

Expresión del antígeno linfocitario cutáneo en las placas alopecicas de pacientes con alopecia areata

Expression of Cutaneous Lymphocyte Associated Antigen in the Patches of Patients with Alopecia Areata

Laura Lacueva, Gisela Hausmann, Juan Ferrando

Servicio de Dermatología. Hospital Clínic. Universidad de Barcelona. España

Correspondencia:

Dr. Juan Ferrando

Servicio de Dermatología. Hospital Clínic. Universidad de Barcelona

Villarroel 170. 08036 Barcelona. España.

e-mail: ferrando@medicina.ub.es

Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido el análisis cualitativo y cuantitativo del infiltrado inflamatorio presente en las placas alopecicas de cuero cabelludo de pacientes con alopecia areata (AA), a nivel intraepidérmico, intrafolicular, perifolicular y perivascular, así como la expresión del antígeno linfocitario cutáneo "cutaneous lymphocyte antigen" (CLA) por las células de ese infiltrado, en esas mismas áreas.

Material y métodos: Para ello, hemos contado con 20 muestras de cuero cabelludo(cc): 12 obtenidas de la periferia de placas alopecicas de pacientes con diferentes formas clínicas de AA (en los casos de AA total y AA universal se tomaron de la región occipital) y 8 de individuos control aparentemente sanos.

Se realizó estudio inmunohistoquímico con los anticuerpos monoclonales[AcMo) anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68 y HECA-452 (anti-CLA) según la técnica de la biotina-estreptoavidina-peroxidasa.

Resultados: Los resultados mostraron que la mayor celularidad correspondió a las placas de AA, a las áreas perifolicular y perivascular, donde observamos un 34% y 36% de las células del infiltrado respectivamente. El fenotipo predominante fue de linfocitos T cooperadores (CD4), que suponían el 41% del total de células. La relación linfocitos T CD4/CD8 fue 5,2. En cuanto a las secciones de cc sano, el predominio del infiltrado se observó a nivel intraepidérmico (51%). El 76% de ese infiltrado eran células de Langerhans y el cociente CD4/CD8 fue de 1,47.

Respecto a la expresión del CLA, el 29% de las células en las muestras de AA se tiñeron con HECA-452; es decir, fue casi seis veces superior a la expresión del CLA en las secciones de cc sano, en las que solo el 5% de las células fueron HECA-452 positivas.

Conclusión: Los datos obtenidos dan soporte a la hipótesis de que el CLA probablemente está implicado en la etiopatogenia de la AA, posiblemente favoreciendo los movimientos migratorios de las células inmunocompetentes de la piel, secundarios a la manifestación autoantígeno.

(Lacueva L, Hausmann G, Ferrando J. Expresión del antígeno linfocitario cutáneo en las placas alopecicas de pacientes con alopecia areata. *Med Cutan Iber Lat Am* 2003; 31(3): 161-172)

Palabras clave: alopecia areata, infiltrado inflamatorio, antígeno linfocitario cutáneo.

Summary

The cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) is a glycoproteic adhesion molecule of the cellular surface whose epitopes (sialyl Lewis -a- and sialyl Lewis -x- carbohydrates) are recognized by the monoclonal antibody HECA-452. CLA is the ligand of the endothelial E-selectin and an appropriate marker of memory cutaneous T cells.

We have studied immunophenotypic characterisation and specially the expression of the CLA in the inflammatory infiltrates of the initial patches of alopecia areata (AA) at intraepidermic, intrafolicular, perifolicular and perivascular level.

Material and Methods: *Twenty biopsies of the scalp corresponding to 12 patients affected of AA and 8 healthy controls were performed. The biopsies of the patients were performed in the margin of an initial patch, except for the patients with AA totalis and AA universalis that were performed in the occipital area.*

Immunohistochemical studies were performed with monoclonal antibodies anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68 and HECA-452 (anti-CLA), following the biotin-streptoavidin-peroxidasa method.

Results: *The highest cellularity were found in the biopsies of the patches of AA, specially in the perifolicular and the perivascular areas (34% and 36%, respectively]. The predominant phenotype were T-helper lymphocytes (CD4)(41% of total cellularity]. The CD4/CD8 ratio was 5.2. In the healthy controls the highest cellularity was at the intraepidermic site. The predominant phenotype were Langerhans cells (CD1a)(76%) and the CD4/CD8 ratio was of 1.47.*

The CLA expression was 29.34% in the biopsies of AA (HECA-452 positive cells), while in the biopsies of healthy controls was 5%.

Comment: *These data support the hypothesis that the CLA play a role in the etiopathogenesis of AA. CLA should help the migration of the immunocompetent cells of the skin induced by the impact of the autoantigen in the hair follicle.*

Key words: alopecia areata, cutaneous lymphocyte associated antigen, inflammatory infiltrated.

La alopecia areata (AA) es una enfermedad que afecta al folículo piloso de un modo potencialmente reversible, occasionando una o varias placas alopecicas e incluso alopecia universal.

La etiología de la AA es desconocida; sin embargo, existen argumentos para considerarla como un proceso de naturaleza autoinmune, como son:

- 1) La asociación a otras enfermedades de naturaleza autoinmune, como: atopia[1,2], diabetes mellitus tipo I[3], tiroiditis de Hashimoto[4,5], artritis reumatoide, anemia perniciosa[6], enfermedad de Addison, gastritis atrófica, miastenia gravis[7], vitíligo[8,9], anemia hemolítica autoinmune[10] o lupus eritematoso discoide[11].
- 2) Se beneficia de tratamientos inmunomoduladores-inmunosupresores[12,13,14,15,16,17,18].
- 3) La predisposición genética. Puede observarse una incidencia valorable de AA en gemelos univitelinos[19,20], en pacientes con síndrome de Down[21] y en familiares de pacientes con AA[1,22,23]. Además, existe una asociación entre antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y la AA[24,25,26,27,28,29].
- 4) La observación de fenómenos inmunológicos generales como autoanticuerpos[AuAc] circulantes inespecíficos y órgano-específicos contra estructuras foliculares y no foliculares. Tobin[30,31] encontró mediante inmunofluorescencia indirecta, hasta en un 90% de los pacientes examinados, la presencia de AuAc frente antígenos de la vaina epitelial externa y menos frecuentemente de la vaina interna, matriz y tallo piloso. Por otro lado, Mc Elwee[32] halló AuAc frente a diferentes estructuras epidérmicas del folículo piloso en animales de experimentación. También Randall[33] cita una reacción entre el suero de pacientes con AA y diferentes estructuras foliculares, así como también con el estrato basal de la epidermis. No es menos significativo el hecho de que en un número variable de pacientes con AA se encuentran AuAc antitiroideos[34], anticélula parietal gástrica[35], antiadrenales y anti-músculo liso[35,36]. Según algunos autores, la frecuencia del hallazgo de estos AuAc es de 2-5 veces superior en pacientes con AA[7] que en individuos sanos. La coexistencia de AuAc específicos con otros autoanticuerpos, propia también de otras enfermedades autoinmunes, se interpreta como una pérdida de la autotolerancia inmunológica.
- 5) El hallazgo de fenómenos inmunológicos "in situ". Como por ejemplo el infiltrado inflamatorio perifolicular y/o perivasculares de linfocitos T, macrófagos y células de Langerhans; el papel patogénico que parecen jugar los linfocitos T[37]; el depósito de inmunocomplejos y complemento (c) perifoliculares[18,38] cuestionado por Igarashi[39,40] que observó también depósitos de C en folículos pilosos aparentemente sanos; y el perfil de expresión de moléculas de adhesión, similar a otras enfermedades autoinmunes (ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1, LFA-1)[41,42].

Moléculas de adhesión y alopecia areata

Entre las diversas moléculas de adhesión descritas en relación a enfermedades autoinmunes, hay una que parece estar implicada en diversos procesos inflamatorios cutáneos y que es el objeto esencial de este trabajo: el antígeno linfocitario cutáneo *cutaneous lymphocyte antigen* (CLA).

El CLA es una molécula de adhesión glicoproteica de la superficie celular, de la cual el carbohidrato sialyl Lewis (a) y sialyl Lewis (x) son los posibles epítopos o determinantes antigenicos reconocibles por el Ac Mo HECA-452[43].

La expresión del CLA se realiza de un modo tejido-específico, fundamentalmente por las células T cutáneas[44,45]. Estas células T adquieren la capacidad de expresar el CLA durante la transición de células T vírgenes a células T memoria[46]. Este proceso se realiza en los ganglios linfáticos periféricos asociados a la piel, después de ser activadas por el correspondiente estímulo antigenico específico. El CLA es pues un marcador de las células T memoria cutáneas[47].

El modo de acción sería el siguiente[48]: La presencia cutánea del antígeno pondría en marcha el procesamiento del mismo por las células presentadoras de antígenos (CPA) y la formación del complejo péptido antigenico-sistema HLA-CPA. De esta forma, las CPA, con el antígeno expreso en su superficie, migrarían hacia los ganglios linfáticos periféricos correspondientes que drenan esa superficie cutánea y allí entrarian en contacto con los linfocitos T, simultáneamente secuestrados, de un modo inespecífico en esos ganglios. La interacción del complejo antigenico con el receptor de células T del linfocito tendría como resultado la activación del linfocito T, que sufriría un proceso de maduración y proliferación traducido en la expresión de moléculas de activación y también del CLA.

Funcionalmente, el CLA es el ligando de la E-selectina endotelial[49,50] y, según algunos autores, una forma especializada de la glicoproteína ligando-1 de la P-selectina[51], una conocida glicoproteína de la superficie celular expresada

constitucionalmente por prácticamente todas las células T de sangre periférica humana, a diferencia del CLA que se expresa fundamentalmente por las células T asociadas a la piel. Así pues, las células T CLA+ podrían interaccionar con la P-selectina y la E-selectina; mientras que, las células T CLA- lo harían solamente con la P-selectina.

En esta misma línea, otras publicaciones definen el CLA como un componente fundamental del ligando leucocitario de la P-selectina y también de los ligandos leucocitario y endotelial de la L-selectina leucocitaria[52,53].

En contraste con los estudios que sugieren que el carbohidrato (tetrasacárido sialylatado y fucosilado) sialyl Lewis X es un importante componente del ligando leucocitario de la E-selectina y de la P-selectina vasculares, existen trabajos[54] con una variante estable de células HL60 s-Lex deficiente, las cuales podrían ser una evidencia de que ese carbohidrato no es esencial para la interacción del CLA con las selectinas vasculares.

Además de las células T, existen otras células capaces de ser HECA-452+, como las células de Langerhans[55], células NK[56], células CD68[57,58], células B memoria/efectoras de sangre periférica y amígdalas[59], y neutrófilos circulantes[58].

Antígeno linfocitario cutáneo y dermatosis inflamatorias

El CLA parece implicado en diversos procesos inflamatorios cutáneos. Un trabajo de Picker et al. de 1990[44], refiere que el 85% de células T cutáneas de piel inflamada son CLA+, Jones et al. en 1997[60] encuentran un 52% de células T HECA-452+ en lesiones cutáneas de psoriasis, así como Pitzalis en 1996[61], que también menciona la presencia variable de células T CLA+ en las lesiones cutáneas psoriásicas. Además, en varias enfermedades inflamatorias cutáneas se ha demostrado un incremento de la expresión del CLA por las células T, entre ellas: dermatitis alérgica de contacto[62,63], dermatitis atópica[63,64,65,66], enfermedad cutánea injerto contra huésped[48,67], vitíligo[68], linfoma cutáneo de células T[48] y liquen plano[69].

A diferencia de las enfermedades antes mencionadas, en la AA no se ha estudiado hasta el momento la expresión del CLA por el conjunto de las células implicadas en su desarrollo, por lo que el principal objetivo de este trabajo ha sido la observación del infiltrado inflamatorio en las lesiones cutáneas de pacientes con AA a cuatro niveles: intraepidérmico, intrafolicular, perifolicular y perivasculares, y también determinar la expresión del CLA por las células de ese infiltrado.

Material y métodos

Este estudio se realizó con el consentimiento informado escrito de los pacientes para la obtención de las biopsias.

Pacientes

Se incluyeron un total de 20 muestras de cuero cabelludo (cc): 12 de las cuales se tomaron del margen de placas alopécicas de pacientes con diferentes formas clínicas de AA (en los casos de AA total y AA universal, se obtuvieron de la región occipital) y las 8 restantes, de individuos control sanos, también de la región occipital.

Los 8 controles sanos eran varones entre los 21 y 42 años de edad (media de 31,5 años). Los 12 pacientes estudiados eran 4 varones y 8 mujeres entre 16 y 44 años de edad en el momento de la primera consulta, con una media de edad de 28,5 años.

La media de edad de inicio de la AA fue de 24,54 años (rango de 1,5-39 años).

El tiempo de evolución del episodio de AA objeto de este estudio fue de una media de 3,97 años con un rango de 15 días-23 años.

En cuanto a la forma clínica de AA, 5 de los pacientes padecían AA universal, un paciente AA total, 4 pacientes AA multifocal, un paciente AA focal y otro paciente AA oclusiva.

Entre los antecedentes patológicos personales, 5 pacientes habían padecido enfermedades relacionadas con la AA y entre los antecedentes patológicos familiares, 6 pacientes tenían uno o más parientes afectos de alteraciones relacionadas con la AA y alguna otra no relacionada, en principio, con la AA (carcinoma de colon y retraso mental).

Recogida de las muestras

Como material de estudio se utilizaron los husos obtenidos mediante biopsia del margen de una placa alopéctica de cc de cada paciente, realizada con fines diagnósticos y de la zona occipital de cc de individuos aparentemente sanos.

A todas las muestras obtenidas, tanto de cc afecto de AA como de controles sanos, se les realizó estudio histopatológico, inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos conjugados fluorescidos frente a IgG, IgM, IgA y C3 (fracción 3 del complemento) humano (Behringwerke AG, Marburg, Germany) y estudio inmunohistoquímico con los AcMo: anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68 y HECA-452 (Tabla 1).

A todos los pacientes de AA, se les practicó examen de sangre periférica (analítica general, complemento (c), Ac antisucales e inmunocomplejos circulantes (ICC)).

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales empleados.

Ac conjugados	*Reactividad	Isotipo	Procedencia
Anti-CD1a	CD1a	IgG1, Kappa mouse	Immunotech
Anti-CD4	CD4	IgG1, Kappa mouse	Dikinson
Anti-CD8	CD8	IgG1, Kappa mouse	Dikinson
Anti-CD68	CD68	IgG1, Kappa mouse	Dakopatts
HECA-452	CLA	Rat IgM	Louis Picker, USA University of Texas
Ac Secundario	—	Igs biotinadas antimouse	BIO-Genex
Anti-Rat IgM	Rat Igs	Rabbit antimouse	Dakopatts
Ac Terciario	—	Estreptoavidina conjugada con peroxidasa	BIO-Genex

*Correspondencia reactividad/especificidad: CD1a (células de Langerhans), CD4 (linfocitos T cooperadores), CD8 (linfocitos T citotóxicos-supresores), CD68 (macrófagos), CLA (células que expresan el CLA).

Preparación de las secciones

Una vez obtenidas las muestras, un tercio de cada una (T^1), previa fijación del tejido con formol tamponado, se incluyó en parafina, se cortó mediante microtomo a temperatura ambiente en secciones seriadas de 4 micras de espesor y se teñió para estudio histopatológico, con fines diagnósticos, con hematoxilina-eosina según la técnica convencional. Los dos tercios restantes se procesaron para IFD(T^2) y para el estudio inmunohistoquímico(T^3). Se sometieron a congelación brusca en nitrógeno líquido con isopentano a -180°C . Posteriormente se practicaron cortes seriados de 4 micras de espesor en un microtomo criostático a -25°C . Se dejaron secar los cortes durante 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente se fijaron en acetona fría durante 10 minutos para dejar secar nuevamente a temperatura ambiente. Llegados a este punto se guardaron en el congelador a -80°C hasta su procesamiento.

Estudio inmunohistoquímico

Se practicó mediante tinción simple para CD1a, CD4, CD8, CD68 y CLA, con los AcMo citados anteriormente y según la técnica de la biotina-estreptoavidina-peroxidasa.

Después de rotular y rehidratar las muestras con PBS (phosphate-buffered salina) al 1x10 durante 10 minutos, se procedió a la supresión de fondo con suero normal de Goat al 1/20 durante 15 minutos. Posteriormente se sometió a incubación con el AcMo primario correspondiente durante 30 minutos a las siguientes diluciones: anti-CD1a: 1/20, anti-CD4: 1/10, anti-CD8: 1/10, anti-CD68: 1/50 y HECA-452: 1/20.

Después de tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS, se incuban con el anticuerpo secundario: Ig antirabbit biotinada durante 20 minutos y después con el anticuerpo

terciario: estreptoavidina conjugada con peroxidasa durante 20 minutos más.

Finalmente se revela con diaminobencidina (DAB), se contrasta con hematoxilina y se procede a montar cada muestra.

Recuento de las células de las muestras

El recuento de las células se hizo a partir de los elementos celulares teñidos, con núcleo visible en el plano de sección, comprendidos en todo el campo del microscopio óptico, a 1x40 aumentos. Para ello seleccionamos, de cada muestra, un infiltrado celular representativo en cada una de las áreas estudiadas.

Análisis estadístico

El estudio estadístico de los resultados obtenidos fue realizado por la Unidad de Bioestadística del Hospital Clínico de Barcelona.

Se compararon los datos referentes a la expresión del CLA por las células del infiltrado inflamatorio de las muestras procedentes de la biopsia del margen de placas alopecicas de pacientes con AA, con los obtenidos a partir de secciones de cuero cabelludo sano de individuos control. Se contemplaron 4 variables: variable 1 (área intraepidérmica), variable 2 (área intrafolicular), variable 3 (área perifolicular) y variable 4 (área perivascular).

El método estadístico utilizado para este estudio fue el Wilcoxon Rank Sum test. Se calculó la media y la desviación estándar en ambos grupos (grupo afecto de AA y grupo control), así como el valor de p , según el programa State Corp 1999 Release 7.0.

Resultados

Anticuerpos circulantes

En el 90% de los pacientes, encontramos: Ac circulantes órgano-específicos, Ac. antimúsculo liso, Ac. antitiroideos, Ac anticélula parietal gástrica) a títulos inferiores a 1/640 y/o aumento moderado del C y/o ICC (no superior a 3).

Inmunofluorescencia directa

La IFD fue negativa en todos los casos, tanto de AA como de cc sano.

Inmunohistoquímica

Una vez hecho el recuento celular del modo indicado en párrafos anteriores, podemos constatar los siguientes datos:

Características del infiltrado inflamatorio

El infiltrado inflamatorio resultó ser aproximadamente 7 veces más intenso en la AA que en las biopsias de cc sano. Así, la media de células contadas por sección fue de 331 y 48 células, respectivamente.

Distribución del infiltrado (Tabla 2)

En las muestras de AA, la media de células por muestra fue de 331 células. La mayor celularidad se observó a nivel perivascular (media de 118) y perifolicular (media de 111), lo que supone un 36% y 34% respectivamente respecto al total de la media de células por muestra del infiltrado. Las células intraepidérmicas (media de 43 células por muestra) suponían un 13% y las células intrafoliculares (media de 59 células por muestra) un 18% del total.

En las secciones de cc sano, la celularidad absoluta fue de una media de 48 células por muestra. El mayor porcentaje de infiltrado ocupaba al área intraepidérmica (media de 24 células por muestra) con un 51% respecto a la media de la totalidad del infiltrado por muestra. A las áreas intrafolicular, perifolicular y perivascular les correspondió un 25%, 9% y 15% (media de 12,4 y 7 células por muestra) respectivamente.

Tabla 2. Distribución del infiltrado.

	AA nº de células (%)	cc sano nº de células (%)
Células intraepidérmicas	43 (13%)	24 (51%)
Células intrafoliculares	59 (18%)	12 (25%)
Células perifoliculares	111 (34%)	4 (9%)
Células perivasculares	118 (36%)	7 (15%)

Porcentajes calculados respecto a una media de 331 células por muestra en la AA y de una media de 48 células por muestra en cc sano.

Fenotipo del infiltrado (Tabla 3)

En las biopsias de AA, las células predominantes fueron los linfocitos T CD4+ (Figura 1) con una cifra media de 134 células por muestra, lo cual suponía un 41% de la media del total de células del infiltrado por muestra. Le seguían los macrófagos CD68+ que sumaban una media de 89 células por muestra (27%), las células de Langerhans CD1a+ que se hallaron en número de 81 célula de media por muestra (25%) y por último, los linfocitos T CD8+ con una media de 26 células por muestra (8%).

Tabla 3. Fenotipo del infiltrado

	AA nº de células (%)	cc sano nº de células (%)
Células de Langerhans	81 (25%)	36 (76%)
Células T CD4	134 (41%)	4 (8%)
Células T CD8	26 (8%)	3 (5%)
Células T CD68	89 (27%)	5 (11%)

Porcentajes calculados a partir de una media de 331 células por muestra en la AA y 48 en cc sano.

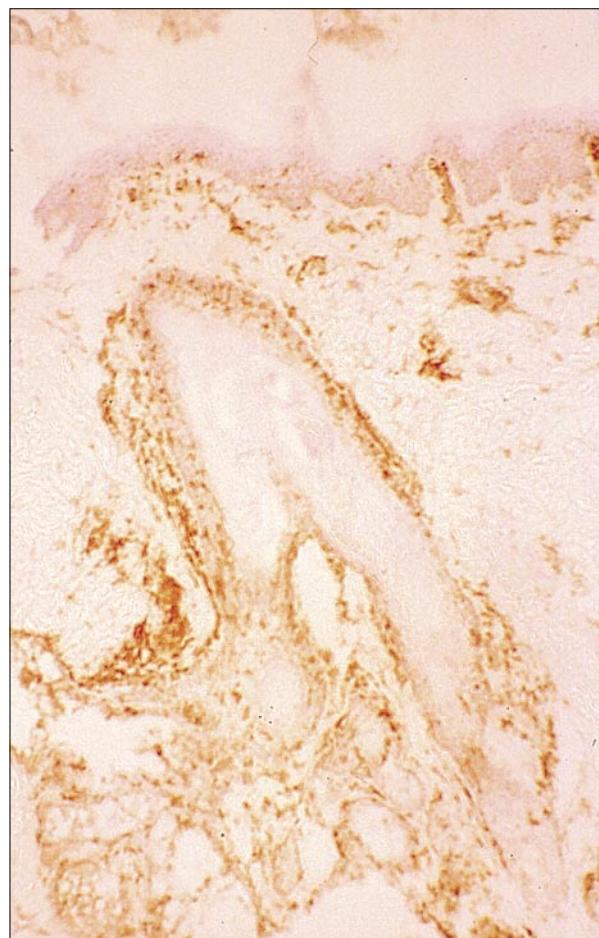


Figura 1. Abundantes infiltrados perivasculares y perifolículares en una muestra de AA a expensas de linfocitos T cooperadores.

En las biopsias de cc sano, predominaban las células de Langerhans (Figura 2) con un número medio de 36 células por muestra, un 76% del total de la media de células del infiltrado por muestra. Con una gran diferencia de esta cifra, a las células T CD4+, T CD8+ y células CD68+ les correspondió un 8%, un 5% y un 11% (una media de 4, 3 y 5 células por muestra) respectivamente.

Respecto a los **linfocitos T colaboradores**, la mayor diferencia del infiltrado entre AA y cc sano, a favor de la AA, tanto porcentual (39% y 23% respectivamente) como en valores absolutos (una media de 52 y 0,8 células por muestra respectivamente), se observa a nivel perifolicular. En cuanto a valores absolutos solamente, le sigue en predominio el área perivascular de la AA con una media de células por

muestra de 47,2 y porcentualmente, la zona intrafolicular con un 19% (media de 25 células) en la AA y un 10% (media de 0,3 células) en cc sano.

Respecto a las zonas intraepidérmica y perivascular, el gradiente porcentual relativo del infiltrado disminuye en la AA respecto al cc sano (6%-19% y 37%-48% respectivamente) (Tabla 4).

Tabla 4. Infiltrado de células T CD4.

	AA	cc sano
epidermis	8 (6%)	0,7 (19%)
intrafolicular	25 (19%)	0,3 (10%)
perifolicular	52 (39%)	0,8 (23%)
perivascular	49 (37%)	1,8 (48%)
Media por muestra	134	4

Media de células por muestra en las diferentes áreas y % de distribución por regiones de ese nº de células.

En cuanto a los **linfocitos T supresores**, el gradiente total entre AA y cc sano, aunque escaso, estaría a favor de la AA (una media de 26 células) respecto al cc sano (una media de 3 células). Por otra parte, el gradiente porcentual relativo sería a expensas del infiltrado perivascular con un 54% y 48% respectivamente (14 células de media en la AA y 1,2, en cc sano) y perifolicular con unos porcentajes de 29% (media de 7 células por muestra) y 24% respectivamente (idem 0,6), que en ambos casos es superior en la AA. Sigue a la inversa en las áreas intraepidérmica e intrafolicular (6%-14% y 11%-14% respectivamente), en las que los porcentajes son mayores en cc sano (Tabla 5).

Tabla 5. Infiltrado de células T CD8.

	AA	cc sano
epidermis	2 (6%)	0,4 (14%)
intrafolicular	3 (11%)	0,4 (14%)
perifolicular	7 (29%)	0,6 (24%)
perivascular	14 (54%)	1,2 (48%)
Media por muestra	26	3

Media de células por muestra en las diferentes áreas y % de distribución por regiones de ese nº de células.

Al observar la distribución del infiltrado de macrófagos CD68, puede verse que la mayor diferencia porcentual entre AA y cc sano se da a nivel perifolicular (40% y 29% respectivamente). El porcentaje perivascular es parecido en ambos casos (48% en la AA y 46% en cc sano). En cuanto a las áreas intraepidérmica e intrafolicular, sucede algo similar a lo anteriormente referido con respecto a los linfocitos T su-

presores. Esas áreas tienen porcentajes relativos inferiores en la AA comparados con el cc sano (6%-15% y 6%-10% respectivamente) (Tabla 6).

Tabla 6. Infiltrado de macrófagos.

	AA	cc sano
epidermis	5 (6%)	1 (15%)
intrafolicular	6 (6%)	0,5 (10%)
perifolicular	35 (40%)	1,5 (29%)
perivascular	43 (48%)	2 (46%)
Media por muestra	89	5

Media de células por muestra en las diferentes áreas y % de distribución por regiones de ese nº de células.

Las células de Langerhans (CD1a+) también superan en términos absolutos los valores del infiltrado en las lesiones de AA (una media de 82 células por muestra) respecto a las muestras de cc sano (una media de 36 células por muestra); sin embargo, los porcentajes comparativos son similares a nivel intrafolicular (30% en ambos casos). Son mayores en la AA que en cc sano, en regiones perifolicular (20% y 3%) y perivascular (15% y 5%) respectivamente; y menores así mismo en la AA en epidermis (34% y 62% respectivamente) (Tabla 7).

Tabla 7. Infiltrado de células de Langerhans

	AA	cc sano
epidermis	28 (34%)	22 (62%)
intrafolicular	25 (30%)	11 (30%)
perifolicular	17 (20%)	1 (3%)
perivascular	12 (15%)	2 (5%)
Media por muestra	82	36

Media de células por muestra en las diferentes áreas y % de distribución por regiones de ese nº de células.

En **función del área** estudiada, observamos que en epitelios, tanto en AA (Figura 3) como en cc sano (Figura 4), predominaban las células de Langerhans (66% y 42% de la media de células epidérmicas e intrafoliculares respectivamente en la AA, y 92% y 90% en cc sano, en las mismas áreas); mientras que a nivel perifolicular y perivascular, predominan las células T CD4+ en la AA (47% y 42% de la media de células perifoliculares y perivasculares respectivamente) y los macrófagos CD68+ en cc sano (35% y 33% de la media de células perifoliculares y perivasculares respectivamente). En la AA, el predominio del área folicular es compartido por dos tipos celulares: las células T CD4+ con un porcentaje del 43% y las células de Langerhans CD1a con un 42% (Tabla 8).

Tabla 8. Fenotipo del infiltrado por áreas.

	Predominio celular	AA	cc sano
Intraepidérmica	células CD1a	66%	92%
Intrafolicular	células CD1a	42%	90%
	células T CD4	43%	—
Perifolicular	células T CD4	47%	—
	células CD68	—	35%
Perivasicular	células T CD4	42%	—
	células T CD68	—	33%

Porcentajes calculados a partir de la media del nº de células totales y de la media del nº de células específicas de cada área.

Por lo que respecta a la **distribución de cada tipo celular** en las diferentes áreas (Tabla 9), las células de Langerhans tienen mayor apetencia por la epidermis, tanto en AA como en cc sano (34% y 62% de la media del total de células de Langerhans, respectivamente). Las células T CD4 infiltran fundamentalmente el área perifolicular (39%) y el área perivasicular (37%) en la AA y en cc sano el 48% corresponde al área perivasicular (Figura 5). Las células T CD8 se hallan sobre todo a nivel perivasicular en AA (54%) y en cc sano (48%). Los macrófagos CD68 fueron más abundantes en la región perifolicular en la AA (40%) y en la perivasicular, tanto en la AA (48%) como en cc sano (46%) (Figura 6). El cc sano expresó menos intensamente células T CD4+ (23%) y macrófagos (29%) a nivel perifolicular.

Tabla 9. Distribución de células en las diferentes áreas.

	Área de predominio	AA	cc sano
Células CD1a	epidermis	34%	62%
Células CD4	perifolicular	39%	23%
	perivasicular	37%	48%
Células CD8	perivasicular	54%	48%
	perifolicular	40%	29%
Células CD68	perifolicular	48%	46%
	perivasicular	—	—

Porcentajes calculados a partir de la media del nº total de cada clase celular por muestra y la media del nº de esa misma clase celular en la diferentes áreas.

Relación linfocitos T CD4/CD8

En las secciones de AA, se halló una relación de linfocitos T CD4+/CD8+ de 5,2. Esta cifra variaría según las áreas estudiadas: 4,71 (intraepidérmica), 8,95 (intrafolicular), 7 (perifolicular) y 3,54 (perivasicular).

En las muestras de cc sano, la relación linfocitos T CD4/CD8 fue de 1,47 y por áreas, de 2 (intraepidérmica), 1 (intrafolicular), 1,4 (perifolicular) y 1,5 (perivasicular).

Expresión del antígeno linfocitario cutáneo (CLA) por las células del infiltrado

En las biopsias de AA, de una media de 331 células por muestra, un promedio de 97 células expresaron el CLA, lo que supone que el 29% de esas células fueron positivas para

el AcMo HECA-452, que define al CLA. El mayor índice de expresión corresponde a las áreas perifolicular: de una media de 111 células, 41 células son HECA-452+ (36%) (Figura 7) y perivasicular: de una media de 118 células, 42 células fueron HECA-452+ (35%) (Figura 8). El porcentaje de expresión del CLA fue notablemente inferior en la epidermis (17%), aproximadamente la mitad de las dos localizaciones anteriores y en la región intrafolicular (13%), prácticamente un tercio de las áreas perivasicular y perifolicular.

En las biopsias de cc sano, de una media de 48 células por muestra, un promedio de 3 células expresaron el CLA; es decir, 5% de las células fueron HECA-452+. Igual que en el caso de la AA, el mayor índice de expresión se observó a nivel perifolicular (15%) y perivasicular (17%) (Tabla 10).

Tabla 10. Expresión del CLA por las células del infiltrado.

	AA			cc sano		
	células	células HECA+	% células HECA+	células	células HECA+	% células HECA+
epidermis	42,57	7,16	17%	24,37	0,5	2%
intrafolicular	58,66	7,91	13%	12,12	0,25	2%
perifolicular	111,31	40,58	36%	4,25	0,62	15%
perivasicular	118,07	41,66	35%	7,24	1,25	17%
Por muestra	330,62	97,33	29%	47,99	2,62	5%

Resultado del estudio estadístico

Según el análisis estadístico de los datos referentes a la expresión del CLA por los dos grupos de muestras estudiados: las pertenecientes a pacientes afectos de AA y a individuos controles sanos, se obtuvieron para las cuatro variables contempladas, valores de p que oscilaron entre 0,001 y 0,008 (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación del % de HECA en los dos grupos según el área.

Variable	Grupo					
	Individuos sanos (8)		Afectos de AA (12)		Total (20)	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Zona 1	3.281069	5.53702	20.30513	20.33639	13.4955	17.99853
Zona 2	1.296296	2.527528	13.67111	9.287194	8.721188	9.538134
Zona 3	13.95833	11.91696	40.51406	23.61382	29.89177	23.52247
Zona 4	12.7904	15.31218	35.19413	13.12943	26.23264	17.69134

DS: desviación standard. Zona 1: intraepidérmica. Zona 2: intrafolicular. Zona 3: perifolicular. Zona 4: perivasicular.

Comentario

La intensidad del infiltrado celular observado en las muestras de AA [más de 7 veces superiores que en cc sano], fundamentalmente a nivel perifolicular y perivasicular (34% y 36% respectivamente), y a expensas sobre todo de células T,

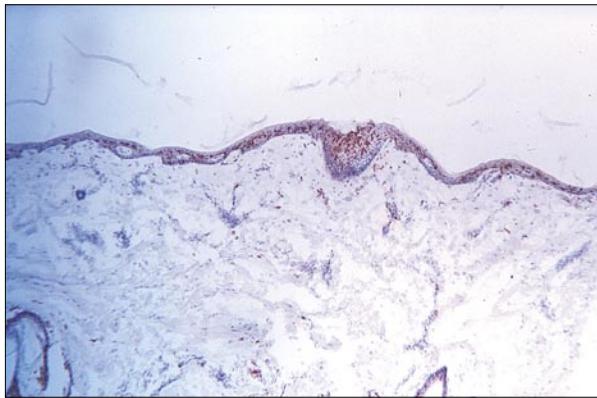


Figura 2. Intenso infiltrado de células de Langerhans en área epidérmica de cuero cabelludo sano.

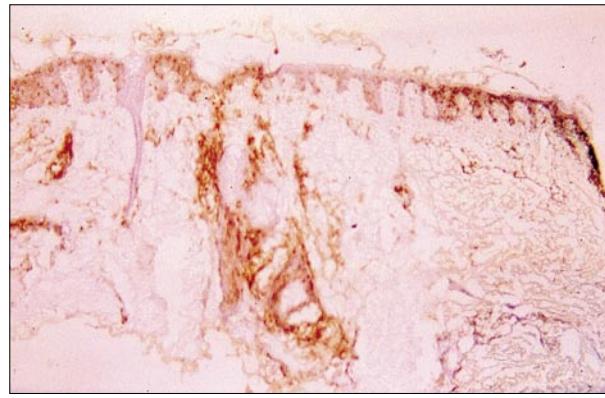


Figura 3. Células de Langerhans epidérmicas en placas alopecicas de AA.

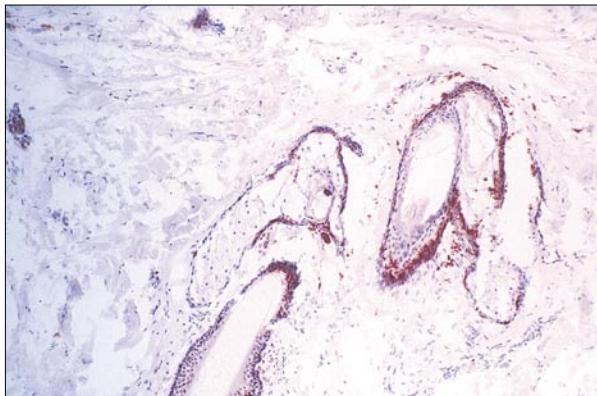


Figura 4. Células de Langerhans en áreas intrafoliculares de cuero cabelludo sano.

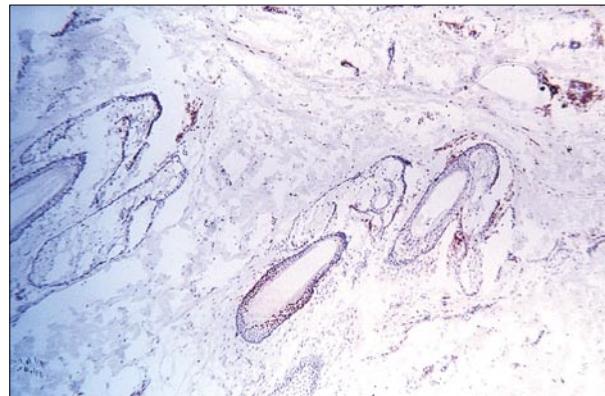


Figura 5. Infiltrado de linfocitos T cooperadores perifoliculares y perivasculares en cuero cabelludo sano.

muestra una vez más, que la AA es una dermatosis inflamatoria mediada por linfocitos T[70,71]. Cuando se ejerce un insulto sobre la piel, el fenómeno de inmunovigilancia cutánea permanente posibilita una respuesta inflamatoria “in situ” mediada por diferentes células del sistema inmunitario, entre ellas las células T, que habitualmente se hallan distribuidas por todo el organismo y que ahora se concentrarán en el lugar de la agresión para participar en el proceso inflamatorio cutáneo desarrollado para la defensa del organismo. Las células T serían reclutadas específicamente en esos lugares de inflamación cutánea crónica.

En menor cuantía, forman también parte de ese infiltrado los macrófagos y las células de Langerhans.

La epidermis presenta el porcentaje inferior (13%) del infiltrado inflamatorio de la AA (Tabla 2), orientando la mayor actividad inflamatoria hacia otras estructuras. No obstante, las células residentes no hematopoyéticas de la epidermis y

la piel en general[queratinocitos epidérmicos, fibroblastos, células endoteliales etc.] tienen también una importancia vital en la generación de la respuesta inflamatoria, probablemente produciendo citocinas, después de una estimulación adecuada, que afectan de una manera decisiva la conducta y función de los linfocitos, granulocitos y monocitos[72].

En la AA existe un incremento total del infiltrado inflamatorio respecto a cc sano. Es a expensas fundamentalmente de los linfocitos T CD4+ perifoliculares y perivasculares. También están aumentadas en valor absoluto, las células CD68+ preferentemente a nivel perifolicular y perivasculares, las células CD1a, sobre todo, en las áreas intraepidérmica e intrafolicular y en menor cuantía los linfocitos T CD8+.

El mayor gradiente de media de células por muestra, entre cc afecto de AA y cc sano, está en el infiltrado de linfocitos T colaboradores (134 y 4 células respectivamente) y el menor, en el de linfocitos T supresores (26 y 3 células

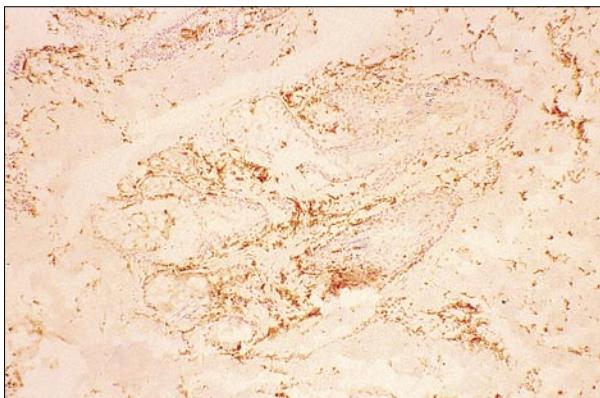


Figura 6. Tinción para monófagos en áreas perivasculares de lesiones de AA.

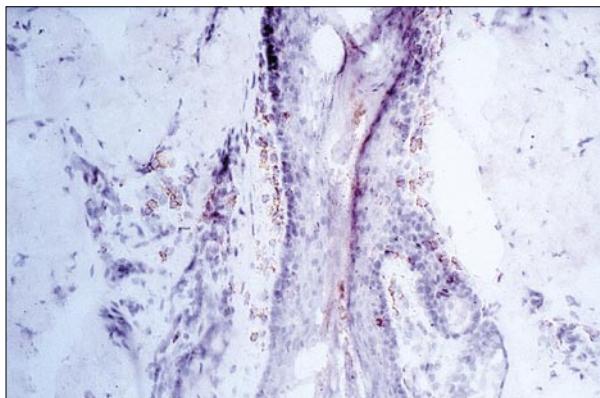


Figura 7. Expresión del CLA por el infiltrado inflamatorio perifolicular en la AA.

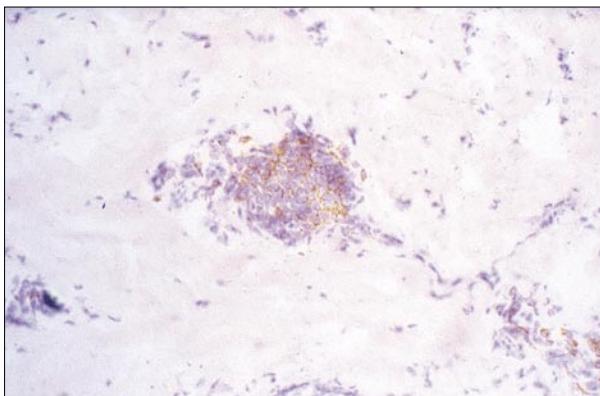


Figura 8. Expresión del CLA por las células inflamatorias perivasculares en la AA.

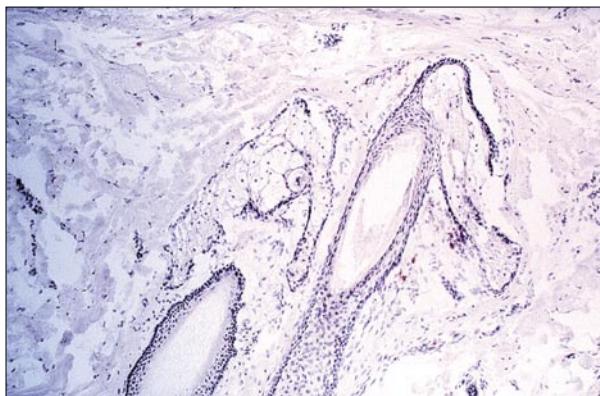


Figura 9. Tinción con el AcMo HECA-452 en áreas perifoliculares de cuero cabelludo sano.

respectivamente). Posiblemente estos dos hechos sean fundamentales en la etiopatogenia de la AA.

El estudio de los porcentajes relativos de esas células, en las diferentes áreas, da lugar a comentarios más detallados:

La distribución del aumento porcentual de linfocitos T colaboradores parece orientarse hacia las estructuras folículares y perifolículares en la AA (estructuras que corresponden al punto de mira fundamental en el estudio del desarrollo de esta enfermedad) cuando lo comparamos con el cc sano, a pesar de que haciendo una valoración absoluta de las cifras obtenidas, el predominio de los linfocitos T colaboradores en la AA es, sin duda, perifolícular y perivasculares (39% y 37% respectivamente).

Podría decirse, que más que un gran incremento de linfocitos T supresores, que es discreto, en la AA tiene lugar

una redistribución del infiltrado de estos linfocitos diferente al que se observa en cc sano (hecho, este último que, como puede observarse en las diversas tablas, ocurre también con el resto de las células del infiltrado). Esta redistribución comparativa estaría orientada hacia las áreas perifolículares y perivasculares.

En cuanto a las células CD68 +, parece ser pues, que una vez instaurada la enfermedad, las principales áreas de actuación de los macrófagos son las perifolículares y las perivasculares. De modo que, a partir del cc sano, la redistribución de los mismos se hace fundamentalmente hacia los vasos y la periferia de las estructuras folículares.

La mayor diferencia porcentual de las células de Langerhans es a nivel intraepidérmico y perifolícular. En este caso, la redistribución celular partiría de la epidermis hacia las estructuras perifolículares.

Expresión del CLA

Por parte de las células del infiltrado, observamos que el significativo aumento del mismo en la AA (29% versus 5% en cc sano) es consecuencia del notable incremento a nivel perifolicular (36%) y perivascular (35%) en las muestras afectas de la enfermedad.

En la AA, es evidente pues, que todas las células que componen el infiltrado inflamatorio observado en las lesiones, incluyendo la expresión del CLA por las mismas, presentan su máximo incremento porcentual relativo respecto a las muestras de cc sano, fundamentalmente a nivel perifolicular, es decir los distintos tipos de células, al incrementarse en número absoluto por el proceso inflamatorio desarrollado durante la enfermedad, tienden a orientarse fundamentalmente hacia las estructuras perifolículares. En este punto, es interesante recordar un trabajo de Ghersetich[62] en el que estudiaba la composición fenotípica de los infiltrados inflamatorios en piel afecta de AA y en piel no afecta. Parece poder deducirse de sus conclusiones que los infiltrados perivasculares preceden a los perifolículares o, lo que es lo mismo, que las células implicadas en dicho proceso inflamatorio se dirigen hacia el área perifolicular. También es constante una cifra porcentual relativa menor, de las distintas clases de células y de la expresión del CLA, a nivel intraepidérmico, en las secciones de AA en relación a las de cc sano. Como ya hemos comentado en párrafos anteriores, la epidermis, aparentemente, pierde protagonismo a favor del área perifolicular fundamentalmente.

En cc sano predomina la presencia intraepitelial de células de Langerhans, tanto a nivel folicular (90%) como epidérmico (92%). Estas células, cuyo papel esencial es la identificación del antígeno en la piel y la presentación del mismo a los linfocitos T en los ganglios linfáticos periféricos que drenan la zona cutánea correspondiente, son fundamentales en la función de inmunovigilancia cutánea que el sistema inmunitario tiene desarrollada con mucha eficacia en la piel, para proteger al organismo de posibles agresiones. Alrededor de los folículos y de los vasos dérmicos de cc sano, la actividad fundamental, según nuestros resultados, podría ser la de protección macrofágica por las células dendríticas dérmicas.

Observando el fenotipo del infiltrado en las diferentes áreas estudiadas (Tabla 8), únicamente el predominio celular a nivel intrafolícular en la AA es compartido por las células de Langerhans y las células T CD4 a partes iguales, las cuales suman entre las dos el 85% de las células observadas en esa área. Esta presencia similar (42% y 43% respectivamente) de ambos tipos celulares, en donde podrían ubicarse la/s posible/s estructura/s folicular/es diana, podría definir esta área como el punto de partida y de llegada respectivamente de dichas células, a través de un movimiento sincronizado de

recirculación cutánea-linfática-sanguínea-cutánea, desde la manifestación del autoantígeno hasta la constitución del proceso inflamatorio propiamente dicho. Así mismo, partiendo de la afirmación de Ghersetich[73] de que la semejanza del infiltrado linfocitario y el infiltrado de células de Langerhans se da fundamentalmente en la fase progresiva de la enfermedad o lo que es lo mismo, en los momentos de máxima actividad inflamatoria, podríamos extrapolar que la similitud porcentual de esos dos tipos de células en el lugar clave del proceso inflamatorio, juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad en cuestión.

Por otra parte, la escasez relativa de células T CD8 citotóxico/supresoras respecto a las células T CD4 cooperadoras, como lo muestra la relación CD4/CD8 de 5,2 en la AA versus 1,47 en cc sano, sugiere, abundando en lo dicho por otros autores[74,75], que el defecto en la inmunoregulación que sin duda está presente en la AA, podría ser debido, total o parcialmente, a la falta de actividad supresora por parte de esos linfocitos T supresores. Compatible con esta hipótesis sería el hecho de que esta falta de actividad supresora de las células T CD8 es comparativamente mayor en la zona intrafolícular (CD4/CD8=8,9) que en otras áreas estudiadas, seguida del área perifolicular (CD4/CD8=7), las áreas intraepidérmica (CD4/CD8=4,7) y perivascular (CD4/CD8=3,5) respectivamente. Un trabajo de Todes-Taylor de 1984[74], refiere que la relación Leu 3a/Leu 2a varía desde 2,6 hasta 19,8 y que el cociente más alto corresponde a los pacientes con enfermedad clínicamente activa. Además, se ha observado un predominio de células T cooperadoras sobre células T citotóxico-supresoras circulantes en diversas enfermedades autoinmunes, como la enfermedad aguda de injerto contra huésped[76], el lupus eritematoso sistémico[77] y la dermatitis atópica[78,79]. Cabe citar también que el uso de alergenos de contacto para el tratamiento de la AA, produce un incremento de los linfocitos T supresores[80,81].

El alto índice de pacientes (90%) en los que en sangre periférica se hallaron anticuerpos circulante órgano-específicos y/o un aumento moderado de complemento y de inmunocomplejos circulantes, coincide con otros trabajos y corrobora la hipótesis de disfunción inmunológica de la AA.

En cuanto a la expresión del CLA, el hecho de que sea más de 5 veces superior en las secciones de AA estudiadas que en las de cc sano, induce a pensar que probablemente el CLA está implicado en la etiopatogenia de la AA. Es posible que el CLA favorezca alguno de los pasos que comprenden los movimientos migratorios de las células inmunocompetentes de la piel a través de los sistemas cutáneo, linfático y sanguíneo, secundarios a la manifestación cutánea del autoantígeno.

La hipótesis anterior podemos emitirla en función de que el análisis estadístico de los resultados obtenidos, es estadísticamente significativo, ya que existe una diferencia valorable entre la expresión del CLA por las células del infiltrado inflamatorio de las muestras obtenidas de las placas alopecicas de pacientes con AA, respecto a las secciones de cc sano.

Conclusiones

A la luz de los resultados obtenidos, podemos concluir que:

1. Los distintos tipos de células, al incrementarse en número absoluto por el proceso inflamatorio desarrollado durante la enfermedad, tienden a orientarse fundamentalmente hacia las estructuras perifoliculares.

2. La similitud porcentual del infiltrado de células de Langerhans y células T CD4+ a nivel intrafolicular podría tener una importancia significativa en el desarrollo de la AA.
3. La disfunción inmunológica presente en la AA, podría ser debida parcial o totalmente a la disminución de la actividad celular supresora por la escasez relativa de células T CD8+.
4. Probablemente el antígeno linfocitario cutáneo (CLA) está implicado en la etiopatogenia de la AA. Es posible que intervenga modulando o favoreciendo los movimientos migratorios de las células inmunocompetentes, que se establecen entre la piel, el sistema linfático y el torrente sanguíneo, una vez se ha producido la expresión antigenica a nivel cutáneo y la hipotética agresión del autoanticuerpo.

Bibliografía

1. Muller SA, Winkelmann RK. Alopecia areata. Arch Dermatol 1963; 88: 290-297.
2. Penders AJM. Alopecia areata and atopy. Dermatologica. 1978; 156: 306-308.
3. Wang SJ, Shohat T, Vadheim C, Shellow W, Edwards J, Rotter JL: Increased risk for type 1 (insulin-dependent) diabetes in relatives of patients with alopecia areata Amer J Med Gen 1994; 51: 234-239.
4. Ueki R, Imai R, Takamori K, Ishihara A, Ogawa H. Three patients with concurrent alopecia areata, vitiligo and chronic thyroiditis. Eur J Dermatol 1993; 3: 454-456.
5. Klein U, Weinheimer B, Zahn H. Simultaneous occurrence of alopecia areata and immunothyroiditis. Int J Dermatol 1974; 13: 116-118.
6. Camacho F. Alopecia areata. Cuadros clínicos. Dermatopatología. En: Camacho F, Montagna W. Tricología. Aula Médica. Madrid 1996; 10: 421.
7. Bystryn JC, Tamesis J. Immunologic aspects of Hair Loss. J Invest Dermatol 1991; 96(suppl): 88-89.
8. Cunliffe WJ, Hall R, Stevenson CJ, Weightman D. Alopecia areata, thyroid disease and autoimmunity. Br J Dermatol 1969; 81: 877-881.
9. Adams BB, Lucky AW. Colocalization of alopecia areata and vitiligo. Pediatr Dermatol 1999; 16: 364-366.
10. Becker WG, Buckley RH. Alopecia areata, hypogammaglobulinaemia, concanavalin A (con-A), hyporesponsiveness and autoimmune hemolytic anemia. Clin Res. 1977; 25: 75.
11. Lerchin E, Schwimmer B. Alopecia areata associated with discoid lupus erythematosus. Cutis 1975; 15: 87-88.
12. Gupta A, Ellis C, Cooper K, Nickoloff BJ, Ho VC, Chan LS, et al. Oral ciclosporin for the treatment of alopecia areata. A clinical and immunohistochemical analysis. J Am Acad Dermatol 1990; 22: 242-250.
13. Happle R. Topical Immunotherapy in Alopecia areata. J Invest Dermatol 1991; 96 (suppl.): 71-72.
14. Seiter S, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. High-dose pulse corticosteroid therapy in the treatment of severe alopecia areata. Dermatology 2001; 202: 230-234.
15. Bröcker EB, Echternach-Happle K, Hamm H: Abnormal expression of class I and class II major histocompatibility antigens in alopecia areata : modulations by topical immunotherapy. J Invest Dermatol 1987; 88: 564-568.
16. Ferrando J, Grimalt R. Partial response of severe alopecia areata to cyclosporin A. Dermatology 1999; 199: 67-69.
17. Kern F, Hoffman WH, Hanibrick GW, Blizzard RM. Alopecia areata: Immunologic studies and treatment with prednisone. Archs Dermatol 1973; 107: 407.
18. Jautova J, Jarkuskova D, Dubiska M, Ficova M. Immunoestimulation therapy in patients with alopecia areata. Bratisl Lek Listy 1995; 96: 160-164.
19. Scerri L, Pace JL: Identical twins with identical alopecia areata. J Am Acad Dermatol 1992; 27: 766-767.
20. Weidmann AI, Zion LS, Mamelok AE. Alopecia areata occurring simultaneously in identical twins. Arch Dermatol 1956; 74: 424-426.
21. Chieregato C, Misciari C, Lorenzi S, Guerra L. Alopecia areata e síndrome de Down. G Ital Dermatol Veneerol 1994; 129: 275-278.
22. Hordinsky MK, Hallgren H, Nelson D, Filipovich AH : Familial alopecia areata. Arch Dermatol 1984; 120: 464-468.
23. Wolf D, Wolf R. Simultaneous alopecia areata in two siblings. J Am Acad Dermatol 1984; 11: 897-898.
24. Duvic M, Hordinsky MK, Fiedler VC, O'Brien WR, Young R, Reveille JD: HLA-D locus associations in alopecia areata. DRw52a confer disease resistance. Arch Dermatol 1991; 127: 64-68.
25. Welsh E, Clark HH, Epstein SZ, Reveille JD, Duvic M: Human Leukocyte Antigen-DQB1*03 alleles are associated with alopecia areata. J Invest Dermatol 1994; 103: 758-763.
26. Colombe BW, Price VH, Khoury EL, Lou CD. HLA class II alleles in longstanding alopecia totalis/alopecia universalis and long-standing patchy alopecia areata. Differentiate these two clinical groups. J Invest Dermatol 1995; 104: 4s-5s.
27. de Andrade M, Jacknow CM, Dahm N, Hordinsky M, Reveille JD, Duvic M. Alopecia areata in families: association with the HLA locus. J Invest Dermatol Symp Proc 1999; 4: 220-223.
28. Duvic M, Welsh EA, Jackow C, Papadopoulos E, Reveille JD, Amos CH. Analysis of HLA-D locus alleles in alopecia areata patients and families. J Invest Dermatol 1995; 104: 5s-6s.
29. Offidani AM, Simonetti O, Politi A, Salvi A, Gabrielli A, Bossi G. Antigeni HLA-DR e alopecia areata. G Ital Dermatol 1998; 123: 409-412.
30. Tobin D, Hann SK, Song MS, Bystryn JC. Hair follicle structures targeted by antibodies in patients with alopecia Areata. Arch Dermatol 1997; 133: 57-61.
31. Tobin DJ, Sundberg JP, King LE, Boggess D, Bystryn JC. Autoantibodies to hair follicles in the C3H/HeJ mouse model of alopecia areata. J Invest Dermatol 1996; 106: 939.
32. Mc Elwee JK, Pickett P, Oliver RF, Hair follicle autoantibodies in DEBR rat sera. J Invest Dermatol 1995; 104: 34s-35s.
33. Randall VA, Mc Donald SP, Nutbrown M, Calver NS, Parkin SM, Cunliffe WJ. Is the dermal papilla a primary target in alopecia areata? J Invest Dermatol 1995; 104: 7s.
34. Friedmann PS: Alopecia areata and autoimmunity. Br J Dermatol 1981; 105: 153-157.
35. Kumar B, Sharma VK, Sehgal S: AntisMOOTH muscle and antiparietal cell antibody-dies in Indians with alopecia areata. Int J Dermatol 1995; 34: 542-545.
36. Main RA, Robbie RB, Gray ES, Donald D, Horne CH W: Smooth-muscle antibodies and alopecia areata. Br J Dermatol 1975; 92: 389-393.
37. Gilhar A, Ullman Y, Berkutzi T, Assy B, Kalish RS. Autoimmune Hair Loss (Alopecia Areata) Transferred by T Lymphocytes to Human Scalp Explants on SCID Mice. J Clin Invest 1998; 101: 62-67.
38. Bystryn JC, Orentreich N, Stengel F. Direct Immunofluorescence studies in Alopecia Areata and male pattern alopecia. J Invest Dermatol 1979; 73: 317-320.

39. Igarashi R, Takeuchi S, Sato Y. Immunofluorescent studies of complement C3 in the hair follicles of normal scalp and of scalp affected by alopecia areata. *Acta Dermatovener (Stockh)* 1980; 60: 33-37.
40. Igarashi R, Morohashi M, Takeuchi S, Sato Y. Immunofluorescence studies on complement components in the hair follicles of normal scalp and of scalp affected by alopecia areata. *Acta Dermatovener (Stockh)* 1981; 61: 131-135.
41. Mc Donagh AJG, Snowden JA, Sterle C, Elliott, Messenger AG: HLA and ICAM-1 expression in alopecia areata in vivo and in vitro: the role of cytokines. *Br J Dermatol* 1993; 129: 250-256.
42. Nickoloff BJ, Griffiths CEM. Aberrant Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Expression by Hair-Follicle Epithelial Cells and Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 (ELAM-1) by vascular Cell Are Important Adhesion-Molecule. Alteraciones in Alopecia Areata. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 91-92.
43. Bos JD, de Boer OJ, Tibbosch E, Das PK, Pals ST. Skin-homing T lymphocytes: detection of cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) by HECA-452 in normal skin. *Arch Dermatol Res* 1993; 285: 179-183.
44. Picker LJ, Mitchie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cell at cutaneous sites. *Am J Pathol* 1990; 136: 1053-1068.
45. Picker LJ, Martin RJ, Trumble A, Newman LS, Collins PA, Bergtresser PR, Leung DY. Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites. *Eur J Immunol* 1994; 24:1269-1277.
46. Picker LJ, Treer JR, Ferguson DB, Collins PA, Bergtresser PR, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cell. *J Immunol* 1993; 150: 1122-1136.
47. Rossiter H, van Reijen F, Mudde GC, Kalthoff F, Bruijnzeel KC, Picker LJ, Kupper TS. Skin disease-related T cells bind to endothelial selectins: expression of cutaneous lymphocyte antigen (CLA) predicts E-selectin but not P-selectin binding. *Eur J Immunol* 1994; 24: 205-210.
48. Robert C, Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells and immune surveillance. *N Engl J Med* 1999; 341: 1817-1828.
49. Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK et al. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1991; 174: 1461-1466.
50. Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le-a and sialyl Le-x is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule, ELAM-1. *J Biol Chem* 1991; 266: 14869.
51. Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSLG-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 1997; 389: 978-981.
52. Tu L, Delahunt MD, Ding H, Luscinskas FW, Tedder TF. The cutaneous lymphocyte antigen is an essential component of the L-selectin ligand induced on human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1999; 189: 241-252.
53. Tu L, Murphy PG, Li X, Tedder TF. L-selectin ligands expressed by human leukocytes are HECA-452 antibody-defined carbohydrate epitopes preferentially displayed by P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Immunol* 1999; 163: 5070-5078.
54. Wagers AJ, Stoolman LM, Craig R, Knibbs RN, Kansas GS. An sLex-deficient variant of HL60 cells exhibit high levels of adhesion to vascular selectins: further evidence that HECA-452 and CSLEX-1 monoclonal antibody epitopes are not essential for high avidity binding to vascular selectins. *J Immunol* 1998; 160: 5122-5129.
55. Koszik F, Strunk D, Simonitsch I, Picker LJ, Stingl G, and Payer E. Expression of monoclonal antibody HECA-452-defined E-selectin ligands on Langerhans cells in normal and disease skin. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 773-780.
56. Unger RE, Yawalkar N, Braathen LR y Brand CU. The HECA-452 epitope is highly expressed on lymph cells derived from human skin. *Br J Dermatol* 1999; 141: 565-569.
57. Nakamura K, Yasaka N, Asahina A, Kato M, Miyazono K, Furue M, Tamaki K. Increased numbers of CD68 antigen positive dendritic epidermal cells and upregulation of CLA expression on these cells in various skin diseases. *J Dermatol Sci* 1998; 18: 170-180.
58. Kieffer JD, Fuhlbrigge RC, Armerding D, Robert C, Ferenczi K, Camphausen RT, Kupper TS. Neutrophils, monocytes and dendritic cells express the same specialized form of PSLG-1 as do skin-homing memory T cells: CLA. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 577-587.
59. Yoshino T, Okano M, Chen HL, Tsuchiyama J, Kondo E, Nishiuchi R, Teramoto N, Nishizaki K, Akagi T. Cutaneous lymphocyte antigen is expressed on memory/effector B cells in the peripheral blood and monocyteoid B cells in the lymphoid tissues. *Cell Immunol* 1999; 197: 39-45.
60. Jones SM, Dixey J, Hall ND, McHugh NJ. Expression of the CLA and its counter-receptor E-selectin in the skin and joints of patients with psoriatic arthritis. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 748-757.
61. Pitzalis C, Cauli A, Pipitone N, Smith C, Barker J, Marchesoni A, et al. Cutaneous lymphocyte antigen-positive T lymphocytes preferentially migrate to the but not to the joint in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 137-145.
62. Santamaria Babi LF, Pérez Soler MT, Hauser C, Blaser K. Skin-homing T cells in human cutaneous allergic inflammation. *Immunol Res* 1995; 14: 317-324.
63. Santamaria Babi LF, Picker LJ, Pérez Soler MT, Drzimalla K, Flohr P, Blaser K, Hauser C. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med* 1995; 181: 1935-1940.
64. Akdis M, Akdis CA, Weigl L, Disch R, Blaser K. Skin-homing, CLA+ memory T cells are activated in atopic dermatitis and regulate IgE by an IL-13-dominated cytokine pattern: IgG4 counter-regulation by CLA- memory T cells. *J Immunol* 1997; 159: 4611-4619.
65. Campbell DE, Kemp AS. Cutaneous lymphocyte-associated antigen expression in children with atopic dermatitis and non-atopic healthy children. *Pediatr Allergy Immunol* 1999; 10: 253.
66. Teraki Y, Hotta T, Shiohara T. Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)+ type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2000; 143: 373-378.
67. Davis RE, Smoller BR. T lymphocytes expressing HECA-452 epitope are present in cutaneous acute graft-versus-host disease and erythema multiforme, but not in acute graft-versus-host disease in gut organs. *Am J Pathol* 1992; 141: 691-698.
68. Al Badri AMT, Todd PM, Garioch JJ, Gudeon JE, Stewart DG, Goudie RB. An immunohistological study of cutaneous lymphocytes in vitiligo. *J Pathol* 1993; 170: 249-255.
69. Walton LJ, Thorhill MH, Macey MG, Farthing PM. CLA and alpha e beta 7 integrins expressed by mononuclear cells in skin and oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 402-407.
70. Baadsgaard O. Alopecia Areata: An Immunologic Disease? *J Invest Dermatol* 1991; 96 (suppl): 89-90.
71. Gianetti A, Di Silverio A, Castellazzi AM and Maccario R. Evidence for defective T cell function in patients with alopecia areata. *Br J Dermatol* 1978; 98: 361.
72. Kupper TS. Immune and Inflammatory Processes in Cutaneous Tissues. *J Clin Invest* 1990; 86: 1783-1789.
73. Ghersetich I, Campanile G, Lotti T. Alopecia areata: Immunohistochemistry and ultrastructure of infiltrate and identification of adhesion molecule receptors. *Int J Dermatol* 1996; 35:28-33.
74. Todes-Taylor N, Turner R, Wood GS, Stratte PT, Morhenn VB. T cell subpopulations in alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 1984; 11: 216-223.
75. D'Ovidio R, Vena GA, Angelini G. Cell-mediated immunity in alopecia areata. *Arch Dermatol Res* 1981; 271: 265-273.
76. Reinherz EL, Parkman R, Rappaport J, Rosen F, Schlossman SR. Aberrations of suppressor T cells in human graft versus host disease. *N Engl J Med* 1979; 300: 1061-1068.
77. Morimoto C, Abe T, Homma M. Altered function of suppressor T lymphocytes in patients with active systemic lupus erythematosus: In vitro immune response to autoantigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1979; 13: 161-170.
78. Leung DY, Rhodes AR, Geha RS. Enumeration of T cell subsets in atopic dermatitis using monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 67: 450-455.
79. Leung DY. The immunologic basis of atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy* 1993; 11: 447-469.
80. Perret CM, Steijlen PM, Happle R. Alopecia areata. Pathogenesis and topical immunotherapy. *Int J Dermatol* 1990; 29: 83-88.
81. Happle R. Antigenic competition as a therapeutic concept for alopecia areata. *Arch Dermatol Res* 1980; 267: 109-114.