

Expresión del antígeno linfocitario cutáneo y de la E-Selectina en la alopecia areata

Expression of Cutaneous Lymphocyte Antigen and E-Selectin in Alopecia Areata

Laura Lacueva, Gisela Hausmann, Juan Ferrando

Servicio y Unidad de Dermatología. Hospital Clínic. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

Correspondencia

Laura Lacueva

Servicio de Dermatología. Hospital Clínic
c/ Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España
e-mail: llacueva@yahoo.es

Resumen

Objetivo: Partiendo de la base de que en la alopecia areata (AA) el antígeno linfocitario cutáneo "cutaneous lymphocyte antigen" (CLA) se expresa casi 6 veces más que en cuero cabelludo (cc) sano[1], el objetivo de este trabajo ha sido determinar la expresión del CLA por cada uno de los tipos celulares del infiltrado de la AA, a nivel intraepidérmico, intrafolicular, perifolicular y perivascular; así como determinar el nivel de expresión de E-Selectina por el endotelio vascular dérmico

Material y métodos: Para ello, hemos dispuesto de:

a) para la expresión del CLA: de 12 biopsias de la perifería de placas alopécicas de cc de pacientes afectos de diferentes formas clínicas de AA (en las formas total y universal, se tomó de la región occipital) y de 8 secciones de la zona occipital de cc de individuos control aparentemente sanos. Con todas las muestras se realizó una inmunofluorescencia directa doble (IFDD) con los anticuerpos monoclonales (AcMo) primarios: anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68 y HECA-452 y con dos anticuerpos secundarios fluorescidos frente a IgG e IgM, según la técnica de doble marcaje con FITC y Rodamina.

b) para la expresión de la E-Selectina: de 12 muestras pertenecientes a las mismas biopsias de los pacientes afectos de AA que se usaron para la determinación de la expresión del CLA y de 8 muestras de la zona occipital de cc de individuos control aparentemente sanos. Con todas las secciones, se realizó una tinción de los vasos dérmicos mediante la técnica de Ulex y posteriormente, en los respectivos cortes consecutivos de cada biopsia, una tinción para E-Selectina según la técnica de la peroxidasa indirecta Envision de Dako.

Resultados: Todos los tipos celulares estudiados expresaron, en grado variable, el CLA. Globalmente, fueron HECA-452+, el 58% del conjunto de células del infiltrado de las muestras de AA, casi 6 veces más que en las de cc sano en el que el recuento fue del 10%. En la AA, el mayor porcentaje de expresión del CLA correspondió a las células T, siendo similar para los linfocitos T CD4+ (71%) y los linfocitos T CD8+ (70%). El área de mayor expresión fue la perifolicular con un 61% del infiltrado CLA+. En cuanto al cc sano, la máxima expresión también la presentaron las células T. Respecto a la expresión de E-Selectina, de las 12 biopsias estudiadas en la AA, 7 presentaron cifras entre 79% y 97%; 3 de ellas, entre 2% y 28% y en las 2 restantes, prácticamente no hubo expresión. En cc sano, la expresión global fue del 40% (rango de 29%-55%).

Conclusiones: La mayoría de los linfocitos T perifolículares expresan el CLA. Es posible que el órgano diana se halle en las estructuras más externas del folículo piloso. Quizá la diferente expresión del CLA por los linfocitos T CD4+ y CD8+, en las distintas áreas, podría ser clave en la composición del infiltrado inflamatorio de la AA y por tanto en su etiopatogenia. La interacción CLA- E-Selectina podría ser crucial en la migración celular como en otras dermatosis inflamatorias.

(Lacueva L, Hausmann G, Ferrando J. Expresión del antígeno linfocitario cutáneo y de la E-Selectina en la alopecia areata. Med Cutan Iber Lat Am 2003; 31(5): 295-303)

Palabras clave: alopecia areata, antígeno linfocitario cutáneo, E-Selectina.

Summary

As we recently reported, the cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) is highly expressed in the patches of alopecia areata (AA) of the scalp (1). The aim of our study is to determinate the CLA expression in the cellular components of the infiltrate at different levels: intradermic, intrafollicular, perifollicular and perivascular; as well as to determine the E-Selectin expression in the dermal vascular endothelium.

Material and Methods. Twelve biopsies of the scalp corresponding to 12 patients affected of AA as well as 8 biopsies of the occipital region of healthy controls were performed.

a) CLA expression: A double direct immunofluorescence technique (were performed in all samples, with the primary mononuclear antibodies: anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68 and HECA-452, and two fluorescent secondary antibodies versus IgG and IgM, following the double staining technique with FITC and Rodamine.

b) *E-Selectin expression:* In all samples a Ulex staining technique followed by the E-Selectin expression with the Envision technique of Dako were performed.

Results. CLA expression were differently manifested by the cellular components. HECA-452 were positive in 58% of the cells of the AA biopsies, while healthy scalp biopsies expressed HECA-452 only in 10% of cells. In AA the highest expression of CLA were manifested by T lymphocytes, similar within CD4+ (71%) and CD8 (70%) cells. The perifollicular area manifested the highest expression of CLA (61% of cells). Concerning to the E-Selectin, 7 out of the 12 samples of AA showed within 79-97% of cellular expression of that component, while in healthy scalp samples it was manifested within 29-55%.

Conclusions. Perifollicular T lymphocytes mainly shows CLA expression and probably follicular target structures in AA are located in the most external components of the hair follicle. May be the different expression of CLA by CD4+ and CD8+ cells, in the different areas, gives the key to the specific infiltrate as well as the pathogenesis of this disorder. E-Selectin-CLA interaction may play a primordial role in the migratory process in that and others inflammatory dermatosis.

Key words: alopecia areata, E-Selectin, cutaneous lymphocyte antigen.

En un trabajo realizado previamente[1] sobre la composición, distribución y expresión global del CLA por parte del infiltrado inflamatorio hallado en las placas afectas de AA, comprobamos que la expresión del antígeno linfocitario cutáneo (CLA) por las células de ese infiltrado era casi 6 veces superior en las muestras de AA que el expresado por las secciones de cuero cabelludo (cc) sano. Este gradiente, estadísticamente significativo ($p < 0,05$), nos permitió deducir que, probablemente, el CLA estaba implicado en la etiopatogenia de la AA, posiblemente favoreciendo o modulando los movimientos migratorios que, en este proceso inflamatorio y autoinmune, podrían establecer las células inmunológicamente activas entre la piel, el sistema circulatorio sanguíneo y el sistema linfático.

Partiendo de este supuesto, hemos realizado un nuevo trabajo para determinar si todos los tipos celulares observados en el infiltrado inflamatorio de la AA tienen la capacidad de expresar el antígeno linfocitario cutáneo, el porcentaje de expresión del CLA por cada uno de ellos, el predominio de la expresión del CLA por cada fenotipo celular en las diferentes áreas observadas; así como también, la capacidad de expresión de su contrarrreceptor en la piel, la E-selectina, por las células del endotelio vascular dérmico.

El CLA es una molécula de adhesión glicoprotéica de la superficie celular, de la cual el carbohidrato sialil Lewis (a) y sialil Lewis (x) son los posibles epitopos o determinantes antigenicos reconocibles por el AcMo HECA-452[2].

La expresión del CLA se realiza de un modo tejido-específica, fundamentalmente por los linfocitos T cutáneos[3, 4], por lo que se le considera un marcador de dichas células T cutáneas[5]. Estos linfocitos T adquieren la capacidad de expresar el CLA durante la transición de células T vírgenes a células T memoria[6] en los ganglios linfáticos periféricos asociados a la piel. También hay otras células capaces de expresar el CLA: las células de Langerhans[7], células NK[8], los macrófagos[9, 10], células B memoria de sangre periférica y amígdalas[11] y neutrófilos circulantes[10].

Funcionalmente, el CLA es el ligando de la E-Selectina endotelial[12, 13].

La E-Selectina (ELAM-1, CD62E, molécula de adhesión endotelial leucocitaria) es una molécula de adhesión expresada por las células del endotelio vascular dérmico activado.

Como el resto de las selectinas (P-Selectina y L-Selectina), se trata de una molécula transmembrana con un núcleo central común y una serie de dominios extracelulares propios, homólogos a los que aparecen en las proteínas de control del complemento (por ej. el factor H). La región extracelular contiene un dominio relacionado con el factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor) y otro dominio en el extremo amino con propiedades parecidas a las que poseen las lectinas (es decir, con capacidad para unirse a hidratos de carbono). Por ello se denominan selectinas y lógicamente sus ligandos son de naturaleza glucídica.

En el caso de la E-Selectina, su ligando es el Sialil Lewis (x), un oligosacárido presente fundamentalmente en las glicoproteínas de superficie de leucocitos circulantes, así como en otras muchas células, tal como hemos indicado anteriormente al referirnos al CLA. El Sialil Lewis (x) también puede actuar como ligando de la P-Selectina (expresada por el endotelio vascular activado y las plaquetas) y en su forma sulfatada (Sialil Lewis (x) sulfatado), de la L-Selectina (expresada por linfocitos naïve y algunos con memoria, neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos)[15].

Los cambios moleculares inducidos en la superficie de las células endoteliales por mediadores proinflamatorios, activan en dichas células la expresión de moléculas de adhesión, las cuales parecen participar de un modo decisivo en la respuesta inflamatoria. Concretamente, la expresión de E-Selectina participa en la adhesión de los leucocitos al endotelio frenándolos (también la P-Selectina) durante la primera fase del proceso de migración.

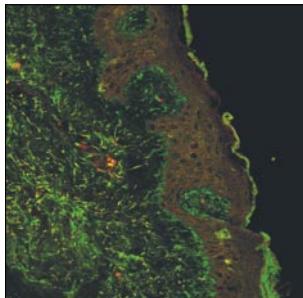


Figura 1. Linfocitos T CD8 epidermicos en la AA.

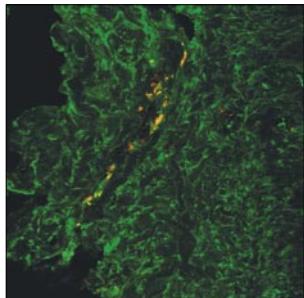


Figura 2. Linfocitos T CD8 perivasculares en la AA.

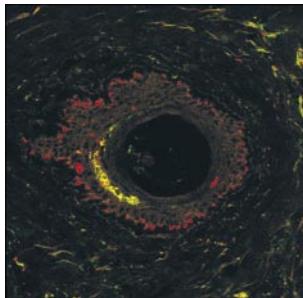


Figura 3. Linfocitos T CD8 foliculares en la AA.

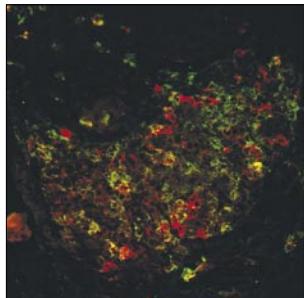


Figura 4. Linfocitos T CD8 perifoliculares en la AA.

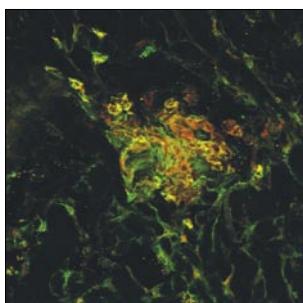


Figura 5. Linfocitos T CD4 perivasculares en la AA.

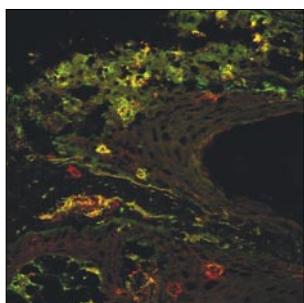


Figura 6. Linfocitos T CD4 foliculares y perifoliculares en la AA.

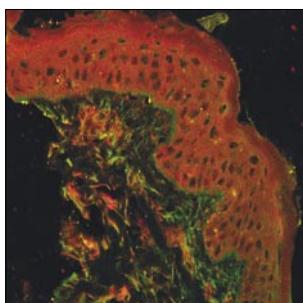


Figura 7. Linfocitos T CD4 epidermicos en la AA.

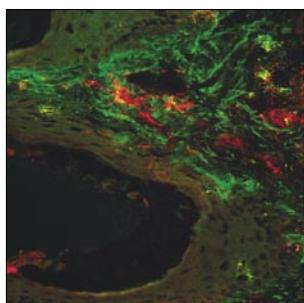


Figura 8. Células de Langerhans CD1a foliculares y perifoliculares en la AA.

Durante la respuesta inflamatoria, los linfocitos deben ser dirigidos desde el torrente circulatorio, donde viajan a gran velocidad por el centro del vaso, hacia el tejido inflamado. En este contexto, el enfriamiento del flujo linfocitario mediante la adherencia al endotelio vascular a través de la interacción de moléculas de adhesión es fundamental para facilitar la llegada de los linfocitos al área diana.

La migración y el reclutamiento de las células inflamatorias en los lugares de agresión se realiza mediante un proceso fisiológico que consta de tres pasos:

- 1) la adherencia y rodadura de los linfocitos a través de las células de las paredes vasculares, que se consigue mediante la unión del ligando leucocitario tetrasacárido fucosilado sialil-Lewis (x) a la E-Selectina y a la P-Selectina endoteliales. Así, los linfocitos, que circulaban con rapidez, se adhieren a las paredes vasculares del tejido hacia el cual se dirigen, donde el flujo circulatorio es más lento. Después de este proceso de adherencia, el linfocito rueda a lo largo de la célula endotelial, en parte a través de la interacción con las selectinas, pero ahora cada vez más a través de la unión de las integrinas linfocitarias $\alpha 4 \beta 1$ (subfamilia VLA-4) o $\alpha 4 \beta 7$, a sus respectivos ligandos (fibronectina o FN, VCAM-1 y FN, VCAM-1,

MAdCAM-1 o molécula de adhesión celular dirigida de la mucosa respectivamente).

- 2) la adhesión estrecha de los leucocitos al endotelio mediante la unión con mucha firmeza de las integrinas $\beta 2$, en particular moléculas como la LFA-1 (antígeno asociado a la función linfocitaria-I), a contrareceptores de las células endoteliales ICAM-1 e ICAM-2). Este contacto íntimo y esta fijación firme hace que el linfocito se aplane.
- 3) la transmigración de los leucocitos (diapédesis) entre células endoteliales adyacentes hacia el tejido extravascular, para dirigirse al lugar de la lesión cutánea, gracias a gradientes de moléculas quimiotácticas que se originan en dicho lugar. El linfocito aplanado se vale de la interacción LFA-1/ICAM-1 y de PECAM-1 (CD31), una molécula de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas, para deslizarse entre las células endoteliales y dirigirse hacia el tejido subepitelial.

Como hemos dicho anteriormente, el CLA es el ligando de la E-Selectina. Teniendo en cuenta que el CLA, como también hemos comentado, es expresado por diversas células, todas estas células, en teoría serían capaces de

interaccionar con la E-Selectina vascular. Podríamos, por tanto, formular la hipótesis de que si las diferentes células inmunorreactivas estudiadas expresan el CLA y a su vez, la E-Selectina endotelial está significativamente aumentada respecto a cuero cabelludo sano, la interacción de ambas moléculas de adhesión probablemente sea un hecho importante en la etiopatogenia de la AA al igual que sucede en otras dermatosis inflamatorias cutáneas.

Objetivo del estudio

Partiendo del razonamiento previamente expuesto, el objetivo de este trabajo ha sido:

1. Estudio de los porcentajes de expresión del CLA por los diferentes tipos celulares hallados en el infiltrado de las muestras de AA y cc sano, a nivel intraepidérmico, intrafolicular, perifolicular y perivascular. Las células estudiadas fueron: células de Langerhans CD1a+, linfocitos T CD4+ cooperadores, linfocitos T CD8+ citotóxicos y macrófagos CD68+.
2. Determinar el nivel de expresión de E-Selectina por las células endoteliales de los vasos dérmicos, en las secciones de AA y de cc sano.

Material y métodos

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

Pacientes

- a) para la expresión del CLA se incluyeron 12 biopsias de la perifería de placas alopécicas de cc de pacientes afectos de diferentes formas clínicas de AA (en las formas totales y universales, se biopsió la zona occipital) y 8 secciones de la zona occipital de cc de individuos control aparentemente sanos.
- b) para la expresión de la E-Selectina dispusimos de 12 muestras pertenecientes a las mismas biopsias de los pacientes afectos de AA que se usaron para la determinación de la expresión del CLA y de 8 muestras de la zona occipital de cc de individuos control aparentemente sanos

Recogida de las muestras

Las muestras para estudio se obtuvieron de biopsias del margen de placas alopécicas de cc de pacientes afectos de alopecia areata y de la zona occipital de cc de individuos sanos, con diferentes grados de alopecia androgenética, sometidos a autotransplante de cabello con fines estéticos.

A todas las muestras obtenidas, tanto de cuero cabelludo afecto de AA como de controles sanos, se les realizó estudio histopatológico, inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos conjugados fluorescinados frente a IgG, IgM, IgA y

C3 (fracción 3 del complemento) humano (Behringwerke AG, Marburg, Germany), una inmunofluorescencia directa doble (IFDD) con los anticuerpos monoclonales (AcMo) primarios: anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68 y HECA-452 y con dos anticuerpos secundarios fluorescinados frente a IgG e IgM, según la técnica de doble marcaje con FITC y Rodamina, una tinción para vasos con lectina Ulex y posteriormente, en cortes consecutivos de cada biopsia, una tinción para E-Selectina según la técnica Envision (Tabla 1).

Tabla 1. Anticuerpos empleados.

Ac. conjugados	Ractividad	Isotipo	Procedencia
Anti-ELAM-1	ELAM-1	IgG-1 mouse	Bender Med Systems
Ac. secundario para ELAM-1	anti-ELAM-1	Dextrán conjugado con Peroxidasa mouse	DAKO
Ulex Europaeus lectin (UEA-1)	célula endotelial vascular	lectina tipo 1 rabbit	DAKO
Ac. secundario para Ulex	Ulex (lectina)	antilectina tipo 1 conjugado con peroxidasa rabbit	DAKO
Ac. primarios (DIF)			
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 IgM (DIF) anti-Rat	Rat IgM	Igs de Goat conjugadas con FITC antirat	ICN
Ac. secundario IgG de mouse (DIF) anti-IgG de mouse	IgG de mouse	Igs de rabbit conjugadas con Rodamina antimouse	DAKO

DIF (Inmunofluorescencia)

*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, una de tres porciones de cada una (T_1), previa fijación del tejido con formol tampónico, se incluyó en parafina, se cortó mediante microtomo a temperatura ambiente en secciones seriadas de 4 micras de espesor y se tiñó para estudio histopatológico, con fines diagnósticos, con hematoxilina-eosina según la técnica convencional. Las dos porciones restantes se procesaron para IFD (T_2), y para doble inmunofluorescencia directa, Ulex y Envision (T_3).

Las muestras destinadas a estudio mediante IFDD, Ulex y Envision, fueron congeladas en metilbutano y guardadas en el congelador a -70° C. Posteriormente se practicaron cortes seriados de 4 micras de espesor en microtomo criostático a -26° C. Se dejaron secar los cortes durante 24 horas a temperatura ambiente. Las muestras destinadas a Ulex y En Vision fueron fijadas en acetona durante 10 minutos. Finalmente, todas ellas se guardaron en una caja de plástico en el congelador a -70° C hasta su procesamiento.

Inmunofluorescencia doble directa (IFDD)

Se realizó según la técnica de doble marcaje con FITC y Rodamina. Después de rotular los portas y rodear la pieza con un lápiz diamantado, se rehidrataron los cortes con PBS (phosphate-buffered salina) al 10% durante 10 minutos y se procedió a la supresión de fondo con suero normal de Goat al 1/20 durante 15 minutos. Posteriormente, se incubaron con los dos anticuerpos monoclonales (AcMo) primarios mezclados (anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD68 y HECA-452), en diluyente especial de Dako durante 30 minutos. Después de tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS, se incubaron con los dos anticuerpos (Acs) secundarios fluorescidos (Ig de Goat anti-IgM de Rat conjugado con FITC al 1/20 y Ig de Rabbit anti-IgG de Mouse conjugado con Rodamina al 1/20) durante 30 minutos. Nuevamente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS y se montaron con Glicerina Tamponada.

Ulex

Después de rehidratar los cortes con PBS, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena con solución de DAKO durante 7 minutos. Posteriormente se incubó con lectina (Ulex) a una dilución de 1/200 durante 1 hora y después de varios lavados con PBS, se incubó nuevamente con el Ac secundario: rabbit anti-Ulex europaeus conjugado con peroxidasa a una dilución de 1/200 durante 1 hora. Finalmente y después de varios lavados, se reveló con AEC (3-amino-9-etil-carbazol), se contrastó con hematoxilina acuosa y se montó con acuatax.

Técnica ELAM-1 (Envision)

El procedimiento de esta técnica fue idéntico al de Ulex, aunque obviamente con anticuerpos diferentes. El Ac Mo primario se diluyó con un diluyente especial de DAKO a 1/20 y el Ac secundario fue Dextrán conjugado con peroxidasa. Ambos se incubaron durante 30 minutos.

Contaje de las células de las muestras

a) para la expresión del CLA: Se visualizaron las muestras en un microscopio confocal, a 1x40 aumentos, seleccio-

nando una sola sección transversal de la muestra incluida en el porta y dentro de ella, un campo representativo, el cual fue guardado, mediante sistema informático, en un disco compacto para el posterior recuento de células. Este se hizo a partir de los elementos celulares teñidos, con núcleo visible, comprendidos en la totalidad de la imagen captada.

b) para la expresión de E-Selectina: En primer lugar se contó el número de vasos dérmicos teñidos con la técnica de Ulex, en todo un campo del microscopio óptico, a 1x10 aumentos. Posteriormente, en una sección consecutiva de la misma muestra, se hizo el recuento de los vasos teñidos para ELAM-1, igualmente en todo un campo del microscopio óptico, a 1x10 aumentos. Por último, se extrajo el porcentaje de expresión de los vasos teñidos para ELAM-1 en relación a los vasos totales; es decir, a los vasos contados con la técnica de Ulex.

Resultados

Inmunofluorescencia directa

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

Inmunofluorescencia directa doble

A) En la alopecia areata

La relación linfocitos T CD4+ / linfocitos T CD8+ resultó ser de 4.

Todos los tipos celulares estudiados expresaron, aunque en diferente grado, el CLA.

La expresión global del CLA fue del 58,13%, casi 6 veces mayor que en cc sano (Tabla 2), cifra superponible a los datos obtenidos en nuestro primer trabajo sobre el CLA[1].

Respecto a las diferentes áreas estudiadas (Tabla 3), encontramos diferencias muy discretas de expresión del CLA entre la zona intrafolicular, perifolicular y perivascular. La de mayor expresión fue la región perifolicular con un 61%, seguida de la perivascular con un 59% y de la intrafolicular con un 57%.

Tabla 2. Porcentaje medio de expresión del CLA por los diferentes tipos celulares.

	CD1a	CD4	CD8	CD68	HECA global (%)
AA	33,08%	70,97%	70,22%	20,06%	58,13
CC sano	5,93%	17,05%	15,45%	8,75%	10,46

Tabla 3. Porcentaje medio de expresión del CLA en las diferentes áreas.

	intraepidérmica	intrafolicular	perifolicular	perivascular
AA	41%	56,9%	60,77%	59,46%
CC sano	3,17%	5,10%	14,15%	14,72%

En la epidermis, observamos una expresión moderadamente menor: 41%.

En cuanto a los fenotipos celulares (Tabla 2), el mayor porcentaje de expresión global del CLA correspondió a las células T, siendo similar para los linfocitos T CD4+ cooperadores (71%) y para los linfocitos T CD8+ citotóxicos (70%).

Las células que expresaron más intensamente el CLA en epidermis fueron los linfocitos T CD8+ (90%) y a nivel perifolicular y perivascular, los linfocitos T CD4+ (72% y 74% respectivamente) (Tabla 4).

Es hecho de que en epidermis hallemos un 90% de linfocitos T CD8+ CLA+, cifra notablemente superior a la de linfocitos T CD4+CLA+ (56%) (Tabla 4), es un dato susceptible de reflexión si tenemos en cuenta que el porcentaje de linfocitos T CD4+ que infiltra la epidermis es 4 veces superior al de los linfocitos TCD8+[1]. En el resto de las áreas, los porcentajes de expresión del CLA por los linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos fueron más aproximados.

Un 33% de las células de Langerhans CD1a+ fueron CLA+, observándose el mínimo porcentaje de células CD1a+ CLA+ en el área intrafolicular (21%) y el máximo, a nivel perifolicular (56%) (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de expresión del CLA de cada tipo celular en las distintas áreas.

		AA	CC sano
Intraepidérmica	CD1a	44,75%	2,59%
	CD4	55,75%	7,69%
	CD8	90,32%	6,66%
	CD68	25%	2,70%
Intrafolicular	CD1a	21,27%	5,21%
	CD4	70,80%	4,16%
	CD8	76,13%	27,27%
	CD68	31,25%	0%
Perifolicular	CD1a	56,16%	7,46%
	CD4	71,71%	16,12%
	CD8	67,28%	16,86%
	CD68	18,65%	12,74%
Perivascular	CD1a	41,73%	11,76%
	CD4	73,69%	22,54%
	CD8	63,41%	14,41%
	CD68	17,46%	9,70%

El menor porcentaje de expresión del CLA correspondió a los macrófagos CD68 + con un 20%. No se observaron grandes diferencias entre las diferentes áreas, aunque las células CD68+CLA+ fueron porcentualmente más abundantes en epitelios y predominaron en la región intrafolicular (31%).

B) En cuero cabelludo sano

La relación linfocitos T CD4+/CD8+ fue 1,17

Todas las células estudiadas expresaron, aunque en diferente grado, el CLA. Estas diferencias en los porcentajes de expresión del CLA por los diferentes fenotipos celulares fueron, sin embargo, notablemente menores que en el caso de la AA.

La expresión global del CLA fue del 10,46%, como hemos dicho anteriormente, casi 6 veces menor que en la AA (Tabla 2).

Respecto a las diferentes áreas estudiadas, se observó una expresión similar del CLA por el conjunto de células, entre las zonas perivascular (15%) y perifolicular (14%). También fue semejante la expresión del CLA entre las regiones intraepidérmica (3%) e intrafolicular (5%) (Tabla 3).

En cuanto a los diferentes tipos celulares (Tabla 2), el mayor porcentaje de expresión correspondió, igual que en la AA, a las células T, con poca diferencia entre los linfocitos T CD4+ CLA+ (17%) y los linfocitos T CD8+ CLA+ (15%).

Un 9% de los macrófagos CD68+ fueron CLA+.

El menor porcentaje de expresión del CLA correspondió a las células de Langerhans CD1a+ con un 6%.

Expresión de la E-Selectina endotelial

A) En la alopecia areata

De las 12 biopsias estudiadas (Tabla 5), 7 de ellas presentaban un grado de expresión de E-Selectina entre el 79% y 97% (una media aproximada del 89%). En las 5 restantes, en cambio, fue por debajo del 28%. De estas 5 biopsias, en 3 de ellas se observó un rango de 12%-28% (media de alrededor del 17%) y en dos de ellas, prácticamente no hubo expresión de E-Selectina (2% en ambos casos).

Tabla 5. Porcentaje de expresión de E-Selectina.

Caso nº	AA	CC sano
1	89,47%	42%
2	27,68%	55,26%
3	12,10%	44,29%
4	85,71%	32,82%
5	91,17%	35,89%
6	1,96%	35,29%
7	90,41%	29,41%
8	2,14%	46%
9	11,53%	
10	97,05%	
11	79,37%	
12	92,59%	

Media de 40%

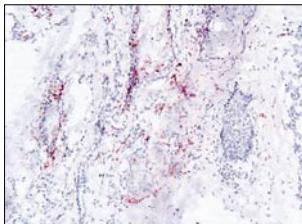


Figura 9. Alta expresión de E-Selectina en la AA.

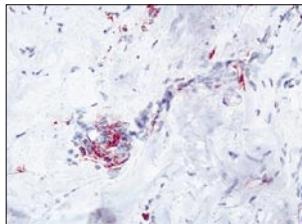


Figura 10. Alta expresión de E-Selectina (detalle).

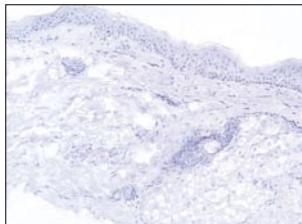


Figura 11. Baja expresión de E-Selectina en la AA.

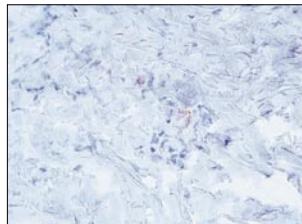


Figura 12. Baja expresión de E-Selectina (detalle).

Tabla 6.

	Linfocitos CD4+ CLA+	Linfocitos CD8+ CLA+
epidérmicos	55,75%	90,32%
intrafoliculares	70,80%	76,13%
perifoliculares	71,71%	67,28%
perivasculares	73,69%	63,41%
% global	70,97%	70,20%

B) En cuero cabelludo sano

La expresión global de las muestras control estudiadas fue del 40% con un rango de 29%-55%.

Comentario

Algunos de los datos que se desprenden de este trabajo suscriben los obtenidos en publicaciones previas, como el cociente de la relación de linfocitos T CD4+/linfocitos TCD8+, tanto en las muestras de cc afecto de AA como de cc sano. Así mismo, al igual que los dos fenotipos de linfocitos T estudiados, las células de Langerhans y los macrófagos también son capaces de expresar el CLA.

Por otra parte, podemos decir que además de aumentar el número absoluto de las células de cada cada substrato celular hallado en las placas de AA en relación a los grupos controles sanos, existe también un incremento de la capacidad de expresar la molécula de adhesión CLA, por parte de cada uno de los tipos celulares del infiltrado.

En la AA la mayoría de linfocitos T expresan el CLA, en igual medida los linfocitos T cooperadores que los linfocitos T citotóxico-supresores (71% y 70% respectivamente), de modo que hay un importante predominio de las células T memoria; es decir, de aquellas que han accusado un estímulo antigénico específico durante su secuestro inespecífico en los ganglios linfáticos que drenan la zona cutánea inflamada.

Los linfocitos T CD8+ CLA+ predominan fundamentalmente a nivel intraepidérmico; es decir, el 90% de las

células T citotóxico-supresoras epidérmicas expresan el antígeno linfocitario cutáneo en su superficie (Figura 1). Los linfocitos T CD8+ van incrementando la expresión del CLA progresivamente desde la posición perivascular, perifolicular, intrafolicular, hasta la epidérmica (63%, 67%, 76%, 90% respectivamente) (Figuras 2, 3 y 4) donde llega a ser notablemente superior a la expresión del CLA por parte de los linfocitos T CD4+ (Tabla 4). Sin embargo, el porcentaje de células T CD4+ que infiltira la epidermis es 4 veces superior al de las células T CD8+[1]. A nivel intrafolicular, la diferencia de expresión del CLA es menor en ambos fenotipos de células T, aunque sigue estando a favor de los linfocitos T citotóxicos. La razón de ese incremento porcentual de la expresión del CLA por estas células T CD8+CLA+ podría explicarse por el hecho de que llegarán a las estructuras foliculares y epidérmicas preferentemente aquellos que fueran capaces de expresar el CLA en su superficie.

Los linfocitos T CD4+ CLA+ son mayoritarios fundamentalmente en la región perivascular (74%) (Figura 5). Le siguen muy de cerca, en intensidad de expresión de la molécula glicoprotéica, las áreas perifolicular e intrafolicular (Figura 6). Con ellos ocurre lo contrario que con los linfocitos T CD8+CLA+; es decir, las células T cooperadoras van disminuyendo la expresión del CLA desde la posición perivascular, perifolicular, intrafolicular, hasta la epidérmica (Figura 7) (74%, 72%, 71% y 56% respectivamente). Podría deducirse que quizás su actividad fundamental ocurre entre los folículos y los vasos dérmicos y que pudieran ir perdiendo parcialmente la capacidad de presentar en su superficie el CLA después de su extravasación a los tejidos y durante su proceso de migración hacia el foco inflamatorio.

En definitiva, no conocemos los mecanismos que expliquen esta “inversión direccional” (Tabla 6) de la expresión del CLA por estos dos substratos celulares T y por supuesto, tampoco la importancia etiopatogénica que tiene en el desarrollo de la AA. Algo que sí podemos intuir es que el grado de expresión del CLA, similar a nivel global en las células

T CD4+ y en las células T CD8+ (71% y 70% respectivamente), podría condicionar de algún modo la composición linfocitaria del infiltrado inflamatorio en las diferentes áreas estudiadas.

Un dato de interés es el hecho de que el mínimo porcentaje de expresión del CLA por las células de Langerhans CD1a+ (células presentadoras de antígeno por excelencia) sea en el área intrafolicular (21%) y el máximo, a nivel perifolicular (56%) (Figura 8). Quizá este hecho junto a la observación de que el área de mayor expresión global del CLA es la perifolicular (61%) (Tabla III) y que la mayoría de linfocitos T en esta zona son CLA+, podría orientar la localización de/de los órgano/s diana, en la AA, hacia las estructuras más externas del folículo piloso.

Respecto a los macrófagos CD68+CLA+, puede observarse que, a nivel intrafolicular, tienen su máxima expresión porcentual (31%). Este dato pudiera ser significativo ya que contrasta con lo expresado en las secciones de cc sano donde ocurre todo lo contrario; en esa área, la expresión del CLA por los macrófagos es prácticamente de 0%, la menor de todas las regiones exploradas. También hay una notable diferencia entre las cifras halladas en la zona intraepidérmica en las muestras de AA y de cc sano (25% y 3% respectivamente). A nivel perifolicular y perivasculares el porcentaje de células CD68+CLA+ respecto a cc sano tiene un gradiente, a favor de la AA, mucho más discreto. Estas diferencias, posiblemente, contribuyen a localizar el lugar de máxima inflamación en el folículo piloso.

Por último, cabe decir que la máxima diferencia porcentual de la expresión del CLA por las muestras de las placas afectas de AA, en relación a las secciones de cc aparentemente sano, en función del área estudiada, es a nivel intrafolicular (57% y 5% respectivamente) y perifolicular (61% y 14% respectivamente). Respecto al fenotipo celular, el mayor gradiente entre AA y cc sano es a expensas de las células T, tanto CD4+ como CD8+, las cuales juegan un papel fundamental en la respuesta inflamatoria.

En cuanto a la diferencia de expresión del CLA por los diferentes tipos celulares, en las distintas áreas, vemos que la mayor diferencia entre AA y cc sano, en epidermis es a expensas de las células T CD8+ y en las regiones intrafolicular, perifolicular y perivasculares, está en relación a las células T CD4+.

En cc sano, los diferentes tipos celulares estudiados también expresaron el CLA en su superficie, aunque todos

ellos, en grado notablemente inferior a las muestras de AA. En concreto, el porcentaje medio de expresión global del CLA por las células observadas en las muestras de cc sano fue casi 6 veces inferior a las células del infiltrado de las secciones de AA. El grado de expresión fue similar en los dos subgrupos de linfocitos T; sin embargo, el fenómeno de "inversión direccional" no fue observado.

Por otra parte, los porcentajes tan diversos, incluso por debajo de los controles sanos, obtenidos en el estudio de la expresión de la E-Selectina (Figuras 9, 10, 11, 12) por las células endoteliales vasculares dérmicas, no se pudieron relacionar con ninguna variable clínica: tiempo de evolución de la enfermedad o del episodio actual, tratamientos previos o actuales, forma clínica de AA, edad, sexo, etc. Probablemente, podrían obedecer a una percepción momentánea de esa expresión, en función probablemente del momento en que se produce el estudio. Es de interés recordar aquí un trabajo de Ilaria Ghersetich[15] en el que estudió la expresión de E-Selectina en la fase progresiva y estable de la AA, en cc afecto y no afecto de lesiones alopecicas. Los resultados obtenidos fueron que la E-Selectina solamente tiene una expresión intensa, en la piel afecta de cc durante la fase progresiva de la enfermedad. Durante esta fase, el cc no afecto tiene una expresión moderada y durante la fase estable de la AA, no hay expresión de E-Selectina en ningún caso, ni en las placas alopecicas ni en las zonas de cuero cabelludo aparentemente no afectado.

Parece ser pues que la expresión de la E-Selectina, no está relacionada con la extensión de la enfermedad sino con la actividad de la misma, momento en el cual, tendría lugar la activación o reactivación del endotelio vascular dérmico por determinadas citocinas proinflamatorias.

De cualquier forma, en la mayoría de las muestras se observa un nivel de expresión de E-Selectina del 89%, lo cual es indicativo de que el proceso inflamatorio desarrollado durante la enfermedad, está relacionado con la activación del endotelio vascular. La consecuencia sería la expresión por las células endoteliales de moléculas de adhesión, entre ellas la E-Selectina, que posibilitarían la extravasación y migración de las células capaces de expresar el ligando de la E-Selectina; es decir, el CLA.

Por último, hay que remarcar que, a diferencia de lo publicado en otros trabajos, la expresión de E-Selectina mostró un nivel basal de alrededor de un 40%, observable en los controles sanos.

Conclusiones

1. La mayoría de linfocitos T expresan el CLA.
2. La actividad fundamental de los linfocitos T CD4+ probablemente está entre los folículos y los vasos dérmicos.
3. El porcentaje de expresión del CLA por los diferentes tipos celulares, podría ser clave en la composición del infiltrado inflamatorio hallado en las lesiones de AA y por tanto desempeñar un papel importante en la etiopatogenia de la misma.
4. El órgano diana en la AA quizás podría localizarse en las estructuras más externas del folículo piloso.
5. La expresión de la E-Selectina parece ser que no está relacionada con la extensión de la AA, sino con la actividad de la misma.
6. La interacción entre las moléculas de adhesión CLA y E-Selectina probablemente es crucial para la extravasación y migración de las células inmunocompetentes en la AA, al igual que sucede en otras dermatosis inflamatorias.

Bibliografía

1. Lacueva L, Hausmann G, Ferrando J. Expresión del antígeno linfocitario cutáneo (CLA) en las placas alopécicas de pacientes con alopecia areata. *Med Cutan Iber Lat Am* 2003; 31: 161-72.
2. Bos JD, de Boer OJ, Tibbosch E, Das PK, Pal ST. Skin-homing T lymphocytes: detection of cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) by HECA-452 in normal skin. *Arch Dermatol Res* 1993; 285: 179-83.
3. 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 cutaneous sites. *Am J Pathol* 1990; 136: 1053-68.
4. Picker LJ, Martin RJ, Trumble A, Newman LS, Collins PA, Bergtresser PR et al. Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cell in pulmonary versus cutaneous immune effector site. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1269-77.
5. 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: 205-10.
6. 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: 1122-36.
7. Koszik F, Strunk D, Simonitsch I, Picker LJ, Stingl G, 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: 773-80.
8. 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: 565-9.
9. 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: 170-80.
10. 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 PSGL-1 as do skin-homing memory T cells: CLA. *Biochem Biophys Res Common* 2001; 285: 577-87.
11. 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.
12. Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK et al. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1991; 174: 1461-6.
13. 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.
14. Springer T, Allison JP, Murphy KM, Griffiths G, Paulnock DM. Inmunidad mediada por células T (8): 263-365. En: Janeway C A Jr. Inmunobiología. Ed. Msson. Barcelona 2000 4^a edición.
15. 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.