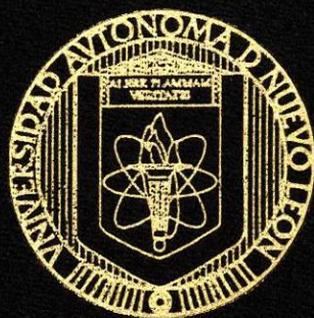


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA



CUANTIFICACION DE CELULAS CEBADAS
DURANTE EL INICIO Y PROGRESION DE LA
REACCION LOCAL DE SHWARTZMAN

Por

CECILIA RAMIREZ HERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AGOSTO 2002

TL

RB131

.R3

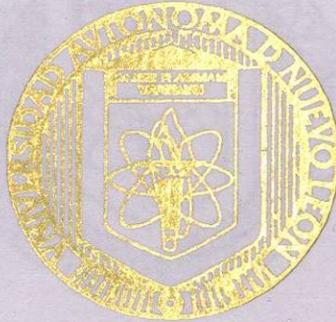
2002

c.1



1080124465

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA



CUANTIFICACION DE CELULAS CEBADAS
DURANTE EL INICIO Y PROGRESION DE LA
REACCION LOCAL DE SHWARTZMAN

Por

CECILIA RAMIREZ HERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

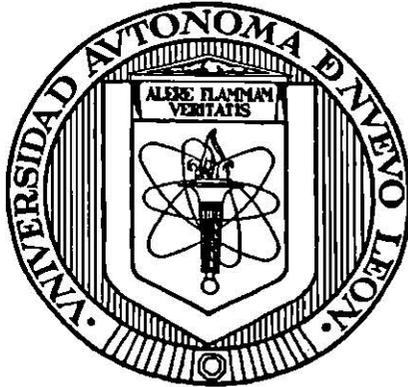
AGOSTO 2002



TL
RB131
.R3
2002



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS CEBADAS DURANTE EL INICIO Y
PROGRESIÓN DE LA REACCIÓN LOCAL DE SHWARTZMAN**

Por

CECILIA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Agosto, 2002

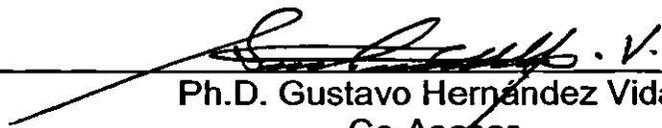
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS CEBADAS DURANTE EL INICIO Y
PROGRESIÓN DE LA REACCIÓN LOCAL DE SHWARTZMAN**

Aprobación de la Tesis:



Ph.D. Rafael Ramírez Romero
Asesor Principal



Ph.D. Gustavo Hernández Vidal
Co-Asesor



Dr. Alfredo Wong González
Co-Asesor

PREFACIO

La presente tesis fue iniciada a partir de su aceptación como anteproyecto en febrero del 2001. Todo el trabajo experimental se llevó a cabo en el Departamento de Patología del Laboratorio Central y de Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. La investigación se realizó con el apoyo monetario de PAICYT (clave: SA587-01) y bajo el asesoramiento del Ph.D. Rafael Ramírez Romero, Ph.D. Gustavo Hernández Vidal y el Dr. Alfredo Wong González.

Con relación a este trabajo; cabe hacer notar que los antecedentes sobre células cebadas son extensos; pero hay muy pocas investigaciones acerca de la densidad de éstas en la reacción local de Shwartzman. Inclusive, la escasa bibliografía que existe sobre este tema, no se pudo obtener debido a su antigüedad. Por lo tanto, podemos aseverar que la información aportada a través de este proyecto es de las más recientes y de las pocas en tratar la densidad de células cebadas durante la reacción local de Shwartzman.

Cecilia Ramírez Hernández
Agosto del 2002

AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi agradecimiento a PAICYT por su apoyo financiero para la realización de esta tesis.

A mi asesor principal el Ph.D. Rafael Ramírez Romero y mis co-asesores el Ph.D. Gustavo Hernández Vidal y el Dr. Alfredo Wong González.

A la laboratorista del departamento de Patología la Sra. María Marciana Covarrubias.

A los niños del servicio social del Laboratorio Central: Nelly, Mario, Flor, Alejandro, Sonia y Gerardo.

A mis kekos.

DEDICATORIA

A mi abuelo Tomás y a mi tío Manuel.

A mis padres Rafael y María Dolores.

A las familias Ramírez Romero y Hernández Rodríguez.

A mis grandes amigos José Luis, Mirthala, Alejandro, Martha y Carlos.

ABREVIATURAS

HCl	Ácido clorhídrico
CID	Coagulación intravascular diseminada
SCF	Factor de la célula madre
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
g	Gramos
H & E	Hematoxilina y eosina
h	Horas
pH	Índice de acidez o alcalinidad
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
k	Kilogramo
LPS	Lipopolisacárido
μ g	Microgramos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm ²	Milímetros cuadrados
min	Minutos
N	Normal

PMN

%

1: 10

Polimorfonucleares

Porcentaje

Uno en diez

ÍNDICE

Prefacio	iii
Agradecimientos	iv
Dedicatoria	v
Abreviaturas	vi
Índice	vii
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Resumen	x

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Justificación	3
1.2	Hipótesis	3
1.3	Objetivo	3
2	LITERATURA REVISADA	4
2.1	Reacción de Shwartzman	4
2.2	Células Cebadas	6
3	MATERIAL Y MÉTODOS	9

3.1	Agrupación de los Conejos	9
3.2	Manejo de los Conejos	10
3.3	Inducción a la Reacción Local de Shwartzman	10
3.4	Sacrificio de los Animales	12
3.5	Manejo de las Muestras	12
3.6	Conteo de células Cebadas	13
3.7	Procedimientos Estadísticos	14
4	RESULTADOS	15
4.1	Lesiones Macroscópicas	15
4.2	Lesiones Microscópicas	15
4.3	Conteo de Células Cebadas	26
5	DISCUSIÓN	28
6	CONCLUSIÓN	32
	BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Organización de los Grupos y sus Tratamientos	9

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Sitios de Inoculación, Colección y Proceso de Muestras	11
Figura 2	?	17
Figura 3		18
Figura 4	?	19
Figura 5		20
Figura 6		21
Figura 7		22
Figura 8	"	23
Figura 9	"	24
Figura 10	"	25
Figura 11	Valores Promedio de Células Cebadas	27

In completo

RESUMEN

Este trabajo se elaboró con la finalidad de determinar la cantidad de células cebadas presentes en el desarrollo de la Reacción local de Shwartzman. Se utilizaron 30 conejos machos y hembras de la raza Nueva Zelanda con un peso mayor de 2.00 k al inicio del experimento. Los animales se separaron aleatoriamente en dos grandes grupos con igual número de individuos; a 15 de ellos se les indujo la reacción local de Shwartzman en tanto que el resto sirvieron como control. Subsecuentemente, con cada cinco animales de cada grupo original se formaron 6 subgrupos a los que se les establecieron tres fechas de sacrificio, día uno, día ocho y día quince. A los grupos Shwartzman se les inoculó 100µg de lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* en cuatro sitios del dorso usando 0.1 ml de solución salina para diluirlo; 24 horas después, se les volvió a inocular en la vena marginal de la oreja con 100 µg de lipopolisacárido en 1.0 ml de solución salina como diluyente. Los animales pertenecientes a los grupos control recibieron solamente solución salina tanto en piel como en vena. Al día uno después de haber realizado la inoculación endovenosa se sacrificaron los grupos 1 y 2 (Shwartzman y control, respectivamente); al día ocho los grupos 3 y 4, y para el día quince los grupos 5 y 6. Luego del sacrificio se tomaron las cuatro áreas de piel y se partieron en dos para conservar la mitad en formalina al 10% y la otra mitad en solución de Carnoy y teñirlas

con H & E y azul de Toluidina pH 0.5, respectivamente. A las laminillas teñidas con el azul de Toluidina se les tomó en cuenta para determinar la cantidad de células cebadas.

Los resultados demostraron que de los tres grupos a los que se les indujo la reacción de Shwartzman, el grupo 1 que se sacrificó en el primer día^x fue el que tuvo una mayor cantidad de células cebadas (415.00 ± 287.29). Para el día ocho (grupo 3) el número de células declinó significativamente (62.70 ± 63.09), y hacia la última fecha de sacrificio (día quince) el grupo 5 tuvo una menor cantidad de células (14.00 ± 3.51); este último valor similar a los grupos control 2, 4 y 6, con valores de 12.70 ± 7.38 , 11.80 ± 6.97 y 11.70 ± 4.14 , respectivamente. Se concluye que las células cebadas constituyen una población celular dinámica que se modifica conforme evoluciona la reacción local de Shwartzman y que estas células tienen una participación preponderante durante el inicio del fenómeno.

1 INTRODUCCIÓN

La respuesta inflamatoria es considerada la parte más compleja e importante de los mecanismos de defensa innatos, necesarios para la supervivencia. La respuesta inflamatoria puede ser inducida por agentes físicos, químicos y biológicos. Diversas células inflamatorias y mediadores flogísticos participan en la iniciación y desarrollo de esta reacción tisular. Muchas de estas células tienen también una participación relevante en la instauración de los mecanismos de defensa adquiridos, dependientes de la respuesta inmune. Asimismo, la respuesta inflamatoria y la restauración tisular están íntimamente ligadas; muchos de los elementos celulares y los mediadores que participan en la inflamación también lo hacen durante la restauración del tejido dañado. Sin embargo, ocasionalmente el desarrollo de la respuesta inflamatoria no tiene un curso favorable y en muchas circunstancias el daño tisular resulta desproporcionado provocando daños irreversibles e incluso la muerte (Slauson y Cooper, 1990; Cotran *et al.*, 1999).

De manera muy simple durante el inicio de la respuesta inflamatoria aguda se reconoce una fase inmediata de vasoconstricción mediada por estímulos neurogénicos;

posteriormente, ocurre una vasodilatación sostenida que favorece la hiperemia, aunada a un aumento de la permeabilidad. Estos eventos son mediados principalmente por sustancias vasoactivas como la histamina que son liberadas por las células cebadas y otros compuestos derivados de los fosfolípidos de las membranas celulares. Subsecuentemente, la activación plaquetaria o la exposición de la membrana basal activan los sistemas de coagulación y fibrinólisis, que a su vez inician los sistemas de cininas y del complemento. Estos sistemas están interrelacionados y se activan a sí mismos reiteradamente. Asimismo, las citocinas producidas por células cebadas y macrófagos favorecen la expresión de moléculas de adhesión tanto en células endoteliales como en neutrófilos. Estas condiciones facilitan la adhesión firme y la migración de los neutrófilos hacia el sitio del daño para tratar de resolver las condiciones que generaron la respuesta inflamatoria (Slauson y Cooper, 1990; Cotran *et al.*, 1999). En muchos casos el factor inicial de la respuesta inflamatoria son agentes infecciosos. Los lipopolisacáridos (LPS, también conocidos como endotoxinas) son compuestos derivados de la pared externa de las bacterias Gram negativas y se les considera los agentes inflamatorios más comunes en la naturaleza (Rietschel y Brade, 1992).

La reacción local de Shwartzman es un fenómeno inflamatorio experimental inducido originalmente en la piel del conejo. Este fenómeno caracterizado por trombosis y hemorragia semeja una reacción alérgica, pero es en realidad una respuesta inflamatoria aguda en la que no participan los anticuerpos. La reacción de Shwartzman depende de citocinas, particularmente el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1), liberadas por células sensibles a los lipopolisacáridos bacterianos. Los LPS bacterianos son los agentes que inducen la reacción de Shwartzman con más consistencia (Ramírez-Romero y Brogden, 2000).

1.1 Justificación

La reacción de Shwartzman ha permitido entender la relevancia de las células inflamatorias y sus mediadores en el desarrollo de la respuesta inflamatoria; sin embargo, queda aún mucho por dilucidar. La participación de las células cebadas, aunque se supone importante, aún no ha sido determinada con precisión en el desarrollo de la reacción local de Shwartzman.

1.2 Hipótesis

Se supone que las células cebadas tienen una participación relevante en las lesiones inflamatorias inducidas por la reacción local de Shwartzman y, por ende, su número variará durante el inicio y la progresión de este fenómeno.

1.3 Objetivo

Determinar el número de células cebadas durante el inicio y progresión de la reacción local de Shwartzman.

2 LITERATURA REVISADA

2.1 Reacción de Shwartzman

La reacción local de Shwartzman se induce cuando se inoculan LPS en la piel (inoculación preparatoria) y posteriormente, 18 a 24 h después, la inoculación se repite por vía endovenosa (inoculación desencadenante). Al poco tiempo después de esta última inoculación aparece un marcado eritema cutáneo en el sitio de la inoculación preparatoria. Las lesiones más severas pueden acompañarse de necrosis de la piel. Microscópicamente se caracteriza por vasculitis, trombosis, hemorragia, infiltración masiva de polimorfonucleares (PMN) y necrosis. La reacción de Shwartzman también puede ser provocada sistémicamente. Para la inducción del fenómeno por vía sistémica se emplean dos inoculaciones del LPS por vía endovenosa. En la reacción sistémica (reacción de Shwartzman generalizada) se observa trombosis de pequeños vasos sanguíneos con hemorragias adyacentes. La necrosis bilateral de la corteza renal y el edema alveolar son lesiones típicas de la reacción generalizada (Milner *et al.*, 1971; Freeman, 1979). Más recientemente se ha referido la inducción de un tercer tipo, la reacción de Shwartzman

univisceral. En este caso el LPS se administra en el tejido u órgano de interés y posteriormente el desafío se administra por vía endovenosa (Mori, 1981).

La reacción de Shwartzman en todas sus modalidades ha permitido explicar la patogenia de varias enfermedades de importancia en el hombre. Por ejemplo, la reacción de Shwartzman generalizada se considera equivalente del fenómeno de coagulación intravascular diseminada (CID), un fenómeno que se presenta en diversos estados de toxemia y sepsis (Robbins *et al.*, 1981). La reacción de Shwartzman también se ha propuesto como el mecanismo patológico dominante en diversos padecimientos tales como la necrosis hepática aguda, el síndrome de Waterhouse-Friderichsen, la colitis pseudomembranosa, la necrosis pituitaria (Mori, 1981) y el síndrome respiratorio agudo del adulto (Imamura *et al.*, 1997). También se ha propuesto a la reacción local de Shwartzman como equivalente de las lesiones cutáneas que se presentan en las personas diabéticas (Ramírez-Romero, 2001). Por último, en medicina veterinaria se ha sugerido que la reacción de Shwartzman es el mecanismo patológico que contribuye mayormente en la generación del severo daño pulmonar que se presenta en la pasteurelisis neumónica del ganado bovino (Ramírez-Romero y Brogden, 2000).

En la reacción local de Shwartzman la participación de los neutrófilos es considerada imprescindible (Argenbright y Barton, 1992). La activación del complemento y la producción de citocinas tales como TNF son un prerequisite (Beck *et al.*, 1986; Movat *et al.*, 1987; Norman *et al.*, 1996). Estos mediadores favorecen la expresión de moléculas de adhesión y por ende la participación de los neutrófilos (Argenbright y Barton, 1992). Sin embargo, la participación de las células cebadas se supone importante en la reacción local

de Shwartzman (Ramírez-Romero y Brogden 2000). Dado que el TNF se encuentra preformado y almacenado en grandes cantidades en los gránulos de las células cebadas (Malaviya *et al.*, 1996; Iuvone *et al.*, 1999), es probable que la fuente mayor de TNF durante la reacción de Shwartzman sean precisamente estas células.

2.2 Células Cebadas

Aunque las células cebadas han sido tradicionalmente asociadas con las severas manifestaciones clínicas que ocurren en los fenómenos de hipersensibilidad, ahora se sabe que estas células son imprescindibles para el desarrollo de la respuesta inflamatoria, la restauración tisular y la instauración de la respuesta inmune (Metcalf *et al.*, 1997; Galli, 2000). Las células cebadas se encuentran principalmente en vías respiratorias, tracto gastrointestinal y piel. Derivan de la médula ósea y son transportadas aún inmaduras por el torrente circulatorio; posteriormente, luego de arribar a los diferentes tejidos, las células cebadas maduran *in situ* bajo la influencia de condiciones tisulares específicas. Su localización anatómica las hace pertenecer a la primer línea de defensa contra infecciones (Metcalf *et al.*, 1997; Iuvone *et al.*, 1999).

Las células cebadas han sido asignadas a dos categorías principales, células cebadas mucosas y células cebadas del tejido conectivo. Las primeras son células asociadas a los epitelios respiratorio, urogenital e intestinal. En cambio, las células cebadas del tejido conectivo se encuentran en la piel, la cavidad peritoneal, las capas musculares del intestino

y alrededor de los vasos sanguíneos pulmonares. Esta clasificación se ha basado en estudios en ratones y por analogía también se ha empleado en humanos (Metcalf *et al.*, 1997).

Las células cebadas mucosas también difieren de las células cebadas del tejido conectivo en sus funciones y características. Por ejemplo, los gránulos de las primeras contienen una matriz de condroitin sulfato y muy poca cantidad de histamina. Estas células son sensibles a los fijadores de formaldehído y requieren condiciones especiales para su fijación y tinción. Por el contrario, las células cebadas del tejido conectivo contienen heparina en sus gránulos, grandes cantidades de histamina y son resistentes al formaldehído. Las células cebadas mucosas son consideradas migratorias con una vida media corta (40 días) mientras que las células cebadas del tejido conectivo son fijas y su vida media es larga (6 meses). La población celular de las primeras se expande en eventos mediados por linfocitos T en tanto que las del tejido conectivo son independientes de ellos porque se encuentran en números similares tanto en ratones desnudos (sin timo) como en ratones convencionales. Se debe mencionar que existe una población de células cebadas que no puede incluirse en estas categorías y que las células cebadas mucosas pueden convertirse en células del tejido conectivo y viceversa, dependiendo de las condiciones tisulares específicas (Metcalf *et al.*, 1997; Welle, 1997).

El relevante papel de las células cebadas en la regulación de la respuesta inflamatoria ha sido perfectamente demostrado en ratones *W/W^v*. Estos ratones han sido manipulados genéticamente y no poseen células cebadas. Los ratones *W/W^v* son altamente sensibles a los desafíos bacterianos por vía intranasal e intraperitoneal porque no presentan una infiltración adecuada de neutrófilos. Cuando estos ratones son reconstituidos con

células cebadas de ratones normales soportan los desafíos bacterianos. Estos efectos protectores se han atribuido a la mayor infiltración de neutrófilos dependiente de la producción de TNF producido por las células cebadas normales (Malaviya *et al.*, 1996; Echtenacher *et al.*, 1996).

Las células cebadas están íntimamente relacionadas con la progresión de la respuesta inflamatoria. Durante las fases iniciales de la inflamación las células se degranulan y por ende se encuentran casi ausentes en los sitios de mayor daño tisular (Cheville, 1994). Posteriormente, en las fases tardías de la respuesta inflamatoria, las células cebadas proliferan (Metcalf *et al.*, 1997). Diversos padecimientos crónicos de la piel y del pulmón en el hombre se caracterizan por una hiperplasia de células cebadas (Levi-Schaffer, 1995). Recientemente se ha informado que las células cebadas prácticamente desaparecen en las áreas de necrosis y hemorragia inducidas por una incisión quirúrgica; sin embargo, cuando la lesión evoluciona (14 días), las células cebadas proliferan en compañía de tejido conectivo fibroso. Es importante mencionar que la proliferación de las células no se debe a una replicación *in situ* sino a un mayor reclutamiento de células inmaduras circulantes (Trautmann *et al.*, 2000). Una situación similar podría presentarse durante la iniciación y progresión de la reacción local de Shwartzman.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Agrupación de los Conejos

Se utilizaron treinta conejos (machos y hembras) Nueva Zelanda del Bioterio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con los cuales se formaron seis grupos de cinco miembros cada uno, tal y como se muestra en la siguiente tabla.

TABLA 1
ORGANIZACIÓN DE LOS GRUPOS Y SUS TRATAMIENTOS

Días de sacrificio

	1 día	8 días	15 días
Grupos Reacción de Shwartzman	Grupo 1	Grupo 3	Grupo 5
Grupos Control	Grupo 2	Grupo 4	Grupo 6

3.2 Manejo de los Conejos

El manejo de los conejos fue igual para todos. Los animales se adaptaron a jaulas individuales y se les proporcionó alimento comercial (Purina) y agua *ad libitum*. Por lo menos una vez a la semana se les dio verdura fresca como suplemento. Se esperó a que alcanzaran un peso mayor a los 2.00 k para empezar a trabajar con ellos. Por principio se les depiló el área del dorso para delimitar los sitios de inoculación intradérmica, tal y como se muestra en la Figura 1. Se les dejó descansar por un día en caso de que hubieran sufrido algún traumatismo durante la depilación.

3.3 Inducción de la Reacción Local de Shwartzman

Los animales a los cuales se les provocó la reacción local de Shwartzman se les tranquilizó utilizando xilacina (Fort Dodge) con una dosis de 7 mg/kg vía intramuscular para hacer más fácil su manejo. Luego de esperar a que hiciera efecto el tranquilizante se les inoculó intradérmicamente lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* (SIGMA) en cuatro sitios del dorso previamente depilados. En cada área se inoculó 100 µg de lipopolisacárido utilizando jeringas de insulina y como diluyente 0.1 ml de solución salina. A las 24 h de haber inoculado en piel, nuevamente se tranquilizó a los animales para inocular en la vena marginal de la oreja (vía endovenosa) la cantidad de 100 µg de lipopolisacárido diluidos en 1.0 ml de solución salina. A los conejos de los grupos control se les hizo exactamente el mismo manejo para inocularlos, sólo que a éstos se les administró solución salina sin el lipopolisacárido, tanto en la piel como sistémicamente.

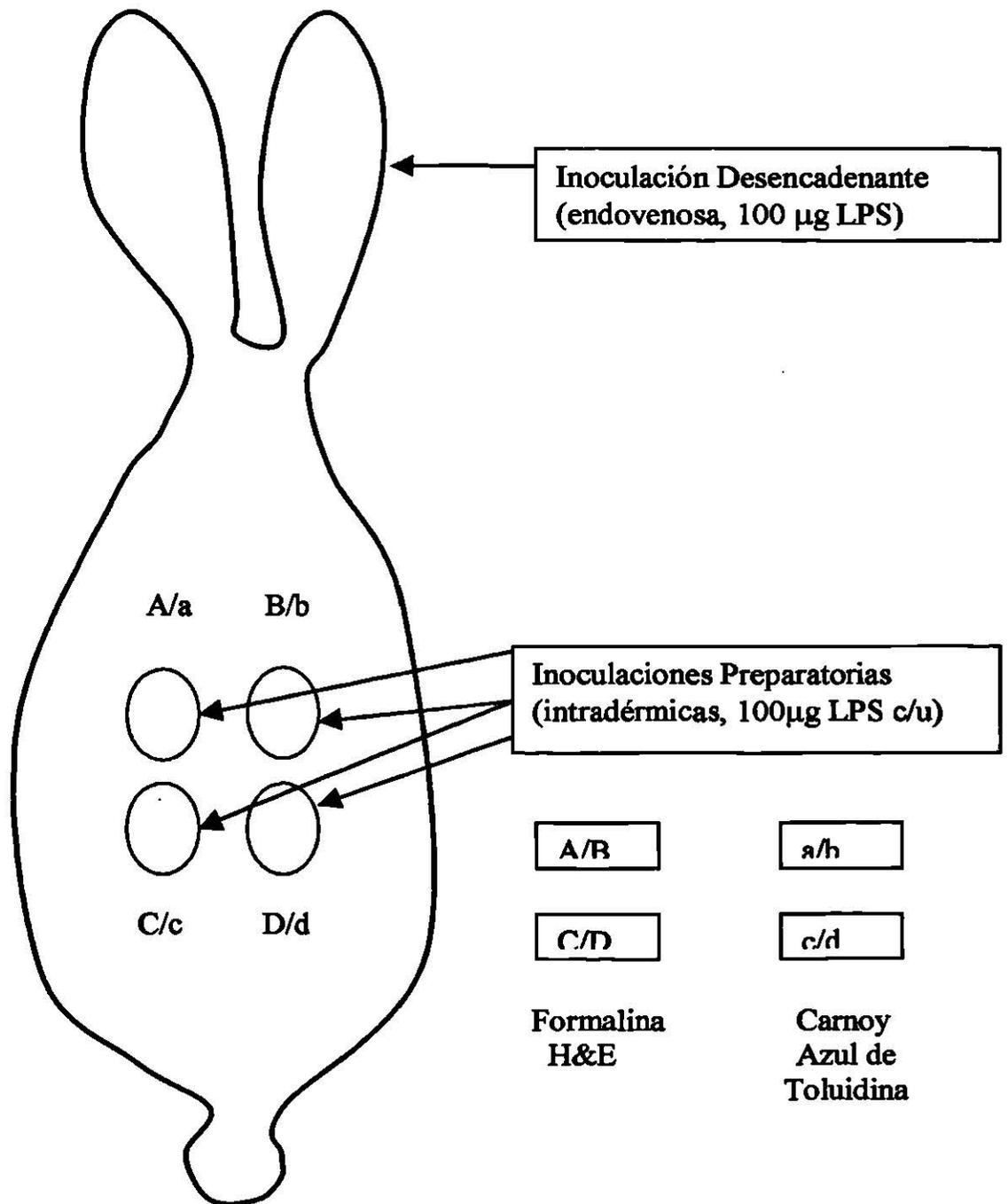


FIGURA 1. Sitios de Inoculación, Colección y Proceso de las Muestras. Cada uno de los sitios de inoculación cutánea se dividió en dos (A/a, B/b, C/c, D/d) para fijarse y procesarse de manera diferente. Un grupo de éstos (A, B, C, D) se fijó en formalina al 10% amortiguada y se tiñeron con H & E. Los otros se fijaron en Carnoy (a, b, c, d) y se tiñeron con Azul de Toluidina. Cada laminilla incluyó dos secciones. De esta forma, se obtuvieron cuatro laminillas de cada animal que incluyeron dos secciones de piel cada una; dos de ellas teñidas con H&E y las otras dos teñidas con Azul de Toluidina.

3.4 Sacrificio de los Animales

Después de la inoculación endovenosa se sacrificó a los animales de acuerdo al día que les correspondía. Para llevar a cabo esto se volvieron a tranquilizar a los conejos con xilacina y se les administró una sobredosis de pentobarbital (Aranda).

3.5 Manejo de las Muestras

Inmediatamente después de la muerte de cada conejo, se tomaron cada uno de los sitios de piel inoculados. Estos se dividieron en dos, para así obtener dos muestras de cada sitio. Dos muestras fueron fijadas en formalina al 10 % amortiguada en tanto que las otras dos se mantuvieron refrigeradas en solución de Carnoy (Figura 1). Las muestras fijadas en formalina se mantuvieron a temperatura ambiente durante 72 h para posteriormente continuar el proceso rutinario en el histoquinete. Las muestras fijadas en Carnoy se mantuvieron 24 h en refrigeración y luego se hicieron dos enjuagues en alcohol absoluto con intervalos de una hora (Thompson, 1966), para finalmente mantenerse en alcohol de 80 % hasta su proceso en el histoquinete a partir del alcohol correspondiente. Las muestras fijadas en formalina se procesaron rutinariamente y se tiñeron con H & E. En el caso de las muestras fijadas en Carnoy, éstas se tiñeron con azul de Toluidina (Merck) pH 0.5. El colorante se preparó de la siguiente manera: Se pesaron 0.5 g de azul de Toluidina y se diluyeron en 100 ml de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.5 N, a la cual se le acidificó hasta obtener un valor de pH de 0.5. Las laminillas en las que se montaron estas pieles fijadas en Carnoy fueron previamente lavadas en 400 ml de una solución ácido-

alcohol (396 ml de alcohol al 70 % y 4 ml de ácido clorhídrico). Las laminillas se dejaron secar por un día cuidando que no les cayera polvo para después empaparlas en Poly L Lisine (SIGMA) preparada 1:10 con agua desionizada. Luego de montar las pieles en las laminillas tratadas, se quedaron por 15 min en la platina para eliminar el exceso de parafina e inmediatamente después se pasaron dos veces en xilol durante 5 min. Se hizo lo mismo con alcohol absoluto y alcohol de 96 %, sólo que en este último duraron 3 min; para luego sumergirlas en alcohol de 70 % por 3 min y rehidratarlas en agua destilada durante 15 min, antes de ponerlas en una jarra coplin con azul de Toluidina (pH 0.5). Luego de 24 h de tinción las laminillas se sacaron y se hicieron enjuagues de 1 min a partir de alcohol de 96 %, pasando al alcohol absoluto para terminar en xilol. Las laminillas fueron cubiertas con resina Entellan (Merck) y un cubreobjetos.

3.6 Conteo de Células Cebadas

Los cuatro sitios de la piel inoculada, tanto en los animales Shwartzman como en los control, fueron incluidos en dos laminillas teñidas con azul de Toluidina (Figura 1). Previo al conteo de las células las laminillas se mezclaron sin importar el grupo al que pertenecían, ignorando la identificación anterior para así darles una nueva identificación. Este procedimiento lo realizó una persona ajena a la asignación original de los grupos. De esta forma el conteo celular se realizó desconociendo la correspondencia con los tratamientos. Para realizar el conteo de células cebadas se tomaron en cuenta 20 campos por laminilla en aumento de 40 X lo que equivale a 3.694 mm² (Ramírez-Romero *et al.*, 2000). Cada laminilla se recorrió por el microscopio en forma de grecas a lo largo de la dermis,

contando todas las células cebadas encontradas por campo. Posteriormente se hizo la suma del total de los 20 campos y se anotó el resultado para transformarlo en células cebadas /mm². Después, las laminillas se volvieron a asignar a su correspondencia original por animal para sacar un valor promedio por cada conejo. Cada valor por conejo se asignó a los grupos correspondientes para realizar las comparaciones estadísticas posteriores.

3.7 Procedimientos Estadísticos

Se empleó un diseño completamente al azar para reconocer la probable diferencia entre los grupos. Posteriormente, en caso de existir diferencias significativas, se procedió con una comparación de las medias empleando el procedimiento de Tukey para identificar el o los grupos con la contribución mayor. El valor mínimo para reconocer significancia fue $P < 0.05$. Además, se realizaron análisis de regresión lineal simple tanto para los animales a los que se les indujo la reacción de Shwartzman como para los animales control. En ambos casos los valores independientes (x) fueron los tiempos de sacrificio (1, 8 y 15 días). Todos los procedimientos se llevaron a cabo empleando un programa convencional para análisis estadísticos por computadora (Statistix para Windows).

4 RESULTADOS

4.1 Lesiones Macroscópicas

La típica lesión hemorrágica cutánea que caracteriza a la reacción local de Shwartzman se observó en todos los animales en los que se indujo este fenómeno. Las lesiones mostraron su máxima intensidad al primer día y se caracterizaron por tener un color amoratado oscuro y una forma circular muy bien delimitada y abultada (Figura 2). En su mayoría, estas lesiones desaparecieron hacia el día ocho; solamente las más intensas permanecieron como unas pequeñas áreas de necrosis puntiforme (Figura 3). A los quince días ya no se apreciaron lesiones en los sitios de inoculación e incluso el pelo depilado ya había vuelto a crecer (Figura 4). En los animales control que recibieron solución salina fisiológica no se observaron lesiones cutáneas.

4.2 Lesiones Microscópicas

Los animales en los que se indujo la reacción de Shwartzman y fueron sacrificados el primer día presentaron lesiones histológicas típicas de este fenómeno, incluyendo una intensa infiltración de PMN, edema, congestión, trombosis y hemorragias perivasculares (Figura 5). Las lesiones fueron más intensas en dermis superficial, provocando necrosis de la epidermis. Sin embargo, en las reacciones más severas las lesiones se introdujeron hasta la hipodermis subyacente. En estos animales la tinción especial demostró que, salvo en los sitios con mayor infiltración de neutrófilos y necrosis, el aumento de células cebadas fue muy evidente (Figuras 6 y 7). Cuando los animales se sacrificaron a los ocho días los cambios inflamatorios fueron menos intensos e incluyeron proliferación de fibroblastos aledaños a los sitios de lesión (Figura 8). En estos casos el número de células cebadas fue considerablemente menor (Figura 9). Finalmente, a los quince días el único cambio que se mantuvo fue la fibroplasia. En estos casos los números de células cebadas fue por lo general similar al de los animales control (Figura 10). En las secciones de los animales control no se observaron lesiones histológicas.



FIGURA 2. Día 1 luego de haber provocado la reacción local de Shwartzman. Se observan las lesiones bien definidas en el dorso del animal.

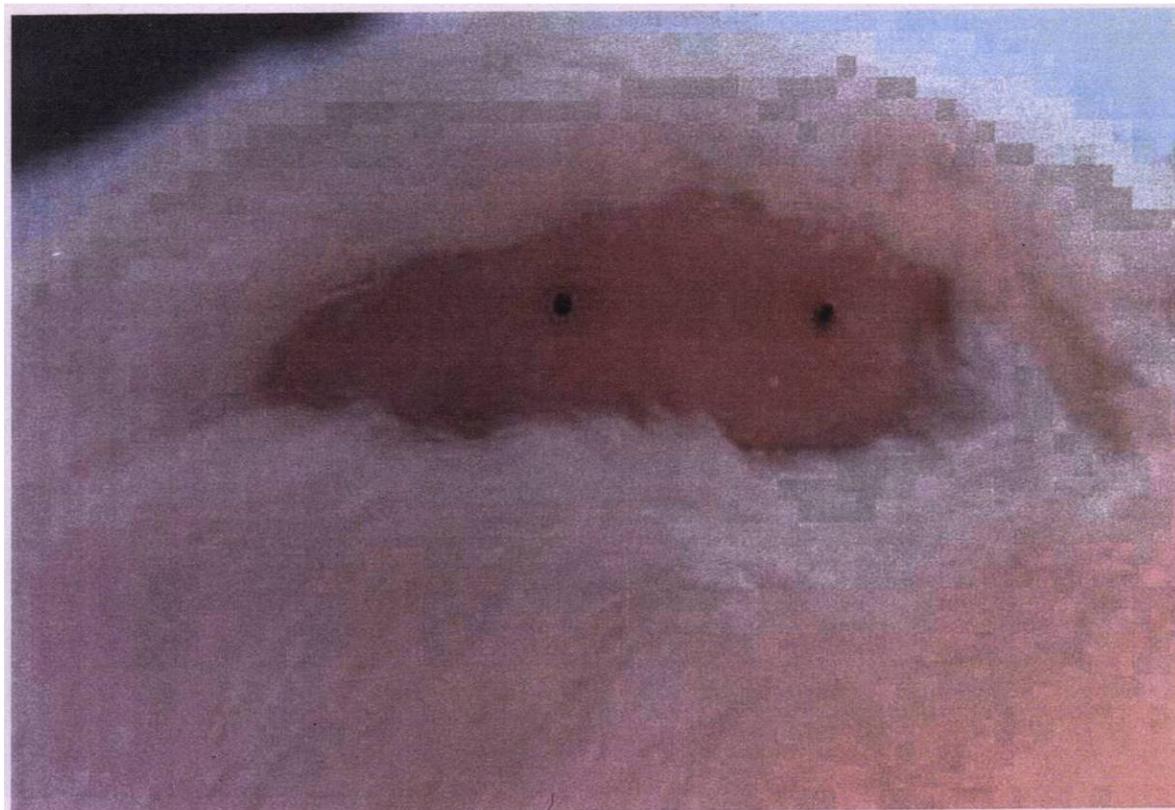


FIGURA 3. Día 8, las lesiones casi desaparecieron y sólo se observan como un pequeño punto oscuro.



FIGURA 4. Día 15, los sitios de inoculación desaparecieron e incluso el pelo depilado ya había crecido.

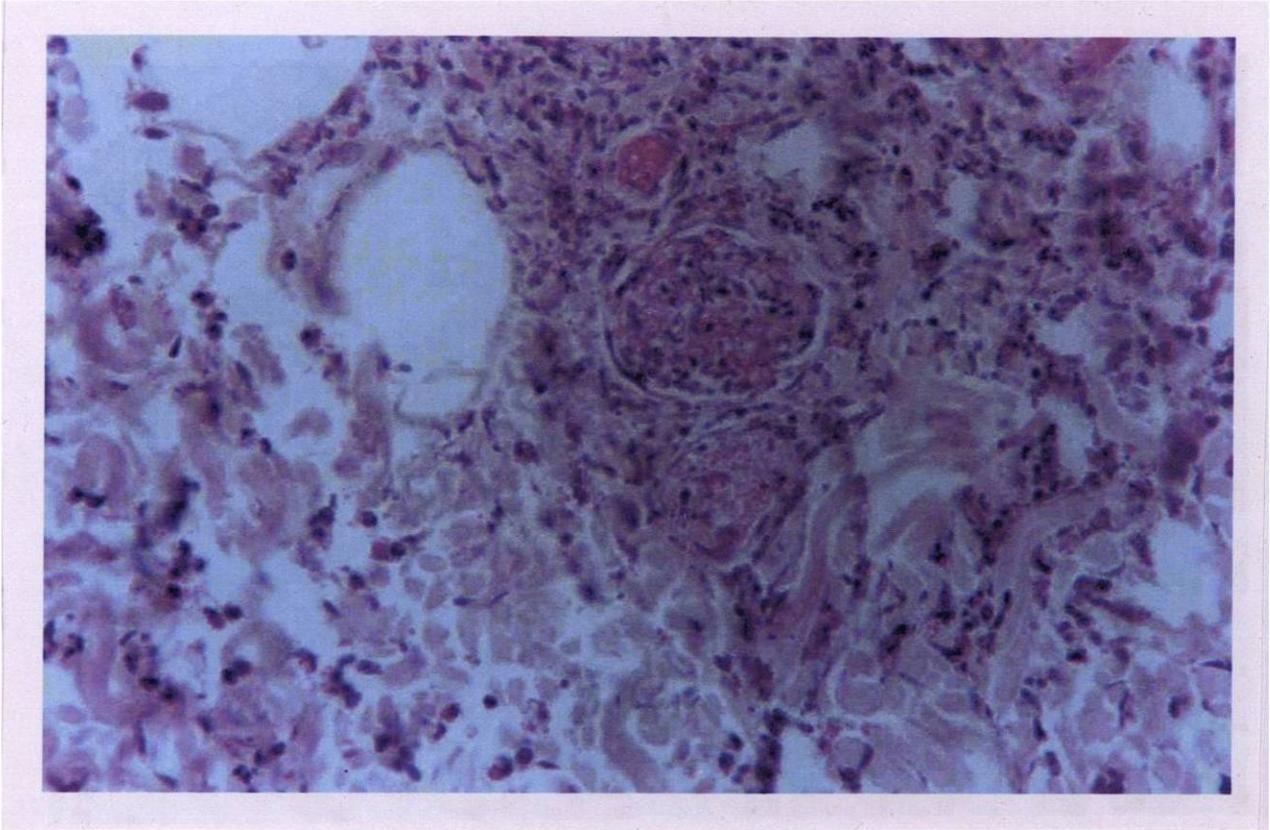


FIGURA 5. Lesión microscópica del día 1. Se observa trombosis en pequeños vasos sanguíneos con necrosis adyacente e infiltración de PMN. H&E; 400X.

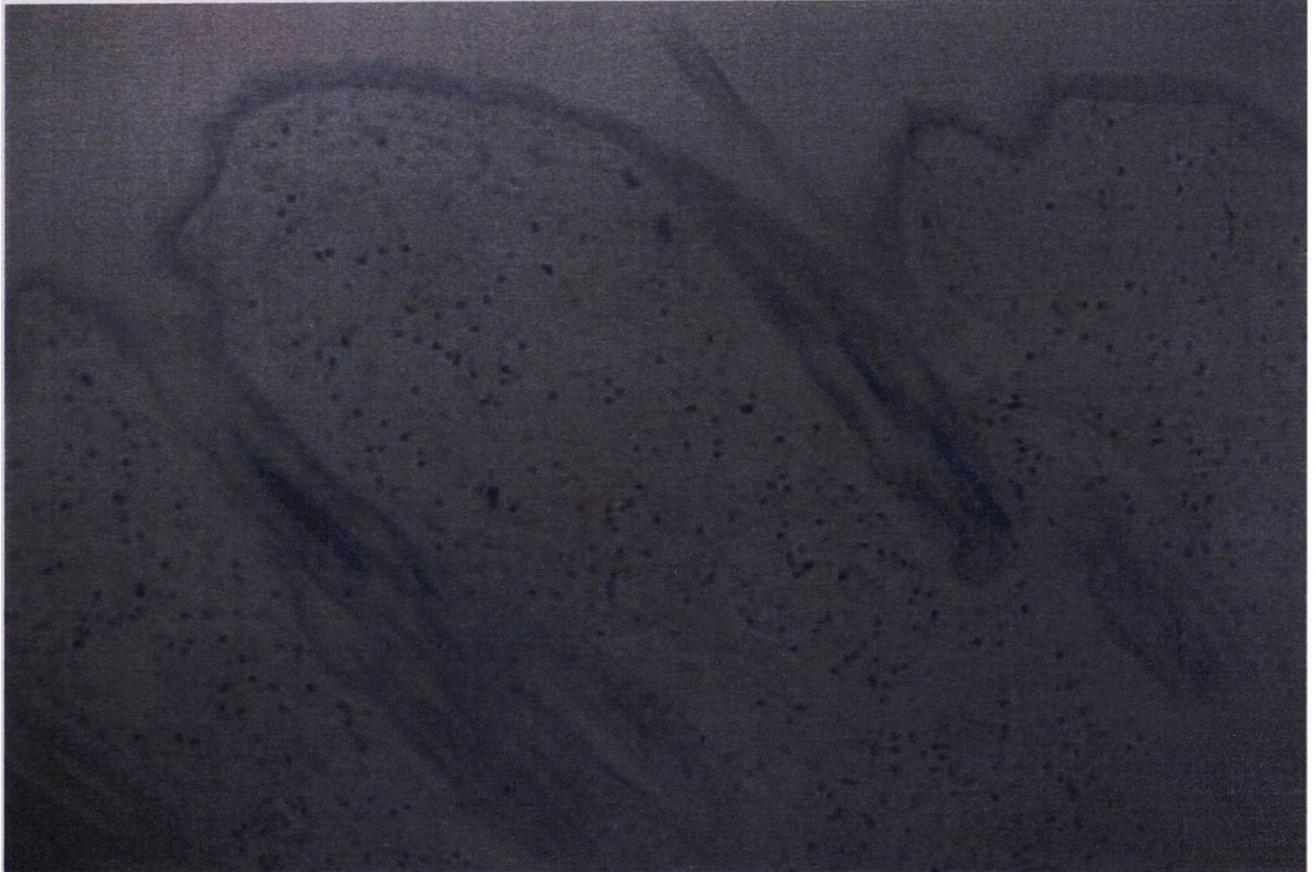


FIGURA 6. Lesión microscópica del día 1. Se muestra una abundante cantidad de células cebadas. Azul de Toluidina, pH 0.5; 100X.



FIGURA 7. Lesión microscópica del día 1. Área de necrosis con escasas células cebadas. Azul de Toluidina, pH 0.5; 400X.

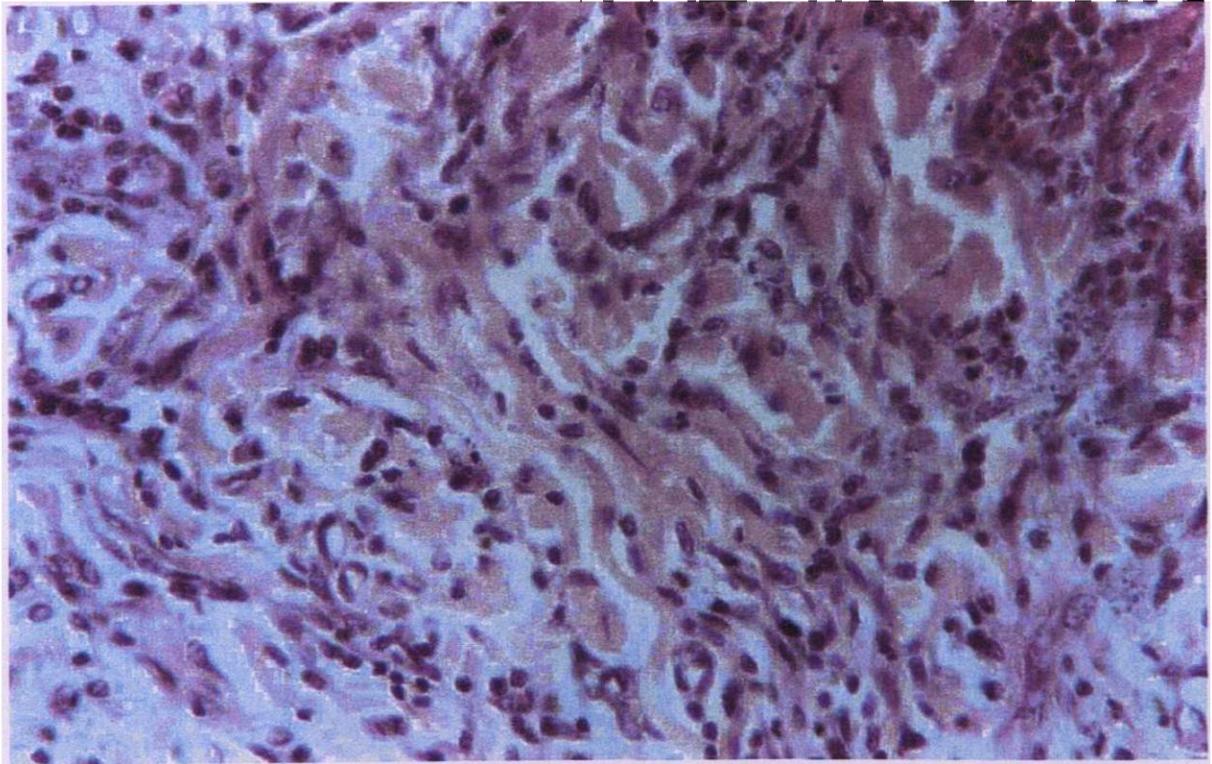


FIGURA 8. Lesión microscópica del día 8. Se observa la proliferación de fibroblastos en los márgenes de un área de necrosis. H&E: 400X.

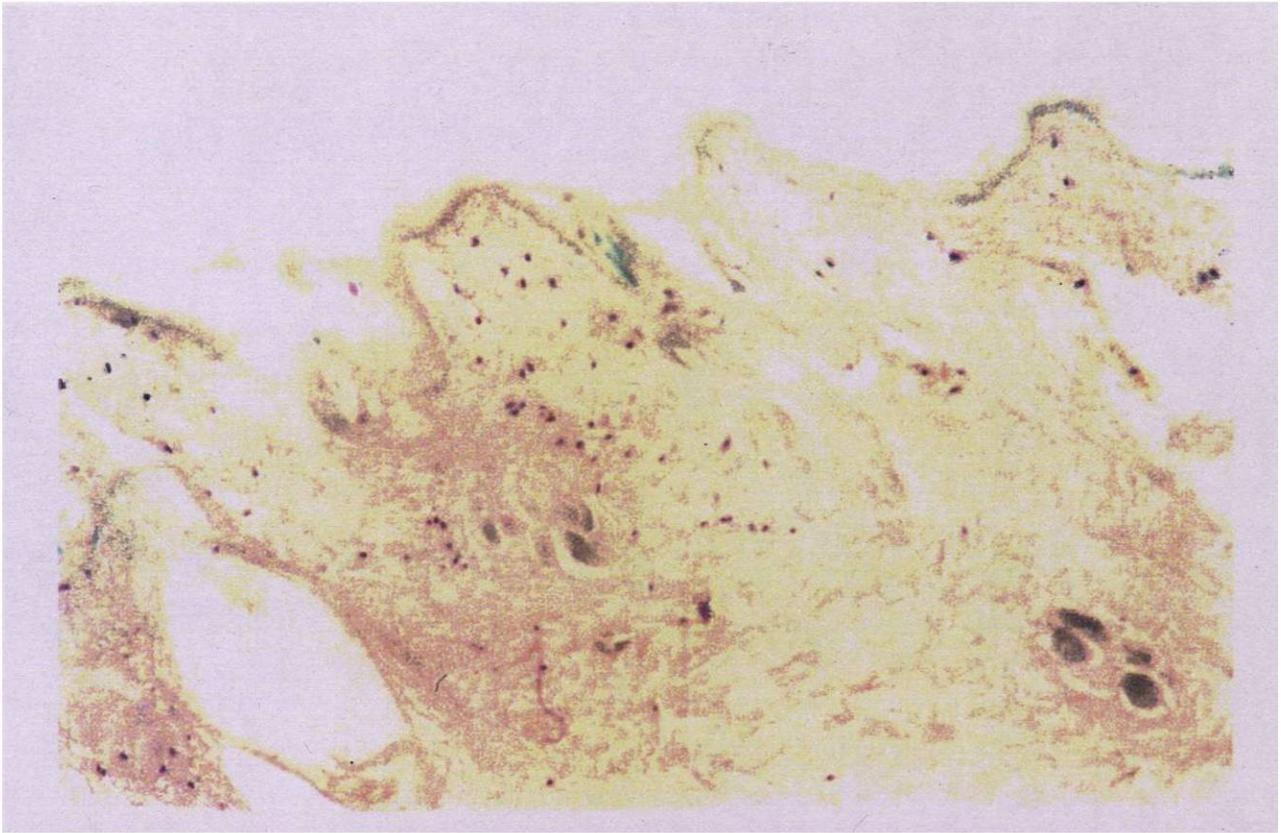


FIGURA 9. Lesión microscópica del día 8. El número de células cebadas es mucho menor. Azul de Toluidina, pH 0.5; 400X.



FIGURA 10. Lesión microscópica del día 15. Se presenta fibrosis con presencia de escasas células cebadas. Azul de Toluidina, pH 0.5; 400X.

4.3 Conteo de Células Cebadas

Se observó que los animales de los grupos Shwartzman mostraron un aumento en la cantidad de células cebadas durante el inicio de la reacción y después el número de células fue declinando hasta alcanzar una cantidad similar a los grupos de los animales control. Esto se comprueba con los datos obtenidos de los grupos 1, 3 y 5, sacrificados a los días 1, 8 y 15, respectivamente. Los valores correspondientes fueron: 415.00 ± 287.29 (media \pm desviación estándar), 62.7 ± 63.09 y 14.00 ± 3.51 (Figura 11). En tanto que los animales control sacrificados en los mismos intervalos (grupos 2, 4, 6) tuvieron valores de: 12.70 ± 7.38 , 11.80 ± 6.97 y 11.70 ± 4.14 , respectivamente (Figura 11). Cuando se compararon todos los grupos en un análisis de varianza empleando un diseño completamente al azar, se demostró que existía una diferencia entre ellos bastante significativa; es decir los grupos no eran iguales ($P < 0.005$). Sin embargo, cuando se aplicó el análisis de Tukey se apreció que el único grupo diferente era el grupo 1 ($P < 0.05$), mientras que todos los demás eran iguales entre sí. Por otra parte, los valores de los animales control no mostraron ninguna tendencia al paso del tiempo y permanecieron similares; en tanto que los valores de los animales a los que se les indujo la reacción de Shwartzman mostraron una clara tendencia lineal negativa ($P < 0.005$; $R^2 = 0.48$) (Figura 11).

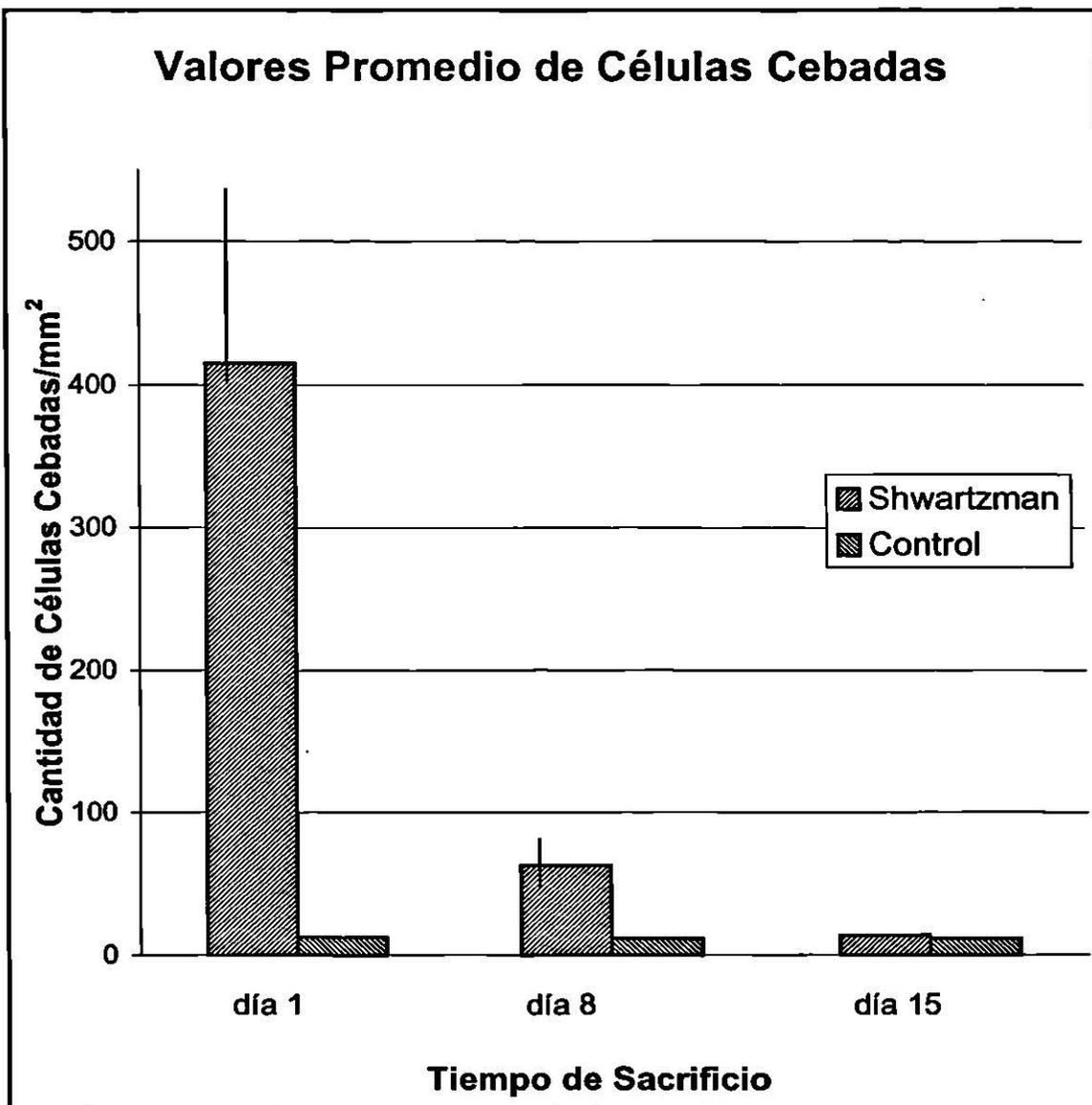


FIGURA 11. Se demuestra la gran diferencia que hay entre las tres fechas de sacrificio de los grupos Shwartzman. Los tres grupos control permanecen iguales. El grupo Shwartzman perteneciente al día 15 aparece muy similar con los grupos control. Hay una tendencia lineal negativa en los grupos a los que se indujo la reacción de Shwartzman que muestra un número decreciente de células cebadas conforme pasa el tiempo.

5 DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la población de células cebadas tiene una respuesta dinámica durante la iniciación y la progresión de la reacción local de Shwartzman. En el inicio (día 1), cuando el proceso inflamatorio está en su máxima expresión, las células cebadas mostraron un dramático incremento. Subsecuentemente, en el tiempo en que la respuesta inflamatoria empieza a decrecer y aparece el proceso de restauración (día 8), las células cebadas declinan rápidamente pero aun aparecen en mayor cantidad que los grupos control. Finalmente, cuando el proceso de restauración tisular se hace más evidente (día 15), las células cebadas decrecen más lentamente hasta alcanzar números similares a los control. Estos resultados muestran similitud con los resultados reportados por Riech *et al* (1991), quienes encontraron un patrón similar en el número de células cebadas después de inducir en cerdos libres de patógenos heridas quirúrgicas. Riech menciona que pueden ser identificadas tres fases; la primera (0-2 días) que se caracteriza por un marcado incremento en el número de células cebadas, la segunda (2-4 días), donde las células cebadas también decrecen rápidamente, y la final, (4-14 días), cuando las células cebadas declinaron más lentamente (Riech *et al.*, 1991). Por el contrario, Trautmann *et al* (2000) demostraron que

en heridas quirúrgicas en humanos las células cebadas inicialmente decrecen y luego se incrementan acompañadas de una gran proliferación de fibroblastos alrededor del día 10 (Trautmann *et al.*, 2000). Estos resultados contrastan con lo referido por Riech *et al* (1991), y tampoco corresponden con lo encontrado en el presente trabajo.

Tal vez sea más adecuado comparar los resultados del presente trabajo con aquellos experimentos que investigan el papel que juegan las células cebadas durante una respuesta inflamatoria inducida por agentes flogísticos, tales como citocinas y LPS bacterianos. Por ejemplo, la administración en la rata y en el ratón de RANTES, una quimiocina proinflamatoria miembro de la subfamilia C-C, causa una fuerte respuesta inflamatoria acompañada por una acumulación masiva de células cebadas (Conti *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 1998). Este efecto puede ser demostrado a las cuatro horas de haber inyectado RANTES. Sin embargo, el lipopolisacárido bacteriano es un agente más flogístico que RANTES e induce una mayor infiltración de células cebadas (Conti *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 1998). En últimas fechas se ha demostrado que en la piel de ratas el lipopolisacárido bacteriano induce la pérdida de plasma a través de la activación de las células cebadas y la liberación de mediadores proinflamatorios como la histamina y el TNF- α (Iuvone *et al.*, 1999). Las células cebadas no son la única fuente, pero sí la más importante de esta citosina, la cual se encuentra preformada y almacenada en sus gránulos (Abraham, 1997). Es por eso que después de su activación y degranulación, las células cebadas podrían influir en los eventos iniciales de la inflamación producida por la reacción local de Shwartzman porque, como se mencionó con anterioridad, el TNF- α es uno de los mediadores más importantes de este fenómeno experimental, particularmente durante la inoculación preparatoria (Norman *et al.*, 1996). Al respecto, se ha referido que los ratones

particularmente durante la inoculación preparatoria (Norman *et al.*, 1996). Al respecto, se ha referido que los ratones genéticamente deficientes de células cebadas W/W^Y responden mínimamente a los agentes proinflamatorios como RANTES y los lipopolisacáridos (Conti *et al.*, 1997).

En el presente estudio se reconoció que en aquellas áreas en las que los cambios inflamatorios fueron tan severos como para observar necrosis, las células cebadas fueron verdaderamente escasas. Sin embargo, la evaluación completa de las secciones de piel mostró un incremento en la cantidad de células en el día 1. Es probable que mientras el severo daño persiste las células cebadas permanecen con un número reducido, pues en lepra, la cantidad de células cebadas es muy escasa dentro del propio granuloma mientras que en el intersticio adyacente es mucho mayor (Mahaisavariya *et al.*, 2000). Cheville (1994) menciona que la disminución de células cebadas en sitios de severa inflamación se debe a una degranulación de las mismas células.

Por otra parte, se ha establecido que durante ciertas condiciones patológicas crónicas en humanos, tales como la urticaria y la psoriasis, las células cebadas aparecen en una mayor cantidad. (Haas *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2001). Incluso, en un modelo en ratones donde se indujo experimentalmente escleroderma, se demostró un incremento en el número de células cebadas después de 3 a 4 semanas de tratamiento con bleomicina (Yamamoto *et al.*, 1999). Sin embargo, en el presente experimento se observó lo contrario; para el día 15, cuando la restauración del tejido fue completa, las células cebadas retornaron a sus valores normales. Como se sabe, las citocinas y los factores de crecimiento como la interleucina 4 (IL-4) y el factor de la célula madre (SCF, también

conocido como ligando KIT o factor Steel) influyen en la supervivencia de las células cebadas en los tejidos (Holgate, 2000; Krishnaswamy *et al.*, 2001). Aparentemente, el proceso normal de restauración tisular en piel, tal y como se desarrolló en el presente estudio, no se encuentra acompañado de condiciones que favorezcan la hiperplasia de las células cebadas.

En conclusión, se ha demostrado que las células cebadas se incrementan durante las primeras etapas de la reacción local de Shwartzman y, más tarde, mientras la reacción inflamatoria declina y el proceso de restauración se desarrolla, las células cebadas disminuyen y regresan a sus valores normales. Los resultados demuestran que las células cebadas juegan un papel muy importante durante el inicio de la reacción local de Shwartzman.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, S.N.: Discovering the benign traits of the mast cell. *Science and Medicine*, Septiembre/Octubre 46-55 (1997).

Argenbright, L.W. and Barton, R.W.: Interaction of leukocyte integrins with intercellular adhesion molecule 1 in the production of inflammatory vascular injury *in vivo*. The Shwartzman reaction revisited. *Journal of Clinical Investigation*, 89: 259-272 (1992).

Beck, G., Habicht, G.S., Benach, J.L. and Miller, F.: Interleukin 1: a common endogenous mediator of inflammation and the local Shwartzman reaction. *The Journal of Immunology*, 136: 3025-3031 (1986).

Cheville, N.F.: Ultrastructural Pathology. An Introduction to Interpretation. *Iowa State University*, Ames, Iowa, 1994.

Conti, P., Pang, X., Boucher, W., Letourneau, R., Reale, M., Barbacane, R.C., Thibault, J. and Theoharides, T.C.: Impact of Rantes and MCP-1 chemokines on *in vivo* basophilic cell recruitment in rat skin injection model and their role in modifying the protein and mRNA levels for histidine decarboxylase. *Blood*, 89: 4120-4127 (1997).

Conti, P., Reale, M., Barbacane, R.C., Letourneau, R. and Theoharides, C.: Intramuscular injection of hrRANTES causes mast cell recruitment and increased transcription of histidine decarboxylase in mice: lack of effects in genetically mast cell-deficient W/W^V mice. *The FASEB Journal*, 12: 1693-1700 (1998).

Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T.: *Pathologic Basis of Disease*, 6th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 1999.

Echtenacher, B., Männel, D. and Hültner, L.: Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*, 281:75-77 (1996).

Freeman, B.A.: *Textbook of Microbiology*, 21st ed. W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 1979.

Galli, S.J.: Mast cells and basophils. *Current Opinion in Hematology*, 7: 32-39 (2000).

Haas, N., Toppe, E. and Henz, B.M.: Microscopic morphology of different types of urticaria. *Archives of Dermatology*, 134:41-46 (1998).

Holgate, S.T.: The role of mast cells and basophils in inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, 30 (1): 28-32 (2000)

Imamura, S., Matsukawa, A., Ohkawara, S., Kagayama, M. and Yoshinaga, M.: Involvement of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-8, and interleukin-1 receptor antagonist in acute lung injury caused by local Shwartzman reaction. *Pathology International*, 47: 16-24 (1997).

Iuvone, T., Den Bossche, R.V., D'Acquisto, F., Carnuccio, R. and Herman A.G.: Evidence that mast cell degranulation, histamine and tumour necrosis factor alpha release occur in LPS-induced plasma leakage in rat skin. *British Journal of Pharmacology*, 128: 700-704 (1999).

Jiang, W.Y., Chattedee, A.D., Raychaudhuri, S.P., Raychaudhuri, S.K. and Farber, E.M.: Mast cell density and IL-8 expression in non lesional and lesional psoriatic skin. *International Journal of dermatology*, 40: 699-703 (2001).

Krishnaswamy, G., Kelley, J., Johnson, D., Youngberg, G., Stone, W., Huang, S-K., Bieber, J. and Chi, D.S.: The human mast cell: Functions in physiology and disease. *Frontiers in Bioscience*, 6: d1109-1128 (2001).

Levi-Schaffer, F.: Mast cell/fibroblast interactions in health and disease. In: Human Basophils and Mast cells: Biological Aspects, Chemical Immunology, Vol. 61. Edited by: Marone, G. 161-185. *Karger*, Basel, Switzerland, 1995.

Mahaisavariya, P., Jiamton, S., Manonukul, J. and Khemnegern, S.: Mast cells in leprosy and leprosy reaction. *International Journal of Dermatology*, 39: 274-277 (2000).

Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E. and Abraham, S.N.: Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature*, 381:77-80 (1996).

Metcalf, D.D., Baram, D. and Mekori, Y.A.: Mast cells. *Physiological Reviews*, 77: 1033-1079 (1997).

Milner, K.C., Rudbach, J.A. and Ribic, E.: General characteristics. In: Microbial Toxins. Vol. IV. Bacterial Endotoxins. Edited by: Weinbaum, G., Kadis, S. and Ajl, S.J. 1-56. *Academic Press*, New York, New York, 1971.

Mori, W.: The Shwartzman reaction: a review including clinical manifestations and proposal for a univisceral or single organ third type. *Histopathology*, 5: 113-126 (1981).

Movat, H.Z., Burrowes, C.E., Cybulsky, M.I. and Dinarello, C.A.: Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury. *American Journal of Pathology*, 129: 463-476 (1987).

Norman, K.E., Williams, T.J., Feldmann, M. and Rossi, A.G.: Effect of soluble P55 tumour-necrosis factor binding fusion protein on the local Shwartzman and Arthus reactions. *British Journal of Pharmacology*, 117: 471-478 (1996).

Ramírez-Romero, R.: Aplicación de insulina en lesiones de conejos diabéticos. *Gaceta Regional*, 9: 8 (2001).

Ramírez-Romero, R. and Brogden, K.A.: The potential role of the Arthus and Shwartzman reactions in the pathogenesis of pneumonic pasteurelosis. *Inflammation Research*, 49: 98-101 (2000).

Ramírez-Romero, R., Brogden, K.A., Gallup, J.M., Dixon, R.A.F. and Ackermann, M.R.: Reduction of pulmonary mast cells in areas of acute inflammation in calves with *Mannheimia* (Pasteurella) *haemolytica* pneumonia. *Journal of Comparative Pathology*, 123: 29-35 (2000).

Riech, J.D., Cazzaniga, A.L., Mertz, P.M., Kerdel, F.A., and Eaglstein, W.H.: The effect of electrical stimulation on the number of mast cells in healing wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25: 40-46 (1991).

Rietschel, E.T. and Brade, H.: Bacterial endotoxins. *Scientific American*, 267: 26-33 (1992).

Robbins, S.L., Angell, M. and Kumar, V.: Basic Pathology, 3rd ed. *W.B. Saunders*, Philadelphia, Pennsylvania, 1981.

Slauson, D.O. and Cooper, B.J.: Mechanisms of Disease, 2nd ed. *Williams & Wilkins*, Baltimore, Maryland, 1990.

Thompson, S.W.: Selected Histochemical and Histopathological Methods. *Charles C. Thomas*, Springfield, Illinois, 1966.

Trautmann, A., Toksoy, A., Engelhardt, E., Bröcker, E-B. and Gillitzer, R.: Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *Journal of Pathology*, 190: 100-106 (2000).

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

Yamamoto, T., Takagawa, S., Katayama, I., Yamazaki, K., Hamazaki, Y., Shinkai, H. and Nishioka, K.: Animal Model of Sclerotic Skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *The Journal of Investigative Dermatology*, 112: 456-462 (1999).

