacia mayor que el agonista selectivo EP2 *in vivo*, según nuestros resultados, coincidiendo con parte de los resultados obtenidos *in vitro*.

3.2. Desarrollo de un modelo de anafilaxia respiratoria en ratones transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE

Nos planteamos desarrollar un modelo *in vivo* de anafilaxia respiratoria pasiva (*passive respiratory anaphylaxis*, PRA) en ratones transgénicos “humanizados” FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺ con la finalidad de evaluar el agonismo EP2 frente a la estrategia de inhibición anti-IgE en los mastocitos.

3.2.1. Efecto de la sensibilización local con IgE humana en la actividad mastocitaria de ratones transgénicos $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$ y $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{-/-}$

Con la finalidad de asegurar la correcta distribución de los compuestos en el pulmón tras la administración por vía intratraqueal, se realizaron pruebas administrando azul de ébano con el *Microsprayer Aerosolizer* (Penn-Century). En el anexo 6 se observa como la nebulización con el aerosolizador repartió uniformemente el azul de ébano en los diferentes lóbulos pulmonares.

a) Efecto de la sensibilización con hIgE y el antígeno NP en ratones transgénicos $Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$

Después de administrar por vía intratraqueal la Chimeric human IgE anti-NP y exponer localmente a los ratones al antígeno NP (Figura 41), se evaluó la actividad mastocitaria.

Las figuras 52 y 53 muestran la producción del mediador específico de mastocitos mMCP-1 en tejido pulmonar normalizado por la concentración de proteína total. Se determinó el efecto de la sensibilización local con IgE humana y el antígeno en ratones transgénicos que expresaban el receptor humano de la IgE y eran *knock out* para el receptor de ratón de la IgE ($Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$). En la figura 52 se observa un aumento claro y significativo de la expresión de mMCP-1 en los ratones sensibilizados con IgE humana y expuestos al antígeno NP al compararlos con los no sensibilizados (incremento de 3 veces, de 34.755 ± 55.101 pg/ μ g proteína total [n=12] a 106.983 ± 70.054 pg/ μ g de proteína total [n=14], $p<0.05$).

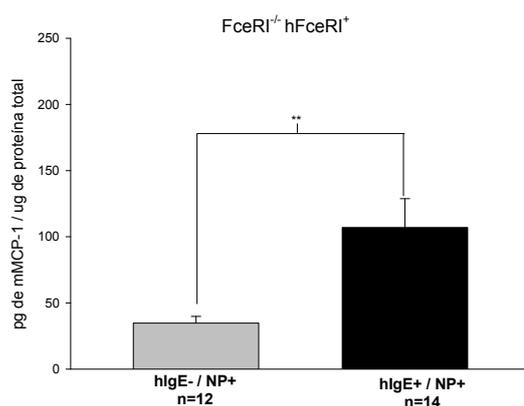


Figura 52. Actividad mastocitaria en ratones transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE ($Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI$) sensibilizados y no sensibilizados a Chimeric human IgE anti-NP y tratados con el antígeno específico NP-BSA. Determinación de la producción local de la proteína mMCP-1 en fragmentos pulmonares de ratones no sensibilizados y sensibilizados a IgE humana. Los resultados representan dos experimentos hechos por separado. Se expresa la media \pm SEM (n=12-14/grupo experimental). (**Pvalor<0.001). $Fc\epsilon RI$ (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), $hFc\epsilon RI$ (receptor humano de alta afinidad de la IgE), hIgE (inmunoglobulina E humana), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), NP (nitrofenol), SEM (error estándar de la media).

Posteriormente se añadieron dos grupos experimentales control, uno sin exposición local a IgE ni NP y otro con sensibilización a IgE, pero sin exposición al antígeno (Figura 53). La actividad mastocitaria no aumentó en ninguno de los dos controles analizados.

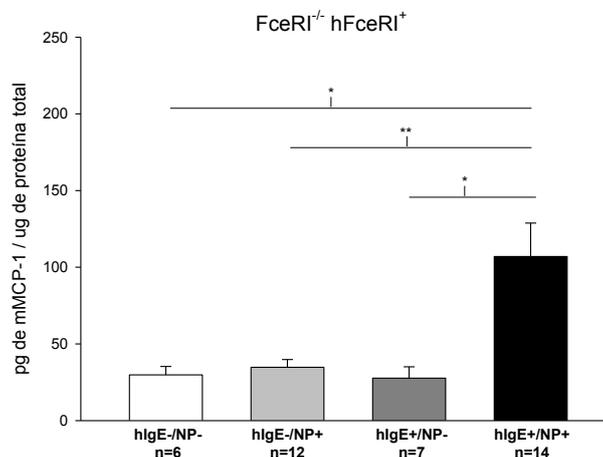


Figura 53. Actividad mastocitaria en ratones transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE (FcεRI^{-/-} hFcεRI⁺) sensibilizados y no sensibilizados a Chimeric human IgE anti-NP y tratados y no tratados con el antígeno específico NP-BSA. Determinación de la producción local de la proteína mMCP-1 en fragmentos pulmonares de ratones no sensibilizados y sensibilizados a IgE humana. Los resultados representan tres experimentos hechos por separado. Se expresa la media±SEM (n=6-7-12-14/grupo experimental). (*Pvalor<0.05; **Pvalor<0.001). FcεRI (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), hFcεRI (receptor humano de alta afinidad de la IgE), hIgE (inmunoglobulina E humana), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), NP (nitrofenol), SEM (error estándar de la media).

b) Efecto de la sensibilización con hIgE y el antígeno NP en ratones transgénicos que no expresan el receptor humano de la IgE FcεRI^{-/-} hFcεRI^{-/-}

Para poder contrastar estos datos con los resultados anteriores se realizó un experimento adicional en el cual se determinó el efecto de la sensibilización con IgE humana de ratones transgénicos que no expresasen el receptor humano de la IgE y eran *knock out* para el receptor de ratón (FcεRI^{-/-}/hFcεRI^{-/-}). En la figura 54 se analiza la actividad mastocitaria *in vivo* y no se observan diferencias significativas respecto a la cantidad de mMCP-1 en los grupos experimentales analizados de ratones doble *knock out* tras la sensibilización local con IgE y/o antígeno NP.

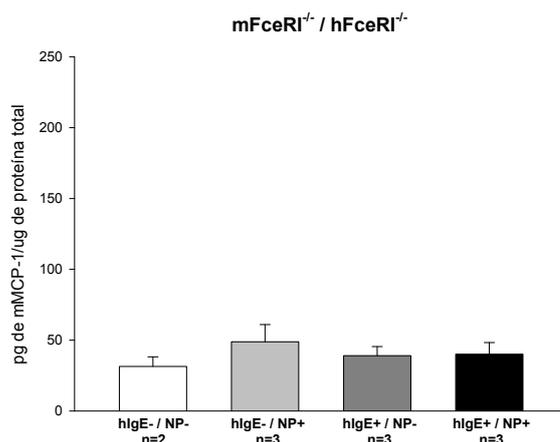


Figura 54. Actividad mastocitaria en ratones en ratones transgénicos que no expresan el receptor humano de la IgE y son *knock out* para el receptor de ratón ($Fc\epsilon RI^{-/-}hF\epsilon RI^{-/-}$) sensibilizados y no sensibilizados a IgE y tratados y no tratados con el antígeno específico NP-BSA. Determinación de la producción local de la proteína mMCP-1 en fragmentos pulmonares de ratones no sensibilizados y sensibilizados a IgE humana. Los resultados representan un experimento. Se expresa la media \pm SEM (n= 2-3/grupo experimental). Fc ϵ RI (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), hFc ϵ RI (receptor humano de alta afinidad de la IgE), hIgE (inmunoglobulina E humana), mMCP-1 (proteasa 1 de los mastocitos de la mucosa de ratón), NP (nitrofenol), SEM (error estándar de la media).

La exposición a aeroalérgenos desencadena la liberación de una variedad de mediadores mastocitarios a través de la unión de la IgE al receptor de alta afinidad Fc ϵ RI que conllevan una serie de respuestas inmediatas y tardías. El control de la actividad mastocitaria se ha visto en ocasiones como una estrategia terapéutica efectiva, como el omalizumab, cuyo efecto beneficioso en el tratamiento antiasmático se ha evidenciado anteriormente.

Los primeros experimentos *in vivo* realizados con ratones Fc ϵ RI^{-/-}hFc ϵ RI⁺ y Fc ϵ RI^{-/-}hFc ϵ RI^{-/-} permiten demostrar que la interacción de la IgE humana con su receptor de alta afinidad, presente en los ratones “humanizados”, es la responsable de la reacción anafiláctica respiratoria. El modelo de PRA desarrollado servirá de modelo de estudio para comparar el efecto de diferentes tratamientos que por un lado, estimulen selectivamente el receptor EP2, y por otro, bloqueen a los mastocitos mediante anti-IgE.

3.2.2. Efecto de la sensibilización local con IgE humana en la broncoconstricción de las vías aéreas de ratones transgénicos Fc ϵ RI^{-/-}hFc ϵ RI⁺

48 horas después de la última administración intratraqueal de IgE y 24 horas después de la última estimulación con el antígeno NP se evaluó la broncoconstricción (BHR) inducida por la

sensibilización local. Se analizó la resistencia pulmonar (R_L) a 200 μ g de NP-BSA nebulizado durante 2 minutos mediante un sistema de pletismografía invasiva.

La figura 55 muestra la broncoconstricción en las vías aéreas de ratones sensibilizados y no sensibilizados con IgE humana. Tras la sensibilización local con Chimeric human IgE anti-NP aumentó el broncoespasmo en comparación con los ratones no sensibilizados con IgE humana ($p < 0.001$, ANOVA dos factores). Específicamente del minuto 4 al minuto 16 posterior a la nebulización del antígeno NP se manifestó un aumento significativo ($p < 0.05$; test *Post Hoc* Bonferroni de comparaciones múltiples) manteniéndose dicha tendencia hasta minuto 20 ($p = 0.0877$; test *Post Hoc* Bonferroni de comparaciones múltiples). La BHR consecuente al antígeno nebulizado revirtió hacia niveles basales del minuto 20 al minuto 90 ($p > 0.05$, test *Post Hoc* Bonferroni de comparaciones múltiples). Por lo tanto, bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 41), los ratones sensibilizados con IgE humana y antígeno específico presentaron un aumento significativo en la broncoconstricción.

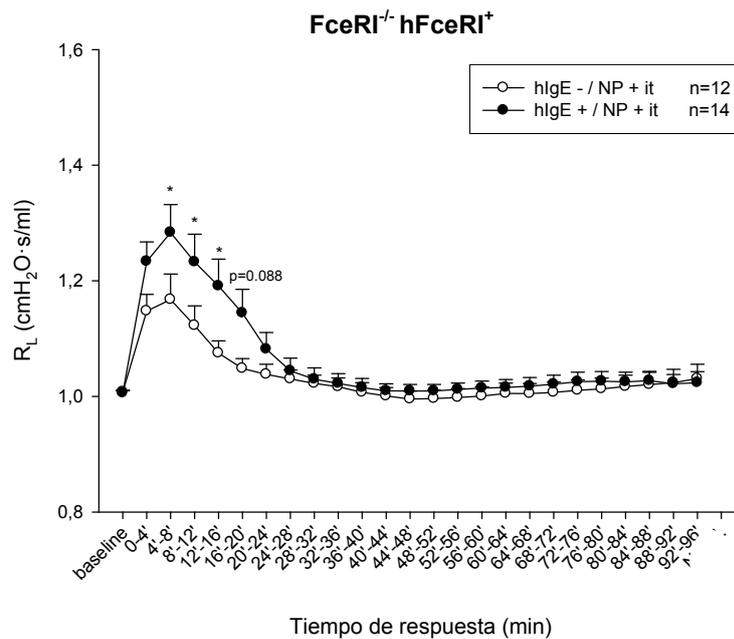


Figura 55. Broncoconstricción (BHR) en ratones que expresan el receptor humano de la IgE ($Fc\epsilon RI^{-/-}hFc\epsilon RI^{+}$) sensibilizados y no a IgE humana y tratados con el antígeno específico NP-BSA. La Chimeric human IgE anti-NP se administra tres días alternos (0, 2 y 6), el NP-BSA se administra durante 7 días alternos (0, 1, 2, 3, 6, 7 y 8). El día 8 se analiza la BHR mediante un método de pletismografía invasiva tras la nebulización de 200 μ g de NP-BSA. Los resultados representan dos experimentos hechos por separado. Se expresa la media \pm SEM (n=12-14/grupo experimental). (*Pvalor<0.05, ***Pvalor<0.001). Fc ϵ RI (receptor de ratón de alta afinidad de la IgE), hFc ϵ RI (receptor humano de alta afinidad de la IgE), hIgE (inmunoglobulina E humana), NP (nitrofenol), R_L (resistencia pulmonar), SEM (error estándar de la media).

El modelo de sensibilización pasiva con IgE humana en ratones “humanizados” ha permitido generar satisfactoriamente una de las principales manifestaciones clínicas del asma, como el broncoespasmo. La anafilaxia respiratoria también ha incrementado la actividad mastocitaria en las vías aéreas a partir de una activación mediada por IgE humana. El modelo de PRA posiblemente imita parte de la respuesta temprana característica del asma inducido por aeroalérgenos. Además aporta una plataforma biológica que servirá para investigar la acción de herramientas farmacológicas potencialmente relevantes en controlar la activación de los mastocitos con IgE. En particular, el posible efecto sinérgico anti-IgE/agonismo EP2.

V. Discusión General

V. DISCUSIÓN GENERAL

En esta Tesis Doctoral nos propusimos estudiar preclínicamente el efecto modulador del receptor prostanoide EP2 mastocitario en la reacción del aparato respiratorio a la sensibilización a aeroalérgenos, y anticipar su potencial terapéutico. El abordaje experimental ha sido diverso, combinando distintas poblaciones mastocitarias, experimentos *in vivo* e *in vitro*, estudiando agonistas y antagonistas de EP2, utilizando ratones *wild type* y transgénicos de distinta naturaleza, y comparando algunos de los resultados con un tratamiento antiasmático efectivo de última generación. Creemos que dicha diversidad experimental otorga solidez a las conclusiones recogidas en este trabajo. En esta sección se hace una valoración e interpretación global de los datos obtenidos en los tres Subproyectos. Parte de esta valoración se recoge en el apartado “Resultados Comentados” de cada uno de ellos.

1. La Activación Selectiva del Receptor EP2 Reduce la Actividad Mastocitaria mediante Interacción Directa

Mediante tres abordajes experimentales se ha evaluado la solidez de la relación entre la activación EP2 y la disminución de la actividad mastocitaria como posible origen de un mecanismo terapéutico beneficioso en el asma.

En primer lugar se planteó determinar si poblaciones mastocitarias heterogéneas conservaban la propiedad de ser inhibidas como consecuencia de la estimulación del receptor EP2 (Subproyecto 1). La comparación del efecto del agonista selectivo EP2, butaprost, y de la PGE2 *in vitro* en diversos cultivos primarios de mastocitos de ratón, y en la línea C57.1 demostró que el efecto inhibitorio se produce transversalmente en poblaciones celulares con características fenotípicas distintas. Dicho efecto inhibitorio se substanció también en mastocitos humanos, la línea LAD2, reforzando estudios previos nuestros y de otros grupos de investigación (Duffy et al., 2008; Feng et al., 2006; Kay et al., 2006, 2013; Serra-Pagès et al., 2012; Wang & Lau, 2006). En efecto, estudios anteriores confirmaron que el grado de inhibición de la degranulación mastocitaria mediante la activación selectiva del receptor EP2, se correlacionaba con el nivel de expresión del receptor EP2 en la membrana mastocitaria (Brown et al., 2011; Kay et al., 2013; Serra-Pagès et al., 2012). Mastocitos con una elevada expresión de EP2 (línea C57.1) exhibieron un notable efecto inhibitorio en respuesta a la exposición a PGE2 tras estimulación vía receptor FcεRI, mientras que en aquellas células, como las PDMC, en las cuales predominaba la expresión de EP3, la PGE2 provocó un aumento de la respuesta mastocitaria. Por lo tanto, se ha demostrado que la PGE2 es capaz de actuar directamente sobre MC tanto humanos como

murinos en cultivo y que poblaciones celulares en las que prepondera la expresión de EP2, predomina un efecto inhibitorio. La posibilidad de que el agonista de EP2 butaprost ejerciera su efecto inhibitorio por mecanismos farmacológicos alternativos parecía improbable, dada su elevada selectividad, pero quisimos certificar la relación “actividad EP2-bloqueo mastocitario” utilizando un agente agonista selectivo químicamente muy distinto a butaprost, el CP-533536 (Subproyectos 1 y 3). CP-533536 ejerció un efecto inhibitorio en diversas poblaciones mastocitarias (LAD2, RS-ATL8). Dicho efecto inhibitorio es de la misma orden de magnitud que el atribuible a butaprost, lo cual contribuye a sustentar la hipótesis de que es el agonismo EP2 el que explica la inhibición y no posibles acciones farmacológicas colaterales. La confirmación de la sólida relación entre “activación del receptor EP2 e inhibición mastocitaria” se obtuvo mediante experimentos *in vitro* en los que se utilizó un antagonista del receptor. De acuerdo con la hipótesis que se ha substanciado en los estudios *in vitro* con los dos agonistas (butaprost y CP-533536), el antagonismo EP2 en cultivos de mastocitos pulmonares de ratón produjo un efecto estimulador. El aumento observado de la degranulación en nuestros experimentos refrenda los datos de Kay et al. (2006), quienes demostraron que el compuesto AH6809 contrarrestaba el efecto de la PGE2 como inhibidor de la liberación de histamina en los mastocitos. Esta batería de estudios con agonistas y antagonistas de EP2 en diversas poblaciones de mastocitos, unida a datos bibliográficos previos, como que en mastocitos aislados de ratones *knock out* para el receptor EP2, la PGE2 no fue capaz de inhibir la actividad mastocitaria (Serra-Pagès et al., 2012), permite concluir que el agonismo selectivo del receptor EP2 ejerce un claro bloqueo de la actividad mastocitaria. Dicho agonismo EP2 presumiblemente podría resultar beneficioso en distintas enfermedades atribuibles, en gran parte, a una sobreactivación de los mastocitos. Ahora bien, ¿Esta capacidad inhibitoria contrastada *in vitro* se reproduce en un efecto similar *in vivo*? Es posible que las interacciones entre diversas poblaciones celulares y tejidos en el sistema respiratorio alteren las consecuencias del agonismo EP2 en los mastocitos. Aunque dados nuestros resultados *in vitro* parece probable que el bloqueo observado *in vivo* sea resultado de una acción directa sobre el receptor mastocitario, no se puede descartar que la interacción con otras poblaciones celulares lo enmascare *in vivo*. Se estudió en primer lugar la actividad de los mastocitos pulmonares tras la administración del agonista de EP2 (Subproyecto 1). Para ello se expusieron los ratones a extractos de ácaros del polvo (HDM). Estos sufrieron un aumento muy claro de la actividad de los mastocitos según la determinación de la proteasa mMCP-1 pulmonar. No sorprende puesto que se otorga a los mastocitos una función central en el asma humana (Boyce, 2003; Brightling et al., 2002, 2003; Marone et al., 2005), papel que se ha refrendado mediante estudios en modelos de asma en el ratón inducida por antígenos como OVA o *Dermatophagoideis farinae* (de Bie et al., 2000; Yu & Chen, 2003). En los trabajos citados en el ratón, la concentración de mMCP-1 se determinó en suero pocos minutos después de la exposición al alérgeno, de manera

que dicho aumento reflejaba probablemente la actividad mastocitaria inducida directamente por la interacción del alérgeno con la IgE específica de los receptores de alta afinidad de su superficie (FcεRI). En nuestro trabajo en cambio, la actividad de los mastocitos se evaluó localmente 24 horas después de la última exposición al alérgeno (HDM). La actividad mastocitaria, perdura en el tiempo más allá de las fases iniciales de contacto con el alérgeno, quizás en parte por estímulos no inmunológicos inducidos por poblaciones leucocitarias reclutadas, como describen Yu et al. (2006). Si bien no era el objetivo de nuestros experimentos, la observación de una actividad prolongada de los mastocitos probablemente sugiera, tal y como se ha adelantado en la Introducción General, un papel de esta población celular que va mucho más allá de sus funciones efectoras; un papel regulador. El aumento de la actividad mastocitaria *in vivo* en ratones sensibilizados a ácaros del polvo, se previno en parte con la administración del agonista de EP2, CP-533536. En este trabajo estadísticamente solo se observa una tendencia, probablemente debido a la menor potencia de este agonista frente a butaprost, compuesto que previene muy significativamente, según trabajos anteriores, la actividad mastocitaria *in vivo* (Serra-Pagès et al., 2015). Estos datos en modelos animales corroboran en gran medida nuestros resultados *in vitro*. Nuestras observaciones permiten sugerir que el efecto protector de la PGE2 exógena observado (Herrerias et al., 2009a; Torres et al., 2013) es el resultado de la inhibición directa de la actividad mastocitaria a través de EP2.

Aunque las células dendríticas, los eosinófilos o las células T reguladoras se han propuesto como dianas celulares de la prostaglandina E2, en los últimos años se ha centrado la atención de los efectos de la PGE2 sobretodo en la modulación de la función mastocitaria. Se ha demostrado su capacidad por promover la degranulación mastocitaria, la migración y la inducción de la producción de leucotrienos C4 y la secreción de citocinas (Gomi et al., 2000; Kuehn et al., 2008). Por el contrario, otros autores señalan que PGE2 atenúa diversas respuestas mastocitarias (Duffy et al., 2008; Feng et al., 2006; Kay et al., 2006). Esta aparente dicotomía está relacionada con los múltiples receptores EP expresados en la membrana de los MC (Duffy et al., 2008; Feng et al., 2006; Gomi et al., 2000; Kay et al., 2006; Nguyen et al., 2002) y nuestros estudios demostraron que los efectos inhibitorios versus estimulatorios de la PGE2 están relacionados con la expresión relativa de EP2/EP3 en los MC (Serra-Pagès et al., 2012). Cuando en las células predomina la expresión de EP3, en vez de EP2, la PGE2 no ejerce un efecto inhibitorio, si no que magnifica la actividad mastocitaria. Weller et al. (2007) y Nguyen et al. (2002) también observaron esta respuesta en BMDC, mastocitos que únicamente expresan EP1, EP3 y EP4. En cambio, Feng et al. (2006) demostraron que la PGE2 podía suprimir vía receptor EP2 la liberación de mediadores en células del cordón umbilical que expresaban EP2, EP3 y EP4. De la misma manera, Kay et al. (2006) describieron que la PGE2 a través de su receptor EP2, estabilizaba la actividad de los mastocitos pulmonares humanos de individuos no asmáticos y

Duffy et al. (2008) confirmaron que la PGE2 también vía EP2 atenuaba la migración de los mismos. No obstante, no podemos excluir la posibilidad que el receptor EP4, receptor inhibitorio en otras células del sistema inmunitario (Feng et al., 2006; Foudi et al., 2008; Luschnig-Schratl et al., 2011), cuya expresión varía dependiendo de la población mastocitaria, puede también contribuir a los efectos inhibitorios de la PGE2. Sin embargo, esto parece improbable, ya que la expresión de EP4 (mRNA) era similar entre BMMC y PDMC, y la pre-incubación de las BMMC con PGE2 produjo un mayor incremento de la degranulación mastocitaria que en las PDMC (Serra-Pagès et al., 2012). De esta forma se refuerza el papel atribuido al receptor EP2 en la protección ejercida por la PGE2 y se evidencia la importancia de su presencia en una célula efectora clave en el asma, como es el MC (Williams & Galli, 2000).

Se puede afirmar por lo tanto que nuestros datos junto a antecedentes bibliográficos, indican con claridad la capacidad del EP2 de inhibir la actividad mastocitaria, y que este mecanismo es susceptible de resultar beneficioso en el asma y en otras patologías donde mastocitos fenotípicamente distintos puedan ejercer un papel relevante como inductores o facilitadores del proceso patológico. Además el hecho de poder actuar selectivamente vía EP2 con un efecto inhibitorio similar al de la PGE2 permite anticipar una reducción notable de efectos adversos. La posibilidad de que dicha prevención se logre localmente redobla el interés de esta posible diana terapéutica.

2. La Activación Selectiva del Receptor EP2 Reduce la Alteración Respiratoria en Ratones Sensibilizados a Aeroalérgenos

El efecto inhibitorio atribuible a EP2 claramente contrastado y transversal en poblaciones mastocitarias distintas puede o no resultar en un efecto protector en modelos de alergia. Antes de conectar ambos fenómenos, el bloqueo mastocitario y la protección frente a procesos alérgicos, se realizaron diversos experimentos para determinar si el agonismo EP2 resultaba beneficioso frente a la alteración inducida por exposición a ácaros del polvo.

Se observó que el agonista EP2, CP-533536, reducía la hiperreactividad de las vías aéreas de ratones causada por la sensibilización a ácaros del polvo (Subproyecto 1). Recientemente nuestros estudios han confirmado que el butaprost, el otro agonista selectivo EP2, reduce significativamente la reactividad de las vías aéreas y la eosinofilia (Serra-Pagès et al., 2015). Butaprost previene la respuesta de las vías aéreas a concentraciones crecientes de metacolina según mediciones realizadas mediante pletismografía invasiva y no invasiva, demostrando por primera vez la protección del EP2 frente a la AHR. Según nuestros datos el agonista CP-533536 ejerce un efecto equivalente *in vivo*. Aunque en la inflamación broncovascular no se encontraron

diferencias significativas con CP-533536, en estudios previos butaprost sí que disminuyó la eosinofilia pulmonar. Dichos resultados se alinean con los de Sturm et al. (2008) donde también se observó una reducción de un 50% en el reclutamiento de eosinófilos atribuible a PGE2 endógena a través del receptor EP2. La tendencia, pero no diferencia, estadística en la capacidad de reducir la inflamación por parte del agonista CP-533536, es seguramente debido a su menor potencia como inhibidor mastocitario según lo discutido en el apartado anterior. En el modelo murino de HDM se descartó el receptor EP3 como el responsable del efecto protector de la PGE2 (Herrerías et al., 2009b). Nuestros resultados coinciden con los de otros investigadores, Church et al. (2012) y Zaslona et al. (2014), quienes sugieren que es el receptor EP2 el principal mediador en el efecto protector de la PGE2. Por tanto, la observación por parte de Kunikata et al. (2005) de que una activación del EP3 puede ser beneficiosa, utilizando un modelo de sensibilización a OVA en ratones *knock out* para el receptor EP3, se explica probablemente por las condiciones experimentales que se utilizaron: antígeno diferente, vía de administración distinta y posiblemente un modelo animal donde el patrón de expresión de los receptores EP puede verse alterado. Además, según Kunikata et al. (2005) la inyección de una molécula modificada de PGE2, 16,16-dimetil (dm)-PGE 2, no ejerció un efecto protector, efecto contrario al observado por De Campo & Henry (2005) en un modelo de OVA similar. Independientemente de las razones para estas discrepancias, desde nuestro punto de vista, el modelo murino de sensibilización a HDM permite establecer las condiciones ideales para dilucidar los mecanismos antiinflamatorios e inmunoreguladores inducidos por la PGE2 (Torres et al., 2013, 2015). El efecto ejercido por los agonistas EP2 es similar al del agonista EP no selectivo, PGE2. Esto subraya todavía más el probable papel preponderante del EP2 en la protección mediada por PGE2 observada en pacientes asmáticos (Gauvreau et al., 1999; Melillo et al., 1994; Sestini et al., 1996). La posibilidad de modular la patología de las vías aéreas inducida por la exposición a aeroalérgenos a través de una intervención intranasal farmacológica subraya el potencial terapéutico de dianas antiasmáticas locales con un ratio favorable de seguridad y eficacia.

Respecto a los mecanismos implicados en el efecto protector observado *in vivo*, cabe destacar que cuando se administra la PGE2 durante los primeros días del proceso de exposición a HDM y se retira antes de finalizar la exposición, atenúa la AHR hasta niveles basales (Torres et al., 2013), lo cual sugiere que el beneficio observado puede deberse en parte a su actividad en las fases tempranas de la sensibilización. Además los agonistas EP2 inhibieron la hiperreactividad bronquial de manera sostenida en el tiempo, ya que se observó al finalizar el período de sensibilización a HDM a pesar que los animales continuaron siendo expuestos al alérgeno durante 5 días adicionales en ausencia de agonistas EP2. La exposición continuada al alérgeno no revirtió por lo tanto el efecto inhibitorio inducido por el tratamiento temprano de CP-

533536 y butaprost. A todo esto le apoyan datos de nuestro grupo de investigación donde se demuestra que en el modelo murino de sensibilización a HDM parece haber un mecanismo de regulación inmunitaria basado en un aumento de la PGE2 endógena, asociado a un aumento de la expresión del receptor EP2 en los pulmones acentuado por la administración exógena de PGE2 (Herrerias et al., 2009b).

Se pudo por lo tanto demostrar que la activación del receptor EP2 parece tener un claro efecto protector que seguramente explique el beneficio de la administración experimental de PGE2 en pacientes asmáticos. Dada la relevancia de los MC en el asma como efectores y reguladores no es descartable que el efecto protector observado, atribuible al agonismo EP2, en el modelo en ratón se explique por la capacidad de inhibir los mastocitos pulmonares. Por ello, se estudió si efectivamente podía haber correlación directa entre la modulación mastocitaria por EP2 y la modulación de la patología inducida en las vías respiratorias.

3. Relación Funcional entre la Reducción de la Actividad Mastocitaria mediante Activación EP2 y la Reducción de la Alteración Alérgica/Respiratoria

Los resultados hasta ahora comentados permiten afirmar que la activación de EP2 reduce la actividad mastocitaria y que además atenúa el proceso respiratorio inducido por exposición a extractos de ácaros del polvo, pero ¿Se trata de epifenómenos? ¿Existe una conexión funcional entre la reducción de la actividad mastocitaria y la reducción del proceso patológico respiratorio? Se abordó esta cuestión mediante tres diseños experimentales: *a)* el efecto *in vivo* del antagonismo EP2 y la administración de un estabilizador de los mastocitos, *b)* el modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) y *c)* las consecuencias de la sobreexpresión del receptor EP2 mastocitario.

El bloqueo de la vía endógena de la PGE2 en ratones sensibilizados a HDM administrando un antagonista del receptor EP2 (AH6809) (Subproyecto 1) produjo un empeoramiento de la AHR a la metacolina (también se observó una tendencia al incremento de la inflamación broncovascular). Aunque se sabe que AH6809 tiene un leve efecto antagonista EP1, se ha establecido que EP1 no está funcionalmente expresado en las poblaciones mastocitarias (Duffy et al., 2008; Kay et al., 2013; Serra-Pagès et al., 2012) y por lo tanto es improbable que EP1 ejerza influencia alguna en este fenómeno. Los datos resultantes del bloqueo de EP2 sugieren que en los ratones expuestos a aeroalérgenos se desencadena espontáneamente un mecanismo compensatorio vía PGE2 para minimizar el daño en las vías respiratorias (Herrerias et al., 2009b). Esto apoyaría la hipótesis de que deficiencias en la regulación de la vía COX2-PGE2

puede ser un factor coadyuvante en la progresión del asma (Roca-Ferrer et al., 2011). El empeoramiento inducido por el bloqueo de la vía endógena de PGE₂-EP2 se previno al administrar cromoglicato de sodio, un estabilizador mastocitario, lo cual sugiere que al bloquear la protección espontánea de PGE₂ se fomenta la actividad mastocitaria, actividad que a su vez actúa directamente agravando la inflamación y la AHR inducidas por la exposición a ácaros del polvo. En conjunto, estos datos confirman que la modulación del receptor EP2 mastocitario tiene un impacto directo en el desarrollo de las alteraciones respiratorias inducidas por exposición a aeroalérgenos en el modelo de HDM.

De igual manera, con el fin de corroborar que la modulación de la actividad mastocitaria por el EP2 guarda relación directa con la reacción inducida por el antígeno, se evaluó *in vivo* el efecto del agonismo EP2 en un modelo de alergia dependiente de mastocitos, PCA (Wershil et al., 1987) (Subproyecto 3). Es decir, de una sensibilización mediante inyección intradérmica de IgE seguida de activación con antígeno específico y la evaluación de la reacción cutánea. Se sabe que en ese modelo la respuesta tisular (inflamación) es consecuencia enteramente de la actividad mastocitaria, lo cual permite concluir que cualquier modificación de la misma es debida a la mayor o menor actividad de esta población celular. La administración del agonista EP2 butaprost en el modelo de PCA redujo el proceso inflamatorio cutáneo lo cual suscribe la relación directa EP2-MC-inflamación y subraya que la protección mediada por PGE₂ en procesos alérgicos (asmáticos o no) puede ser consecuencia de la intermediación mastocitaria. Los datos obtenidos confirman en los ratones que expresan el receptor humano de la IgE, FcεRI^{-/-}/hFcεRI⁺, lo ya observado anteriormente en ratones *wild type* y ratones deficientes en mastocitos (Wsh) (Serra-Pagès et al., 2012). Además estudios más recientes demostraron con claridad mediante la utilización de ratones *knock out* de EP2 que este era el receptor responsable único de la protección atribuible a butaprost (Serra-Pagès et al., 2015). El agonismo EP2 observado en nuestro trabajo reproduce en parte el efecto preventivo de la PGE₂ observado anteriormente en modelos de anafilaxia en ratones (Hedqvist et al., 1989; Lake et al., 1984; Raud et al., 1990). Por lo tanto, se ha reproducido en un modelo de anafilaxia cutánea el más que probable efecto protector del receptor EP2, pero con el valor añadido de utilizar ratones transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE (detallados en el siguiente apartado), los cuales nos permitirán combinar distintos tratamientos terapéuticos para el asma humano.

Finalmente, el hallazgo de la probable conexión “EP2-MC-Asma” se quiso substanciar mediante la generación de ratones que sobreexpresaran en los mastocitos pulmonares el receptor EP2. Con ello se pretendió desarrollar un modelo *in vivo* que claramente asociara al receptor EP2 mastocitario con el beneficio ejercido por la PGE₂ en el asma. A lo largo de un proyecto de 4 años se insertó el gen EP2 murino junto a la región promotora del gen Alpha-Chymase en ratones de la cepa C57BL/6. Se retrocruzaron con ratones BALB/c y se seleccionaron las líneas

según los criterios expuestos (Subproyecto 2). Tal y como se ha comentado, estos ratones transgénicos se generaron mediante una técnica de microinyección, donde el cDNA EP2 está bajo el control del promotor del Alpha-Chymase. De esta manera el receptor EP2 se sobreexpresa principalmente en los mastocitos donde el promotor Alpha-Chymase es más activo. Efectivamente, los MC contienen abundantes gránulos citoplasmáticos con compuestos preformados, entre ellos encontramos diversas proteasas específicas, como las cinasas, triptasas o la carboxipeptidasa A (Caughey, 2007; Metcalfe et al., 1997; Pejler et al., 2007). Dichas proteasas se expresan en los MC con una cantidad de mRNA similar a la de los genes constitutivos (Blank & Rivera, 2004), y se encuentran almacenadas en elevadas proporciones. Se ha calculado que representan más del 25% de la proteína total de los mastocitos (Schwartz et al., 1981; 1987).

Tras obtener los fundadores (FO) y los cruces F1 y F2, con *background* genético C57BL/6, se empezaron los retrocruzamientos con ratones BALB/c, cepa con una predisposición genética a presentar un fenotipo atópico (Brewer et al., 1999; Herz et al., 1998). Además fue interesante observar que PGE2 no mejoró el daño inducido en las vías respiratorias en un modelo de sensibilización a HDM en ratones de la cepa C57BL/6 (Serra-Pagès et al., 2015), donde el mecanismo de desarrollo de la patología respiratoria no implica el mastocito (Becker et al., 2011; Pae et al., 2010), contrariamente a lo ya discutido respecto a la cepa BALB/c, donde los mastocitos sí que están implicados en la respuesta de las vías aéreas (Becker et al., 2011; Pae et al., 2010) y la PGE2 sí que protege. Respecto a la cepa de ratón, butaprost tampoco ejerció el efecto esperado en la patología respiratoria entre ratones *wild type* y *knock out* EP2 de la cepa C57BL/6 (Subproyecto 1). En base a estas observaciones se decidió entonces retrocruzar los ratones transgénicos a la cepa BALB/c. Los ratones transgénicos de genotipos diferentes deben ser retrocruzados hasta conseguir al menos un 99% del *background* genético de la cepa de interés (probablemente ~10 generaciones) (Baron et al., 2012). Por lo tanto se retrocruzaron hasta un total de más de 10 generaciones, período durante el cual mediante RT-PCR (PCR a tiempo real) se monitorizaba la presencia del transgen de EP2 a lo largo de cada generación de las líneas de ratones obtenidas.

Con el fin de comprobar las consecuencias funcionales de la sobreexpresión se realizaron experimentos *in vitro* en poblaciones mastocitarias de estos ratones en las que se evaluó el efecto de la modulación del receptor EP2 mediante agonistas y antagonistas (butaprost, PGE2, AH6809). Los experimentos funcionales *in vitro* se empezaron a realizar en generación 7 (~95% *background* genético). En general los resultados fueron dispares dependiendo de la línea transgénica analizada. Mientras que el efecto del antagonista AH6809 no fue el esperado, ya que incluso en ratones sin sobreexpresión no se observó un aumento de la degranulación, la PGE2 sí que incrementó la liberación mastocitaria en cultivos primarios de PDMC y LMC. Por lo que

respecta al agonista selectivo EP2, butaprost, en cultivos de mastocitos peritoneales de la línea L2 se observó que alguna concentración apuntaba hacia una mayor disminución de la actividad mastocitaria en los ratones TG EP2 en comparación con los WT. Estos resultados corroboraron en cierta medida los datos que reflejan un mayor efecto inhibitorio como consecuencia de la sobreactivación del EP2 mastocitario. Los estudios *in vitro* con ratones transgénicos permitieron preseleccionar las líneas presumiblemente más adecuadas. Sin embargo, el objetivo del experimento era certificar que la modulación del EP2 mastocitario repercutía en la alteración respiratoria inducida por aeroalérgenos. Los estudios *in vivo* en el modelo de asma con o sin administración de PGE2, realizados tras 10 retrocruzamientos, no permitieron corroborar la conexión entre la sobreexpresión del EP2 en los mastocitos pulmonares y la inflamación o la hiperreactividad bronquial. La obtención de un animal transgénico es compleja, la sobreexpresión genética de proteínas y receptores conlleva una alteración de otros genes que probablemente influye en nuestros resultados haciéndolos difícilmente interpretables. Si bien el interés de un modelo de estas características es claro, se requiere de una valoración más exhaustiva que la que nosotros hicimos de la presencia selectiva de EP2 en mastocitos pulmonares. Probablemente convenga estudiar la fluctuación en la expresión en el pulmón de los otros receptores prostanoides (EP1, EP3 y EP4) en los ratones transgénicos para entender en parte los resultados aparentemente dispares obtenidos. Además, el patrón de expresión de los receptores en otros órganos nos daría información adicional sobre la inserción del transgen y sus consecuencias funcionales, ya que la eficacia de la expresión del promotor puede variar entre diferentes tejidos. Asimismo, la inserción del transgen tiene el potencial de romper secuencias de DNA accidentalmente (~5-10%) afectando directamente a la expresión de otros genes (Meisler, 1992; Tecott & Johnson, 2002). En otros casos, debido a múltiples puntos de inserción del transgen, el efecto observado puede ser consecuencia de una expresión génica en exceso, muy por encima de los niveles fisiológicos que incluso pueden llegar a ser tóxicos (Davey & MacLean, 2006; Perl et al., 2009). Por otro lado, los resultados entre machos y hembras pueden presentar diferencias, por ello idealmente ambos sexos deberían ser examinados por separado (Baron et al., 2012). La generación de un ratón transgénico es un proceso laborioso, añadiendo además los retrocruzamientos a la cepa de interés, hizo que utilizáramos indistintamente machos y hembras, repartiéndolos por igual en la medida de lo posible entre los grupos experimentales. Por ello, probablemente una comparación más exhaustiva entre ambos géneros nos daría información adicional que nos ayudaría a interpretar parte de los resultados. Las diferencias funcionales dependiendo de la cepa de ratón, junto con la posibilidad de una descendencia con mezcla de genotipos al añadir retrocruzamientos de múltiples líneas del ratón aumentan la complejidad de trabajar con ratones transgénicos (Baron et al., 2012). Por lo tanto es necesario, tal y como nosotros hemos hecho, utilizar como controles a ratones hermanos de camada de cada línea para todos los experimentos funcionales. Excepcionalmente, algunos fenotipos de

animales modificados genéticamente se manifiestan solamente en un determinado modelo, a una edad específica del ratón y con unas condiciones experimentales limitadas (Davey & MacLean, 2006). En efecto, todas estas variables deben tenerse en consideración y estudiarse para poder interpretar los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo*. Es necesario por lo tanto caracterizar más exhaustivamente el modelo. El éxito de la inserción del transgen y los datos preliminares *in vitro* aconsejan perseverar hasta obtener una línea adecuada.

Los resultados de los estudios con el estabilizador mastocitario en el modelo de asma y del modelo de PCA indican que el efecto protector de la PGE2 *in vivo* se debe a la capacidad de la PGE2 de contener la actividad mastocitaria a través de una interacción directa con su receptor EP2. El modelo transgénico no nos permite hoy por hoy alcanzar esa conclusión y requiere de un mayor esfuerzo en su caracterización. Por lo tanto, el agonismo EP2 en modelos *in vivo* probablemente ejerce un efecto directo en los mastocitos que explica el efecto protector observado. Parece por lo tanto existir una relación funcional directa entre el agonismo EP2, la disminución de la actividad mastocitaria y la reducción de la AHR e inflamación inducida por aeroalérgenos.

4. Potencial Terapéutico del Agonismo EP2 frente a la Neutralización de la IgE (Anti-IgE)

La estrategia terapéutica antiasmática conocida y utilizada más próxima al bloqueo mastocitario que se propone en esta tesis es la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-IgE, el omalizumab. Como ya se ha destacado, la IgE juega un papel central en la patofisiología de las enfermedades alérgicas. Los anticuerpos monoclonales selectivos anti-IgE son una nueva e importante opción terapéutica para el asma grave. Por ello, se valoró la actividad biológica de ambos mecanismos inhibitorios, agonismo EP2 y anti-IgE (Subproyecto 3), con el fin de establecer el potencial terapéutico que ofrecerá la estrategia de activar el receptor EP2 en pacientes asmáticos.

Diversas poblaciones celulares mastocitarias que expresaban el receptor humano de la IgE hFcεRI, fueron sensibilizadas *in vitro* mediante la incubación con IgE humana. Se estudió y comparó entonces el efecto de las dos estrategias inhibitorias: el agonismo EP2 y la anti-IgE. En células LAD2 se ha confirmado que OMA inhibe la síntesis y secreción de leucotrienos, producto de los MC (Serrano-Candelas et al., 2016). Efecto descrito también por otros autores durante la inflamación prolongada en el asma y otras enfermedades alérgicas (Djukanovic et al., 2004; Holgate et al., 2009; Mauri et al., 2014). Sin embargo, recientemente se ha publicado que omalizumab no inhibe la activación mastocitaria y basofílica *in vitro* (Gericke et al., 2015).

Nuestros resultados no coinciden con los de Gericke et al. (2015), ya que a la misma dosis utilizada (10µg/ml), sí que se observó una disminución en la liberación de β-hexosaminidasa. Posiblemente las diferencias se deban al tipo de población mastocitaria utilizada, tiempo de incubación con el anticuerpo anti-IgE y el momento de sensibilización con la IgE humana antes o después de la pre-incubación con omalizumab. Otros autores, al igual que nosotros, observaron el efecto de omalizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-IgE sobre la liberación de β-hexosaminidasa en células RBL-SX38 sensibilizadas a IgE humana, utilizando concentraciones similares a las nuestras (Shiung et al., 2012). Nuestra aportación a los datos de anti-IgE *in vitro* en diversas poblaciones mastocitarias es la evaluación comparada de ambos mecanismos preventivos de la actividad mastocitaria: anti-IgE y agonismo EP2. Para ello se realizaron bioensayos comparativos entre omalizumab y agonistas selectivos EP2 (butaprost y CP-533536) en células RS-ATL8 y PDMC de ratones que expresan el receptor humano de la IgE, FcεRI⁻/hFcεRI⁺. En las RS-ATL8, subtipo de las RBL-SX38, se observó el efecto de concentraciones crecientes de butaprost y omalizumab inhibiendo la degranulación mastocitaria. Finalmente en PDMC de ratones FcεRI⁻/hFcεRI⁺, también se demostró como ambos mecanismos de bloqueo mastocitario, anti-IgE y agonismo EP2, disminuyeron la liberación del mediador mastocitario β-hexosaminidasa. Comparando estos resultados con PDMC de ratones *wild type* de la cepa BALB/c (Subproyecto 1), el agonista selectivo EP2 inhibió de manera similar la activación mastocitaria en ambos cultivos primarios de mastocitos peritoneales.

Además, estudios *in vivo* complementarios en el modelo de PCA enteramente dependiente de mastocitos (inducido en ratones transgénicos con el receptor de la IgE humano) reflejaron que tanto butaprost como omalizumab reducen significativamente la reactividad en la piel (en el caso de butaprost solo se observa significación estadística en hembras). El omalizumab tiene una elevada especificidad por la IgE humana y no se une a la IgE de ratón (Eggel et al., 2014). Por eso en este experimento se utilizaron ratones transgénicos que expresaban la cadena α del receptor FcεRI humano (Dombrowicz et al., 1996). El receptor FcεRI “humanizado” (hFcεRI⁺) fue capaz de mediar una reacción anafiláctica *in vivo*. Cabe destacar que se observó como el omalizumab disminuyó la reacción de hipersensibilidad de manera dosis-dependiente. Eggel et al. (2014) también observaron una inhibición de la anafilaxia cutánea pasiva en ratones FcεRI⁻/hFcεRI⁺, ahora bien, a concentraciones de OMA más elevadas que las nuestras.

Puesto que la inhibición de la IgE (anti-IgE) es una estrategia contrastada en asma que presumiblemente ejerce su efecto beneficioso mayoritario mediante la prevención de la actividad MC, el paralelismo entre ambas estrategias de bloqueo mastocitario (butaprost y omalizumab) detectado en estudios *in vitro* e *in vivo* sugiere que el agonismo EP2 pudiera resultar potencialmente terapéutico. Pudiendo tratarse de estrategias terapéuticas sinérgicas o complementarias.

5. Sinergia Agonismo EP2 y Anti-IgE: Propuesta de un Modelo In Vivo

Los resultados hasta ahora expuestos sugieren claramente la conveniencia de explorar más a fondo el eje EP2-Mastocito-Asma, pero a su vez plantean el reto de disponer de modelos que conecten todos los elementos y que permitan comparar la efectividad inhibitoria de ese eje con tratamientos antiasmáticos conocidos efectivos. Se suscitó en esta tesis la necesidad de abordar el desarrollo de un nuevo modelo que cumpliera esas premisas *in vivo*.

Uno de los problemas que se planteaban de cara a evaluar el potencial terapéutico del agonismo EP2 y de su posible combinación con anti-IgE, era disponer de un modelo respiratorio *in vivo* en el que se pudiera evaluar el efecto de neutralizar la IgE humana. En los modelos clásicos de ratón sensibilizados a antígenos el omalizumab no puede estudiarse, dado que solo detecta la IgE humana. Por eso se decidió intentar inducir una reacción respiratoria mediada por IgE humana en el ratón. Se utilizaron para ello ratones transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE, FcεRI⁻/hFcεRI⁺. Se expuso a los ratones a IgE humana por vía aerógena y posteriormente a antígeno; dado su paralelismo con el modelo de PCA, le llamamos modelo *in vivo* de anafilaxia respiratoria pasiva o PRA (Subproyecto 3). Una herramienta biológica de estas características permitiría soslayar en gran medida las limitaciones que supone el no poder estudiar el efecto del omalizumab preclínicamente en modelos animales. Mediante este procedimiento se indujo un proceso respiratorio en ratones mediado por IgE humana. La sensibilización pasiva con IgE y posterior exposición al antígeno específico generó un aumento inmediato de la resistencia pulmonar (broncoespasmo) acompañado de un incremento de la proteasa específica de los mastocitos mMCP-1 en el pulmón. En cambio, como se esperaba, en ratones doble *knock out*, deficientes para el receptor humano y murino FcεRI⁻/hFcεRI⁻ (Dombrowicz et al., 1993), la IgE humana no aumentó la actividad mastocitaria en el pulmón. La inducción de una reacción anafiláctica respiratoria (PRA) era importante para poder estudiar específicamente la población mastocitaria pulmonar. Si bien la PCA puede darnos alguna clave respecto a la efectividad comparada de ambos tratamientos, dadas las diferencias entre las reacciones observadas en la oreja y el pulmón, y también las poblaciones mastocitarias de ambos lugares, convenía desarrollar un modelo respiratorio. Recientemente, Wex et al. (2014) han desarrollado un modelo de anafilaxia pulmonar pasiva en ratas donde han observado signos de una respuesta asmática temprana, incluyendo liberación de algunos mediadores mastocitarios (histamina, triptasa y leucotrienos), formación de edema pulmonar e incremento de la resistencia pulmonar.

El especial interés de la PRA recae además en que se trata de un modelo reproducible, de corta duración y fácilmente manejable. El esfuerzo culminó por lo tanto en la obtención de un modelo *in vivo* que permitirá estudiar en paralelo (sinergias) o secuencialmente el efecto

bloqueante de anti-IgE (humana) combinado con el agonismo EP2. El éxito en la obtención de un modelo de anafilaxia respiratoria da paso a un proyecto de mayor envergadura que permitirá preclínicamente validar la estrategia de activación de EP2 ante el asma.

VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral nos permiten sacar las siguientes conclusiones:

1. La estimulación del receptor EP2 mastocitario previene la activación de los mastocitos *in vitro* e *in vivo*, y su inhibición la promueve, demostrando que la modulación de la actividad del receptor EP2 mastocitario es un mecanismo mediante el cual se modula la actividad de esta población celular.
2. La efectividad del agonismo EP2 es similar a la del bloqueo de la IgE (anti-IgE) en la prevención de la actividad mastocitaria *in vitro* e *in vivo*, lo cual sugiere que el agonismo EP2 puede suponer un mecanismo beneficioso en enfermedades mediadas por mastocitos en diversos órganos y tejidos.
3. Existe una conexión funcional directa entre la modulación de la actividad mastocitaria mediante el receptor EP2 y la prevención o potenciación de la inflamación y/o de la hiperreactividad bronquial en ratones sensibilizados a ácaros del polvo.
4. El efecto protector de la PGE2 en el modelo de asma en ratón sensible a ácaros del polvo, es atribuible en gran medida al receptor EP2 mastocitario.
5. La inserción del gen *AlphaChymase-EP2-SV40PA* ha permitido la obtención de una línea de ratones transgénicos que sobreexpresa el receptor EP2 en los mastocitos pulmonares.
6. Los ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor EP2 mastocitario son una herramienta biológica idónea para estudiar el mecanismo de protección de la PGE2 en el asma; es decir en el eje “PGE2-Mastocitos-Asma”.
7. La exposición local a IgE humana de ratones transgénicos que expresan el receptor FcεRI humano, permite generar una reacción respiratoria dependiente de la IgE (Anafilaxia Respiratoria Pasiva o PRA), lo cual constituye un modelo idóneo para evaluar preclínicamente el potencial terapéutico del agonismo EP2 frente a la estrategia, terapéuticamente contrastada, de neutralizar la IgE.

8. La activación del receptor EP2 de los mastocitos previene el desarrollo y la progresión del proceso asmático en el modelo de asma inducida por aeroalérgenos de ácaros del polvo en el ratón, lo cual permite afirmar que el receptor EP2 mastocitario ha sido validado preclínicamente como diana terapéutica antiasmática. Posteriores estudios en los modelos transgénicos desarrollados (sobreexpresión de EP2 y PRA) permitirán desvelar los mecanismos protectores involucrados y predecir su potencial terapéutico en pacientes.

Conclusión General

“La activación del eje PGE2 - EP2 Mastocitario - Asma supone un mecanismo endógeno de protección frente a la patología y la disfunción de las vías respiratorias inducida por aeroalérgenos, y por lo tanto constituye una fuente de potenciales dianas terapéuticas antiasmáticas por explorar”

VII. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

A continuación aparecen por orden alfabético todas las referencias bibliográficas consultadas:

Adcock IM & Barnes PJ. 2008. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest* 134 (2): 394-401.

Adcock IM, Caramori G, Chung KF. 2008. New targets for drug development in asthma. *Lancet* 372 (9643): 1073-87.

Aggarwal S, Moodley YP, Thompson PJ, Misso NL. 2010. Prostaglandin E2 and cysteinyl leukotriene concentrations in sputum: association with asthma severity and eosinophilic inflammation. *Clin Exp Allergy* Jan; 40 (1):85-93.

Akinbami LJ, Moorman JE, Liu X. 2011. Asthma prevalence, health care use, and mortality: United States, 2005-2009. *Natl Health Stat Report* (32):1-14

Amin K, Janson C, Boman G, Venge P. 2005. The extracellular deposition of mast cell products is increased in hypertrophic airways smooth muscles in allergic asthma but not in nonallergic asthma. *Allergy* Oct; 60 (10):1241-7.

Aoki T & Narumiya S. 2012. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol Sci* Jun; 33 (6): 304-11.

Bang LM & Plosker GL. 2004. Omalizumab: a review of its use in the management of allergic asthma. *Treat Respir Med* 3 (3): 183-99.-+*1

Barnes PJ. 2006. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* Jun; 148 (3): 245-54.

Barnes PJ. 2010. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* May 31; 120 (2-3): 76-85.

Barnes PJ & Adcock IM. 2009. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* May 30; 373 (9678): 1905-17.

Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW. 1998. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am J Respir Crit Care Med* Mar; 157 (3 Pt 2): S1-53.

Baron RM, Choi AJ, Owen CA, Choi AM. 2012. Genetically manipulated mouse models of lung disease: potential and pitfalls. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Mar 15; 302 (6): L485-97.

Basagana X, Sunyer J, Zock JP, Kogevinas M, Urrutia I, Maldonado JA, et al. 2001. Incidence of asthma and its determinants among adults in Spain. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1133-1137.

Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJH, Pauwels RA, et al. 2004. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control Study. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 836-44.

Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. 2008. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. Jan; 31 (1): 143-78.

Beck LA, Marcotte GV, MacGlashan D, Togias A, Saini S. 2004. Omalizumab-induced reductions in mast cell FcεRI expression and function. *J Allergy Clin Immunol* Sep; 114 (3): 527-30.

Becker M, Reuter S, Friedrich P, Doener F, Michel A, Bopp T, et al. 2011. Genetic variation determines mast cell functions in experimental asthma. *J Immunol* Jun 15; 186 (12): 7225-31.

Befus AD, Dyck N, Goodacre R, Bienenstock J. 1987. Mast cells from the human intestinal lamina propria. Isolation, histochemical subtypes, and functional characterization. *J Immunol* Apr 15; 138 (8): 2604-10.

Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB, Durham SR. 1993. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* Jan; 8 (1): 35-42.

Blank U & Rivera J. 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol* 25 (5): 266-273

Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. 2005. Hope for the hygiene hypothesis: when the dirt hits the fan. *J Asthma* May; 42 (4): 225-47.

Borish LC, Nelson HS, Corren J, Bensch G, Busse WW, Whitmore JB, et al. 2001. Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol* Jun; 107 (6): 963-70.

Botella A, Delvaux M, Fioramonti J, Frexinós J, Bueno L. 1993. Stimulatory (EP1 and EP3) and inhibitory (EP2) prostaglandin E2 receptors in isolated ileal smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* Jun 11; 237 (1): 131-7.

- Boulet LP, Chapman KR, Côté J, Kalra S, Bhagat R, Swystun VA, et al. 1997. Inhibitory effects of an anti-IgE antibody E25 on allergen-induced early asthmatic response. *Am J Respir Crit Care Med* Jun; 155 (6): 1835-40.
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* May; 161 (5): 1720-45.
- Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, Ait-Khaled N, Baena-Cagnani CE, Bleecker ER, et al. 2010. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 126: 926-38.
- Boyce JA. 2003. The role of mast cells in asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69 (2-3): 195-205.
- Bradding P & Cruse G. 2008. Mast cells: biological properties and role in health and allergic diseases. In: Kay B, Kaplan A, Bousquet J, Holt P (Eds.), In Allergy and Allergic Diseases, 2nd edition Wilky-Blackwell. pp. 217-257.
- Bradding P, Walls AF, Holgate ST. 2006. *The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma*. *J Allergy Clin Immunol* Jun; 117 (6): 1277-84.
- Braman SS. 2006. The global burden of asthma. *Chest* Jul; 130 (1 Suppl): 4S-12S.
- Brewer JP, Kisselgof AB, Martin TR. 1999. Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. *Am J Respir Crit Care Med* Oct; 160 (4): 1150-6.
- Brightling C, Berry M, Amrani Y. 2008. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol* Jan; 121 (1): 5-10; quiz 11-2.
- Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. 2003. New insights into the role of the mast cell in asthma. *Clin Exp Allergy* May; 33 (5): 550-6.
- Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. 2002. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 346 (22): 1699-705.
- Broide DH, Gleich GJ, Cuomo AJ, Coburn DA, Federman EC, Schwartz LB, et al. 1991. Evidence of ongoing mast cell and eosinophil degranulation in symptomatic asthma airway. *J Allergy Clin Immunol* Oct; 88 (4): 637-48.

Brown JM, Nemeth K, Kushnir-Sukhov NM, Metcalfe DD, Mezey E. 2011. Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. *Clin Exp Allergy* 41 (4): 526-34.

Buckley J, Birrell MA, Maher SA, Nials AT, Clarke DL, Belvisi MG. 2011. EP4 receptor as a new target for bronchodilator therapy. *Thorax* Dec; 66 (12): 1029-35.

Buhl R. Anti-IgE antibodies for the treatment of asthma. 2005. *Curr Opin Pulm Med*. Jan; 11 (1): 27-34.

Burgess JK, Ge Q, Boustany S, Black JL, Johnson PR. 2004. Increased sensitivity of asthmatic airway smooth muscle cells to prostaglandin E2 might be mediated by increased numbers of E-prostanoid receptors. *J Allergy Clin Immunol* 113 (5): 876-81.

Burgess JK, Ge Q, Poniris MH, Boustany S, Twigg SM, Black JL, et al. 2006. Connective tissue growth factor and vascular endothelial growth factor from airway smooth muscle interact with the extracellular matrix. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290 (1): L153-61.

Burrows B, Martínez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. 1989. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 320: 212-7.

Busse WW, Elias J, Sheppard D, Banks-Schlegel S. 1999. Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med* 140: 1745-53

Busse WW, Morgan WJ, Gergen PJ, Mitchell HE, Gern JE, Liu AH, et al. 2011. Randomized trial of omalizumab (anti-IgE) for asthma in inner-city children. *N Engl J Med* Mar 17; 364 (11): 1005-15.

Cameron KO, Lefker BA, Ke HZ, Li M, Zawistoski MP, Tjoa CM, et al. 2009. Discovery of CP-533536: an EP2 receptor selective prostaglandin E2 (PGE2) agonist that induces local bone formation. *Bioorg Med Chem Lett* Apr 1; 19 (7): 2075-8.

Casale TB, Wood D, Richerson HB, Trapp S, Metzger WJ, Zavala D, et al. 1987. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *J Clin Invest* Apr; 79(4):1197-203.

Cates EC, Fattouh R, Wattie J, Inman MD, Goncharova S, Coyle AJ, et al. 2004. Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. *J Immunol* 173 (10): 6384-92.

Caughey GH. 2007. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev* 217: 141-154

- Chang TW. 2000. The pharmacological basis of anti-IgE therapy. *Nat Biotechnol* Feb; 18 (2): 157-62.
- Cheung D, Timmers MC, Zwinderman AH, Bel EH, Dijkman JH, Sterk PJ. 1992. Long-term effects of a long-acting beta 2-adrenoceptor agonist, salmeterol, on airway hyperresponsiveness in patients with mild asthma. *N Engl J Med* Oct 22; 327 (17): 1198-203.
- Chung KF. 2005. Evaluation of selective prostaglandin E2 (PGE2) receptor agonists as therapeutic agents for the treatment of asthma. *Sci STKE* Sep 27; (303): pe47.
- Church MK & Hiroi J. 1987. Inhibition of IgE-dependent histamine release from human dispersed lung mast cells by anti-allergic drugs and salbutamol. *Br J Pharmacol* Feb; 90 (2): 421-9.
- Cohn L, Elias JA, Chupp GL. 2004. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 22: 789-815.
- Coleman RA, Kennedy I, Humphrey PPA, Lumley P. 1984. Prostanoid receptors — the development of a working classification. *Trends Pharmacol Sci* 5, 303-306.
- Corren J, Casale TB, Lanier B, Buhl R, Holgate S, Jimenez P. 2009. Safety and tolerability of omalizumab. *Clin Exp Allergy* Jun; 39 (6): 788-97.
- Cruse G & Bradding P. 2015. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. *Eur J Pharmacol* May 8. pii: S0014-2999 (15) 00408-2.
- Cuthbert MF. 1969. Effect on airways resistance of prostaglandin E1 given by aerosol to healthy and asthmatic volunteers. *Br Med J* Dec 20; 4 (5685): 723-6.
- Davey RA & MacLean HE. 2006. Current and future approaches using genetically modified mice in endocrine research. *Am J Physiol Endocrinol Metab* Sep; 291 (3): E429-38.
- De Bie JJ, Kneepkens M, Kraneveld AD, Jonker EH, Henricks PA, Nijkamp FP, et al. 2000. Absence of late airway response despite increased airway responsiveness and eosinophilia in a murine model of asthma. *Exp Lung Res* Oct-Nov; 26 (7): 491-507.
- De Campo BA & Henry PJ. 2005. Stimulation of protease-activated receptor-2 inhibits airway eosinophilia, hyperresponsiveness and bronchoconstriction in a murine model of allergic inflammation. *Br J Pharmacol* 144 (8): 1100-8.

De Llano LP, Vennera Mdel C, Álvarez FJ, Medina JF, Borderías L, Pellicer C, et al. 2013. Effects of omalizumab in non-atopic asthma: results from a Spanish multicenter registry. *J Asthma* Apr; 50 (3): 296-301.

De Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koëter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, et al. 1985. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* Mar; 131 (3): 373-6.

Demeure CE, Yang LP, Desjardins C, Raynauld P, Delespesse G. 1997. Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* Dec; 27 (12): 3526-31.

Diaz P, Gonzalez MC, Galleguillos FR, Ancic P, Cromwell O, Shepherd D, et al. 1989. Leukocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* Jun; 139 (6): 1383-9.

Djukanović R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, et al. 1992. Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. *Am Rev Respir Dis* Mar; 145 (3): 669-74.

Djukanović R, Wilson SJ, Kraft M, Jarjour NN, Steel M, Chung KF, et al. 2004. Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* Sep 15; 170 (6): 583-93.

Dombrowicz D, Brini AT, Flamand V, Hicks E, Snouwaert JN, Kinet JP, et al. 1996. Anaphylaxis mediated through a humanized high affinity IgE receptor. *J Immunol* Aug 15; 157 (4): 1645-51.

Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet JP. 1993. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell* Dec 3; 75 (5): 969-76.

Duffy S. M., Cruse G., Cockerill S. L., Brightling C. E., Bradding P. 2008. Engagement of the EP2 prostanoid receptor closes the K⁺ channel KCa3.1 in human lung mast cells and attenuates their migration. *Eur. J. Immunol* 38, 2548–2556

Eder W, Ege MJ, von Mutius E. 2006. The asthma epidemic. *N Engl J Med* Nov 23; 355 (21): 2226-35.

Eggel A, Baravalle G, Hobi G, Kim B, Buschor P, Forrer P, et al. 2014. Accelerated dissociation of IgE-FcεRI complexes by disruptive inhibitors actively desensitizes allergic effector cells. *J Allergy Clin Immunol* Jun; 133 (6): 1709-19.

Ehrlich, P. 1878. Beiträge zur Theorie und Praxis der Histologischen Färbung. [Contribution to the theory and practice of histological staining]. Thesis, Leipzig University. Leipzig.

Encuesta Europea de Salud en España 2009. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Agencia de calidad del SNS. Madrid (España). [Consulta el 25 de Octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/EncuestaEuropea/PrincipalesResultadosInforme.pdf>

Encuesta Nacional de Salud 2011-2012. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Instituto Nacional de Estadística. Madrid (España). [Consulta el 25 de Octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.ine.es/prensa/np770.pdf>

Erin EM, Zacharasiewicz AS, Nicholson GC, Tan AJ, Neighbour H, Engelstätter R, et al. 2008. Rapid effect of inhaled ciclesonide in asthma: a randomized, placebo-controlled study. *Chest* Oct; 134 (4): 740-5

European Respiratory Society. 2013. The European Lung White Book. Sheffield (Reino Unido). [Consultada el 2 de Octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.erswhitebook.org>.

Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, Liu JT, Su JQ, Reimann J, et al. 1997. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* Jun; 155 (6): 1828-34.

Feldsien DC, Sloan SI, Wenzel SE. 1996. Misoprostol, a PGE1 analog, improves the physiologic and inflammatory changes of nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 97 (1Pt3), A354.

Feng C, Beller EM, Bagga S, Boyce JA. 2006. Human mast cells express multiple EP receptors for prostaglandin E2 that differentially modulate activation responses. *Blood* 15; 107 (8): 3243-50.

Foudi N, Kotelevets L, Louedec L, Leséche G, Henin D, Chastre E, et al. 2008. Vasorelaxation induced by prostaglandin E2 in human pulmonary vein: role of the EP4 receptor subtype. *Br J Pharmacol* Aug; 154 (8): 1631-9.

Funk CD, Furci L, FitzGerald GA, Grygorczyk R, Rochette C, Bayne MA, et al. 1993. Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J Biol Chem* Dec 15; 268 (35): 26767-72.

Galli SJ. 1993. New concepts about the mast cell. *J Clin Invest* Mar; 91 (3): 1176-82

Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. 2005. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 23: 749-86.

Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol*. Feb; 11 (1): 53-9.

Galli SJ & Tsai M. 2012. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* May 4; 18 (5): 693-704.

Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* Jul 24; 454 (7203): 445-54.

Gauvreau GM, Watson RM and O'Byrne PM. 1999. Protective effects of inhaled PGE2 on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 31-36.

Gavett SH, Madison SL, Chulada PC, Scarborough PE, Qu W, Boyle JE, et al. 1999. Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J Clin Invest* 104: 721-732.

Gericke J, Ohanyan T, Church MK, Maurer M, Metz M. 2015. Omalizumab may not inhibit mast cell and basophil activation in vitro. *J Eur Acad Dermatol Venereol* Sep; 29 (9): 1832-6.

Gibson GJ, Loddenkemper R, Lundbäck B, Sibille Y. 2013. Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book. *Eur Respir J* Sep; 42 (3): 559-63.

Global strategy for asthma management and prevention. Vancouver (WA, Estados Unidos): Global Initiative for Asthma Inc GINA. [Actualizado Abril 2015; consulta el 30 de Setiembre de 2015] Disponible en: http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015.pdf

Gomez G, Ramirez CD, Rivera J, Patel M, Norozian F, Wright HV, et al. 2005. TGF-beta 1 inhibits mast cell Fc epsilon RI expression. *J Immunol* May 15; 174 (10): 5987-93.

- Gomi K, Zhu FG, Marshall JS. 2000. Prostaglandin E2 selectively enhances the IgE-mediated production of IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mast cells through an EP1/EP3-dependent mechanism. *J Immunol* 165 (11): 6545-52.
- Haak-Frendscho M, Robbins K, Lyon R, Shields R, Hooley J, Schoenhoff M, et al. 1994. Administration of an anti-IgE antibody inhibits CD23 expression and IgE production in vivo. *Immunology* Jun; 82 (2): 306-13.
- Hakimi J, Seals C, Kondas JA, Pettine L, Danho W, Kochan J. 1990. The alpha subunit of the human IgE receptor (FcεRI) is sufficient for high affinity IgE binding. *J Biol Chem* Dec 25; 265 (36): 22079-81.
- Hanania NA, Alpan O, Hamilos DL, Condemi JJ, Reyes-Rivera I, Zhu J, et al. 2011. Omalizumab in severe allergic asthma inadequately controlled with standard therapy: a randomized trial. *Ann Intern Med* May 3; 154 (9): 573-82.
- Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N. 2002. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol*. Mar 1; 168 (5): 2255-63
- Hart TK, Blackburn MN, Brigham-Burke M, Dede K, Al-Mahdi N, Zia-Amirhosseini P, et al. 2002. Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. *Clin Exp Immunol* Oct; 130 (1): 93-100.
- Hartert TV, Dworski RT, Mellen BG, Oates JA, Murray JJ, Sheller JR. 2000. Prostaglandin E(2) decreases allergen-stimulated release of prostaglandin D(2) in airways of subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* Aug; 162 (2 Pt 1): 637-40.
- Hashimoto K, Sheller JR, Morrow JD, Collins RD, Goleniewska K, O'Neal J, et al. 2005. Cyclooxygenase inhibition augments allergic inflammation through CD4-dependent, STAT6-independent mechanisms. *J Immunol* 174: 525-532.
- Hedqvist P, Raud J, Dahlén SE. 1989. Dual action of prostaglandin E2 in allergic inflammation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 19:539-42.
- Herrerias A, Torres R, Serra M, Marco A, Roca-Ferrer J, Picado C, et al. 2009a. Subcutaneous prostaglandin E (2) restrains airway mast cell activity in vivo and reduces lung eosinophilia and Th(2) cytokine overproduction in house dust mite-sensitive mice. *Int Arch Allergy Immunol* 149 (4): 323-32.

Herrerias A, Torres R, Serra M, Marco A, Pujols L, Picado C, et al. 2009b. Activity of the cyclooxygenase 2-prostaglandin-E prostanoid receptor pathway in mice exposed to house dust mite aeroallergens, and impact of exogenous prostaglandin E2. *J Inflamm (Lond)* Oct 30; 6: 30.

Herz U, Braun A, Rückert R, Renz H. 1998. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* May; 28 (5): 625-34.

Holgate S, Smith N, Massanari M, Jimenez P. 2009. Effects of omalizumab on markers of inflammation in patients with allergic asthma. *Allergy* Dec; 64 (12): 1728-36.

Isenberg-Feig H, Justice JP, Keane-Myers A. 2003. Animal models of allergic asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* Jan; 3 (1): 70-8.

Jaffar Z, Ferrini ME, Buford MC, Fitzgerald GA, Roberts K. 2007. Prostaglandin I2-IP signaling blocks allergic pulmonary inflammation by preventing recruitment of CD4+ Th2 cells into the airways in a mouse model of asthma. *J Immunol* 179 (9): 6193-203.

Jarjour NN, Calhoun WJ, Schwartz LB, Busse WW. 1991. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthma-tics are associated with increased airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* 144: 83-7.

Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. 2004. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 169 (3): 378-85.

Jouvin MH, Numerof RP, Kinet JP. 1995. Signal transduction through the conserved motifs of the high affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Semin Immunol* Feb; 7 (1): 29-35.

Kay LJ, Gilbert M, Pullen N, Skerratt S, Farrington J, Seward EP, et al. 2013 Characterization of the EP receptor subtype that mediates the inhibitory effects of prostaglandin E2 on IgE-dependent secretion from human lung mast cells. *Clin Exp Allergy* Jul; 43 (7): 741-51.

Kay LJ, Yeo WW, Peachell PT. 2006. Prostaglandin E2 activates EP2 receptors to inhibit human lung mast cell degranulation. *Br J Pharmacol* 147 (7): 707-713.

Ketchell RI, Jensen MW, Lumley P, Wright AM, Allenby MI, O'connor BJ. 2002. Rapid effect of inhaled fluticasone propionate on airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in mild asthma. *Allergy Clin Immunol* Oct; 110 (4): 603-6.

- Kim J & Remick DG. 2007 *Tumor necrosis factor inhibitors for the treatment of asthma. Curr Allergy Asthma Rep* May; 7 (2): 151-6.
- Kips JC, Tournoy KG, Pauwels RA. 2001. New anti-asthma therapies: suppression of the effect of interleukin (IL)-4 and IL-5. *Eur Respir J* Mar; 17 (3): 499-506.
- Kirshenbaum, A. S., Akin, C., Wu, Y., Rottem, M., Goff, J. P., Beaven, M. A., et al. 2003. Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of Fc_εRI or Fc_γRI. *Leuk Res* 27, 677–682.
- Kontogianni K, Bakakos P, Kostikas K, Hillas G, Papaporfyriou A, Papiris S, et al. 2013. Levels of prostaglandin E(2) and Cysteinyl-leukotrienes in sputum supernatant of patients with asthma: the effect of smoking. *Clin Exp Allergy* Jun; 43 (6): 616-24.
- Koshino T, Arai Y, Miyamoto Y, Sano Y, Itami M, Teshima S, et al. 1996. Airway basophil and mast cell density in patients with bronchial asthma: relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Asthma* 33: 89-95.
- Kuehn HS, Beaven MA, Ma HT, Kim MS, Metcalfe DD, Gilfillan AM. 2008. Synergistic activation of phospholipases Cgamma and Cbeta: a novel mechanism for PI3K-independent enhancement of FcεRI-induced mast cell mediator release. *Cell Signal* Apr; 20 (4): 625-36.
- Kuehn HS, Jung MY, Beaven MA, Metcalfe DD, Gilfillan AM. 2011. Distinct PGE2-responder and non-responder phenotypes in human mast cell populations: "all or nothing" enhancement of antigen-dependent mediator release. *Immunol Lett* Dec 30; 141 (1): 45-54.
- Kunikata T, Yamane H, Segi E, Matsuoka T, Sugimoto Y, Tanaka S, et al. 2005. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol* 6 (5): 524-31.
- Lake AM, Kagey-Sobotka A, Jakubowicz T, Lichtenstein LM. 1984. Histamine release in acute anaphylactic enteropathy of the rat. *J Immunol* 133 (3): 1529-34.
- Lambrecht BN, Van Rijt LS, Kuipers H. 2003. Immunology of eosinophilic airway inflammation: what the animal models teach us. En: Lambrecht BN, Hoogsteden HC, Diamant Z, editors. *The immunological basis of asthma*. New York: Marcel Dekker p. 343-565
- Leckie MJ. 2003. Anti-interleukin-5 monoclonal antibodies: preclinical and clinical evidence in asthma models. *Am J Respir Med* 2 (3): 245-59.

Li S, Aliyeva M, Daphtary N, Martin RA, Poynter ME, Kostin SF, et al. 2014. Antigen-induced mast cell expansion and bronchoconstriction in a mouse model of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Jan; 306 (2): L196-206.

Li H, Edin ML, Bradbury JA, Graves JP, DeGraff LM, Gruzdev A, et al. 2013. Cyclooxygenase-2 inhibits T helper cell type 9 differentiation during allergic lung inflammation via down-regulation of IL-17RB. *Am J Respir Crit Care Med* Apr 15; 187 (8): 812-22.

Li M, Ke HZ, Qi H, Healy DR, Li Y, Crawford DT, et al. 2003. A novel, non-prostanoid EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist stimulates local bone formation and enhances fracture healing. *J Bone Miner Res* Nov; 18 (11): 2033-42.

Licari A, Marseglia G, Castagnoli R, Marseglia A, Ciprandi G. 2015. The discovery and development of omalizumab for the treatment of asthma. *Expert Opin Drug Discov* Sep; 10 (9): 1033-42.

Liu MC, Bleecker ER, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Niv Y, McLemore TL. 1990. Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D2, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis* Jul; 142 (1): 126-32.

Liu FT, Bohn JW, Ferry EL, Yamamoto H, Molinaro CA, Sherman LA, et al. 1980. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation, and characterization. *J Immunol* Jun; 124 (6): 2728-37.

Liu T, Laidlaw TM, Feng C, Xing W, Shen S, Milne GL, et al. 2012. Prostaglandin E2 deficiency uncovers a dominant role for thromboxane A2 in house dust mite-induced allergic pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* Jul 31; 109 (31): 12692-7.

Loeffler LJ, Lovenberg W, Sjoerdsma A. 1971. Effects of dibutyl-3',5'-cyclic adenosine monophosphate, phosphodiesterase inhibitors and prostaglandin E1 on compound 48-80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells in vitro. *Biochem Pharmacol* Sep; 20 (9): 2287-97.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, et al. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* Dec 15; 380 (9859): 2095-128.

Luschnig-Schratl P, Sturm EM, Konya V, Philipose S, Marsche G, Fröhlich E, et al. 2011. EP4 receptor stimulation down-regulates human eosinophil function. *Cell Mol Life Sci* Nov; 68 (21): 3573-87.

- MacGlashan D. 2004. Loss of receptors and IgE in vivo during treatment with anti-IgE antibody. *J Allergy Clin Immunol* Dec; 114 (6): 1472-4.
- MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, McGuire VA, Nöehren G, Kristariyanto Y, et al. 2013. PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J Immunol* Jan 15; 190 (2): 565-77.
- Maher SA, Birrell MA, Belvisi MG. 2009. Prostaglandin E2 mediates cough via the EP3 receptor: implications for future disease therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 180 (10): 923-928.
- Main IH. 1964. The inhibitory actions of prostaglandins on respiratory smooth muscle. *Br J Pharmacol Chemother* Jun; 22: 511-9.
- Manning PJ, Lane CG, O'Byrne PM. 1989. The effect of oral prostaglandin E1 on airway responsiveness in asthmatic subjects. *Pulm Pharmacol* 2 (3): 121-4.
- Marone G, Triggiani M, de Paulis A. 2005. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends Immunol* 26 (1): 25-31.
- Martin JG, Suzuki M, Maghni K, Pantano R, Ramos-Barbón D, Ihaku D, et al. 2002. The immunomodulatory actions of prostaglandin E2 on allergic airway responses in the rat. *J Immunol* 169 (7): 3963-9.
- Martinez FD, Chinchilli VM, Morgan WJ, Boehmer SJ, Lemanske RF Jr, Mauger DT, et al. 2011. Use of beclomethasone dipropionate as rescue treatment for children with mild persistent asthma (TREXA): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* Feb 19; 377 (9766): 650-7.
- Martínez-Moragón E, Serra-Batlés J, De Diego A, Palop M, Casan P, Rubio-Terrés C, et al.; por el Grupo de Investigadores del estudio AsmaCost. 2009. Economic cost of treating the patient with asthma in Spain: the AsmaCost study. *Arch Bronconeumol* Oct; 45 (10): 481-6.
- Martínez-Moratalla J, Almar E, Sunyer J, Ramos J, Pereira A, Payo F, et al. 1999. European Asthma Study. Identifying and treating young adults with epidemiological criteria for asthma in five areas of Spain. Spanish Group of the European Asthma Study. *Arch Bronconeumol* May; 35 (5): 223-8.
- Matsuda K, Piliponsky AM, Iikura M, Nakae S, Wang EW, Dutta SM, et al. 2005. Monomeric IgE enhances human mast cell chemokine production: IL-4 augments and dexamethasone suppresses the response. *J Allergy Clin Immunol* Dec; 116 (6): 1357-63.

Maurer D, Fiebigler E, Reininger B, Wolff-Winiski B, Jouvin MH, Kilgus O, et al. 1994. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* Feb 1; 179 (2): 745-50.

Mauri P, Riccio AM, Rossi R, Di Silvestre D, Benazzi L, De Ferrari L, et al. 2014. Proteomics of bronchial biopsies: galectin-3 as a predictive biomarker of airway remodelling modulation in omalizumab-treated severe asthma patients. *Immunol Lett* Nov; 162 (1 Pt A): 2-10.

Meisler MH. 1992. Insertional mutation of 'classical' and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet* Oct; 8 (10): 341-4.

Melillo E, Woolley KL, Manning PJ, Watson RM, O'Byrne PM. 1994. Effect of inhaled PGE2 on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* May; 149 (5): 1138-41.

Metcalf DD, Baram D, Mekori YA. 1997. Mast cells. *Physiol Rev* 77 (4): 1033-1079.

Metzger WJ, Zavala D, Richerson HB, Moseley P, Iwamoto P, Monick M, et al. 1987. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. Description of the model and local airway inflammation. *Am Rev Respir Dis* Feb 135 (2): 433-40.

Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, et al. 1999. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAB-E25 Study Group. *N Engl J Med* Dec 23; 341 (26): 1966-73.

Moiseeva EP, Bradding P. 2011. Mast cells in lung inflammation. *Adv Exp Med Biol* 716: 235-69.

Montefort S, Gratziau C, Goulding D, Polosa R, Haskard DO, Howarth PH, et al. 1994. 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* Apr; 93 (4): 1411-21.

Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, et al. 2010. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol* Mar; 3 (2): 111-28.

Moore BB, Coffey MJ, Christensen P, Sitterding S, Ngan R, Wilke CA, et al. 2000. GM-CSF regulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a prostaglandin-dependent mechanism. *J Immunol* 165 (7): 4032-9.

- Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. 2010. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* Feb 15; 181 (4): 315-23.
- Moqbel R, Walsh GM, Macdonald AJ, Kay B. 1986. Effect of disodium cromoglycate on activation of human eosinophils and neutrophils following reversed (anti-IgE) anaphylaxis. *Clin Allergy* Jan; 16 (1): 73-83.
- Mullane K. 2011. The increasing challenge of discovering asthma drugs. *Biochem Pharmacol* 82 (6): 586-99.
- Nakamura R, Ishiwatari A, Higuchi M, Uchida Y, Nakamura R, Kawakami H, et al. 2012. Evaluation of the luciferase assay-based in vitro elicitation test for serum IgE. *Allergol Int Sep*; 61 (3): 431-7.
- Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, et al. 2010 A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. *Allergy Oct*; 65 (10): 1266-73.
- Nakata J, Kondo M, Tamaoki J, Takemiya T, Nohara M, Yamagata K, et al. 2005. Augmentation of allergic inflammation in the airways of cyclooxygenase-2 deficient mice. *Respirology* 10: 149-156.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev Oct*; 79 (4): 1193-226.
- National Asthma Education and Prevention Program. 2002. Expert Panel Report: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma Update on Selected Topics-2002. *J Allergy Clin Immunol* 110 (5): 141-219.
- Nguyen M, Solle M, Audoly LP, Tilley SL, Stock JL, McNeish JD, et al. 2002. Receptors and signaling mechanisms required for prostaglandin E2-mediated regulation of mast cell degranulation and IL-6 production. *J Immunol* 169 (8): 4586-93.
- Nieto A, Alvarez-Cuesta E, Boquete M, Mazón A, de la Torre F. 2001. The cost of asthma treatment in Spain and rationalizing the expense. *J Investig Allergol Clin Immunol* 11 (3): 139-48.
- Nishigaki N, Negishi M, Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Narumiya S, et al. 1995. Identification of prostaglandin E receptor 'EP2' cloned from mastocytoma cells EP4 subtype. *FEBS Lett May* 15; 364 (3): 339-41.

Niven R, Chung KF, Panahloo Z, Blogg M, Ayre G. 2008. Effectiveness of omalizumab in patients with inadequately controlled severe persistent allergic asthma: an open-label study. *Respir Med* Oct; 102 (10): 1371-8.

Normansell R, Walker S, Milan SJ, Walters EH, Nair P. 2014. Omalizumab for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* Jan 13; 1: CD003559.

O'Byrne PM, Pedersen S, Busse WW, Tan WC, Chen YZ, Ohlsson SV, et al. 2006. Effects of early intervention with inhaled budesonide on lung function in newly diagnosed asthma. *Chest* Jun; 129 (6): 1478-85.

Oguma T, Asano K, Ishizaka A. 2008. Role of prostaglandin D₂ and its receptors in the pathophysiology of asthma. *Allergol Int* 57 (4): 307-12.

Ogushi F, Endo T, Tani K, Asada K, Kawano T, Tada H, et al. 1999. Decreased prostaglandin E₂ synthesis by lung fibroblasts isolated from rats with bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 80 (1): 41-9.

Okayama Y, Ra C, Saito H. 2007. Role of mast cells in airway remodeling. *Curr Opin Immunol* Dec; 19 (6): 687-93.

Orr TS, Hall DE, Gwilliam JM, Cox OS. 1971. The effect of disodium cromoglycate on the release of histamine and degranulation of rat mast cells induced by compound 48-80. *Life Sci* Jul 15; 10 (14): 805-12.

Ortega S. 2009. Ratones transgénicos en investigación biomédica. [Transgenic mice in biomedical research]. SEBBM. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid (España). [Consulta el 26 de noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/158-ratones-transgenicos-en-investigacion-biomedica>

Oskeritzian CA, Zhao W, Min HK, Xia HZ, Pozez A, Kiev J, et al. 2005. Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. *J Allergy Clin Immunol* Jun; 115 (6): 1162-8.

Owen CE. 2007. Immunoglobulin E: role in asthma and allergic disease: lessons from the clinic. *Pharmacol Ther* Jan; 113 (1): 121-33.

Pae S, Cho JY, Dayan S, Miller M, Pemberton AD, Broide DH. 2010. Chronic allergen challenge induces bronchial mast cell accumulation in BALB/c but not C57BL/6 mice and is independent of IL-9. *Immunogenetics* Aug; 62 (8): 499-506.

Patalano F, Ruggieri F. 1989. Sodium cromoglycate: a review. *Eur Respir J Suppl* Jun; 6:556s-560s.

Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, et al. 2012. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* Aug 18; 380 (9842): 651-9.

Pavord ID, Wisniewski A, Mathur R, Wahedna I, Knox AJ, Tattersfield AE. 1991. Effect of inhaled prostaglandin E2 on bronchial reactivity to sodium metabisulphite and methacholine in patients with asthma. *Thorax* Sep; 46 (9): 633-7.

Pavord ID, Wong CS, Williams J, Tattersfield AE. 1993. Effect of inhaled prostaglandin E2 on allergen-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 148 (1): 87-90.

Pearce FL, Befus AD, Gauldie J, Bienenstock J. 1982. Mucosal mast cells. II. Effects of anti-allergic compounds on histamine secretion by isolated intestinal mast cells. *J Immunol* Jun; 128 (6): 2481-6.

Peebles RSJ, Hashimoto K, Morrow JD, Dworski R, Collins RD, Hashimoto Y, et al. 2002. Selective cyclooxygenase-1 and -2 inhibitors each increase allergic inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1154-1160.

Pejler G, Åbrink M, Ringvall M, Wernersson S. 2007. Mast cell proteases. *Adv Immunol* 95: 167-255.

Perl AK, Zhang L, Whittsett JA. 2009. Conditional expression of genes in the respiratory epithelium in transgenic mice: cautionary notes and toward building a better mouse trap. *Am J Respir Cell Mol Biol* Jan; 40 (1): 1-3.

Peters SP, Ferguson G, Deniz Y, Reisner C. 2006. Uncontrolled asthma: a review of the prevalence, disease burden and for treatment. *Respir Med* Jul; 100 (7): options 1139-51.

Peters SP, Prenner BM, Mezzanotte WS, Martin P, O'Brien CD. 2008. Long-term safety and asthma control with budesonide/formoterol versus budesonide pressurized metered-dose inhaler in asthma patients. *Allergy Asthma Proc* Sep-Oct; 29 (5): 499-516.

Picado C, Fernandez-Morata JC, Juan M, Roca-Ferrer J, Fuentes M, Xaubet A, et al. 1999. Cyclooxygenase-2 mRNA is downexpressed in nasal polyps from aspirin-sensitive asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* Jul; 160 (1): 291-6.

Pierzchalska M, Szabó Z, Sanak M, Soja J, Szczeklik A. 2003. Deficient prostaglandin E2 production by bronchial fibroblasts of asthmatic patients, with special reference to aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* May; 111 (5): 1041-8.

Plaza V, Rodríguez Trigo G, Peiró M, Fernández S, Nolla T, Puig J, Sanchis J. 2003. Primary care physicians' and patients' degree of satisfaction with a new respiratory medicine health care program. *Arch Bronconeumol* Feb; 39 (2): 57-61.

Polosa R. 2007. Critical appraisal of antileukotriene use in asthma management. *Curr Opin Pulm Med* Jan; 13 (1): 24-30.

Profita M, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Siena L, Melis MR, et al. 2003. Increased prostaglandin E2 concentrations and cyclooxygenase-2 expression in asthmatic subjects with sputum eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* Oct; 112 (4): 709-16.

Prussin C, Griffith DT, Boesel KM, Lin H, Foster B, Casale TB. 2003. Omalizumab treatment downregulates dendritic cell FcepsilonRI expression. *J Allergy Clin Immunol* Dec; 112 (6): 147-54.

Raud J. 1990. Vasodilatation and inhibition of mediator release represent two distinct mechanisms for prostaglandin modulation of acute mast cell-dependent inflammation. *Br J Pharmacol* 99(3): 449.

Ravetch JV & Kinetic JP. 1991. Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9: 457-92.

Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, et al. 1994 Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol* Aug; 46 (2): 213-20.

Rhen &, Cidlowski JA. 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* Oct 20; 353 (16): 1711-23.

Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, Di Ilio C, D'Orazio N. 2007. Antileukotriene drugs: clinical application, effectiveness and safety. *Curr Med Chem* 14 (18): 1966-77.

Robbie-Ryan M, Brown M. 2002. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* Dec; 14 (6): 728-33.

- Robuschi M, Refini RM, Pieroni MG, Gambaro G, Spagnotto S, Vaghi A, et al. 1994. Protective effect of inhaled PGE-2 against aspirin-induced asthma. *Eur Respir J* 7 (18), 319S.
- Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, Perez-Gonzalez M, Pujols L, Alobid I, et al. 2011. Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E(2) in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. *J Allergy Clin Immunol* Jul; 128 (1): 66-72.
- Rodrigo GJ, Neffen H, Castro-Rodriguez JA. 2011. Efficacy and safety of subcutaneous omalizumab vs placebo as add-on therapy to corticosteroids for children and adults with asthma: a systematic review. *Chest* Jan; 139 (1): 28-35.
- Saini SS. 2003. Immune functions of mast cells and basophils. En: Lam-brecht BN, Hoogsteden HC, Diamant Z, editors. *The immunological basis of asthma*. New York: Marcel Dekker; p. 121-45.
- Saitoh S, Arudchandran R, Manetz TS, Zhang W, Sommers CL, Love PE. 2000. LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity* May; 12 (5): 525-35.
- Salvato G. 1962. Asthma and mast cells of bronchial connective tissue. *Experientia* Jul 15; 18: 330-1.
- Samitas K, Delimpoura V, Zervas E, Gaga M. 2015. Anti-IgE treatment, airway inflammation and remodelling in severe allergic asthma: current knowledge and future perspectives. *Eur Respir Rev* Dec; 24 (138): 594-601
- Schröder NW & Maurer M. 2007. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy* 62 (6): 579-90.
- Schwartz LB, Irani AM, Roller K, Castells MC, Schechter NM. 1987. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol* Apr 15; 138 (8): 2611-5.
- Schwartz LB, Lewis RA, Austen KF. 1981. Tryptase from human pulmonary mast cells: purification and characterization. *J Biol Chem* 256 (22): 11939-11943.
- Serra-Pagès M, Olivera A, Torres R, Picado C, de Mora F, Rivera J. 2012. E-prostanoid 2 receptors dampen mast cell degranulation via cAMP/PKA-mediated suppression of IgE-dependent signaling. *J Leukoc Biol* Dec; 92 (6): 1155-65.

Serra-Pagès M, Torres R, Plaza J, Herrerias A, Costa-Farré C, Marco A, et al. 2015. Activation of the Prostaglandin E2 receptor EP2 prevents house dust mite-induced airway hyperresponsiveness and inflammation by restraining mast cells' activity. *Clin Exp Allergy* Oct; 45 (10): 1590-600.

Serrano-Candelas E, Martínez-Aranguren R, Valero A, Bartra J, Gastaminza G, Goikoetxea MJ, et al. 2016. Comparable actions of omalizumab on mast cells and basophils. *Clin Exp Allergy* Jan; 46 (1): 92-102.

Sestini P, Armetti L, Gambaro G, Pieroni MG, Refini RM, Sala A, et al. 1996. Inhaled PGE2 prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE4 excretion in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* Feb; 153 (2): 572-5.

Shardonofsky FR, Venzor J 3rd, Barrios R, Leong KP, Huston DP. 1999. Therapeutic efficacy of an anti-IL-5 monoclonal antibody delivered into the respiratory tract in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* Jul; 104 (1): 215-21.

Sheller JR, Mitchell D, Meyrick B, Oates J, Breyer R. 2000. EP(2) receptor mediates bronchodilation by PGE(2) in mice. *J Appl Physiol* 1985 Jun; 88 (6): 2214-8.

Shiung YY, Chiang CY, Chen JB, Wu PC, Hung AF, Lu DC, et al. 2012. An anti-IgE monoclonal antibody that binds to IgE on CD23 but not on high-affinity IgE.Fc receptors. *Immunobiology* Jul; 217 (7): 676-83.

Sin DD, Man J, Sharpe H, Gan WQ, Man SF. 2004. Pharmacological management to reduce exacerbations in adults with asthma: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 21; 292 (3): 367-76.

Skelton J, Gower LH, McGough A, Labosky PA. 2013. Transgenic mouse models. *Methods Mol Biol* 1032: 1-17.

Smith AP, Cuthbert MF, Dunlop LS. 1975. Effects of inhaled prostaglandins E1, E2, and F2alpha on the airway resistance of healthy and asthmatic man. *Clin Sci Mol Med* 48 (5): 421-30.

Smith SJ, Piliponsky AM, Rosenhead F, Elchalal U, Nagler A, Levi-Schaffer F. 2002. Dexamethasone inhibits maturation, cytokine production and Fc epsilon RI expression of human cord blood-derived mast cells. *Clin Exp Allergy* Jun; 32 (6): 906-13.

- Sobradillo V, Miravittles M, Jiménez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, et al. 1999. Estudio IBERPOC en España: prevalencia de síntomas respiratorios habituales y de limitación crónica al flujo aéreo. *Arch Bronconeumol* 35: 159-66.
- Sturm EM, Schratl P, Schuligoi R, Konya V, Sturm GJ, Lippe IT, et al. 2008. Prostaglandin E2 inhibits eosinophil trafficking through E-prostanoid 2 receptors. *J Immunol* 181: 7273-83.
- Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M, Ichikawa A, et al. 1992. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem* Apr 5; 267 (10): 6463-6.
- Sutton BJ, Bevil RL, Bevil AJ. 2000. Inhibition of IgE-receptor interactions. *Br Med Bull* 56 (4): 1004-18.
- Sweatman WJ & Collier HO. 1968. Effects of prostaglandins on human bronchial muscle. *Nature* Jan 6; 217 (5123): 69.
- Swystun VA, Gordon JR, Davis EB, Zhang X, Cockcroft DW. 2000. Mast cell tryptase release and asthmatic responses to allergen increase with regular use of salbutamol. *J Allergy Clin Immunol* Jul; 106 (1 Pt 1): 57-64.
- Szczeklik A, Mastalerz L, Nizankowska E, Cmiel A. 1996. Protective and bronchodilator effects of prostaglandin E and salbutamol in aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* Feb; 153 (2): 567-71.
- Szczeklik A, Nizankowska E, Nizankowski R. 1977. Bronchial reactivity to prostaglandins F2alpha, E2, and histamine in different types of asthma. *Respiration* 34 (6): 323-31.
- Tecott LH & Johnson DS. 2002. Gene targeting and transgenic technologies. En: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, chapt. 19, p. 241–251.
- Tilley SL, Hartney JM, Erikson CJ, Jania C, Nguyen M, Stock J. 2003. Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin E2 on airway tone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Apr; 284 (4): L599-606.
- To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, et al. 2012. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health* 12: 204.

Torres R, Herrerias A, Serra-Pagès M, Marco A, Plaza J, Costa-Farré C, et al. 2013. Locally administered prostaglandin E2 prevents aeroallergen-induced airway sensitization in mice through immunomodulatory mechanisms. *Pharmacol Res* Apr; 70 (1): 50-9.

Torres R, Herrerias A, Serra M, Roca-Ferrer J, Pujols L, Marco A, et al. 2008. An intranasal selective antisense oligonucleotide impairs lung cyclooxygenase-2 production and improves inflammation, but worsens airway function, in house dust mite sensitive mice. *Respir Res* Nov 12; 9 (1): 72.

Torres R, Pérez M, Marco A, Picado C, de Mora F. 2009. A cyclooxygenase-2 selective inhibitor worsens respiratory function and enhances mast cell activity in ovalbumin-sensitized mice. *Arch Bronconeumol* Apr; 45 (4): 162-7.

Torres R, Picado C, de Mora F. 2005. Descubriendo el asma de origen alérgico a través del ratón. Un repaso a la patogenia de los modelos de asma alérgica en el ratón y su similitud con el asma alérgica humana. [Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans]. *Arch Bronconeumol* 41 (3): 141-52.

Torres R, Picado C, de Mora F. 2015. The PGE2-EP2-mast cell axis: an antiasthma mechanism. *Mol Immunol* Jan; 63 (1): 61-8.

Tsai, M., Hunt, J., Arm, J. P., London, C., Gurish, M., Galli, S. J. 1996. CLMC/C57.1 (C57) mouse mast cell line is of BALB/c origin and tumorigenic in BALB/c mice. *FASEB J* 10, A1253.

Vennera MdelC, Picado C. 2012. Patologías mediadas por la inmunoglobulina E: de la inmunoglobulina E al omalizumab. [Immunoglobulin E-mediated diseases: from immunoglobulin E to Omalizumab]. *Immunología* Oct; 31 (4): 119-26

Von Recklinghausen, F. 1863. Über Eiter und Bindegewebe Körperchen. [On pus and connective tissue cells]. *Virchows Archiv* 28, 157.

Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M. 2012. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2163–2196

Wan D, Ludolf F, Alanine DG, Stretton O, Ali Ali E, Al-Barwary N, et al. 2014. Use of humanised rat basophilic leukaemia cell line RS-ATL8 for the assessment of allergenicity of *Schistosoma mansoni* proteins. *PLoS Negl Trop Dis* Sep 25; 8 (9): e3124.

- Wang XS & Lau HY. 2006. Prostaglandin E potentiates the immunologically stimulated histamine release from human peripheral blood-derived mast cells through EP1/EP3 receptors. *Allergy Apr*; 61 (4): 503-6.
- Weller CL, Collington SJ, Hartnell A, Conroy DM, Kaise T, Barker JE, et al. 2007. Chemotactic action of prostaglandin E2 on mouse mast cells acting via the PGE2 receptor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (28): 11712-7.
- Wenzel SE, Barnes PJ, Bleeker ER, Bousquet J, Busse W, Dahlén SE. 2009. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of tumor necrosis factor-alpha blockade in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med Apr* 1; 179 (7): 549-58.
- Wershil BK, Mekori YA, Murakami T, Galli SJ. 1987. 125I-fibrin deposition in IgE-dependent immediate hypersensitivity reactions in mouse skin. Demonstration of the role of mast cells using genetically mast cell-deficient mice locally reconstituted with cultured mast cells. *J Immunol Oct* 15; 139 (8): 2605-14.
- Wex E, Thaler E, Blum S, Lamb D. 2014. A novel model of IgE-mediated passive pulmonary anaphylaxis in rats. *PLoS One Dec* 26 ; 9 (12): e116166.
- Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, Kinet JP, Tasset D. 1996. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J Immunol Jul* 1; 157 (1): 221-30.
- Williams CM & Galli SJ. 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol May*; 105 (5): 847-59.
- Williams TJ. 1978. The role of prostaglandins in inflammation. *Ann R Coll Surg Engl May*; 60 (3): 198-201.
- Yang G, Li L, Volk A, Emmell E, Petley T, Giles-Komar J, et al. 2005 Therapeutic dosing with anti-interleukin-13 monoclonal antibody inhibits asthma progression in mice. *J Pharmacol Exp Ther Apr*; 313 (1): 8-15.
- Yu CK & Chen CL. 2003. Activation of mast cells is essential for development of house dust mite *Dermatophagoides farinae*-induced allergic airway inflammation in mice. *J Immunol Oct* 1; 171 (7): 3808-15.

Yu M, Tsai M, Tam SY, Jones C, Zehnder J, Galli SJ. 2006. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest* Jun; 116 (6): 1633-41.

Zaslona Z, Okunishi K, Bourdonnay E, Domingo-Gonzalez R, Moore BB, Lukacs NW, et al. 2014. Prostaglandin E₂ suppresses allergic sensitization and lung inflammation by targeting the E prostanoid 2 receptor on T cells. *J Allergy Clin Immunol* Feb; 133 (2): 379-87.

Zhang T, Finn DF, Barlow JW, Walsh JJ. 2015. Mast cell stabilisers. *Eur J Pharmacol* Jun 27. pii: S0014-2999 (15) 30097-2.

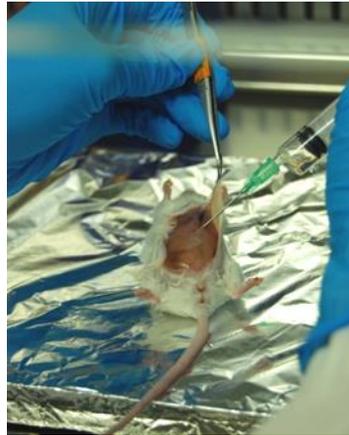
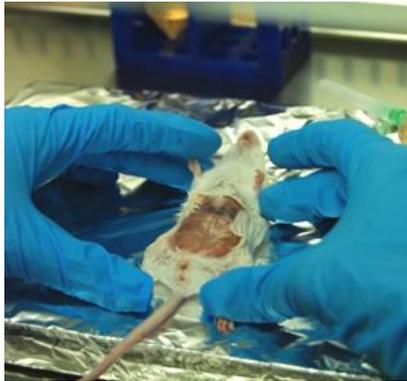
Zhou J, Liu DF, Liu C, Kang ZM, Shen XH, Chen YZ, et al. 2008. Glucocorticoids inhibit degranulation of mast cells in allergic asthma via nongenomic mechanism. *Allergy* Sep; 63 (9): 1177-85.

VIII. Anexos

VIII. ANEXOS

1. Cultivos Primarios de Ratón

1.1. Lavado peritoneal para obtener PDMC



1.2. Cultivo de mastocitos pulmonares (LMC)

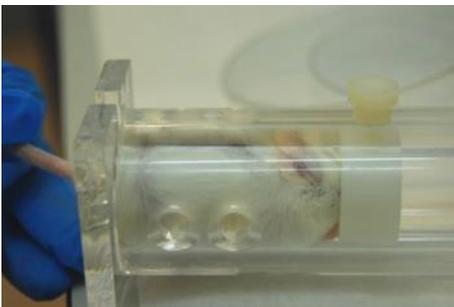
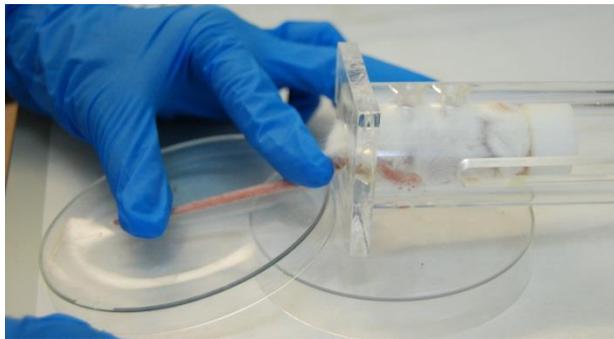


2. Vías de Administración de Compuestos y Fármacos

2.1. Administración intranasal



2.2. Administración intravenosa (cola)



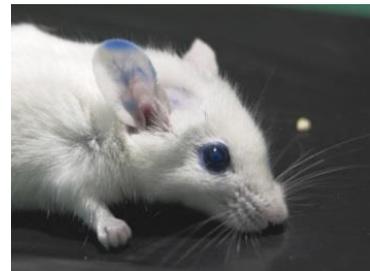
2.3. Administración intraperitoneal



2.4. Administración intradérmica



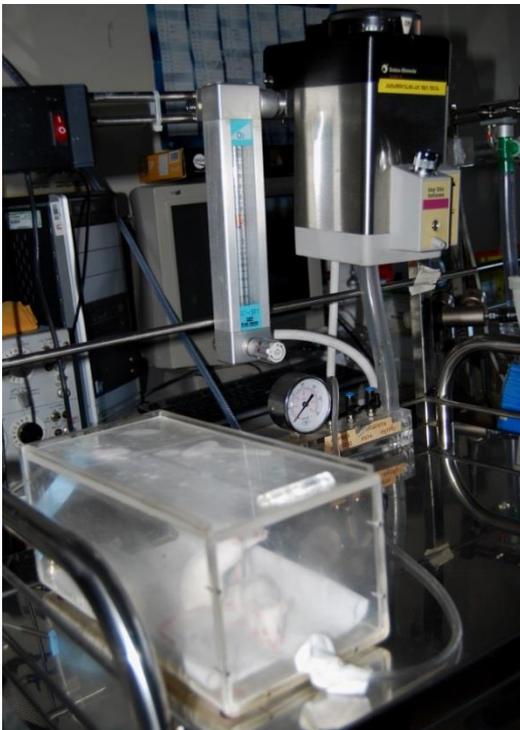
2.5. Administración intravenosa (seno retroorbital)



2.6. Administración intratraqueal (*Microsprayer aerosolizer* de Penn-Century)



2.7. Sedación por anestesia de gases (Isoflurano)

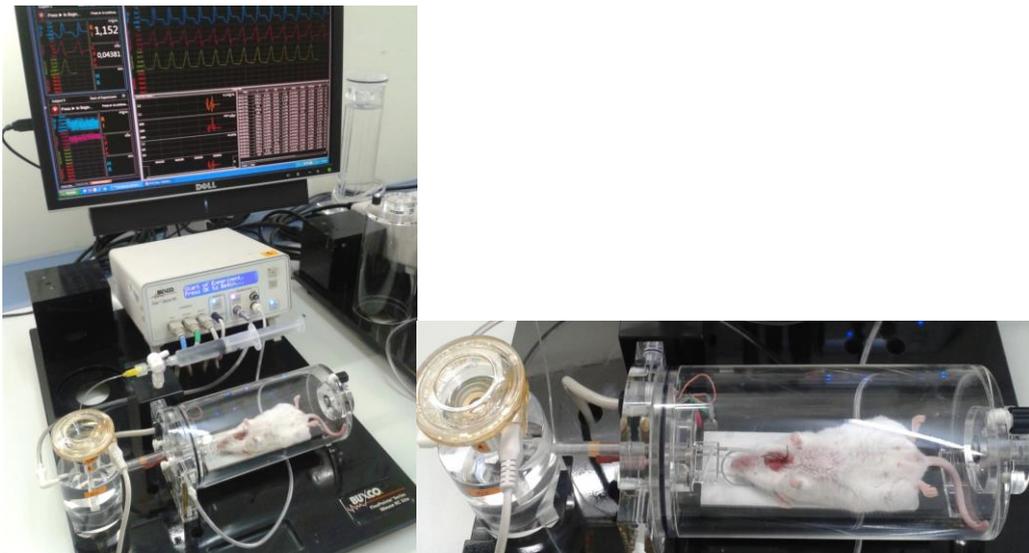


3. Análisis Función Pulmonar y Recogida de Muestras

3.1. Traqueotomía y canulación del ratón



3.2. Pletismografía invasiva (*Buxco Finepointe*)



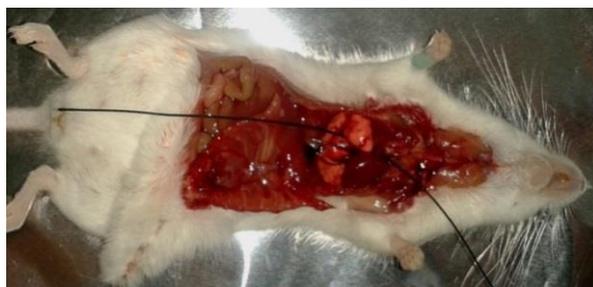
3.3. Exsanguinación vía punción intracardiaca



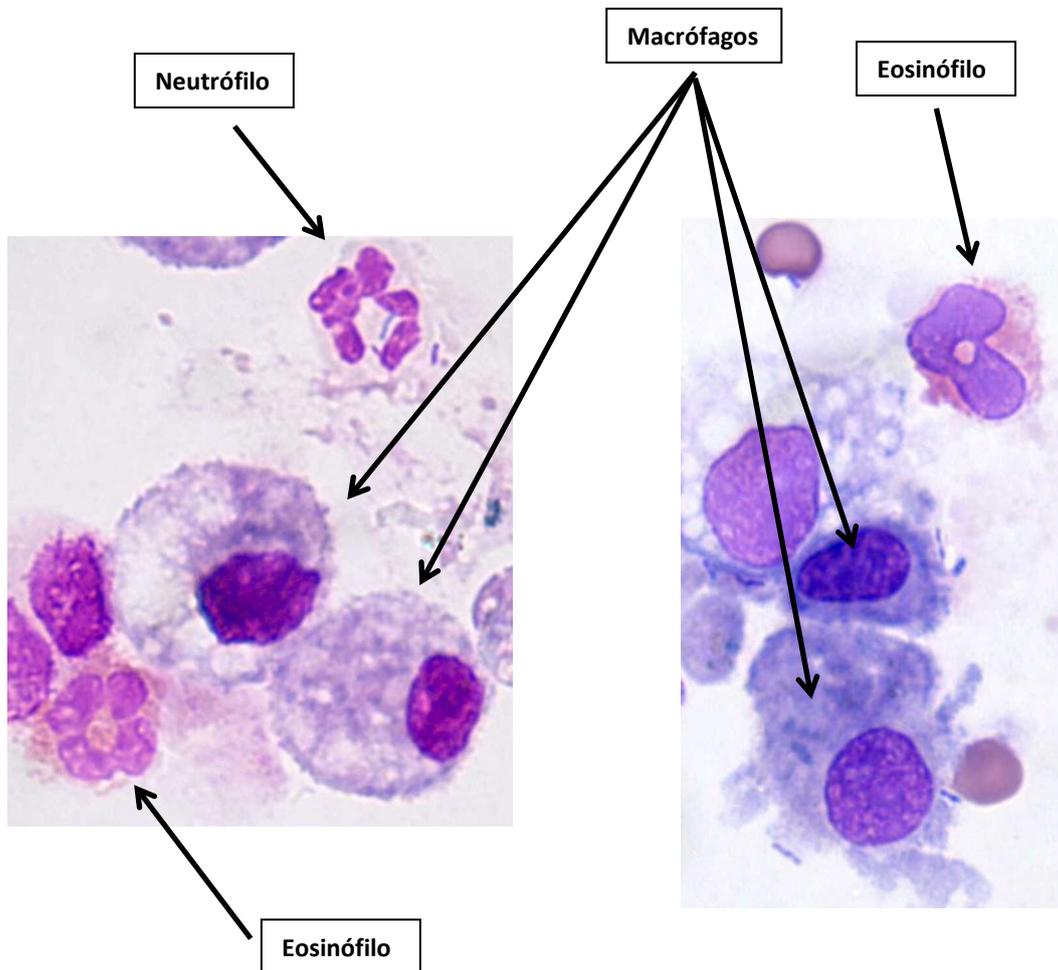
3.4. Lavado broncoalveolar (BAL)



3.5. Recogida del pulmón para evaluación de la actividad mastocitaria



4. Tinción Diff-Quick CITOSPINS: Recuento de Células Inflamatorias del BAL



5. Prueba de Activación de la Línea Celular Humana de Mastocitos LAD2

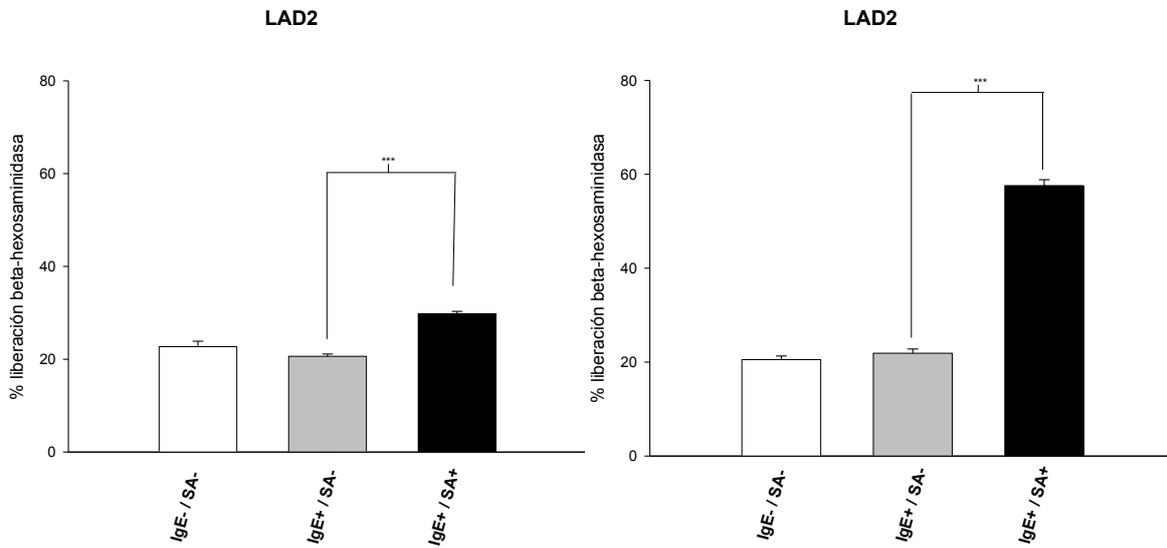


Figura 56. Prueba de activación de la línea celular de mastocitos humanos LAD2 de más de 8 meses de mantenimiento en cultivo. Se observa el % de liberación de β -hexosaminidasa tras activación mediante IgE biotinilada-Streptavidina. Los resultados representan 3 experimentos hechos en cuadruplicado y se expresa la media \pm SEM. (***)Pvalor<0.001). IgE (inmunoglobulina E), LAD2 (línea celular humana de mastocitos), SEM (error estándar de la media), SA (estreptavidina).

Figura 57. Prueba de activación de la línea celular de mastocitos humanos LAD2 de 1 mes de mantenimiento en cultivo. Se observa el % de liberación de β -hexosaminidasa tras activación mediante IgE biotinilada-Streptavidina. Los resultados representan 3 experimentos hechos en cuadruplicado y se expresa la media \pm SEM. (***)Pvalor<0.001). IgE (inmunoglobulina E), LAD2 (línea celular de mastocitos humana), SEM (error estándar de la media), SA (estreptavidina).

6. Distribución de Azul de Ébano por los Lóbulos Pulmonares tras Administración Intratraqueal con el *Microsprayer Aerosolizer* (Penn-Century)



