

VALUTAZIONE CLINICA ED ISTOLOGICA DEL PLR 120 (PALMIDROL DCI, CO-MICRONIZZATO) IN GATTI AFFETTI DA GRANULOMA EOSINOFILICO E PLACCA EOSINOFILICA: STUDIO PILOTA*

F. SCARAMPELLA¹, F. ABRAMO², C. NOLI¹

¹Studio Veterinario, Via Sismondi 62, Milano

²Dipartimento di Patologia Animale, Università di Pisa, Pisa

PATOLOGIA FELINA

Riassunto

Quindici gatti con granuloma eosinofilo o placca eosinofila sono stati trattati per un mese con PLR 120 (10 mg/kg 2 volte al giorno). PLR 120 regola negativamente la degranolazione mastocitaria attraverso un meccanismo di natura recettoriale. Nel corso dello studio non è stato consentito l'utilizzo di altri farmaci, tranne antiparassitari. Prima e dopo il trattamento, sono stati effettuati (a) valutazione clinica e (b) prelievo di biopsie cutanee. Il miglioramento clinico è stato valutato al 15° e al 30° giorno. Le sezioni istologiche colorate con blu di toluidina sono state sottoposte, prima e dopo il trattamento, alla conta dei mastociti e all'analisi densitometrica del loro contenuto granulare. Dieci gatti su quindici (67%) hanno presentato un miglioramento clinico dei segni e delle lesioni. Il numero dei mastociti nelle biopsie cutanee prelevate prima del trattamento non si è dimostrato differire significativamente da quello delle biopsie prelevate al termine del trattamento, mentre la densità dei granuli intracellulari aumentava significativamente ($P < 0,009$). Questo studio pilota suggerisce che il PLR 120 può rappresentare un farmaco utile per il trattamento del granuloma eosinofilo e della placca eosinofila.

Summary

Fifteen cats with eosinophilic granuloma or eosinophilic plaque were given PLR 120 at the dosage of 10 mg kg⁻¹ twice daily for one month. PLR 120 down-modulates mast cell degranulation via a receptor-mediated mechanism. No other drugs were permitted and cats were kept free of parasites throughout the study. A clinical evaluation and skin biopsies were performed before and after the treatment. Clinical improvement was assessed at 15 and 30 days. Mast cell numbers were counted and their granular content was assessed by densitometric analysis on toluidine blue-stained sections before and after the treatment. Ten of 15 (67%) cats showed clinical improvement of signs and lesions. There was no significant difference between mast cell numbers in skin biopsies taken before and after the trial, whereas the number of granules was significantly increased ($P < 0.009$). This pilot study suggests that PLR-120 might be a useful drug for the treatment of eosinophilic granuloma and eosinophilic plaque.

INTRODUZIONE

La placca eosinofila (PE) ed il granuloma eosinofilo (GE) sono lesioni cutanee di comune riscontro nel gatto e vengono generalmente considerate possibili manifestazioni

reattive di sottostanti dermatopatie allergiche (es. allergia al morso di pulce, dermatite atopica, ipersensibilità alimentare, dermatite allergica alla puntura di zanzara)¹⁻⁶.

La PE si manifesta come un'area ben circoscritta caratterizzata da erosione ed essudato, con forte eritema ed alopecia auto-indotta. Le lesioni possono presentarsi in qualunque parte del corpo, sebbene le regioni inguinale e perianale, nonché la faccia mediale della coscia siano le più frequentemente interessate³.

*Da "The Veterinary Dermatology" Vol. 12, N. 1, febbraio 2001, 29. Con l'autorizzazione dell'Editore.

Il GE si manifesta prevalentemente come un'area cutanea rilevata, alopecica ed eritematosa, generalmente localizzata lungo l'aspetto caudale degli arti posteriori^{5,7}. Alternativamente, le lesioni possono comparire a livello di cavità orale, mento ed estremità³.

Le caratteristiche istopatologiche della PE comprendono un infiltrato eosinofilo superficiale e profondo, una diffusa infiltrazione mastocitaria, accompagnata da iperplasia epidermica, spongiosi ed ulcerazione⁸.

Da un punto di vista istologico, il GE è caratterizzato da una dermatite granulomatosa che può essere da nodulare a diffusa, con aree di collagenolisi circondate da macrofagi, cellule giganti, eosinofili e mastociti, localizzati al di sotto di un'epidermide sana⁸. Sebbene le manifestazioni cliniche e l'eziologia siano variabili, le lesioni hanno come costante comune la presenza di un infiltrato infiammatorio misto a carico del derma, con prevalenza di eosinofili e mastociti⁸.

Nella cute del gatto, i mastociti sono rilevabili sia nell'epidermide⁹ che nel derma, dove si localizzano in prossimità dei vasi ematici superficiali e delle locali terminazioni nervose¹⁰. Tali cellule giocano un ruolo chiave nell'attivazione delle reazioni allergiche cutanee¹¹⁻¹⁵, essendo in grado di immagazzinare e di rilasciare una grande varietà di sostanze biologicamente attive. La loro stimolazione entro limiti fisiologici e la conseguente normo-degranulazione rappresenta un fattore importante dell'omeostasi tissutale¹⁶⁻¹⁸.

Un'eccessiva degranulazione mastocitaria, indotta da stimoli immunologici (es. legame antigene-anticorpo) o non-immunologici (es. neuropeptidi), può causare risposte infiammatorie patologiche.

Le reazioni di ipersensibilità di tipo I prendono avvio dall'interazione dell'allergene con l'IgE antigene-specifica legata sulla membrana mastocitaria. Sotto stimolazione, i mastociti rilasciano immediatamente i mediatori infiammatori, sia di tipo preformato - come ammine vasoattive (istamina e serotonina), serino proteasi (triptasi e chimasi), fattori chemotattici, citochine (interleuchine, TNF) -, sia sintetizzati *ex novo*, come i metaboliti dell'acido arachidonico (prostaglandine, leucotrieni). Tali sostanze sono in grado di stimolare una cascata infiammatoria acuta, ma anche di indurre una risposta cronica ritardata, con richiamo di leucociti circolanti, tra cui gli eosinofili^{13,14,19,20}.

Recentemente è stato scoperto un meccanismo di *feedback* locale, detto ALIA (*Autacoid Local Injury Antagonism*), in grado di modulare negativamente la degranulazione mastocitaria nel corso dei processi di danno tissutale^{21,22}. In condizioni patologiche, l'accumulo locale di N-acil lipidi^{23,24}, come la palmitoiletanolamide, sembra giocare un ruolo autacoide nel diminuire la degranulazione mastocitaria, esercitando, così, effetti locali di natura antinfiammatoria^{21,25}. In particolare, la modulazione dell'iperattività di queste cellule sarebbe mediata dal legame della palmitoiletanolamide e dei suoi derivati al recettore periferico per i cannabinoidi (CB2), presente sulla membrana dei mastociti²⁶. Le implicazioni terapeutiche di questo specifico meccanismo recettoriale comprendono lo sviluppo di farmaci antinfiammatori innovativi, specificamente mirati al controllo dell'attivazione mastocitaria e al danno tissutale di natura infiammatoria (ALIAmidi).

Scopo del presente studio pilota è verificare clinicamente ed istologicamente l'effetto farmacologico di una prepa-

razione orale a base di un analogo della palmitoiletanolamide, detto PLR 120 (Palmidrol DCI comiconizzato, Innovet. Milano, Italia), in gatti affetti da GE e PE.

MATERIALI E METODI

Animali

Nello studio sono stati inclusi 17 gatti comuni europei di proprietà di privati (Tab. 1), riferiti da colleghi che indirizzavano i casi presso l'ambulatorio degli sperimentatori coinvolti in questo studio. Ogni proprietario, informato delle finalità e delle procedure, forniva consenso formale all'inclusione del proprio gatto. I gatti - 4 femmine intere, 2 maschi interi, 5 femmine sterilizzate e 6 maschi castrati - avevano età compresa tra i 7 e i 123 mesi (età media: 34 mesi). Lesioni cliniche compatibili con PE e GE venivano rispettivamente diagnosticate in 8 e 9 casi. Nessuno di essi aveva ricevuto antistaminici o cortisonici per os nelle due settimane precedenti all'inclusione, né cortisonici iniettivi nelle sei settimane prima dell'arruolamento. A parte la dermatopatia diagnosticata, tutti i gatti erano sani, con raschiati cutanei e colture fungine negative.

Periodo di run-in

Prima dell'inclusione, i gatti venivano sottoposti ad un periodo di *run-in* di 15 giorni. Il giorno -15 (T-15) (primo giorno del periodo di *run-in*) venivano trattati con ivermectina per via sottocutanea (0,3 mg/kg, Ivomec, Merck, Sharp & Dohne S.p.A., Roma, Italia) e fipronil per applicazione interscapolare (Frontline Spot on, Merial Italia S.P.A., Milano, Italia). Due gatti (un maschio intero con PE e un maschio castrato con GE) miglioravano sensibilmente durante il *run-in* e venivano conseguentemente esclusi dallo studio (caso n° 2 e caso n° 11). Quindici il numero finale di gatti analizzati, 7 dei quali con PE e 8 con GE (Tab. 1). Al quindicesimo giorno dello studio (T15), tutti gli animali arruolati venivano sottoposti ad un ulteriore trattamento con ivermectina e fipronil.

Somministrazione del farmaco

Le tavolette contenenti 120 mg di PLR 120 venivano suddivise in quattro e somministrate al gatto alla dose di 10 mg/kg 2 volte al giorno per 30 giorni, dal 1° (T0) al 30° (T30) giorno dello studio. Durante tale periodo, non erano consentite terapie concomitanti di alcun genere, fatta eccezione per gli antiparassitari sopra indicati.

Valutazione clinica

Il primo giorno (T0) si procedeva a rilevare, separatamente e in 4 differenti regioni del corpo (testa, tronco, arti anteriori, arti posteriori), segni clinici (prurito, eritema, alopecia) e lesioni cutanee (PE e GE) dell'animale, attribuendo loro un punteggio in base ad una scala numerica (0 = assente; 1 = lieve; 2 = moderato; 3 = grave). Ogni valore così registrato veniva poi moltiplicato per un fattore correlato all'estensione della superficie cutanea affetta (1x = testa; 4x = tronco; 2x = arti anteriori; 3x = arti posteriori), sulla base di una scala PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) modificata²⁷⁻²⁹. Per ogni animale, i singoli punteggi venivano sommati tra loro per ottenere un punteggio complessivo compreso tra 0 e 120.

Tabella 1
Segnalamento e diagnosi istologica dei 15 gatti arruolati nello studio. Il gatto n° 2 (maschio intero con PE) ed il n° 11 (maschio castrato con GE) sono stati esclusi in quanto migliorati durante il periodo di run-in

Caso n°	Età (mesi)	Sesso	Diagnosi clinica	Diagnosi istologica
1	123	mc	GE	DE
3	21	fs	PE	DE
4	48	mc	PE	PE
5	24	f	PE	PE
6	10	f	GE	GE
7	11	f	GE	GE
8	11	f	GE	DE
9	10	mc	GE	GE
10	48	fs	PE	DE
12	22	fs	GE	GE
13	24	mc	PE	PE
14	50	fs	PE	PE
15	7	m	GE	GE
16	120	mc	PE	PE
17	12	fs	GE	PE

f, femmina; fs, femmina sterilizzata; m, maschio; mc, maschio castrato; DE, dermatite eosinofila; GE, granuloma eosinofilo; PE, placca eosinofila.

Al 15° e al 30° giorno dello studio, gli sperimentatori valutavano l'eventuale miglioramento o guarigione dei segni e delle lesioni in ognuna delle quattro regioni del corpo considerate. A scopo analitico, il punteggio rilevato per ogni area veniva dimezzato quando si osservava un miglioramento; azzerato nel caso in cui si verificasse la completa risoluzione clinica; mantenuto inalterato quando non vi fosse variazione rispetto al precedente rilevamento. Si procedeva poi al calcolo del nuovo punteggio complessivo.

Ritenendo che, ai fini di uno studio pilota preliminare, fosse sufficiente valutare la percentuale dei gatti migliorati rispetto agli invariati, il reale grado di miglioramento dei segni e delle lesioni non è stato quantificato.

Biopsie cutanee

Il 1° giorno dello studio, ogni gatto è stato sottoposto, in anestesia generale (ketamina e diazepam), ad una biopsia della cute affetta da lesioni PE o GE, utilizzando un punch di 4, 6 o 8 mm (Stiefel Biopsy Punch, SFM, Wachtersbach, Germania). Il 30° giorno si è proceduto a ripetere la biopsia nel medesimo sito. Ogni biopsia è stata divisa in due con una lama da bisturi (metà è stata usata per questo studio, l'altra metà per altre finalità di ricerca) e fissata in formalina tamponata al 10%. Sebbene nelle biopsie cutanee di bovino e di cane^{30,31} sia noto che la formalina riduce il numero di mastociti, uno studio pubblicato su campioni di cute felina³² ha escluso una tale evenienza, motivo per cui si è deciso di ricorrere ugualmente a questo tipo di fissatore.

Istologia

I campioni sono stati inclusi in paraffina, sezionati a 5 micron e colorati con ematossilina-eosina e blu di toluidina, seguendo le tecniche standard³³. Le sezioni istologiche sono state osservate al microscopio per valutare la presen-

za epidermica di croste, ulcerazioni, ipercheratosi, iperplasia, spongiosi, esocitosi, o discheratosi, e per stabilire l'evenienza a carico del derma di infiltrati cellulari, collagenolisi ed edema.

Conta mastocitaria

Le sezioni istologiche, colorate con blu di toluidina, sono state sottoposte ad analisi morfometrica servendosi di un sistema di analisi computerizzata dell'immagine, Quantimet 400 (Laica Microsystems S.p.A., Milano, Italia). Sebbene sia stato dimostrato che il blu di astra è un colorante migliore per questo tipo di analisi dell'immagine³⁴, nel presente studio abbiamo riscontrato risultati superiori utilizzando il blu di toluidina, forse anche grazie al fatto che la fissazione in formalina migliora la colorazione³⁵. I mastociti sono stati identificati sulla base delle loro caratteristiche morfologiche e in virtù della presenza di granuli metacromatici. Sono stati presi in considerazione rispettivamente 56 e 112 campi consecutivi a 40x (1,2 e 2,4 mm²) a seconda che si trattasse di casi di DE/PE o GE, e per ogni sezione vi si è calcolato il numero medio di mastociti. I campi sono stati scelti in modo da rappresentare tutti gli strati del derma, non considerando, ai fini del conteggio dei mastociti, le aree occupate dalle unità follicolo-sebacee e dalle zone di collagenolisi. I risultati sono stati espressi come numero di cellule positive al blu di toluidina per mm² (dove 1 mm² rappresenta circa 47 campi).

Densitometria

La valutazione densitometrica dei granuli citoplasmatici dei mastociti colorati con blu di toluidina è stata effettuata servendosi del suddetto sistema di analisi dell'immagine, ed applicando una tecnica precedentemente descritta³⁶ e leggermente modificata. Il densitometro veniva calibrato quotidianamente, al fine di assicurare la costanza delle condizioni di misurazione. Le immagini venivano raccolte da una telecamera utilizzando un obiettivo ad immersione ad olio (100x) e trasferite in bianco e nero sullo schermo. Sono stati presi in considerazione 7 campi a random nel derma di ogni sezione, valutando 3 mastociti per ogni campo (per un totale di 21 mastociti per sezione). Ad ogni pixel dell'immagine digitalizzata è stato attribuito un valore proporzionale al livello di segnale del video e compreso tra 0 (nero) e 255 (bianco). Una volta che le immagini in bianco e nero sono state digitalizzate ed invertite, si sono valutati circa 200 pixel per mastocita, calcolandone in seguito il valore medio (\pm DS) (Fig. 1).

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il programma "Statistica per Windows" 5.1, edizione 1997 (Statsoft Inc. Tulsa, OK, USA). Per determinare la differenza nei punteggi al basale (pre-trattamento) dei gatti con PE e GE si è fatto ricorso al test "t di Student". L'analisi della covarianza (ANCOVA) per misure ripetute è stata utilizzata per determinare l'andamento nel tempo della differenza tra i due gruppi. La conta mastocitaria è stata analizzata servendosi del test "t di Student". Il test "Shapiro-Wilk" ha confermato la distribuzione normale dei dati. I valori densitometrici sono stati analizzati con il test "t di Student". Al fine di determinare la correlazione tra andamento clinico e risposta densitometrica, si è utilizzato il "test della correlazione lineare di Pearson".

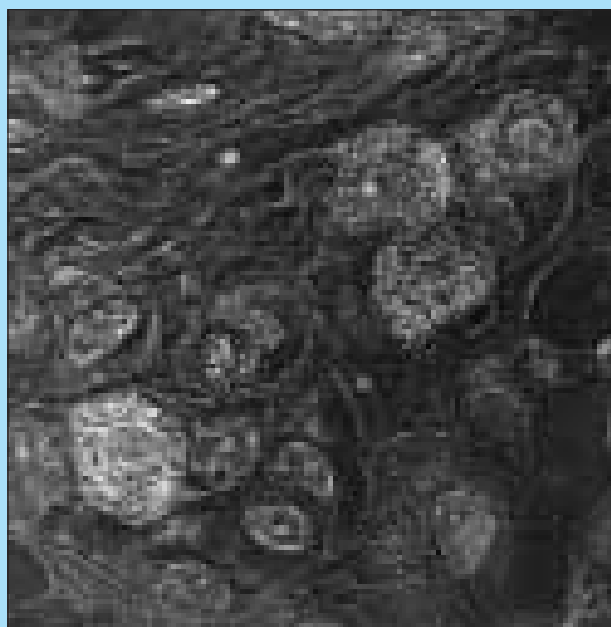


Figura 1A

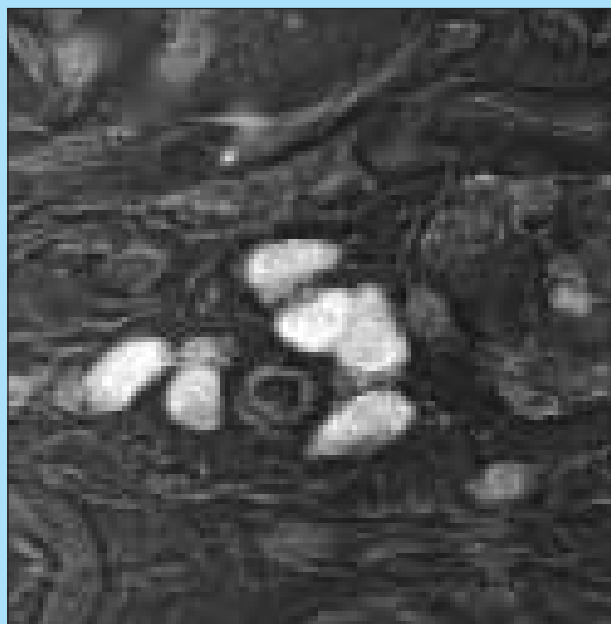


Figura 1B

FIGURA 1 - Caso n° 3: immagine densitometrica dei mastociti, prima (A) e dopo (B) il trattamento con PLR-120 (le immagini in bianco e nero delle sezioni colorate con blu di toluidina sono state invertite).

RISULTATI

Valutazione clinica

Per ciascun animale si è proceduto a calcolare il miglioramento dei segni, il miglioramento delle lesioni (Tab. 2), ed il miglioramento globale (segni + lesioni). Di seguito si riportano i risultati suddivisi per gruppi.

Valutazione dei segni (eritema, prurito e alopecia) in tutti gli animali. Sono stati valutati 14 gatti su 15, perché un caso di granuloma si presentava asintomatico, non manifestando eritema, prurito, o alopecia. 5 dei 14 gatti (35,7%) miglioravano dopo 15 giorni di terapia e 9 (64,3%) dopo 30 giorni.

Valutazione delle lesioni (granuloma o placca) in tutti gli animali. Già dopo 15 giorni di terapia, 8 gatti su 15 (53,5%) mostravano una riduzione dell'estensione e della gravità delle lesioni cutanee; 10 su 15 (66,7%) miglioravano dopo 30 giorni (3 di loro venivano considerati completamente guariti).

Miglioramento globale. Considerati nel loro insieme, i risultati sopra riportati forniscono un valore di miglioramento globale pari a 46,7% (7 gatti su 15) e 66,7% (10 gatti su 15) rispettivamente dopo 15 e 30 giorni di terapia.

Poiché il punteggio al basale rilevato nei gatti con GE era minore rispetto a quello dei gatti con PE (Fig. 2), i due gruppi sono stati confrontati tra di loro, utilizzando il test "t di Student", col risultato di dimostrare una differenza statisticamente significativa ($P < 0,01$) nei punteggi registrati al tempo 0 (T0). Per questo motivo, si è deciso di valutare i due gruppi anche separatamente, in base alla diagnosi clinica (PE vs. GE).

Valutazione dei segni e delle lesioni nei gatti con PE (n=7). Dopo 30 giorni di trattamento, 3 gatti su 7 (42,9%) mostravano un miglioramento sia dei segni che delle lesioni, e altri 3 (42,9%) delle sole lesioni.

Valutazione dei segni e delle lesioni nei gatti con GE (n=8). Dopo 30 giorni di trattamento, 6 gatti su 7 (uno era asintomatico fin dall'inizio), pari all'85,7%, presentavano un miglioramento dei segni, e 7 su 8 (87,5%) mostravano una riduzione delle lesioni. Tre di essi (37,5% di tutti i gatti con GE) venivano considerati completamente guariti.

Confronto del miglioramento dei due gruppi. Considerando la diversità esistente tra i due gruppi in funzione del punteggio registrato al tempo 0, il miglioramento rilevato nei gatti con PE e quello registrato nei gatti con GE, tra loro confrontati tramite analisi della covarianza (ANCOVA), presentava un andamento simile.

Valutazione istologica (Tab. 1)

Sei gatti (1 con GE e 5 con PE) presentavano lesioni istologiche caratterizzate da un denso infiltrato interstiziale superficiale e profondo, costituito da eosinofili e mastociti, con piccoli occasionali foci di collagenolisi e vaste ulcerazioni della sovrastante epidermide. Tali lesioni risultavano simili a quanto precedentemente descritto per la placca eosinofila⁸. Cinque gatti (tutti con GE) mostravano lesioni istologiche granulomatose nel derma profondo, rappresentate da vaste aree di collagenolisi circondate da macrofagi, con scarso infiltrato eosinofilo e mastocitario alla periferia. L'epidermide sovrastante risultava rispettata. Tali lesioni erano identiche a quelle precedentemente riportate per il granuloma eosinofilo⁸. Quattro gatti (2 con GE e 2 con PE) presentavano lesioni istologiche caratterizzate da moderato infiltrato superficiale, da perivascolare ad interstiziale, di mastociti ed eosinofili con epidermide intatta ma iperplastica. Da un punto di vista morfologico, tali lesioni venivano diagnosticate come dermatite eosinofila (DE). In conclusione, l'analisi istologica confermava la diagnosi clinica in 5 degli 8 gatti ascritti al gruppo GE e in 5 dei 7 con PE.

Tabella 2
Punteggi registrati per segni e lesioni, prima durante e dopo il trattamento

N°	Segni			Lesioni			Segni + lesioni (globale)		
	T ₀	T ₁₅	T ₃₀	T ₀	T ₁₅	T ₃₀	T ₀	T ₁₅	T ₃₀
1	24	12	5,5	6	3	1,5	30	15	7
3	41	37	21,5	20	16	12	61	53	33,5
4	62	52	48	36	27	23	98	79	71
5	45	48	48	23	23	23	71	71	71
6	9	6	3	6	0	0	15	6	3
7	12	9	4,5	3	1,5	0,75	15	10,5	5,25
8	15	7,5	3,75	6	3	0	21	10,5	3,75
9	6	6	1,5	9	4,5	2,25	21	10,5	3,75
10	27	16,5	11,25	5	3	1	32	19,5	12,25
12	18	9	4,5	9	4,5	2,25	27	13,5	6,75
13	21	21	21	11	10	9	32	31	30
14	29	14,5	14	18	9	4,5	47	23,5	18,5
15	24	24	24	6	6	6	30	30	30
16	28	28	14	12	12	6	40	40	20
17	0	0	0	6	3	0	6	3	0

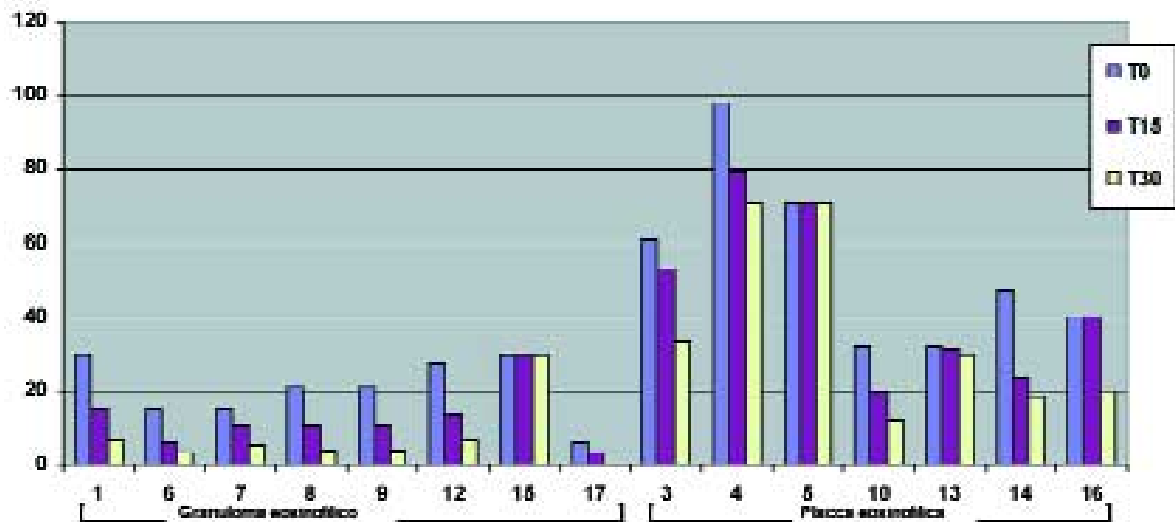


FIGURA 2 - Istogramma dei dati riportati in Tabella 2, con i casi suddivisi in base alla diagnosi clinica.

Conta mastocitaria

Nella Tabella 3 è indicato il numero medio di mastociti/mm² come rilevato nelle biopsie ottenute prima e dopo il trattamento.

L'analisi dei valori morfometrici tramite test "t di Student" e metodo Wilcoxon per campioni appaiati non ha dimostrato una differenza statisticamente significativa tra i valori del pre- e post-trattamento. Se ne conclude che il farmaco in studio non influenza il numero dei mastociti cutanei.

Densitometria

I risultati dell'analisi densitometrica dei mastociti nelle biopsie cutanee prelevate prima e dopo il trattamento sono riportati in Tabella 3. Il confronto dei dati rilevati a T₀ e T₃₀ tramite test "t di Student" ha dimostrato un aumento significativo (P = 0,009) della densità granulare dei mastociti cutanei (Tab. 4 e Figg. 1 e 3). Nessuna differenza, invece, è emersa dal confronto dei dati densitometrici effettuato mediante test "t di Student" tra i gatti con GE e quelli con PE, né prima né dopo il trattamento.

Tabella 3
Numero di mastociti per mm² nelle biopsie di cute lesionata prima e dopo il trattamento

Caso n°	Numero di mastociti / mm ²	
	T ₀	T ₃₀
1	503,0	314,2
3	170,3	454,0
4	218,5	544,2
5	331,5	183,0
6	349,8	198,4
7	182,5	294,0
8	367,7	269,0
9	304,1	345,2
10	454,6	112,0
12	508,7	519,8
13	441,6	465,4
14	314,1	282,7
15	159,6	459,5
16	640,7	265,9
17	1013,5	1483,0
Media	397,35	412,69
DS	219,90	322,66

P (t di Student) 0,81 = non significativo

Correlazione tra risposta clinica e risultati densitometrici

Nei gatti con PE, l'analisi della regressione lineare ha dimostrato l'esistenza di una correlazione statisticamente significativa tra il miglioramento clinico e la risposta densitometrica ($r = 0,74370$, $P = 0,05$), cosa che invece non è stata rilevata nei gatti con GE o nel campione complessivo.

Tollerabilità

Per tutti i casi trattati, la tollerabilità del prodotto è stata giudicata da "buona" ad "eccellente", sia dal proprietario sia dagli sperimentatori.

DISCUSSIONE

La placca eosinofila ed il granuloma collagenolitico possono rappresentare segni clinici di sottostanti dermatopatie allergiche, come l'allergia al morso di pulce, altre ipersensibilità a punture di insetto, l'allergia alimentare o la dermatite atopica^{1,3,4,6}. Il primo approccio nei confronti di un caso di PE o GE dovrebbe essere indirizzato alla ricerca della causa sottostante, ricorrendo agli anti-infiammatori come terapie complementari, e non come sostituti di mancata diagnosi. Ciononostante, possono esistere situazioni in cui il Veterinario deve confrontarsi con gatti che rifiutano la dieta ad eliminazione, non migliorano in seguito al regime dietetico prescritto, presentano test cutanei negativi o, ancora, non rispondono alle terapie iposensibilizzanti. Tali soggetti sono spesso destinati a sottoporsi per tutta la vita a trattamenti corticosteroidi, continui o intermittenti, di cui possono subire gli effetti collaterali. Sebbene nel presente studio siano stati inclusi gatti esenti da allergia al morso di pulci o da altre parassitosi cutanee, non si è di proposito valutata la presenza di altre malattie

allergiche (es. atopia, allergia alimentare), perché si è ritenuto che il campione così selezionato fornisse una buona rappresentazione della reale difficoltà clinica che tali dermatopatie comportano. Scopo dello studio era, infatti, quello di stabilire la validità del PLR 120 come eventuale alternativa all'uso dei corticosteroidi, in quei casi di PE e GE in cui non sia possibile identificare e/o controllare la causa sottostante. Il PLR 120 è stato scelto in virtù del suo meccanismo d'azione, capace di migliorare le condizioni infiammatorie, attraverso una regolazione negativa esercitata sulla degranulazione mastocitaria.

Sebbene si tratti di risultati di uno studio pilota non controllato - che per questo vanno considerati preliminari - dopo 1 mese di trattamento, il 64,3% degli animali mostrava un miglioramento dei sintomi (prurito, eritema ed alopecia) e il 66,7% presentava una riduzione della gravità/estensione delle proprie lesioni cutanee. Si tratta di risultati incoraggianti, sebbene la percentuale di guarigione si limiti al 6% (animale 17). È senz'altro necessario condurre uno studio controllato di maggiore durata, al fine di determinare se prolungando l'uso del farmaco sia possibile ottenere risultati più soddisfacenti in termini di percentuali di remissione clinica della malattia. C'è, inoltre, da considerare l'ipotesi che alcuni animali potrebbero essere migliorati in virtù del trattamento antiparassitario, anziché in funzione dell'efficacia del farmaco. A tale proposito, però, bisogna sottolineare che, nella massima parte dei casi, il solo trattamento antiparassitario non risolve le condizioni di PE e di GE, a causa della notevole infiammazione cutanea presente, motivo per cui generalmente è necessario ricorrere a terapie concomitanti.

In ogni caso, i risultati del presente studio sono paragonabili, e in qualche caso migliori, di quelli finora ottenuti con altri prodotti utilizzati in dermatopatie allergiche del gatto, come la dermatite miliare e il prurito. Con gli EFA (acidi grassi essenziali), ad esempio, si riportano risposte eccellenti nel 57-75% dei casi, per trattamenti della durata compresa tra le 2 e le 18 settimane³⁸⁻⁴¹. Con gli antistaminici, le percentuali di gatti migliorati oscillano tra il 50 e il 73%^{42,43}. Va in ogni caso tenuto presente che finora non sono stati ancora pubblicati studi specifici sull'uso dei suddetti farmaci nella PE o nel GE, malattie in cui i risultati potrebbero essere diversi.

Tra loro associati, antistaminici ed EFA hanno fornito risultati migliori rispetto al loro uso come terapie singole^{44,45}. È lecito supporre - sebbene non ancora indagato - che l'utilizzo combinato di PLR 120 con farmaci antipruriginosi di natura non steroidea potrebbe analogamente innalzare le percentuali di successo terapeutico.

Dai risultati ottenuti nel presente studio, sembra che i gatti con GE rispondano meglio al trattamento rispetto a quelli con PE. Ciò è forse riconducibile a differenti meccanismi patogenetici che sostengono i due tipi di lesione, al fatto che la PE è spesso complicata da infezioni secondarie (che potrebbero compromettere la guarigione e che non sono state oggetto di trattamento in questo studio), oppure all'evenienza che il GE può a volte risolversi spontaneamente^{3,6}. Un'altra possibilità è che le lesioni più lievi rispondano meglio al trattamento rispetto a quelle più gravi, che potrebbero richiedere più alti dosaggi del farmaco. In effetti, i gatti con GE presentavano un punteggio basale significativamente minore rispetto a quelli con PE.

Tabella 4
Dati densitometrici prima e dopo il trattamento dei mastociti colorati con blu di toluidina

Caso n°	Media basale (T0)	DS basale (T0)	Media finale (T30)	DS finale (T30)	Conteggi validi
1	67540,00	12576,83	103565,2	43690,29	21
3	69287,23	17738,15	79397,1	20282,70	21
4	73102,05	18663,66	104514,3	26118,83	21
5	89704,55	18572,97	94274,1	24659,65	20
6	62498,76	13633,22	73047,1	10089,40	21
7	64608,24	16952,60	73795,7	19603,63	21
8	84981,80	32780,71	69198,5	18135,27	20
9	75554,62	17892,78	86321,8	19661,52	21
10	58257,29	10862,72	63356,5	22512,58	21
12	62330,95	18289,67	55755,7	13606,97	21
13	71007,14	15792,77	71253,9	16193,18	21
14	58684,95	17378,43	78195,4	9325,46	21
15	72403,19	12965,56	77086,2	19831,12	21
16	80970,91	12641,58	97573,2	14440,14	21
17	66335,09	11567,36	99648,3	25868,73	21
Total	70484,45	9284,77	81798,87*	15126,19	313

* $P = 0.009$

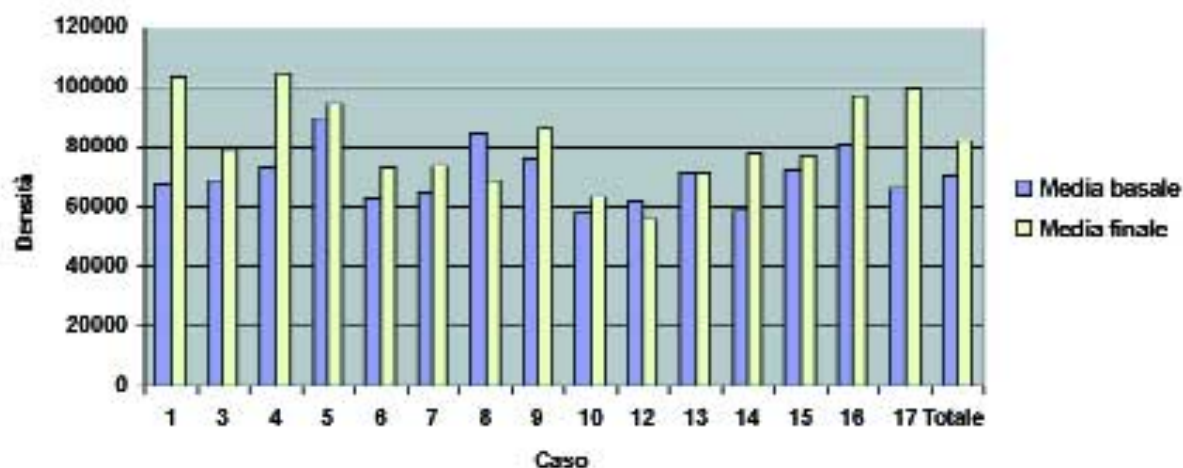


FIGURA 3 - Istogramma dei dati densitometrici rilevati prima e dopo il trattamento nei mastociti colorati con blu di toluidina (dati di Tab. 4).

Deve essere comunque sottolineato che, in realtà, una volta analizzati i dati con l'analisi della covarianza (ANCOVA) tenendo conto delle differenze nel punteggio iniziale, i gatti con GE mostravano un trend di miglioramento del tutto simile a quelli con PE. La maggior parte dei gatti con GE (punteggi di arruolamento più bassi) miglioravano già dopo 15 giorni di trattamento, mentre quelli con PE (punteggi di arruolamento più elevati) presentavano tempi di risposta più lunghi. Proponiamo che, innanzitutto, servano almeno 2-4 settimane di trattamento per osservare un miglioramento e, in secondo luogo, che i casi più gravi necessitino di una terapia di maggior durata. In-

fine, riteniamo che, analogamente a quanto riportato per altri farmaci antipruriginosi di natura non steroidea (es. EFA), l'effetto del PLR 120 potrebbe essere dose dipendente, nel qual caso dosaggi più elevati avrebbero potuto fornire risultati migliori.

Nel presente studio, i rilievi istologici confermavano la diagnosi clinica in 10 gatti su 15, mentre in 4 casi (2 GE e 2 PE) l'analisi istologica evidenziava solo una dermatite eosinofila (DE). Nei lavori finora pubblicati, la diagnosi clinica di PE e GE viene quasi sempre associata alle tipiche lesioni istologiche^{7,8,46,47}. L'aver rilevato lesioni di DE potrebbe dipendere dal fatto che le biopsie venivano divi-

se in due prima di procedere alla fissazione, motivo per cui, in alcuni casi, la metà analizzata poteva in realtà contenere solo la regione periferica della lesione e non quella centrale maggiormente caratteristica. In alternativa, è possibile che la sezione istologica - che rammentiamo fornisce indicazioni statiche di un processo patologico complesso e in evoluzione - abbia "fotografato" uno stadio non diagnostico della malattia, rappresentativo di un momento troppo iniziale della lesione, ovvero troppo vicino alla sua risoluzione. È, infine, legittimo ipotizzare che, in alcuni animali, la tipica manifestazione clinica della PE o del GE potrebbe non essere sempre associata ad un altrettanto tipico quadro istologico.

Nel presente studio, il numero medio di mastociti rilevato nelle lesioni cutanee (tra 160 e 1013 cellule/mm²) è superiore a quello riportato da alcuni Autori nella cute feline sana^{10,32,48,49}. Si tratta di un risultato atteso, perché in effetti esistono osservazioni sull'aumento del numero di mastociti in altre dermatopatie infiammatorie del gatto⁴⁸ (Greek, J. S. dati non pubblicati: Feline pemphigus foliaceus: a retrospective of 23 cases. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Academy of Veterinary Dermatology*. San Diego, 1993: 27-8). In ogni caso, in assenza di dati specifici sulla conta mastocitaria nella cute di gatti affetti da PE e GE, non ci è possibile paragonare i dati ottenuti con altri già pubblicati.

Il trattamento con PLR 120 si è dimostrato non influenzare il numero di mastociti cutanei. A differenza dei glucocorticoidi - che riducono le popolazioni di mastociti tissutali⁵⁰⁻⁵², inibendo la sintesi dell'SCF (*Stem Cell Factor*)^{53,54} - il farmaco, infatti, non esercita alcun effetto sulla vitalità cellulare. Viceversa, i glucocorticoidi tramite il suddetto meccanismo alterano l'equilibrio della risposta infiammatoria, cosa che può rivelarsi svantaggiosa, perché comporta la riduzione dell'iniziale fase di "wheal and flare"⁵⁵ (gonfiore e arrossamento) e l'aumento delle risposte ritardate⁵⁶.

Viceversa il PLR 120, agendo come modulatore della risposta mastocitaria senza compromettere la vitalità di queste cellule, funziona da anti-infiammatorio capace di riequilibrare l'omeostasi cutanea¹⁶.

Nei ratti e nei topi, l'analisi della degranulazione mastocitaria viene descritta come valido mezzo per stabilire l'effettiva attività di un farmaco - compreso quello utilizzato nel presente studio pilota²⁵ - sul comportamento di queste cellule^{57,58}. A tale scopo abbiamo utilizzato un sistema di analisi computerizzata dell'immagine (Quantimet 400, Leica). A conoscenza degli Autori, questo è il primo studio che applica l'analisi densitometrica dei granuli mastocitari al gatto. Il metodo si è dimostrato utile ed attendibile. Il trattamento per 30 giorni con PLR 120 ha indotto un aumento significativo dei valori densitometrici dei mastociti cutanei. Il risultato suggerisce che il PLR 120 è effettivamente in grado di diminuire la degranulazione mastocitaria ed aumentare la concentrazione intracellulare dei granuli. Sulla base delle conoscenze relative al meccanismo d'azione del farmaco (meccanismo ALIA^{21,22}, che funziona per via recettoriale in modo antagonista nei confronti dell'iperattività mastocitaria), risulta meno probabile l'ipotesi secondo cui il PLR 120 possa aver indotto un aumento nella produzione dei granuli mastocitari. I mastociti esprimono sulla propria membrana cellulare il recettore CB2 per i cannabinoidi, del quale la palmitoiletanolamide rappresen-

ta il ligando endogeno. Prodotta dai tessuti in risposta a un danno o ad una condizione infiammatoria, la palmitoiletanolamide si lega ai recettori CB2, esercitando così, un effetto di regolazione negativa nei confronti della degranulazione mastocitaria. Il PLR 120, analogo sintetico della palmitoiletanolamide, si è dimostrato in grado di limitare la reattività infiammatoria sia *in vivo* che *in vitro*^{25,26,59-62}. In particolare, il PLR 120 è capace di ridurre, in maniera dose-dipendente, l'iperalgia e l'extravasazione causate dalla stimolazione mastocitaria, sia di natura immunogenica (anafilassi cutanea passiva) che neurogenica (iniezione sottocutanea di sostanza P)²⁵. Nel topo, inoltre, l'applicazione locale di PLR 120 si è dimostrata attiva nel ridurre la classica risposta comportamentale di leccamento indotta dalla formalina⁵⁹ e di diminuire la sensibilizzazione nervosa periferica associata all'infiammazione cutanea^{60,61}. Attraverso la sua capacità di controllare la degranulazione mastocitaria via CB2, il PLR 120 è dunque in grado di ridurre la produzione di mediatori (come NGF, istamina e serotonina) responsabili dell'abbassamento della soglia di eccitabilità delle fibre nervose di tipo C, che sono coinvolte nella trasmissione del dolore e del prurito^{63,64}.

Nei gatti con PE, il miglioramento clinico risultava direttamente proporzionale all'aumento di densitometria mastocitaria, con una correlazione altamente significativa, nonostante la scarsità dei casi (sette gatti). Si tratta di un risultato atteso, dal momento che la PE (assai più del GE) viene considerata epifenomeno di allergie feline⁶, complicato dal continuo leccamento e dalle sovrainfezioni batteriche. Dal momento che il ruolo dei mastociti nelle allergie è considerato determinante per lo sviluppo delle tipiche reazioni ad esse associate^{13-15,65}, la significativa correlazione tra miglioramento clinico e dato densitometrico non fa che confermare la validità, in queste dermatopatie, di un farmaco antinfiammatorio specificatamente capace di modulare l'attività mastocitaria. Nel caso dei gatti affetti da GE, la mancanza di correlazione significativa tra punteggio clinico e risultato densitometrico potrebbe derivare dalla scarsità dei casi, dall'elevata variabilità inter-individuale, ovvero dal fatto che il punteggio clinico iniziale riscontrato in questi soggetti era minore di quello registrato nei gatti con diagnosi di PE.

Nei casi di PE e GE, soprattutto se di natura ricorrente, il trattamento prevede generalmente tempi lunghi di terapia o addirittura la necessità di ricorrere a terapie di mantenimento, motivi per cui la tollerabilità del farmaco utilizzato diviene un aspetto di estrema importanza. Il PLR 120 si è dimostrato gradevole al gusto e privo di qualsivoglia effetto collaterale. La buona tollerabilità dimostrata rappresenta indubbiamente un vantaggio rispetto ad altri farmaci utilizzati per queste dermatopatie, che invece tendono a manifestare effetti collaterali, frequenti - come nel caso dei corticosteroidi usati a lungo termine⁶⁶ e delle terapie ormonali (es. megestrolo acetato)⁶⁷ - o più rari - come si è registrato per gli antistaminici⁶⁸ e gli EFA^{69,70}.

In conclusione, questo studio pilota ha dimostrato che il PLR 120 può rivelarsi utile nel trattamento dei gatti con PE o GE, potendo rappresentare una valida alternativa alle terapie corticosteroidi a lungo termine. Per confermare i risultati e determinare la dose più efficace sarà necessario condurre uno studio in doppio cieco controllato *versus* placebo.

Ringraziamenti

Lo studio è stato gentilmente sponsorizzato dell'ESVD (European Society of Veterinary Dermatology) e da Innovet, Milano, Italia.

Gli Autori desiderano ringraziare l'ESVD e Innovet per i finanziamenti ricevuti, il dottor Salvatore Bellinva per l'aiuto fornito nel disegnare il protocollo e valutare i risultati, il dottor Carlo Baggio per l'analisi statistica, le dottoresse Federica della Valle e Alda Mito per la collaborazione offerta nell'analisi dei risultati e nel suggerimento di alcuni punti della discussione. Desideriamo, infine, ringraziare la signora Betty Johnston ed il signor John Hemingway per la revisione del manoscritto.

Parole chiave

ALIAmide, gatti, granuloma eosinofilo, placca eosinofila, mastociti, Palmidrol, PLR 120, dermatopatie.

Key words

ALIAmides, cats, eosinophilic granuloma, eosinophilic plaque, mas cells, Palmidrol, PLR 120, skin disease.

Bibliografia

- McDougal B.J. Allergy testing and hyposensitization for three common feline dermatoses. *Modern Veterinary Practice* 1986; 67: 629-33.
- Chalmers S., Medleau L. Feline allergic dermatoses: diagnosis and treatment. *Veterinary Medicine* 1989; 4: 399-405.
- Power H.T., Ihrke P.J. Selected feline eosinophilic skin diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1995; 25: 833-50.
- Mason K., Evans A.G. Mosquito bite caused eosinophilic dermatitis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1991; 198: 2086-8.
- Nagata M., Ishida T. Cutaneous reactivity to mosquito bites and its antigens in cats. *Veterinary Dermatology* 1997; 8: 19-26.
- Rosenkrantz W.S. Feline eosinophilic granuloma complex. In: Griffin C.E., Kwochka K.W., MacDonald J.M., eds. *Current Veterinary Dermatology*. 1st edn. St. Louis: Mosby Year Book, 1993: 319-24.
- Scott D.W. Observations on the eosinophilic granuloma complex of cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1975; 11: 261-70.
- Yager J. A., Wilcock B.P. *Color Atlas and Text of Surgical Pathology of the Dog and Cat*. London: Wolfe Publishing - Mosby Year Book Europe, 1994: 146-9.
- Scott, D. W. Epidermal mast cells in the cat. *Veterinary Dermatology* 1990; 1: 65-9.
- Scott D.W. Feline dermatology 1900-1978: a monograph. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1980; 16: 331-459.
- Gordon J.R., Burd P.R., Galli S.J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunology Today* 1990; 11: 458-64.
- Galli S.J. New concepts about the mast cell. *New England Journal of Medicine*. 1993; 328: 257-65.
- Galli S.J., Costa J.J. Mast cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation. *Allergy* 1995; 50: 851-62.
- Charlesworth E.N. The role of basophils and mast cells in acute and late reactions in the skin. *Allergy* 1997; 52 (Suppl. 34): 31-43.
- Costa J.J., Weller P.F., Galli J. The cells of the allergic response. Mast cells, basophils and eosinophils. *Journal of the American Medical Association* 1997; 278: 1815-22.
- Lewis R.A., Austen F.K. Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. *Nature* 1981; 293: 103-8.
- Yong L.C.J. The mast cell: origin, morphology, distribution and function. *Experimental and Toxicologic Pathology* 1997; 49: 409-24.
- Malaviya R., Abraham S.N. Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. *Journal of Molecular Medicine* 1998; 76: 617-23.
- Holgate S.T. The mast cell and its function in allergic diseases. *Clinical and Experimental Allergy* 1991; 21 (Suppl. 3): 11-16.
- Rothe M.J., Nowak M., Kerdel F.A. The mast cells in health and disease. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1990; 23: 615-24.
- Aloe L., Leon A., Levi-Montalcini R.A. proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents and Actions* 1992; 39 (Special Conference Issue): C145-7.
- Levi-Montalcini R., Skaper S.D., Dal Toso R., Petrelli L., Leon A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokin. *Trends in Neurosciences* 1996; 19: 514-20.
- Epps, D. E., Grupp, I., Grupp, G., Schwartz, A. Ionotropic effects and protection of guinea pig myocardium against hypoxic damage by N-acylethanolamine, a lipid amide. *Federation Proceedings* 1982; 41: 1039.
- Schmid H.H.O., Schmid P.C., Natarajan V. The N-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signalling. *Chemistry and Physics and Lipids* 1996; 80: 133-42.
- Mazzari S., Canella R., Petrelli L., Marcolongo G., Leon A. N-(2-hydroxyethyl) hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *European Journal of Pharmacology* 1996; 300: 227-36.
- Facci L., Dal Toso R., Romanello S., Buniani A., Skaper S.D., Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995; 92: 3376-80.
- Fredriksson T., Pettersson U. Severe psoriasis - Oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 1978; 157: 238-44.
- Marks R., Barton S.P., Shuttleworth D., Finlay A.Y. Assessment of disease progress in psoriasis. *Archives of Dermatology* 1989; 125: 235-40.
- Feldman S. R., Fleischer A.B., Reboussin D.M. et al. The self-administered psoriasis area and severity index is valid and reliable. *Journal of Investigative Dermatology* 1996; 106: 183-6.
- Kube P., Audigé L., Kuther K., Welle M. Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochemistry and Cell Biology* 1998; 110: 129-35.
- Hunt T.C., Campbell A.M., Robinson C., Holgate S.T. Structural and secretory characteristics of bovine lung and skin mast cells: evidence for the existence of heterogeneity. *Clinical and Experimental Allergy* 1991; 21: 173-82.
- Foster A.P. A study of the number and distribution of cutaneous mast cells in cats with disease not affecting the skin. *Veterinary Dermatology* 1994; 5: 17-20.
- Bancroft J.D., Stevens A., eds. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1977: 16-64.
- Bianchi S., Mugnai L. Mast cell fixation and staining in image analysis. *European Journal of Basic and Applied Histochemistry* 1991; 35: 161-74.
- Strobel S., Miller H.R.P., Ferguson A. Human intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. *Journal of Clinical Pathology* 1981; 34: 851-8.
- Poli A., Pistello M., Carli M.A., Abramo F., Mancuso G., Nicoletti E. et al. Tumor necrosis factor- α and virus expression in the central nervous system of cats infected with feline immunodeficiency virus. *Journal of Neurovirology* 1999; 5: 465-73.
- Becker A.B., Chung K.F., McDonald D.M., Lazzarus S.C., Frick O.L., Gold W.M. Cutaneous mast cell heterogeneity: response to antigen in atopic dogs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1986; 78: 937-42.
- Miller W.H., Scott D.W., Wellington J.R. Efficacy of DVM derm caps liquid in the management of allergic and inflammatory dermatoses of the cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1993; 29: 37-40.
- Harvey R.G. Management of feline miliary dermatitis by supplementing the diet with essential fatty acids. *Veterinary Record* 1991; 128: 326-9.
- Harvey R.G. Effect of varying proportions of evening primrose oil and fish oil on cats with crusting dermatosis (miliary dermatitis). *Veterinary Record* 1993; 133: 208-11.
- Harvey R.G. A comparison of evening primrose oil and sunflower oil for the management of papulocrustous dermatitis in cats. *Veterinary Record* 1993; 133: 571-3.
- Miller W.H., Scott D.W. 1990. Efficacy of chlorpheniramine maleate for management of pruritus in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197: 67-70.
- Miller W.H., Scott D.W. Clemastine fumarate as an antipruritic agent in pruritic cats: Results of an open clinical trial. *Canadian Veterinary Journal* 1994; 35: 502-4.
- Paterson S. Additive benefits of EFA in dogs with atopic dermatitis after partial response to antihistamine therapy. *Journal of Small Animal Practice* 1995; 36: 389-94.
- Miller W.H., Scott D.W. Medical management of chronic pruritus. *The Compendium on Continuing Education* 1994; 16: 449-62.

46. Rosenkrantz W.S. Eosinophilic Granuloma Complex (Confusion). *Veterinary Focus* 1989; 1:29-32.
47. Song M.D. Diagnosing and treating feline eosinophilic granuloma complex. *Veterinary Medicine* 1994; 89: 1141-45.
48. McCusker H.B. Histamine and mast cells in the normal skin and eczematous skin in the cat. In: Rook A.J., Walton G.S., eds. *Comparative Physiology and Pathology of the Skin*. Philadelphia: F.A. Davis & Co., 1965: 427-34.
49. Beadleston D.L., Rossje P.J., Goldschmidt M.H. Chymase and tryptase staining of normal feline skin and of feline cutaneous mast cell tumors, *Veterinary Allergy and Clinical Immunology* 1997; 5 (2): 54-8.
50. Lavker R.M., Schechter N.M. Cutaneous mast cell depletion results from topical corticosteroids usage. *Journal of Immunology* 1985; 135: 2368-73.
51. Finotto S., Mekori Y.A., Metcalfe D.D. Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-kit ligand, stem cell factor, by resident cells. In vitro and in vivo evidence in murine systems. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99: 1721-8.
52. Goldsmith P., McGarity B., Walls A.F., Church M.K., Milward Sadler G.H., Robertson G.A. Corticosteroid treatment reduces mast cell numbers in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 1990; 35: 1409-13.
53. Kassel O., Schmidlin F., Duvernelle C., de Blay F., Frossard N. Up- and down-regulation by glucocorticoids of the constitutive expression of the mast cell growth factor stem cell factor by human lung fibroblasts in culture. *Molecular Pharmacology* 1998; 54: 1073-9.
54. Sakai H., Toyota N., Ito F., Takahashi H., Hashimoto Y., Iizuka H. Glucocorticoids inhibit proliferation and adhesion of the IL-3 dependent mast cell line, MC/9, to NIH/3T3 fibroblasts, with an accompanying decrease in IL-3 receptor expression. *Archives of Dermatological Research* 1999; 291: 224-31.
55. Pipkorn U., Hammarlund A., Enerback L. Prolonged treatment with topical glucocorticoids results in an inhibition of the allergen-induced wheal and flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. *Clinical and Experimental Allergy* 1989; 19: 19-25.
56. Katayama I., Igawa K., Minatohara K., Nishioka K. Topical glucocorticoid augments IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis in Balb/C mice and mast cell deficient WBB6F1 v/v mice. *Clinical and Experimental Allergy* 1997; 27: 1477-83.
57. Paus R., Maurer M., Slominski A., Czarnetzki B. M. Mast cell involvement in murine hair growth. *Developmental Biology* 1994; 163: 230-40.
58. Bendele A., Colloton M., Vrkljan M., Morris J., Sabados K. Cutaneous mast cell degranulation in rats receiving injections of recombinant interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1ra) and/or its vehicle: possible clinical implications. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1995; 125:493-500.
59. Nakamura A., Shiomi H. Recent advances in neuropharmacology of cutaneous nociceptors. *Japanese Journal of Pharmacology* 1999; 79: 427-31.
60. Calignano A., La Rana G., Giuffrida A., Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998; 394: 277-81.
61. Jaggar S.I., Hasnie F.S., Sellaturay S., Rice A.S.C. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 1998; 76: 189-99.
62. Skaper, S.D., Buriani A., Dal Toso R., et al. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 3984-9.
63. Torebjork H.E., Ochoa J.L. Pain and itch from C-fiber stimulation. *Society for Neuroscience* 1981; 7: 228.
64. Handwerker H.O., Forster C., Kirchhoff C. Discharge patterns of human C-fibers induced by itching and burning stimuli. *Journal of Neurophysiology* 1991; 66: 307-15.
65. Liu F.T. Truly MASTerful cells: mast cells command B cell IgE synthesis. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99: 1465-6.
66. Behrend E.N., Kemppainen R.J. Glucocorticoid therapy. *Pharmacology, indications and complications. Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 1997; 27: 187-213.
67. Carlotti D.N., Bensignor E. Les dermatoses crouteuses du chat. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 1995; 30: 249-61.
68. Chalmers S.A., Medleau L. Feline atopic dermatitis: its diagnosis and treatment. *Veterinary Medicine* 1994; 89: 342-52.
69. Hall J.A. Potential adverse effects of long-term consumption of (n-3) fatty acids. *Compendium on Continuing Education*, 1996; 18: 879-95.
70. Landymore R.W., Cameron C.A., Sheridan B.L., McCanley M.A. Reduction of intimal hyperplasia in canine autologous vein grafts with cod liver oil and dipyridamole. *Canadian Journal of Surgery* 1986; 29: 357-8.