



**ESTUDIO DE LAS QUIMIOQUINAS  
CTACK/CCL27 Y TARC/CCL17 EN LAS  
REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD  
NO INMEDIATA INDUCIDAS POR FÁRMACOS**

**BEATRIZ TAPIA ABIA**

**MADRID, 2006**

**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**ESTUDIO DE LAS QUIMIOQUINAS  
CTACK/CCL27 Y TARC/CCL17 EN LAS  
REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD  
NO INMEDIATA INDUCIDAS POR FÁRMACOS**

Memoria presentada por BEATRIZ TAPIA ABIA, Licenciada en Bioquímica,  
para optar al grado de Doctor.

Director: Dra. TERESA BELLÓN HEREDIA

HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ  
MADRID, 2006

**TERESA BELLÓN HEREDIA**, Doctora en Biología,  
Investigadora del Hospital Universitario La Paz.

**CERTIFICA:**

Que **Beatriz Tapia Abia**, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Estudio de las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en las reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos”, que presenta como Tesis Doctoral.

Madrid, 28 de Septiembre del 2006

Teresa Bellón Heredia

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI 021027 y BEFI 02/9243) y la Comunidad Autónoma de Madrid (08.3/0020/2003 1 y GR/SAL/0898/2004).



## *Agradecimientos.....*

.....A la Dra. Teresa Bellón, mi directora de tesis, por guiar durante todos estos años mi formación científica. Le agradezco especialmente su paciencia al trasmitirme muchos de sus conocimientos y corregir con detalle esta memoria.

.....Al Dr. Miguel Blanca por darme la oportunidad de entrar en su día a trabajar en el hospital y ser partícipe de mi inicio en la investigación.

.....Al Servicio de Alergia, Servicio de Dermatología, Servicio de Anatomía Patológica y Unidad de Estadística del Hospital Universitario La Paz por su colaboración.

.....A la Dra. Lourdes Gómez, a la que siempre recordaremos por su alegría y vitalidad.

.....Al Dr. Luis Álvarez y la Dra. Nuria Vilaboa por sus sabios consejos.

.....A todos mis compañeros de La Paz (Esther, María, Salomé, Gema, Laura, Marta, Cristina, Yolanda, Pilar, Víctor, Jesús, Cynthia, Carolina, Andrés, Rocío, Carmen, Alberto, Virginia, Merche, Alba, Silvia, Julia, Elena, Javier, Loli, Raúl, Pablo, Susana, Carlos, Alejandro, Miriam, Miguel, Joaquín.....) por todos los ratos divertidos dentro y fuera del laboratorio, y sobre todo por su ayuda y amistad.

.....A mis amigas Vicky, Cris, Ana, Marisa, Vir y Eva con las que siempre puedo contar para lo bueno y lo malo, porque les encanta escucharme hablar de mis “bichitos” aunque no entiendan nada.

.....A mis amigos de la facultad, por esas largas conversaciones sobre ciencia y muchas otras cosas más.

.....A mi familia, por su cariño y apoyo incondicional; especialmente a mis padres y hermana porque sólo ellos saben lo mucho que me ha costado llegar hasta aquí.

.....A Borja, por estar a mi lado dándome esperanzas cuando las perdía.

*A mi madre*

*“El principio de todas las ciencias es  
el asombro de que las cosas sean como son”*

*Aristóteles*



## *Resumen/Summary*

## **RESUMEN**

Las reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos comprenden una amplia gama de manifestaciones clínicas las cuales tienen en común la piel como órgano diana. Las reacciones más graves son el síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidérmica tóxica, caracterizadas por la formación de ampollas y el posterior desprendimiento de la epidermis. Aunque se ha demostrado que los linfocitos T están implicados en la patogénesis de estas enfermedades, aún se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales son reclutados a la piel. Recientemente, se han identificado las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 las cuales atraen linfocitos T CLA+. Mediante RT-PCR cuantitativa y citometría de flujo hemos demostrado un aumento de la expresión de las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 y de sus receptores CCR10 y CCR4 en piel afectada y en células mononucleares de sangre periférica y del líquido de ampollas procedentes de pacientes durante la fase aguda de la reacción. En paralelo detectamos un aumento en la expresión de la proteína CTACK/CCL27 en piel y en suero de pacientes mediante análisis inmunohistoquímico y ELISA. Además los linfocitos de sangre periférica de pacientes en fase aguda mostraron una mejor respuesta migratoria frente a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17, de acuerdo con el aumento de expresión de sus receptores. El análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones que migraron indica que los linfocitos T CD8+ citotóxicos son reclutados preferentemente por CTACK/CCL27 en las reacciones más graves, mientras que TARC/CCL17 atraería principalmente linfocitos T CD4+. En conjunto, los datos sugieren que las interacciones CTACK/CCL27-CCR10 y TARC/CCL17-CCR4 participan en la migración de los linfocitos T a la piel en las reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos, y que CTACK/CCL27 podría representar un papel clave en el reclutamiento de las células citotóxicas en las reacciones más graves.

En ratón se ha identificado una isoforma de CTACK/CCL27, llamada PESKY que carece del péptido señal y se localiza en el núcleo celular. Además se ha demostrado que CTACK/CCL27 puede translocarse al núcleo tras la interacción con su receptor. Hemos analizado la localización subcelular así como los efectos sobre la expresión génica de una forma no secretada de CTACK/CCL27 humana (CTACK-b). Experimentos de microscopía de fluorescencia y western-blot sugieren que CTACK-b puede tener localización nuclear. Además, la sobreexpresión de CTACK-b aumenta los niveles de expresión de genes relacionados con la proliferación, migración y adhesión celular.

## **SUMMARY**

Delayed drug-induced hypersensitivity reactions include a plethora of clinical entities which share the skin as the main target organ. The most severe reactions are toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome, which are characterized by blister formation and epidermis detachment. Although T lymphocytes seem to be involved, little is known about the molecular events leading to their recruitment to the skin. Recently, CTACK/CCL27 and TARC/CCL17 have been described as chemoattractants of CLA<sup>+</sup> T lymphocytes. Quantitative RT-PCR and flow cytometry analysis showed increased levels of CTACK/CCL27, TARC/CCL17 and their receptors in affected skin; and also upregulation of CCR10 and CCR4 expression in peripheral blood and blister fluid mononuclear cells from patients during the acute phase of the reaction. At the same time, we have detected increased protein levels of CTACK/CCL27 in skin and serum from patients by immunochemistry analysis and ELISA. Peripheral blood lymphocytes from patients showed increased migratory response to CTACK/CCL27 and TARC/CL17 in agreement with receptor expression data. Flow cytometry analysis of T lymphocyte subsets that migrated in response to chemokines suggests a selective recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells by CTACK/CCL27 during the acute phase of severe reactions, while TARC/CCL17 would recruit preferentially CD4<sup>+</sup> T cells. Our results suggest an implication of CTACK/CCL27-CCR10 and TARC/CCL17-CCR4 interactions in T lymphocyte recruitment to skin in delayed drug-induced hypersensitivity reactions, with a selective role of CTACK/CCL27 in inducing migration of cytotoxic cells in severe bullous diseases.

It has been described a murine isoform of CTACK/CCL27, called PESKY, that lacks the signal peptide and has nuclear localization. Moreover, translocation to the nucleus of CTACK/CCL27 after interaction with its receptor has been shown. We have analyzed the subcellular localization and the effects in gene expression of a non-secreted human CTACK/CCL27 (CTACK-b). Microscopy and western-blot analysis showed nuclear localization of CTACK-b. Moreover, overexpression of CTACK-b upregulated the expression of genes involved in cell proliferation, adhesion and migration.

# *Índice*

<b>CLAVE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
1. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD NO INMEDIATA INDUCIDAS POR FÁMACOS.....	4
1.1 Mecanismos moleculares: los linfocitos T.....	5
1.2 Entidades clínicas.....	7
2. MIGRACIÓN LINFOCITARIA.....	10
2.1 Quimioquinas.....	12
3. QUIMIOQUINAS EN PATOLOGÍAS CUTÁNEAS.....	16
3.1 CTACK/CCL27-CCR10 y TARC/CCL17-CCR4.....	16
4. PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DEL ARNm DE CTACK/CCL27.....	19
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
1. SELECCIÓN DE PACIENTES. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y PIEL.....	23
2. EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-PCR CUANTITATIVA.....	23
3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO.....	24
4. ELISA(ENZYME LINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY).....	25
5. ENSAYOS DE QUIMIOTAXIS.....	26
6. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	26
7. SEPARACIÓN MAGNÉTICA Y SEPARACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	27
8. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON EGFP.....	27
9. SECUENCIACIÓN.....	28
10. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIÓN.....	28
11. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR Y CITOSÓLICA.....	29
12. WESTERN-BLOT.....	29
13. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	30
14. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR ARRAYS DE ADNc.....	30
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
TABLA II. PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	32

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CTACK/CCL27, TARC/CCL17, CCR10 Y CCR4 EN PIEL AFECTA.....	34
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CTACK/CCL27.....	37
2.1. Análisis inmunohistoquímico de CTACK/CCL27 en piel afecta.....	37
2.2. Análisis de los niveles de CTACK/CCL27 en suero y fluido de ampollas.....	39
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CCR10 Y CCR4 EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA Y FLUIDO DE AMPOLLA.....	40
3.1. Análisis de la expresión génica de CCR10 y CCR4 en sangre periférica.....	40
3.2. Análisis del porcentaje de linfocitos CCR10+ y CCR4+ de sangre periférica.....	41
3.3. Análisis del fenotipo y expresión de CCR10 y CCR4 en linfocitos de ampollas.....	43
4. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA MIGRATORIA A CTACK/CCL27 Y TARC/CCL17 DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	44
4.1. Respuesta migratoria de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ Y CD8+ en el síndrome de Stevens-Johnson y la necrosis epidérmica tóxica.....	48
4.2. Respuesta migratoria de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ Y CD8+ en las reacciones exantemáticas.....	51
5. ESTUDIO DE UNA FORMA NO SECRETADA DE CTACK/CCL27 HUMANA (CTACK-b).....	53
5.1 Localización subcelular.....	53
5.2 Alteraciones en la expresión génica inducidas por CTACK-b.....	56
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
1. EXPRESIÓN GÉNICA DE CTACK/CCL27, TARC/CCL17, CCR10 Y CCR4 EN BIOPSIAS DE PIEL.....	60
2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CTACK/CCL27 EN PIEL Y SUERO.....	60
3. EXPRESIÓN DE CCR10 Y CCR4 EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y FLUIDO DE AMPOLLAS.....	62
4. RESPUESTA MIGRATORIA FRENTE A CTACK/CCL27 Y TARC/CCL17 DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	63
4.1 Migración de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en el síndrome de Stevens-Johnson y la necrosis epidérmica tóxica.....	64

4.2 Migración de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en las reacciones exantemáticas.....	65
5. POSIBLE IMPLICACIÓN TERAPÉUTICA.....	66
6. ESTUDIO DE UNA VARIANTE NO SECRETADA DE CTACK/CCL27 HUMANA.....	67
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>

## *Abreviaturas*



ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
BSA: Bovine serum albumin (Albúmina de suero bovino)  
CLA: Cutaneous lymphocyte antigen (Antígeno linfocitario cutáneo)  
CTACK: Cutaneous T cell attracting chemokine  
DNFB: Dinitrofenolbenzoilo  
DRESS: Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (Reacción inducida por fármacos con eosinofilia y síntomas sistémicos)  
DTT: Ditiotreitól  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
EGFP: Enhanced green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)  
EGTA: Ácido etilenglicol bis (2-amino-etil eter)-N, N, N', N'-tetraacético  
ELISA: Enzyme linked immunoabsorbent assay  
FCS: Fetal calf serum (Suero de ternera fetal)  
HEPES: Ácido 2-[4-(2-Hidroxi-etil)-1-piperazinil] etanolsulfónico  
HLA: Human leucocyte antigen (Antígeno leucocitario humano)  
IFN: Interferón  
IL: Interleuquina  
MDC: Monocyte derived chemokine  
MEC: Mucosae-associated epithelial chemokine  
MHC: Major histocompatibility complex (Complejo principal de histocompatibilidad)  
MPE: Maculo-papular exanthema (Exantema maculo-papular )  
NF- $\kappa$ b: Factor nuclear de unión al gen de la cadena kappa de las inmunoglobulinas  
NK: Natural killer (Célula citotóxica natural)  
OVA: Ovoalbúmina  
pb: pares de bases  
PBLs: Peripheral blood lymphocytes (Linfocitos de sangre periférica)  
PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells (Células mononucleares de sangre periférica)  
PBS: Tampón fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro  
RT-PCR: Transcripción inversa-PCR  
SDF-1 $\alpha$ : Stroma derived factor  
SDS: Dimetil sulfato sódico

SHP: Fosfatasa con dominios con homología a Src

SJS : Stevens-Jhonson syndrome (Síndrome de Stevens-Jhonson )

TARC: Thymus and activation-regulated chemokine

TCR: T-cell receptor (Receptor de la célula T)

TEN: Toxic epidermal necrolysis (Necrolis epidérmica tóxica)

Th: T helper (célula T ayudante)

TNF: Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)

# *Introducción*

## **1. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD NO INMEDIATA INDUCIDAS POR FÁRMACOS**

Los fármacos pueden producir dos tipos de reacciones adversas (Naisbitt y cols. 2000):

Tipo A) reacciones adversas que se deben a la acción farmacológica del medicamento y a las propiedades del mismo: efectos colaterales, sobredosis y efectos secundarios.

Tipo B) reacciones adversas causadas por la interacción del fármaco con el sistema inmunológico o por características idiosincrásicas del individuo. Estas reacciones no son predecibles.

Las reacciones adversas a medicamentos mediadas por el sistema inmunológico, también consideradas como reacciones alérgicas a los medicamentos, se incluyen dentro de las reacciones de hipersensibilidad. Las reacciones de hipersensibilidad se clasifican en cuatro categorías descritas por Gell y Coombs (1968):

Tipo I. Reacción de hipersensibilidad inmediata: Respuesta inmune humoral, en la que participan mayoritariamente los anticuerpos IgE. Ocurren en un plazo de minutos a una hora desde la administración del medicamento. Las entidades clínicas más frecuentes son anafilaxia, asma, angioedema y urticaria.

Tipo II. Reacción citotóxica debida a la activación del sistema del complemento y la acción de los anticuerpos IgG o IgM. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la anemia hemolítica, trombocitopenia, leucopenia y agranulocitosis.

Tipo III. Reacción debida a la formación de inmunocomplejos de IgG o IgM y la activación del sistema del complemento. Algunas reacciones de tipo III son la enfermedad del suero, enfermedades hematológicas, y la vasculitis sistémica y cutánea.

Tipo IV. Reacción de hipersensibilidad retardada o no inmediata: Respuesta inmune celular, en la que participan mayoritariamente células efectoras. Ocurre entre las 2 o 72 horas, o incluso días después de la administración del fármaco.

Las reacciones adversas a medicamentos de tipo B suelen ser reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo I) y reacciones de hipersensibilidad retardada (tipo IV).

Las reacciones de hipersensibilidad retardada o de tipo IV inducidas por medicamentos comprenden una amplia gama de manifestaciones clínicas, la mayoría de las cuales cursan con afectación cutánea. De acuerdo a la clasificación por JC Roujeau (Roujeau, 2005) se pueden distinguir las siguientes entidades clínicas:

- Urticaria

- Exantema maculopapular
- Pustulosis exantemática aguda generalizada
- Síndrome de hipersensibilidad/ DRESS (Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms)
- Exantema fijo
- Eritema exudativo multiforme
- Síndrome de Stevens-Johnson / Necrolisis epidérmica tóxica

### **1.1 MECANISMOS MOLECULARES: LOS LINFOCITOS T**

Aunque los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de las reacciones de hipersensibilidad retardada a medicamentos son complejos y están aun por elucidar, existen evidencias que demuestran la implicación de los linfocitos T en estas patologías:

- Análisis inmunohistoquímicos demuestran la presencia de un infiltrado inflamatorio en la piel compuesto mayoritariamente por células T ( Mauri-Hellweg y cols. 1995; Griem y cols. 1998; Coleman y Blanca. 1998; Gonzalez y cols. 1998; Gerber y Pichler. 2004).
- Experimentos “in vitro” han demostrado la existencia de receptores de los linfocitos T (TCR) específicos de los fármacos causantes de la enfermedad. Además células T obtenidas de sangre periférica de los pacientes son estimuladas “in vitro” por el fármaco demostrándose la memoria inmunológica (Mauri-Hellweg y cols. 1995; Gerber y Pichler. 2004).
- Aumento en las células mononucleares de sangre periférica de marcadores de activación, proteínas que median la citotoxicidad (granzima B, perforina y FasL) y el marcador linfocitario del “homing” a la piel CLA durante la fase aguda de la reacción (Gonzalez y cols. 1998; Leyva y cols. 1999; Posadas y cols. 2002).

#### **Reconocimiento del fármaco por el TCR:**

Los linfocitos T, junto con los linfocitos B, son las células mononucleares del sistema inmune responsables de la respuesta inmune específica. Las células T se activan al recibir dos señales: la primera se debe al reconocimiento específico por el receptor específico de la célula T (TCR) del péptido antigénico embebido en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) (linfocitos B, monocitos y dendríticas). Esta primera interacción promueve la señalización a través del TCR asociado al complejo CD3 y al coreceptor CD4 ó CD8 según el tipo de linfocito T. La segunda señal

comprende un conjunto de señales coestimuladoras debidas a la interacción entre la célula T y la célula APC en las que participan varias moléculas.

Los fármacos son compuestos químicos de bajo peso molecular cuyo reconocimiento por el TCR puede ocurrir de tres maneras (Griem y cols. 1998; Pichler, 2003; Gerber y Pichler. 2004):

1. Cuando el fármaco contiene grupos químicos reactivos se puede comportar como un **hapteno**. Un hapteno es una sustancia de bajo peso molecular incapaz de desencadenar una respuesta inmune específica; pero se vuelve inmunogénico al unirse mediante enlace covalente a péptidos o proteínas. Los linfocitos T reconocen a través de su TCR el péptido haptenizado que proviene de un procesamiento intracelular del complejo proteína-hapteno y es presentado en una molécula del MHC por la célula APC. También es posible que el hapteno se una directamente al péptido antigénico en la membrana celular, o incluso que modifique la molécula del MHC. Un ejemplo de este tipo de fármaco sería la penicilina G, cuyo anillo  $\beta$ -lactámico se une mediante un ataque nucleofílico a los grupos lisina de las proteínas.
2. Cuando el fármaco no es químicamente reactivo se comporta como un **pro-hapteno**: El fármaco puede convertirse en hapteno tras ser metabolizado. El metabolismo de fármacos y xenobióticos tiene lugar principalmente en el hígado. Sin embargo, las reacciones de hipersensibilidad no inmediata tienen como principal órgano diana la piel. Por ello, se sospecha que el metabolismo extrahepático representa un papel crucial. Se ha descrito la presencia de isoenzimas del citocromo P450 (CYP) en los queratinocitos y otras enzimas metabólicas de amplio espectro en monocitos y neutrófilos. Como ejemplo de prohapteno se encuentra el sulfometoxazol.
3. Algunos fármacos químicamente inertes no se comportan como haptenos ni prohaptenos y sin embargo son capaces de activar a linfocitos T específicos. Diversos estudios han demostrado que se unen directamente al TCR y a la molécula HLA mediante una interacción débil pero suficiente para desencadenar la activación. Pichler y cols. denominan a este tipo de unión “Interacción farmacológica” o concepto “p-i” (pharmacologic-interaction). Algunos fármacos como sulfometoxazol, lidocaína, o carbamacepina pueden comportarse de este modo.

### **Linfocitos T CD4+:**

Los linfocitos T CD4 o linfocitos T “helper” (Th) reconocen péptidos antigénicos embebidos en moléculas del MHC-II. Estos péptidos provienen de proteínas exógenas que son procesadas y presentados por las células APC. Los linfocitos CD4+ al activarse secretan citoquinas, proteínas que regulan la respuesta inmune. En función del patrón de citoquinas que producen se han descrito las siguientes subpoblaciones de linfocitos T CD4 (Abbas y cols. 1996):

- Los linfocitos Th2 secretan interleuquina-4 (IL-4) e interleuquina-5 (IL-5), citoquinas que promueven la producción de IgE e IgG4 por los linfocitos B, y la activación de mastocitos y eosinófilos. Son responsables de las respuestas inmunes de tipo humoral, como es el caso de la hipersensibilidad inmediata a medicamentos (asma, urticaria y anafilaxis).
- Los linfocitos Th1 secretan interleuquina-2 (IL-2) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). El IFN- $\gamma$  activa a los monocitos y macrófagos, los cuales producen TNF- $\alpha$  e IL-12. La IL-2 junto con el IFN- $\gamma$  activa las células citotóxicas CD8. Los linfocitos Th1 favorecen una respuesta inmune celular, por ello se han asociado a las reacciones de hipersensibilidad no inmediata a medicamentos (Posadas y cols. 2000).
- Algunos autores (Abbas y cols, 1996) describen como Th0 aquella subpoblación de linfocitos Th que no encaja en el patrón Th1/Th2.
- Las células T supresoras CD25+ (Mason y Powrie, 1998): producen IL-10 y TGF- $\beta$  citoquinas que inhiben la acción de las células efectoras. Esta subpoblación es clave para poner fin a la respuesta inmune.

### **Linfocitos T CD8+:**

Los linfocitos T CD8+ o células T citotóxicas son células efectoras capaces de matar células autólogas cuando se activan al reconocer un péptido antigénico en el contexto de la molécula MHC de clase I presentada en la superficie de la célula diana. La citotoxicidad puede ocurrir mediante lisis por las moléculas granzima B y perforina, o bien mediante apoptosis tras la interacción de la molécula FasL de la célula efectora con su receptor Fas (familia del receptor de TNF- $\alpha$ ) presente en la célula diana.

## **1.2 ENTIDADES CLÍNICAS**

Las reacciones de hipersensibilidad retardada a fármacos comprenden un grupo amplio de entidades clínicas. Los análisis inmunohistoquímicos en las biopsias de piel de pacientes con estas reacciones y los estudios “in vitro” de los linfocitos T específicos de fármaco revelan una contribución distinta de las células T CD4+ y CD8+ en la patogénesis de estas enfermedades. Podemos distinguir las siguientes manifestaciones clínicas:

### **Urticaria:**

Erupción cutánea que cursa con eritema y edema, asociada frecuentemente a prurito. Los fármacos asociados más frecuentes son los AINES (Analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos) y los inhibidores de ACE (angiotensin-converting enzyme) (Roujeau, 2005).

**Exantema maculo-paular (MPE):**

Es la entidad clínica más frecuente, comprende más del 90% de los casos de hipersensibilidad retardada a fármacos. Consiste en máculas o pápulas eritematosas normalmente simétricas que se presentan en tronco y extremidades. Con frecuencia se asocia prurito y fiebre leve. Algunos de los medicamentos relacionados son alopurinol, aminopenicilinas, cefalosporinas, agentes antiepilépticos y sulfonamidas (Roujeau, 2005).

Análisis inmunohistoquímicos en biopsias de piel de pacientes demuestran la presencia de un infiltrado de células T CD3+ (40-70%) y eosinófilos. Las células T CD4+ predominan en la dermis, mientras que en la epidermis se encuentran por igual células T CD4+ y CD8+, así como la presencia de gránulos de granzima B y perforina, posible causa de la degeneración de los queratinocitos. Se asocia bien un patrón de citoquinas Th1 (Posadas y cols, 2000), bien un patrón heterogéneo Th1/Th2 (Yawalkar, 2005). Se ha descrito un aumento en la interleuquina-5 y eotaxina, moléculas responsables de la activación y reclutamiento a la piel de eosinófilos (Yawalkar y cols. 2001; Pichler, 2003).

**Pustulosis exantemática aguda generalizada:**

Se trata de una enfermedad con poca incidencia, causada por fármacos en más del 90% de los casos. Se caracteriza por la aparición de numerosas pústulas estériles y fiebre alta. Se ha descrito la presencia de un abundante infiltrado de neutrófilos en la pústula intraepidérmica, rodeada de células T CD4+ y CD8+; así como el aumento en la expresión de la interleuquina-8 (IL-8) por queratinocitos y por el infiltrado de células T. La producción local de IL-8 parece ser la responsable del reclutamiento de los neutrófilos a la piel. Los antibióticos y el diltiazem son los fármacos más asociados a esta entidad clínica (Britschgi y cols, 2001; Pichler, 2003; Roujeau, 2005).

**Síndrome de hipersensibilidad o DRESS:**

En la literatura se conoce como DRESS (Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms). Se trata de una reacción exantemática con eosinofilia, a la que se asocian afectaciones del hígado, pulmón o riñón, así como anormalidades hematológicas y fiebre alta. Los medicamentos más asociados son los agentes antiepilépticos (carbamacepina, fenitoína.), alopurinol, sulfonamidas y dapsona entre otros (Pichler, 2003; Roujeau, 2005).

**Exantema fijo:**

Consiste en placas eritematosas con edema y frecuentemente se desarrolla una ampolla central. Las mucosas pueden estar afectadas. Una nueva exposición al fármaco causante provoca la lesión en la misma zona. Los fármacos más relacionados son tetraciclinas, sulfonamidas y carbamacepina (Roujeau, 2005).



**Eritema exudativo multiforme:**

Se trata de una reacción que a menudo se confunde con el síndrome de Stevens-Johnson ya que presenta lesiones ampollosas y en algunos casos las mucosas pueden estar afectadas. La causa rara vez es un fármaco y suele estar relacionada con infecciones por el virus herpes simple (Roujeau, 2005).

**Síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y Necrolisis epidérmica tóxica (TEN):**

Son las reacciones adversas a medicamentos más severas y raras, con una elevada mortalidad (30%) y una incidencia muy baja de 0,4-1,2 casos por millón de personas por año. La reacción comienza con eritema en cara y tronco, la piel afecta desarrolla ampollas y se produce un desprendimiento de la epidermis que a veces ocurre en grandes capas. Las mucosas están afectadas, generalmente de ojos, labios y genitales. En los casos más graves el deterioro puede llegar a la mucosa gastrointestinal, tráqueas y bronquios. Como consecuencia de la pérdida de la integridad de la piel, se desarrollan infecciones sistémicas como sepsis o neumonía, lo que provoca la muerte del paciente. El síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y la necrolisis epidérmica tóxica (TEN) se diferencian en el porcentaje de superficie corporal afectada. Se diagnostica como SJS cuando el desprendimiento afecta a menos del 10% de la epidermis y como TEN cuando es más del 30%. SJS y TEN pueden afectar a personas de todas las edades y razas, aunque se ha descrito que la infección por HIV o padecer lupus eritematoso sistémico son factores de riesgo. El tratamiento de estas reacciones es muy similar al aplicado en los pacientes con quemaduras terminales. Hay controversia a la hora de aplicar una terapia específica de SJS y TEN. Se ha demostrado que el uso de corticosteroides empeora la enfermedad. Se han descrito casos donde había mejora con el uso de anticuerpos contra determinadas citoquinas, el uso de ciclosporina o la plasmaferésis (Roujeau y Stern, 1994; Becker, 1998; Greenberger, 2006).

El análisis inmunohistoquímico en biopsias de piel muestra una epidermis muy fina con queratinocitos necróticos y ampollas subepidérmicas. El infiltrado inflamatorio está compuesto por células T y macrófagos. La mayoría de las células mononucleares dispuestas en la unión dermoepidérmica y en la epidermis son linfocitos T CD8+, mientras que en el infiltrado de la dermis predominan las células T CD4+ (Miyachi y cols. 1991).

En sangre periférica se observa un aumento en citoquinas de tipo Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) que se correlaciona con el curso de la enfermedad (Leyva y cols. 2000) y el sobrenadante del líquido de las ampollas contiene elevada cantidad de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y FasL (Nassif y cols. 2004b).

Existen evidencias de que los linfocitos T CD8+ específicos del fármaco causan la muerte de los queratinocitos:

1. La mayoría de las células mononucleares obtenidas de líquido de ampollas son CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> (Nassif y cols. 2002).
2. Existe un aumento de las proteínas responsables de la citotoxicidad (granzima B, perforina y FasL) en células mononucleares de sangre periférica y en biopsias de piel procedentes de pacientes en fase aguda de la reacción (Posadas y cols. 2002).
3. Experimentos “in vitro” demuestran que las células de la ampolla en presencia del fármaco son capaces de matar a los queratinocitos de forma dependiente de MHC I, y a través de las moléculas granzima B y perforina (Nassif y cols. 2002; Nassif y cols. 2004a). Por otro lado, se ha descrito que los queratinocitos entran en apoptosis tras la interacción del receptor Fas expresado en su membrana y su ligando FasL producido por las células citotóxicas (Paul y cols. 1996; Viard y cols. 1998).

## **2. MIGRACIÓN LINFOCITARIA**

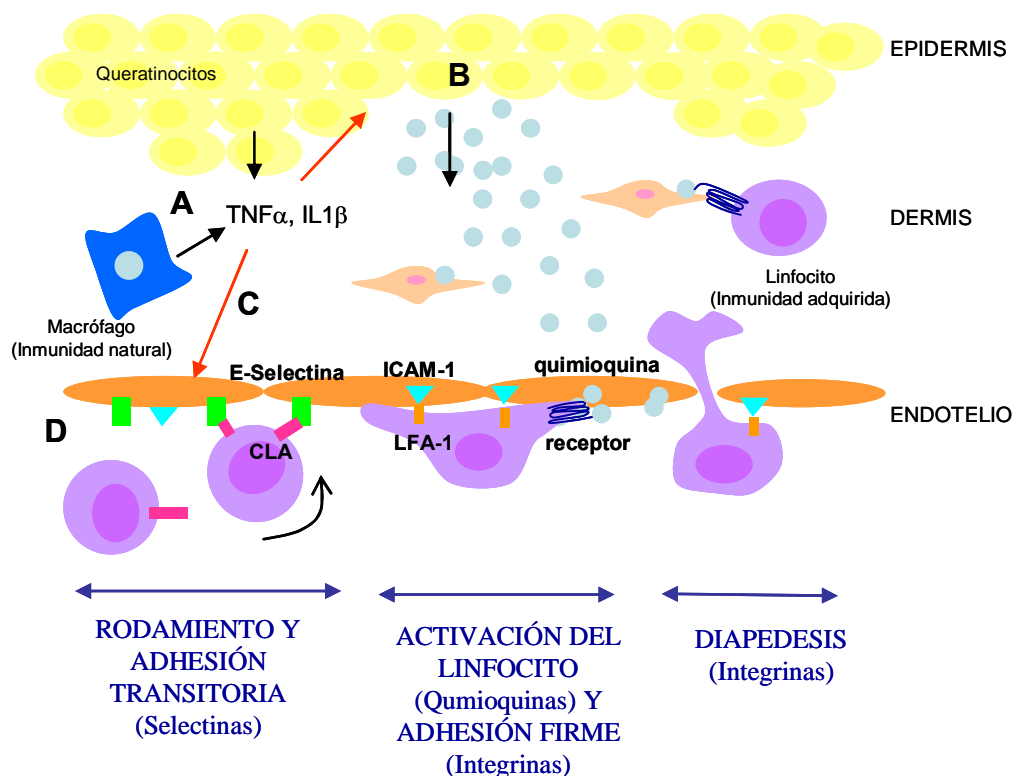
Las células del sistema inmune recirculan a través de la sangre entre los órganos linfoides y los tejidos. El proceso de extravasación es un punto crítico en la homeostasis y en la respuesta inflamatoria ya que controla el acceso de las subpoblaciones del sistema inmune a tejidos específicos. Los linfocitos vírgenes, que se caracterizan por la expresión de la molécula CD45RA y del receptor CCR7, migran hacia los órganos linfoides secundarios donde se produce la presentación antigénica y activación del linfocito. Por otro lado, las células dendríticas captan y procesan los antígenos presentes en los tejidos extralinfáticos como la piel y migran a los órganos linfoides para presentar el antígeno al linfocito virgen. Tras la activación, el linfocito se diferencia en célula efectora y de memoria (CD45RO<sup>+</sup>) y adquiere la capacidad de acceder a tejidos extralinfáticos como el epitelio intestinal y la piel. Esta capacidad se debe a la expresión en su superficie de moléculas conocidas como marcadores “homing”. Entre estos marcadores se encuentran la molécula CLA (Cutaneous lymphocyte antigen) que es característica de los linfocitos que migran a la piel, mientras que la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  se asocia a los linfocitos de memoria que migran a la mucosa intestinal (Butcher y Picker, 1996; Schon y cols. 2003).

La migración linfocitaria (Figura 1) es un proceso complejo en el que participan multitud de moléculas. Se puede dividir en los siguientes pasos (Butcher y Picker, 1996; Kunkel y Butcher, 2002; Schon y cols. 2003).

1) Comienza con un primer contacto o “tethering” del linfocito al endotelio, provocando el rodamiento de la célula a lo largo de la pared vascular. Esta primera interacción es débil y reversible, y está mediada por las selectinas. Las **selectinas** son glicoproteínas transmembrana caracterizadas por un dominio “EGF-like” y un dominio C-lectina en el extremo N-terminal por el cual interaccionan con sus ligandos, azúcares presentados en glicoproteínas transmembrana. Se han descrito tres selectinas: L-selectina que se expresa en la mayoría de los linfocitos y se une a glicoproteínas del endotelio como Spg50. P-selectina y E-selectina se expresan en la superficie del endotelio activado por citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) y se unen a motivos sial-Lewis<sup>X</sup> de glicoproteínas presentes en la superficie de los linfocitos T (Postigo y Sánchez-Madrid, 1993; Cronstein y Weissmann, 1993; Schon y cols. 2003). El receptor de “homing” a la piel CLA es una forma especializada de glicosilación de PSGL-1 (ligando de P-selectina, CD162) e interacciona con E-selectina, de forma que media el primer paso de la migración de los linfocitos T a la piel (Fuhlbrigge y cols. 1997).

2) A continuación es necesario que el linfocito se adhiera firmemente al endotelio. Esta adhesión firme sucede tras la activación del linfocito por las quimioquinas, y la interacción de las integrinas del linfocito con moléculas de adhesión del endotelio. Las **integrinas** son proteínas transmembrana formadas por heterodímeros  $\alpha\beta$ . Se clasifican en cuatro subfamilias en función de su cadena  $\beta$ . Algunas integrinas importantes en inflamación son: VLA-4 ( $\alpha4\beta1$ ) y LFA-1 ( $\alpha L\beta2$ ) que se expresan en linfocitos, Mac-1 ( $\alpha M\beta2$ ) en células mieloides y  $\alpha4\beta7$  en linfocitos que migran a mucosa intestinal. Las **moléculas de adhesión del endotelio** pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y su expresión se induce por citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1). Algunas de estas moléculas son ICAM-1 que interacciona con las integrinas Mac-1 y LFA-1, y VCAM-1 que une VLA-4 (Postigo y Sánchez-Madrid, 1993; Cronstein y Weissmann, 1993; Schon y cols. 2003).

3) Finalmente tiene lugar la diapédesis o migración transendotelial, proceso en el que participan activamente las integrinas. La migración a través del tejido se realiza mediante interacciones entre las integrinas y los componentes de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina, ácido hialurónico). Al mismo tiempo las metaloproteasas del linfocito degradan parte de estos componentes facilitando la migración (Schon y cols. 2003).



**Figura 1. Migración linfocitaria a la piel inflamada:** Los queratinocitos y los macrófagos (A) de la piel expresan citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) en respuesta a un daño o agente extraño. Las citoquinas como el TNF- $\alpha$  inducen la producción de quimioquinas por los queratinocitos (B) y activan el endotelio (C) que comienza a expresar en su superficie selectinas (selectina E) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1). Las quimioquinas se secretan a la dermis donde pueden quedar inmovilizadas sobre la superficie de fibroblastos y células endoteliales. El proceso (D) por el que los linfocitos migran de la sangre a la piel comienza con el rodamiento del linfocito sobre el endotelio, y contactos reversibles entre linfocito y endotelio mediado por selectinas; a continuación el linfocito se activa por quimioquinas y se adhiere firmemente y de forma irreversible al endotelio mediante las integrinas; finalmente se produce la diapedesis o extravasación.

## 2.1 QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas son proteínas de bajo peso molecular, aproximadamente 8-15 KDa, que se secretan al medio para regular el tráfico leucocitario. Constituyen una superfamilia que comparte una estructura terciaria similar establecida por puentes disulfuro entre residuos de cisteína conservados. Se clasifican en cuatro familias (Tabla I) atendiendo a la localización en el extremo N-terminal de motivos cisteína: CC, CXC, C y CX3C (Homey y Zlotnik, 1999; Jeremy Ono y cols, 2003). Las quimioquinas interactúan con receptores específicos que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados proteínas G. La estructura de los receptores de quimioquinas consiste en un extremo N-terminal extracelular que une el ligando, siete dominios transmembrana y un extremo C-terminal intracelular que se asocia a la proteína G heterotrimérica (Murdoch y Finn, 2000; Jeremy Ono y cols. 2003). En humanos se conocen más de 50 quimioquinas y 18 receptores. Se da un cierto grado de promiscuidad ya que algunos

receptores interactúan con más de una quimioquina y viceversa. Los receptores de quimioquinas se expresan en la superficie de la mayoría de los leucocitos: macrófagos, monocitos, linfocitos, mastocitos y eosinófilos (Moser y Loetscher, 2001). Las quimioquinas son proteínas básicas que se pueden unir a glicosaminoglicanos de la superficie celular (endotelio, fibroblastos) o a componentes de la matriz extracelular, y así quedar inmovilizadas. Estas proteínas también son capaces de formar oligómeros y gradientes de concentración. Mediante la interacción con receptores específicos presentes en la superficie de los linfocitos realizan las siguientes funciones (Kunkel y Butcher, 2002; Wong y Fish, 2003; Schon y cols. 2003):

1. Activar las integrinas y establecer la polaridad del linfocito:

Los linfocitos que comienzan a adherirse de forma transitoria al endotelio van a ser activados por quimioquinas dispuestas en la pared endotelial. La señalización por el receptor de la quimioquina induce un reordenamiento del citoesqueleto y la activación de las integrinas, lo que provoca que el linfocito adquiera una polaridad y se adhiera firmemente al endotelio.

2. Dirigir el movimiento del linfocito:

Los linfocitos van a migrar a favor del gradiente de concentración, a través de la señalización por la quimioquina que provoca los cambios de polaridad y la adhesión a la matriz extracelular.

Las quimioquinas que mantienen el tráfico leucocitario en condiciones fisiológicas y por tanto mantienen la homeostasis del sistema inmune se denominan **quimioquinas homeostáticas**. Se expresan de forma constitutiva en los órganos linfoides o en tejidos extralinfáticos como la piel o mucosas. CXCL12/SDF-1 $\alpha$  es una quimioquina que se expresa constitutivamente en múltiples tejidos, se ha relacionado con la localización y retención de las células progenitoras en la médula ósea así como en el mantenimiento general de la homeostasis por su expresión en tejidos epiteliales. Su receptor CXCR4 se expresa uniformemente por todas las células de sangre (linfocitos, monocitos, granulocitos y plaquetas) (Moser y Loetscher, 2001).

Las quimioquinas cuya expresión se induce en condiciones de inflamación se conocen como **quimioquinas inflamatorias**. Pueden expresarse por las propias células del tejido inflamado o bien por células del infiltrado en respuesta a citoquinas inflamatorias o el contacto con un patógeno. Este grupo de quimioquinas está implicado en el reclutamiento de las células efectoras del sistema inmune como monocitos, granulocitos y linfocitos T. La distinción entre quimioquina homeostática e inflamatoria no es absoluta; muchas quimioquinas pueden pertenecer a ambos grupos (Moser y Loetscher, 2001).

Tabla I. Nomenclatura de la Superfamilia de las quimioquinas (Keystone Chemokine Conference, 1999).

Nombre sistemático	Liaando humano	Liaando murino	Receptor(es)
<b>Familia CXC</b>			
CXCL1	GRO $\alpha$	GRO/ KC	CXCR2. CXCR1
CXCL2	GRO $\beta$ / MIP2 $\alpha$	GRO/ KC	CXCR2
CXCL3	GRO $\gamma$ / MIP2 $\beta$	GRO/ KC	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4	Desconocido
CXCL5	ENA - 78	LIX	CXCR2
CXCL6	GCP - 2	C $\kappa\alpha$ - 3	CXCR1 . CXCR2
CXCL7	NAP - 2	Desconocido	CXCR2
CXCL8	IL - 8	Desconocido	CXCR1 . CXCR2
CXCL9	Miq	Miq	CXCR3
CXCL10	IP - 10	IP - 10	CXCR3
CXCL11	I - TAC	Desconocido	CXCR3
CXCL12	SDF -1 $\alpha$ . SDF-1 $\beta$	SDF -1	CXCR4
CXCL13	BLC/ BCA -1	BLC/ BCA -1	CXCR5
CXCL14	BRAK/ bolequina	BRAK	Desconocido
CXCL15	Desconocido	Lunququina	Desconocido
<b>Familia CC</b>			
CCL1	I - 309	TCA - 3, P500	CCR8
CCL2	MCP - 1 / MCAF	JE	CCR2
CCL3	MIP - 1 $\alpha$	MIP - 1 $\alpha$	CCR1. CCR5
CCL4	MIP - 1 $\beta$	MIP - 1 $\beta$	CCR5
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1. CCR3. CCR5
CCL6	Desconocido	C10, MRP - 1	Desconocido
CCL7	MCP - 3	MARC	CCR1. CCR2. CCR3
CCL8	MCP - 2	MCP - 2	CCR3
CCL9 / 10	Desconocido	MRP - 2. MIP - 1 $\gamma$	Desconocido
CCL11	Eotaxina	Eotaxin	CCR3
CCL12	Desconocido	MCP - 5	CCR2
CCL13	MCP - 4	Desconocido	CCR2. CCR3
CCL14	HCC - 1	Desconocido	CCR1
CCL15	HCC-2 / Lkn-1 / MIP-1 $\delta$	Desconocido	CCR1. CCR3
CCL16	HCC-4 / LEC	LCC - 1	CCR1
CCL17	TARC	TARC	CCR4
CCL18	AMAC-1	Desconocido	Desconocido
CCL19	MIP-3 $\beta$ / ELC/ exodus-3	MIP-3 $\beta$ / ELC/ exodus-3	CCR7
CCL20	MIP-3 $\alpha$ / LARC	MIP-3 $\alpha$ / LARC	CCR6
CCL21	6Ckine/SLC/ exodus-2	6Ckine/SLC	CCR7
CCL22	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	Desconocido	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxina-2	Desconocido	CCR3
CCL25	TECK	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	Desconocido	CCR3
CCL27	CTACK	ALP/CTACK/ ESkin	CCR10
CCL28	MEC	MEC	CCR10. CCR3
<b>Familia C</b>			
XCL1	Linfotactina	Linfotactina	XCR1
XCL2	SCM-1 $\beta$	Desconocido	XCR1
<b>Familia CX<sub>3</sub>C</b>			
CX3CL1	Fractalquina	Fractalquina	CX3CR1

La **señalización** por los receptores de quimioquinas (Figura 2) es compleja, induce una serie de cascadas en donde participan numerosas proteínas. La unión de la quimioquina al receptor provoca la activación de la proteína G heterotrimérica, la cual se disocia en la subunidad  $G\alpha$ -GTP (sensible a la toxina pertúsica) y la subunidad  $\beta\gamma$ .  $G\alpha$ -GTP activa a la PI3-K (fosfoinosítidos-3-kinasa) y a la vía de las MAP-Kinasas (serin-treonin-kinasas). PI3-K activa a cdc42, Rho y Rac que son proteínas implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina y la activación de las integrinas. Las MAP-Kinasas activan factores de transcripción que están implicados en la proliferación y diferenciación celular, y en la producción de citoquinas. Por otro lado, la subunidad  $\beta\gamma$  activa la PLC (fosfolipasa C) que origina mensajeros lipídicos que median el aumento de calcio intracelular y la activación de PKC (proteína quinasa C) que participan activamente en la quimiotaxis. (Murdoch y Finn, 2000; Wong y Fish, 2003; Jeremy Ono y cols. 2003). Por último, diversos estudios han demostrado que los receptores de quimioquinas son capaces dimerizar, formando tanto homodímeros como heterodímeros. Se ha descrito que la dimerización por los receptores de quimioquinas provocada por la unión del ligando conduce a la activación de la vía de las JAKs (Janus kinasas) y STATs (signal transducer and activator of transcription), del mismo modo que ocurre con los receptores de las citoquinas con actividad tirosín-kinasa (Wong y Fish, 2003).

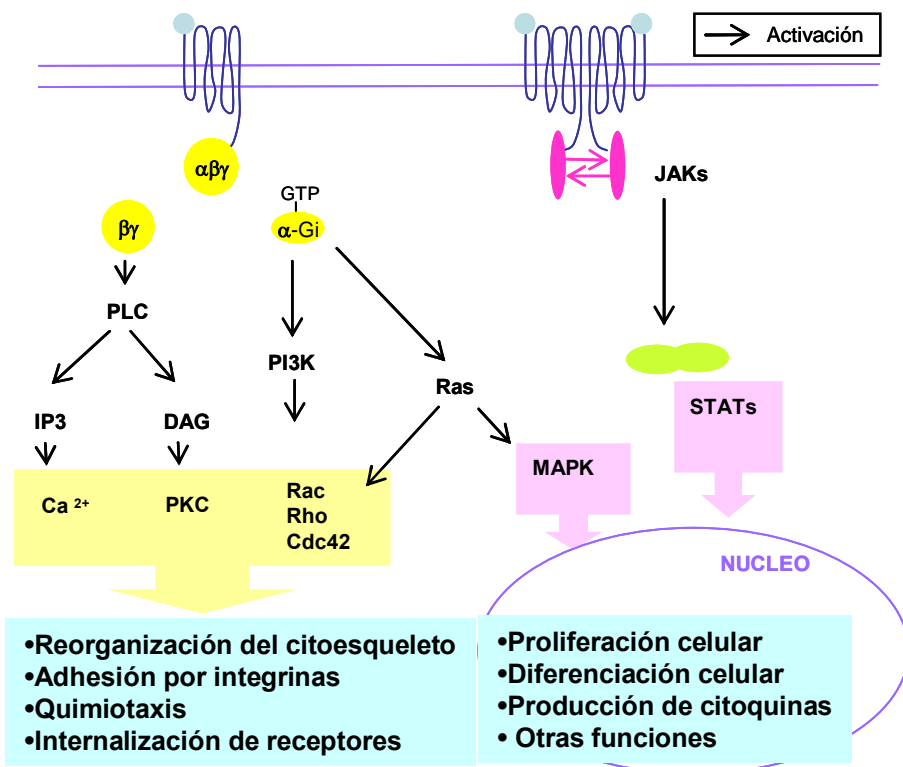


Figura 2. Señalización por receptores de quimioquinas.

Aunque la función principal de las quimioquinas es regular la migración celular también se han implicado en proliferación, diferenciación e incluso apoptosis (Wong y Fish, 2003).

### **3. QUIMIOQUINAS EN PATOLOGÍAS CUTÁNEAS**

Debido a que regulan el tráfico leucocitario y por tanto el reclutamiento de las células efectoras al foco de inflamación durante la respuesta inmune, las quimioquinas son moléculas cruciales en la patogénesis de las reacciones inflamatorias y su estudio es abordado por varios grupos de investigación para el desarrollo de dianas terapéuticas.

La psoriasis es una enfermedad cutánea crónica caracterizada por la hiperproliferación de queratinocitos, presenta un abundante infiltrado citotóxico y un patrón de citoquinas Th1 (Robert y Kupper, 2004). Muchas quimioquinas se han visto implicadas en la psoriasis, entre ellas MIP3 $\alpha$ /CCL20 (Homey y cols. 2000; D'Ambrosio y cols. 2003) y los ligandos del receptor CXCR3 (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) que atraen linfocitos Th1 (D'Ambrosio y cols. 2003). Otra reacción cutánea ampliamente estudiada es la dermatitis atópica, en la cual se distinguen un primer estadio tipo Th2 donde participan quimioquinas como RANTES/CCL5 y Eotaxina-1/CCL11 (Homey y Zlotnik, 1999; D'Ambrosio y cols. 2003), y una fase de inflamación crónica Th1 donde los linfocitos son reclutados a través de la señalización de CCR5 (D'Ambrosio y cols. 2003) y CCR8 (Gombert y cols. 2005).

Son pocos los estudios acerca de las quimioquinas que participan en la patogénesis de las reacciones de hipersensibilidad inducidas por fármacos. En reacciones alérgicas de hipersensibilidad inmediata, como el asma, se ha demostrado la implicación de las quimioquinas Eotaxina-1/CCL11 y CCL1 las cuales reclutan linfocitos CD4+ Th2 y RANTES/CCL5 que atrae a eosinófilos, mastocitos, monocitos, células NK y dendríticas (Homey y Zlotnik, 1999; D'Ambrosio y cols. 2003). Con respecto a las reacciones no inmediatas, diversos estudios han demostrado la implicación de la IL-5 y la Eotaxina-1 en la activación y reclutamiento de los eosinófilos en exantemas (Yawalkar y cols. 2000); y que la IL-8/CXCL8 atrae a los neutrófilos en la pustulosis exantemática aguda (Britschgi y cols. 2001; Padial y cols. 2004). Sin embargo, los mecanismos responsables del reclutamiento de los linfocitos T a la piel, en especial de los linfocitos T citotóxicos, están aún por elucidar.

#### **3.1 CTACK/CCL27- CCR10 y TARC/CCL17-CCR4**

Recientemente, se ha descrito que las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 representan un papel clave en la migración de linfocitos a la piel ya que ambas atraen linfocitos T CLA+.



La quimioquina **TARC (Thymus and Activation-Regulated Chemokine) /CCL17** (Imai y cols. 1996) es producida constitutivamente por células de Langerhans y células dendríticas mieloides (Lieberman y Förster, 1999; Penna y cols. 2002; Fujita H y cols. 2005). En piel inflamada TARC/CCL17 se expresa por células endoteliales de vénulas cutáneas (Campbell y cols. 1999). Las citoquinas IL-4 y TNF- $\alpha$  inducen la expresión de TARC en fibroblastos de la dermis (Fukuda y cols. 2003); y el IFN- $\gamma$  o la combinación IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  estimulan la producción en queratinocitos (Horikawa y cols. 2002; Zheng y cols, 2002). TARC/CCL17 interacciona específicamente con el receptor CCR4 (Imai y cols. 1997), el cual se expresa en la mayoría (más del 80%) de las células T CLA+ (Campbell y cols. 1999; Soler y cols. 2003); y en monocitos, dendríticas y células NK estimuladas con IL-2 (Godiska y cols. 1997). Aunque no se conoce otro receptor aparte de CCR4 que interaccione con TARC/CCL17, CCR4 también puede unir la quimioquina MDC (Macrophage-derived Chemokine)/CCL22 (Godiska y cols. 1997). MDC/CCL22 se expresa en macrófagos, células dendríticas y queratinocitos (Vulcano y cols. 2001; Horikawa y cols. 2002; Fujita y cols. 2005).

Evidencias recientes demuestran que la interacción TARC/CCL17-CCR4 representa un papel importante en el reclutamiento de los linfocitos T a la piel en diversas patologías cutáneas. En la dermatitis atópica se observa un aumento de CCR4 en células mononucleares de sangre periférica y de TARC en suero de pacientes, así como un infiltrado inflamatorio CCR4+ y la inducción de TARC en queratinocitos de piel afecta (Vestergaard y cols. 2000; Wakugawa y cols. 2001; Kakinuma y cols. 2001). La implicación de TARC en psoriasis no está tan clara. Algunos autores han demostrado un aumento de la expresión de CCR4 en piel afecta (Teraki y cols. 2004). Sin embargo, otros autores no detectan un aumento de CCR4 en sangre periférica, ni de TARC en suero de pacientes con psoriasis (Wakugawa y cols. 2001). Mediante ensayos de migración “in vitro” se ha demostrado que linfocitos T CD4+ purificados de sangre periférica de pacientes con dermatitis de contacto al níquel migran en respuesta a TARC (Sebastiani y cols. 2002). Por otro lado, linfocitos T CD4+ y CD8+ aislados de sangre periférica de pacientes con Lupus cutáneo eritematoso responden a TARC en ensayos de migración “in vitro” (Wenzel y cols. 2005).

La quimioquina **CTACK (Cutaneous T-cell Attracting Chemokine)/CCL27** (Morales y cols. 1999), también identificada como ALP/ILC/EsKine (Hromas y cols. 1999; Ishikawa-Mochizuki y cols. 1999; Baird y cols. 1999), se expresa exclusiva y constitutivamente en los queratinocitos de la piel. La producción de CTACK/CCL27 por los queratinocitos aumenta tras el tratamiento conjunto con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Morales J y cols. 1999) y según otros autores únicamente con

TNF- $\alpha$ , vía el factor de transcripción NF $\kappa$ B (Vestergaard y cols. 2005). CCR10 (Jarmin y cols. 2000) es el receptor que interacciona con CTACK, y se expresa en una subpoblación de linfocitos T de memoria (CD45RO+) CLA+ muy definida. Aproximadamente representa un 6,8% del total de linfocitos T CD4+ y apenas un 0,6% del total de linfocitos T CD8+ en individuos sanos (Hudak S y cols. 2002; Soler D y cols. 2003). La expresión del ARNm de CCR10 se ha localizado en otras células no leucocitarias como melanocitos, fibroblastos de dermis, células de Langerhans (Homey y cols. 2000;) y en otros tejidos como el intestino, colon, placas de Peyer y timo (Jarmin y cols. 2000). Los linfocitos T CCR10+ no sólo migran en respuesta a CTACK, sino que también responden a la quimioquina MEC (Mucosae-associated Epithelial Chemokine) /CCL28 (Wang y cols. 2000;), la cual se expresa en mucosas tales como tráquea, glándulas exocrinas y colon. Mientras que CTACK sólo interacciona con CCR10, MEC es también ligando del receptor CCR3 (Pan J y cols. 2000).

La interacción de CTACK/CCL27 con su receptor CCR10 se ha visto implicada en diversas patologías cutáneas. Análisis inmunohistoquímicos demuestran que CTACK/CCL27 se expresa constitutivamente en el estrato basal de queratinocitos en piel sana, y se sobreexpresa en las capas suprabasales de queratinocitos en piel afecta de dermatitis atópica y psoriasis (Homey y cols. 2000; Kakinuma y cols. 2001); así como de linfomas cutáneos (Fujita y cols. 2006). Además se detecta un aumento de CTACK/CCL27 en el suero de pacientes con estas reacciones (Kakinuma y cols. 2001; Fujita y cols. 2006). La inyección intradérmica de CTACK/CCL27 en piel de ratón provoca un aumento de las células CD3+ en el infiltrado (Homey y cols. 2000). Por otro lado, CCR10 se expresa en el 90% del infiltrado cutáneo durante la dermatitis atópica y la psoriasis (Homey y cols. 2000). También se ha descrito la expresión de CCR10 en células T procedentes de pacientes con dermatitis de contacto al níquel (Moed y cols. 2004). CCR10 participa en el desarrollo de melanomas (Murakami y cols, 2003), y se expresa en linfomas T cutáneos (Notohamiprodjo y cols. 2005; Fujita y cols. 2006).

Estudios realizados con modelos murinos de hipersensibilidad no inmediata han demostrado la importancia tanto de TARC/CCL17 como de CTACK/CCL27 en el reclutamiento de linfocitos T a la piel (Reiss Y y cols. 2001, Homey y cols. 2002). En individuos sanos se ha descrito que un gran porcentaje de linfocitos T CCR10+ expresan CCR4 (Soler y cols. 2003), lo que explica que en ensayos “in vitro” de quimiotaxis se haya observado que las células CCR10+ son capaces de migrar en respuesta no sólo a CTACK/CCL27 sino también a TARC/CCL17 (Hudak y cols, 2002). En piel afecta de dermatitis atópica se detectan linfocitos CCR10+ CCR4+ que producen IL-2 e IL-4 (Vestergaard y cols. 2003). Además células T reactivas al níquel procedentes de pacientes con dermatitis de contacto son CCR10+ CCR4+ CXCR3+ y expresan tanto citoquinas

Th1 como Th2 (Moed y cols. 2004). Por otro lado, TARC/CCL17 aumenta la producción de CTACK/CCL27 inducida por TNF- $\alpha$  en queratinocitos (Vestergaard y cols. 2004a; Vestergaard y cols. 2004b). Todo ello apunta a una cooperación entre CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en el reclutamiento de linfocitos T a la piel.

#### 4. PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DEL ARNm DE CTACK/CCL27

Se ha descrito en ratón una forma truncada de CTACK/CCL27, llamada PESKY ( Baird y cols. 1999), que se genera por un “splicing” o procesamiento alternativo del ARN mensajero (Figura 3). El ARNm de PESKY carece del exón que codifica el péptido que señala la secreción de CTACK/CCL27, y en su lugar se encuentra un exón no presente en el ARNm de CTACK. PESKY se localiza en el núcleo y se expresa principalmente en testículos, cerebro y corneas de ratón adulto (Baird y cols. 1999; Ledee y cols. 2004). Se ha demostrado que los aminoácidos implicados en la translocación al núcleo de PESKY se encuentran en la región C-terminal que comparten CTACK/CL27 y PESKY, de tal modo que la forma truncada de CTACK/CCL27 que carece del péptido que señala la secreción es capaz de translocarse al núcleo (Gortz y cols. 2002). En humanos, aún no se ha descrito el homólogo de PESKY pero sí se ha encontrado que la region C-terminal de CTACK/CCL27 presenta aminoácidos básicos conservados en las mismas posiciones que los estudiados en ratón; y ensayos de internalización en la línea celular L1.2-CCR10 han demostrado que CTACK/CCL27 humana se transloca al núcleo después de la interacción con su receptor (Gortz y cols. 2002).

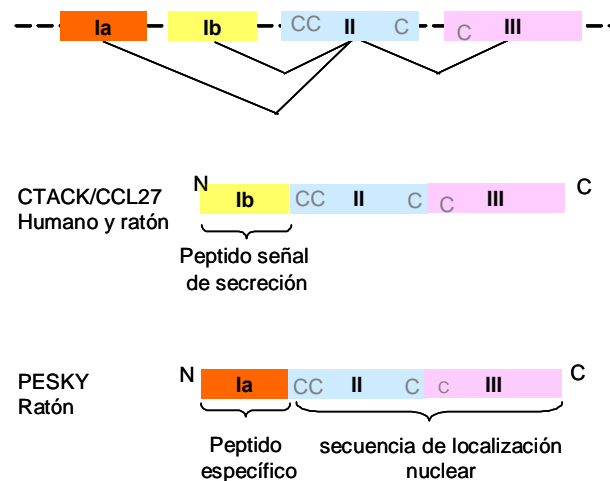


Figura 3. Esquema de la secuencia génica que codifica PESKY y CTACK/CCL27.

## ***Objetivos***

1. Análisis de la expresión génica de las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17, y de sus receptores CCR10 y CCR4 en biopsias de piel procedentes de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.
2. Detección de la proteína CTACK/CCL27 en piel y en suero de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.
3. Análisis de la expresión génica, expresión de proteína y funcionalidad de los receptores CCR10 y CCR4 en células mononucleares de sangre periférica procedentes de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.
4. Análisis de la respuesta migratoria frente a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ de linfocitos T de sangre periférica procedentes de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.
5. Análisis de la localización subcelular y de las alteraciones en la expresión génica inducidas por una forma no secretada de CTACK/CCL27 (CTACKb).

## ***Materiales y métodos***

## **1. SELECCION DE PACIENTES. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y PIEL**

Un total de 52 pacientes (Tabla II) con reacciones de hipersensibilidad retardada inducidas por medicamentos fueron evaluados y seleccionados en el Servicio de Alergia y en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario La Paz, Madrid. En todos los casos los síntomas aparecieron 24 horas o más tarde desde la administración del fármaco, y se resolvieron una vez eliminado el medicamento. De acuerdo a la clasificación más aceptada (Roujeau y cols. 2005) las reacciones estudiadas comprendieron: urticaria (6 casos), exantema maculopapular (32 casos), DRESS (3 casos), eritema exudativo multiforme (1 caso), síndrome de Steven-Johnson (7 casos), y necrólisis epidérmica tóxica (2 casos). Las muestras de sangre periférica y las biopsias de piel procedentes de los pacientes se obtuvieron al inicio de la reacción, y en algunos casos se obtuvo una segunda muestra 1-2 meses después de la reacción, una vez resuelto el cuadro clínico. Ninguno de los pacientes recibió corticoides antes de la obtención de muestras. El líquido de las ampollas, en los pacientes con síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica, se obtuvo mediante aspiración con jeringa de insulina. Las muestras de sangre periférica de individuos sanos anónimos se obtuvieron del Banco de Sangre del Hospital La Paz. Las muestras de piel sana se obtuvieron de intervenciones de cirugía plástica. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital La Paz, y todas las muestras se obtuvieron tras el consentimiento informado de los pacientes.

## **2. EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-PCR CUANTITATIVA**

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (*Pharmacia*). Las células mononucleares del líquido de ampolla se obtuvieron por centrifugación. A partir de 5 millones de células se extrajo ARN total con 1 ml de TriReagent (*Molecular Research Center, Inc*) según las instrucciones del fabricante y el método previamente descrito (Chomczynski y Sacchi, 1987). El ARN de piel fresca se extrajo en TriReagent con ayuda de Ultra Turax T 8.01 (*Ika Labortechnik*). Los cortes de piel parafinada de 5 µm se recogieron en portas; se desparafinaron en xylol, se lavaron en etanol y finalmente se rehidrataron en agua destilada. El ARN total se extrajo del tejido con TriReagent. Todos los ARN se trataron con ADNasa I (*Roche*) para eliminar el posible ADN genómico y fueron cuantificados en un espectrofotómetro. A continuación se procedió a la retrotranscripción de 1 µg de ARN total mediante la incubación con el enzima transcriptasa inversa AMV de *Roche* durante 1 hora a 42°C para obtener el ADN complementario (ADNc). La cuantificación de los niveles de expresión génica de las quimioquinas CTACK, TARC y SDF-1α; y de sus respectivos receptores CCR10, CCR4 y CXCR4; así como de RuvB-like 2, DDB1, RAB6C y CEP57 se

realizó mediante la amplificación de los ADNc en el equipo Light Cycler (*Roche*) con el kit FastStart DNA Master SYBR Green I (*Roche*). Los oligonucleótidos que se usaron fueron: **CTACK** (117pb) 5'-CTG TAC TCA GCT CTA CCG AAA GC-3' y 5'-AGC CAG GTG AAG CAC GAA AGC C-3', **TARC** (133pb) 5'-AGG GAC CTG CAC ACA GAG AC-3' y 5'-CTC GAG CTG CGT GGA TGT GC-3', **SDF-1 $\alpha$**  (179pb) 5'- ATG AAC GCC AAG GTC GTG GTC-3' y 5'- ACA ATC TGA AGG GCA CAG TTT G-3', **CCR10** (132pb) 5'- CCA CAG AGC AGG TTT CCT GG-3' y 5'- GGG AGA CAC TGG GTT GGA AG-3', **CCR4** (96pb) 5'- CAG AAA AGC AAG AAG CTG CTT CTG-3' y 5'- CGA GGG TGG TAT CTG CTA TAT C-3', **CXCR4** (270pb) 5'-ATG GAG GGG ATC AGT ATA TAC AC-3' y 5'- GCG TGA TGA CAA AGA GGA GGT C-3'; **RuvB-like 2** 5'- CAA CCG TTA CAG CCA CAA CC-3' y 5'- TGG CCA GCA ATA AGG ACT GC-3'; **DDB1** 5'- TGC GTG ACC GGA CAC TTT AC-3' y 5'-GAT GTT GAA GGC CTT GAG TTC-3'; **RAB6C** 5'- TCC TCT AGT TCC ACC ATG TCC-3' y 5'- AAT GAG GCT ACG GAG ACG TTC-3'; **CEP57** 5'- CAC TTG TCG AAC AGC TTT GCT G-3' y 5'- TTC TTC TGC CTG AAT CCT CTC-3';  **$\beta$ -2-microglobulina** (300pb) 5'- CCA GCA GAG AAT GGA AGG TC- 3' y 5'-GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG-3'.

La cuantificación del número de moléculas de ARN mensajero específico se obtuvo en el programa Light Cycler (*Roche*) mediante la interpolación en una recta patrón previamente realizada con cantidades conocidas de plasmidos que contienen la secuencia del ADNc de CTACK, TARC, CCR10 y CCR4, o bien de productos de PCR cuantificados y específicos de  $\beta$ -2-microglobulina, CXCR4, SDF-1 $\alpha$ , RuvBlike 2, DDB1, RAB6C y CEP57. El número de moléculas de ARNm por  $\mu$ l de ADNc se normalizó con respecto al número de moléculas de ARNm de  $\beta$ -2-microglobulina/ $\mu$ l ADNc de la misma muestra.

### **3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO**

Las biopsias de piel se fijaron en formalina 10%, se procesaron y embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 5 $\mu$ m que se dispusieron en portas, se desparafinaron en xylol, se hicieron varios lavados en etanol de concentraciones decrecientes (100°C, 96°C, 80°C y 70°C) y finalmente se rehidrataron en agua destilada. A continuación se procedió a la tinción de la proteína CTACK/CCL27 siguiendo el siguiente protocolo: (1) Se inactivó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno y metanol en proporción 1:50 durante 10 minutos; seguido de un lavado con PBS de 15 minutos. (2) Se bloqueó en cámara húmeda con PBS 1% BSA 0,1% Tritón durante 1 hora a temperatura ambiente. (3) Se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-hCTACK (124302; IgG2a; R&D Systems) a 2,5  $\mu$ g/ml en PBS1% BSA 0,1% Tritón,



durante 24 horas a 4°C. (4) Después de lavar en PBS (15 minutos), se añadió un anticuerpo universal biotinilado seguido de Streptavidina-peroxidasa (*Vectastain universal quick kit; PK8880: VECTOR Laboratorios, Inc*). Las incubaciones con el anticuerpo secundario y la peroxidasa se realizaron a T° ambiente durante 20 minutos. (5) La tinción se detectó con 3-3'-Diaminobencidina (10 minutos a temperatura ambiente) (*SK4100: VECTOR Laboratorios, Inc*). Todos los lavados correspondientes se realizaron en PBS durante 15 minutos. (6) Finalmente, los cortes de piel se incubaron en hematosilina (1-2 minutos) para la tinción de contraste; y a continuación se fijaron en concentraciones crecientes de etanol (70°C, 80°C, 96°C y 100°C) y xylol.

#### **4. ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY)**

La detección de la proteína CTACK/CCL27 en el suero y en el fluido de ampolla se realizó mediante *Human CTACK/CCL27 Duo Set ELISA Development kit (# DY376, R&D Systems)* siguiendo las instrucciones del fabricante. El suero se obtuvo por centrifugación a partir de sangre periférica procedente de pacientes y donantes sanos. El líquido de las ampollas, en los pacientes con síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica, se obtuvo mediante aspiración con jeringa de insulina y posterior centrifugación.

Se aplicaron 2µg/ml del anticuerpo de ratón anti-hCTACK/CCL27 (*R&D Systems*) en placas de 96 pocillos y se incubó toda la noche. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS 0,05% Tween® 20, y se bloquearon en PBS 1%BSA, pH 7,2-7,4 (*# DY995, R&D Systems*) durante 1 hora. A continuación se añadieron las muestras de suero diluidas ½ y diluciones seriadas Standard (0, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 pg/ml) de la proteína recombinante humana CTACK/CCL27(*R&D Systems*). Se incubaron 2 horas, se lavaron los pocillos y se añadió 50ng/ml del anticuerpo de cabra biotinilado anti-hCTACK/CCL27 (*R&D Systems*) que se incubó durante otras 2 horas. Tras los lavados correspondientes, se añadió peroxidasa conjugada con streptavidina (*R&D Systems*). Tras 20 minutos de incubación, los pocillos se lavaron y se añadió 1-Step™ Ultra TMP-ELISA (*#34028; Pierce*). La reacción de la peroxidasa se paró con ácido sulfúrico 2N y la absorbancia se midió a 450nm. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

## **5. ENSAYOS DE QUIMIOTAXIS**

La migración linfocitaria se evaluó en Transwell® de 24 pocillos con filtros de policarbonato con poros de 5µm de diámetro (*Corning, Costar*) según el método descrito anteriormente (Pan y cols. 2000; Wright y cols. 2003; Ottaviani y cols. 2006). Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica o del líquido de las ampollas se dispusieron en la cámara superior resuspendidas en RPMI (*Gibco*) suplementado con 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA) (*Sigma*) a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml en un volumen final de 100µl. Las quimioquinas recombinantes hCTACK (*R&D Systems*), hTARC y hSDF-1α (*Preprotech EC*) fueron añadidas en la cámara inferior del transwell en un volumen final de 600µl. Después de 1 hora de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, se recogió todo el medio de la cámara inferior. A continuación el número de linfocitos, migrados a través del filtro hacia la cámara inferior, se contaron durante un minuto en un citómetro de flujo FACScalibur (*Becton-Dickinson*) definidos según los parámetros de SSC y FSC. La especificidad de la migración se evaluó con anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-hCTACK y anti-hTARC (*R&D Systems*) que se añadieron junto a las quimioquinas respectivas en la cámara inferior del transwell.

## **6. CITOMETRÍA DE FLUJO**

Las células mononucleares de sangre periférica y del líquido de ampolla así como las células que migraron en respuesta a las quimioquinas fueron analizadas por citometría de flujo. Las células fueron teñidas con los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón: anti-hCD3 conjugado con PerCP, anti-hCD4 conjugado con FITC, anti-hCD8 conjugado con PE, anti-hCLA conjugado con FITC, anti-hCD45RO conjugado con PE y un anticuerpo de control de isotipo de ratón IgG1/IgG2-FITC, PerCP, PE (*BD Biosciences*). El análisis de la expresión de CCR4 se realizó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-hCCR4 (*R&D Systems*) seguido de un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con FITC (*DAKO*). Para el análisis de la expresión de CCR10 las células se permeabilizaron previamente con FACS™ Permeabilizing Solution 2 (# 340973, *Becton-Dickinson*) durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se teñieron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-hCCR10 (*Imgenex*) seguido de un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con PE (*Jackson ImmunoResearch*). El análisis se realizó con cinco parámetros (FSC, SSC y tres colores PerCP, PE y FITC) en un citómetro de flujo FACScalibur y programa ProQuest (*Becton-Dickinson*).

## **7. SEPARACIÓN MAGNÉTICA Y SEPARACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

Las células mononucleares de sangre periférica obtenida por centrifugación en gradiente de densidad (*Ficoll, Pharmacia*), se deplecionaron de células CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup> mediante la incubación con anticuerpos monoclonales de ratón anti-hCD16 y anti-hCD14 seguidos de microesferas magnéticas asociadas a anti-IgG de ratón (*Miltenyi Biotec*). A continuación, la población restante se incubó con microesferas magnéticas asociadas a anti-hCD8 (*Miltenyi, Biotec*). Las fracciones resultantes de la separación se analizaron por citometría de flujo obteniendo un 90% de pureza de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Todas las separaciones magnéticas se realizaron en el sistema AutoMACS (*Miltenyi, Biotec*). Las células mononucleares de sangre periférica procedentes de un paciente con síndrome de Stevens-Johnson en fase aguda se tiñeron con los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón: anti-hCD3 conjugado con PerCP, anti-hCD4 conjugado con FITC, y anti-hCD8 conjugado con PE (*BD Biosciences*); y se separaron en un citómetro de flujo FACS-Vantage (*Becton-Dickinson*). Se obtuvieron las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con una pureza mayor del 95%.

## **8. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON EGFP**

La secuencia del ADNc completo (357pb) de CTACK/CCL27 se obtuvo mediante RT-PCR a partir de ARN total de piel fresca de donante sano. Los oligonucleótidos que se usaron fueron: 5'-GAG TCT AGG CTG AGC AAC ATG-3' y 5'-TAC CCA ATG CTG CTT TAT TAT TTG-3'. El producto de PCR se clonó en el plasmido pCR<sup>®</sup>-2.1 (*Invitrogen*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*TA Cloning<sup>®</sup>, Invitrogen*). Se transformó en *E.coli* TOP10 F (*Invitrogen*) por choque térmico, y las colonias se seleccionaron en medio LB con X-gal, IPTG y ampicilina. Se purificó el plásmido y la naturaleza del inserto se verificó mediante el patrón de digestión enzimática y secuenciación. A partir de pCR<sup>®</sup>-2.1 -CTACK se amplificaron por PCR las secuencias del ADNc completo de CTACK/CCL27 "CTACK" (357pb) y la secuencia de una forma alternativa que llamamos "CTACK-b" (279pb), en marco de lectura con la secuencia de EGFP presente en los plásmidos pEGFP-N1 y pEGFP-C1 (*Clontech Laboratories*). Los oligonucleótidos usados fueron: 1) CTACK (para la fusión con EGFP en extremo N-terminal) 5'- GCT AAG CTT CTG AGC AAC ATG AAG GG-3' y 5'- CAA GGA TCC TGG GGG CTT CAG CC-3'. 2) CTACK/A (para la fusión con EGFP en extremo C-terminal) 5'- GCT TAA GCT TTC CTA CTG CCA CC-3' y 5'- CAA GGA TCC CTA TTG GGG GCT TCA-3'. Los productos de PCR resultantes se purificaron del gel de agarosa con UltraClean™ 15 DNA Purification kit (*MO BIO Laboratorios, Inc*) y se digirieron con Hind-III y Bam-HI (*Roche*) durante 1 hora a 37°C. Los insertos y los vectores digeridos fueron purificados del gel de

agarosa. La ligación con el vector se realizó mediante la incubación con T4-ADNligasa (*Roche*) a 14°C durante toda la noche. El producto de la ligación se transformó en *E.coli* DH5 $\alpha$  competentes. Las colonias se seleccionaron por resistencia a kanamicina, y se analizaron mediante PCR y patrón de digestión con Hind-III y BamHI. Finalmente las construcciones obtenidas se secuenciaron.

## **9. SECUENCIACIÓN**

Los plásmidos se purificaron con “High pure plasmid isolation kit” (*Roche*) y se cuantificaron en un espectrofotómetro. La amplificación por PCR de la secuencia se realizó en un volumen final de 10 $\mu$ l con : 2 $\mu$ l de BigDye® Terminator v 3.1 (*Applied Biosystems*) , 1  $\mu$ l de oligo (M13 reverso, promotor T7 ó primer interno) a 25ng/ $\mu$ l, 200ng de plásmido y agua mili-Q. La reacción de PCR consistió en : 3 min-94°C; 25 ciclos (20sg-94°C, 15sg-55°C, 4min-60°C); 15min-72°C; 4°C. La secuencia amplificada se precipitó con etanol 95% y acetato sódico pH 5,2 3M durante 15 minutos a -20°C. Se lavó con etanol 70% frío. La secuencia fue procesada en ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer de *Applied Biosystems*.

## **10. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIÓN**

Las células COS-7 (línea epitelial de riñón de mono) e IMR-90 (línea de fibroblastos de pulmón fetal humano) se cultivaron en medio DMEM (*Cambrex*) con 10% suero fetal bovino (FCS) (*Cambrex*).

### **Transfección transitoria en COS-7 con DEAE-Dextrano:**

Las construcciones pEGFP-CTACK-b (5  $\mu$ g), pEGFP-CTACK (10 $\mu$ g), el vector pEGFP-N1 (2,5  $\mu$ g) (*Clontech Laboratorios*) y pSLV-SHP-1 (5  $\mu$ g) (cedido por el Dr. Zhi HuiXie, NIH, Bethesda) se transfectaron en la línea celular Cos-7 mediante el siguiente protocolo: Las células a un 60% de confluencia se lavaron con DMEM sin suero, y a continuación se añadió en cada pocillo la mezcla de transfección (5ml/p100) que contiene: DEAE-Dextrano (*Sigma*) 50mg/ml en PBS, Cloroquina (*Sigma*) 10mM en PBS, y el ADN diluido a 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l en PBS. Se incubaron 2-4 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta que se verifica al microscopio la formación de vesículas lisosomales. Transcurrido dicho tiempo, se retiró el medio y se añadió 5ml de DMSO 10% en PBS durante 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con PBS tres veces para eliminar restos de DMSO, y se incubaron 48 horas en DMEM 10 % FCS hasta su análisis por citómetro de flujo y microscopía. Se obtuvo un 30% de eficiencia para pEGFP-N1 y aproximadamente un 15% para las construcciones con EGFP.

### **Transfección transitoria en IMR90 con fosfato cálcico:**

Por cada placa p100, con células IMR90 sembradas al 80% de confluencia, se añadió 1ml de la mezcla de transfección que contiene pEGFP-CTACK-b (30µg) ó el vector pEGFP-N1 (10µg), CaCl<sub>2</sub> 2M, y HBS pH 7,1 ( NaCl, Hepes, Bifosfato sódico) en 6ml de medio DMEM 10% SFB. Se incubó toda la noche a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se retiró el medio y las células se lavaron en PBS. Se incubaron 24 horas en DMEM 10% FCS. La transfección se verificó por citometría de flujo obteniéndose una eficiencia  $\geq 30\%$ .

### **11. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA NUCLEAR Y CITOSÓLICA**

Se recogieron las células COS-7 transfectadas y se lavaron dos veces en PBS frío. Se resuspendieron en 400µl de buffer A (10mM Tris HCl pH 7,5, 10mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 2µg/µl leupeptina, 1mM PMSF) y 10µl de NP40 10% por 20x10<sup>6</sup> células. Se incubaron 5 minutos en hielo y seguidamente se centrifugaron a 9000 rpm, 1 min para obtener los núcleos. El sobrenadante corresponde al extracto citosólico, que se centrifugó a 9000 rpm durante 15 min para eliminar restos y se guardó a -80°C. Los núcleos se lavaron con 1ml de buffer A, el sobrenadante se retiró con una jeringa y los núcleos se resuspendieron en 50µl de buffer B (20mM Hepes pH 7,9, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 25% glicerol, 0,5 mM DTT, 2µg/µl leupeptina, 0,5 mM PMSF). Se lisaron en agitación a 4°C durante 15 minutos. Tras una centrifugación a 9000 rpm de 20 min, se recogió el sobrenadante que contiene la proteína nuclear y se añadió el mismo volumen de buffer C (20mM Hepes pH 7,9, 0,1 M KCl, 0,1mM EDTA, 20% glicerol, 0,5 mM DTT, 2µg/µl leupeptina, 0,5 mM PMSF). Los extractos de proteína nuclear y citosólica se cuantificaron en un espectrofotómetro mediante el método Bradford (Bradford MM, 1976) con Bradford Protein Assay (*Bio-Rad*) y extrapolación de una recta patrón con BSA.

### **12. WESTERN-BLOT**

Un total de 10 µg de proteína de los extractos nucleares y citosólicos con el mismo volumen de buffer Laemmli 2X (0,125 M Trizma-HCl pH6,8, 4%SDS, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol) se incubó a 100° C y se cargó en un gel SDS-PAGE al 12 % de acrilamida en condiciones no reductoras. La electroforesis se realizó en Tris Glicina/ 1%SDS a 100V. La transferencia de las proteínas a la membrana de nylon (*PALL, Gelman Laboratory*), previamente incubada con metanol 100% y agua destilada, se realizó en Tris Glicina / 20% metanol durante 1 hora a 200 mA. La membrana se bloqueó durante un mínimo de 2 horas con PBS 5% leche

desnatada 0,05% Tween20 a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario: 1µg/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFP (*sc-9996, Santa Cruz Biotechnology, Inc*), 1µg/ml del anticuerpo monoclonal de ratón anti-pJNK (*sc-6254, Santa Cruz Biotechnology, Inc*), ó 1µg/ml de anticuerpo policlonal de conejo anti-SHP-1 (*sc-287, Santa Cruz Biotechnology, Inc*) ; diluido en PBS y un 10% de la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. La membrana se lavó dos veces, 10 min, en PBS 0,01% Tween 20 y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (*PALL, Gelman Laboratory*) ó el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (*Chemicon International*), durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la oscuridad. Tras dos lavados en PBS 0,01% Tween 20 y un último lavado en PBS se procedió al revelado de la membrana. La detección del anticuerpo se realizó por reacción quimioluminiscente de la peroxidasa con LumiGlo® (*PALL, Gelman Laboratory*) o con Lumigen™ –TMA-6 (Amersham Biosciences) para una detección más sensible.

### **13. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

Las células COS-7 se transfectaron con pEGFP-CTACK, pEGFP-CTACK-b y el vector vacío pEGFP-N1. Tras 48 horas se recogieron y se sembraron sobre cristales de 12mm de diámetro, esterilizados previamente con radiación UV, a una densidad de 50.000 a 100.000 células/cristal. Se incubaron en DMEM 10% SFB toda la noche y al día siguiente se procedió a la tinción. La detección de actina-F se realizó mediante el siguiente protocolo: Se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS dos veces. Las células se fijaron en metanol frío (-20°C) durante 2 min, se lavaron en PBS y se incubaron con Tritón 0,5% durante 5 min. A continuación se incubó con faloidina (marcada con rodamina), a 37°C durante 15 min. Se lavó con PBS tres veces para eliminar restos. La tinción de los núcleos se realizó tras la tinción de la actina o bien después de fijar con metanol. Para ello, las células se incubaron con Ho33258 (5 µg/ml) durante 3 min, o bien con Ioduro de propidio (1µg/ml) durante 5 min a temperatura ambiente y se lavó con PBS. Los cristales se montaron con Mowiol sobre portas. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (*Leica microsistemas, SA*) y se analizaron las imágenes con CytoVision® (*Applied Imaging*).

### **14. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE ARRAYS DE ADNc**

Se extrajo ARN total de células IMR-90 transfectadas de forma transitoria bien con EGFP-CTACK-b o bien con el vector pEGFP-N1. A partir de de 50 µg de ARN total se obtuvo el ARNm (poliA<sup>+</sup>) con *Oligotex Direct mRNA kit (Quiagen)*. El ARNm(poliA<sup>+</sup>) se convirtió a

ADNc marcado con  $^{33}\text{P}$ -dATP mediante *BD Atlas™ Pure Total RNA Labeling System* y se purificó con *BD Atlas™ Nucleospin extraction kit (BD Biosciences Clontech)*. La sonda (ADNc) marcada se hibridó con la membrana *BD Atlas™ Plastic Human 12K Microarray (# 634811, BD Biosciences Clontech)* en solución de hibridación (*BD PlasticHyb™ Hybridation solution*) durante toda la noche a 60°C en agitación. La membrana se lavó dos veces (5 min) con SSC 2X/SDS 0,1% a 58°C; dos veces (5min) con SSC 0,1X/ SDS 0,1% a 58°C y dos veces (5min) con SSC 0,1X a temperatura ambiente; se secó y se expuso durante 7 días . La hibridación se reveló en un phosphorimager (*Cyclone, Packard*) y se analizó mediante Phoretix array software (*Nonlinear Dynamics Inc, UK*).

## **15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En los datos que permitieron aplicar análisis estadístico se representa el valor de la media  $\pm$  Desviación Standard. Se aplicó el test paramétrico de *t*-Student o el test no paramétrico U-Mann-Whitney para comparar las medias de variables continuas según el caso. La hipótesis de la normalidad se verificó con el test de de Kolmogorov-Smirnov. En todos los casos se consideró la diferencia estadística cuando el valor de *p* fue menor que 0,05.

Tabla II. Pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata a fármacos incluidos en el estudio

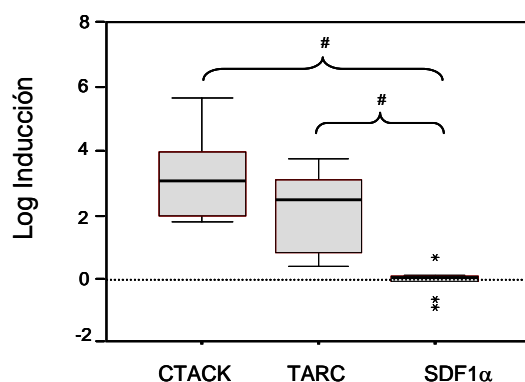
Nº	SEXO	ENTIDAD CLÍNICA	FÁRMACO CAUSANTE	Q-PCR PIEL	Q-PCR PBMCs	Citometría receptores	ELISA	Inmunohistoquímica	Migración CTACK	Migración TARC
<b>Reacciones ampollosas</b>										
1	V	SJS	Estatina							
2	M	SJS	Fenitoína							
3	M	TEN	Eritromicina, Acetaminofeno							
4	M	SJS	Ibuprofeno, Espiramicina y Metronidazol							
5	M	SJS	Desconocido							
6	V	TEN	Ibuprofeno							
7	M	SJS	Piroxicam							
8	M	SJS	Fenitoína							
9	V	SJS	Desconocido							
<b>Reacciones exantemáticas</b>										
10	V	MPE	Fenitoína							
11	M	Urticaria	Clindamicina							
12	V	Exantema fijo	Sulfometosazol							
13	V	MPE	Metamidazol							
14	M	MPE	Fenitoína							
15	M	MPE	Varios							
16	V	MPE	Zyloric			CCR10				
17	V	MPE	Carbamacepina							
18	M	MPE	Amoxicilina			CCR10				
19	V	MPE	Eritromicina							
20	M	MPE	Amoxicilina							
21	M	MPE	Sulfosalacina			CCR10				
22	M	MPE	Desconocido							
23	M	Urticaria	Diltiazem							
24	M	Urticaria	Diclofenac							
25	V	MPE	Hidantoina							
26	M	MPE	Fenitoína							
27	M	Urticaria	Aciclovir							
28	M	DRESS	Pseudoefedrina							
29	V	MPE	Nolotil							
30	V	MPE	Fenitoína							
31	V	MPE	Carbamacepina							
32	V	MPE	Uvofloxacin							
33	M	Eritema exudativo	Amoxicilina e Ibuprofeno							
34	M	DRESS	Alopurinol							
35	M	MPE	Alopurinol							
36	V	MPE	Tegretol							
37	M	MPE	Varios							
38	V	MPE	Desconocido							
39	M	MPE	Desconocido							
40	M	MPE	Clindamicina							
41	V	MPE	Alopurinol							
42	M	DRESS	Antihipertensivos y/o hipolipemiantes							
43	M	MPE	Nolotil y Clindamicina							
44	V	MPE	Nolotil							
45	M	MPE	Nolotil y/o Respiridona							
46	V	MPE	Carbamacepina							
47	V	MPE	Desconocido			CCR10				
48	V	MPE	Desconocido			CCR10				
49	V	MPE	Metronidazol							
50	M	Urticaria	Amoxicilina y ácido clavulánico							
51	M	MPE	Nolotil							
52	V	Urticaria	Amoxicilina y ácido clavulánico							



## *Resultados*

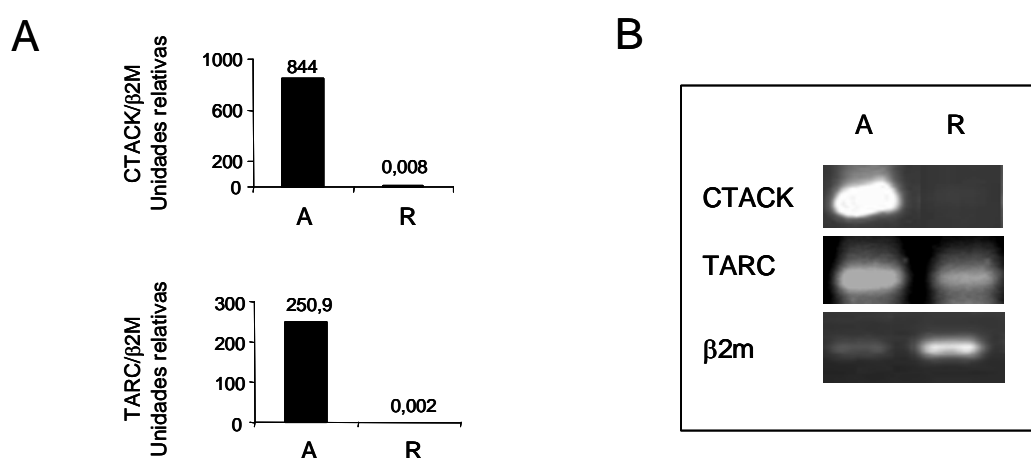
## 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS QUIMIOQUINAS CTACK/CCL27 Y TARC/CCL17, Y SUS RECEPTORES CCR10 Y CCR4 EN PIEL AFECTA

En las reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos se ha descrito una implicación de los linfocitos T, siendo esta población la mayoritaria del infiltrado celular presente en la piel inflamada (Roujeau, 2005). Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos implicados en el reclutamiento de linfocitos T a la piel afectada de estas patologías. Recientemente las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 se han identificado como mediadores clave en la migración específica al tejido cutáneo debido a la expresión de sus receptores en linfocitos T CLA+. Con el objetivo de estudiar si las interacciones CTACK/CCL27-CCR10 y TARC/CCL17-CCR4 pudieran estar implicadas en el reclutamiento de linfocitos T a la piel durante la patogénesis de estas reacciones, analizamos en primer lugar la expresión génica de dichas quimioquinas y de sus receptores en piel afectada.



**Figura 4. Análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión génica de las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en biopsias de piel afectada de reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.** Se extrajo el ARN total de biopsias de piel fresca procedentes de un total de 12 pacientes con diversas entidades clínicas: SJS, MPE, eritema exudativo multiforme y DRESS (pacientes nº 8, 28, 30-38, 40; ver tabla II). Los niveles de expresión de CTACK y TARC se detectaron mediante RT-PCR cuantitativa. El número de moléculas de ARNm del gen específico se normalizó con respecto al nº de moléculas de  $\beta$ -2-microglobulina de la misma muestra. Se representan los valores de inducción de la expresión, calculados como el cociente entre el nivel de expresión de quimioquina en piel afectada de cada paciente y el nivel de expresión en piel sana (media de tres donantes sanos). La cuantificación de la quimioquina SDF1 $\alpha$  se realizó como control. Se efectuó un análisis estadístico de los datos aplicando el test de *t*-Student. # Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ).

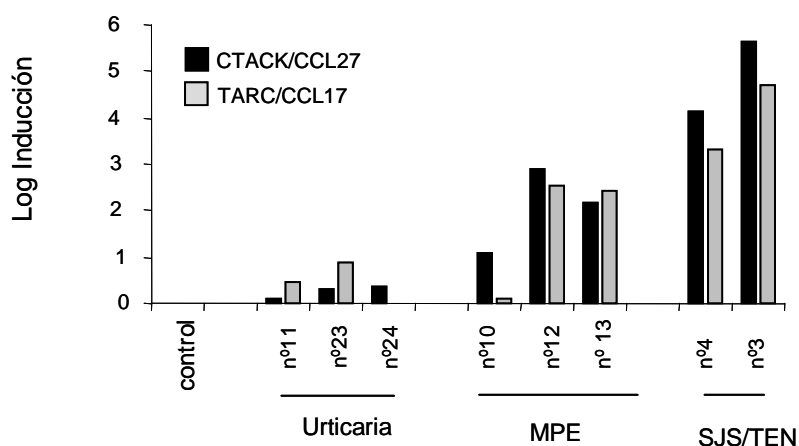
En la figura 4 se muestra el análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en biopsias de piel procedentes de pacientes con síndrome de Stevens-Johnson, exantema maculo-papular, DRESS (Drug-induced reaction with eosinophilia and systemic symptoms) y eritema exudativo multiforme. En todas las entidades clínicas se observó un aumento de la expresión de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en piel inflamada con respecto a la expresión en piel sana (media de expresión en tres donantes sanos). La cuantificación de la quimioquina SDF1 $\alpha$ /CXCL12 se realizó como control, confirmando la especificidad del incremento observado en CTACK/CCL27 y TARC/CCL17.



**Figura 5. Análisis de la expresión génica de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en piel afecta de necrosis epidérmica tóxica.** **A)** Se extrajo ARN total de cortes de piel parafinada procedente de un paciente con necrosis epidérmica tóxica (nº3, tabla II) durante la fase aguda (A) y tras la resolución del cuadro clínico (R). La cuantificación de los niveles de ARNm se determinó por RT-PCR cuantitativa. El nº de moléculas de ARNm de cada quimioquina se normalizó con respecto al nº de moléculas de ARNm de  $\beta$ -2-microglobulina. Los resultados se muestran como unidades relativas. **B)** Electroforesis de los productos de la amplificación por RT-PCR de los ARNm de CTACK y TARC en biopsias de piel procedentes del paciente con TEN (nº 3) durante la fase aguda (A) y tras la resolución (R).

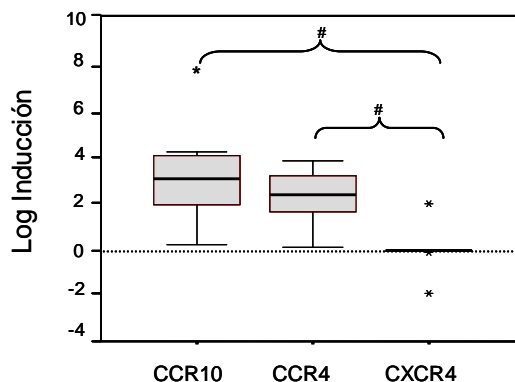
En paralelo, se analizó la expresión génica de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en biopsias de piel obtenidas de un paciente con necrosis epidérmica tóxica (TEN) durante la fase aguda de la reacción y tras la resolución del cuadro clínico (2 meses desde la recuperación del paciente). Los niveles de ARNm tanto de CTACK/CCL27 como de TARC/CCL17 aumentaron considerablemente en la piel afecta de TEN con respecto a los niveles basales tras la resolución (Fig 5A). El análisis de la amplificación de los ARNm específicos por RT-PCR convencional se

muestran en la figura 5B. A continuación, se compararon los niveles de expresión de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en piel afecta de síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica con los niveles en piel afecta de otras reacciones de hipersensibilidad retardada a fármacos. En todas ellas se observó un incremento de la expresión de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en piel afecta con respecto a la expresión en piel sana; aumento que mostró correlación con la gravedad de la reacción (Fig 6).



**Figura 6. Análisis comparativo de la expresión génica de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en cortes de piel parafinada procedente de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos**. Se extrajo ARN total de cortes de piel parafinada procedentes de pacientes con TEN, SJS, MPE y urticaria (pacientes n° 3, 4, 10, 11, 12, 13, 23, 24; ver tabla II) durante la fase aguda de la reacción. Los niveles de expresión de cada quimioquina se analizaron por RT-PCR cuantitativa, y se normalizaron con respecto a  $\beta$ -2-microglobulina. La gráfica muestra los valores de inducción del nivel de expresión en piel afecta con respecto al nivel de expresión en piel sana (media de dos donantes sanos).

Con objeto de determinar si el aumento observado en la expresión génica de las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 se correlacionaba con un aumento en la expresión de sus receptores específicos, se cuantificaron los niveles de ARNm de CCR10 y de CCR4 en biopsias de piel procedentes de pacientes. Se observó un aumento de la expresión génica de CCR10 y CCR4 en la piel inflamada con respecto a la piel sana (Fig 7), Al contrario que la expresión de sus ligandos en piel, no se observó correlación entre el aumento de expresión de los receptores y la severidad de la reacción (no mostrado). La cuantificación de la expresión del receptor CXCR4 se realizó como control (Fig 7).



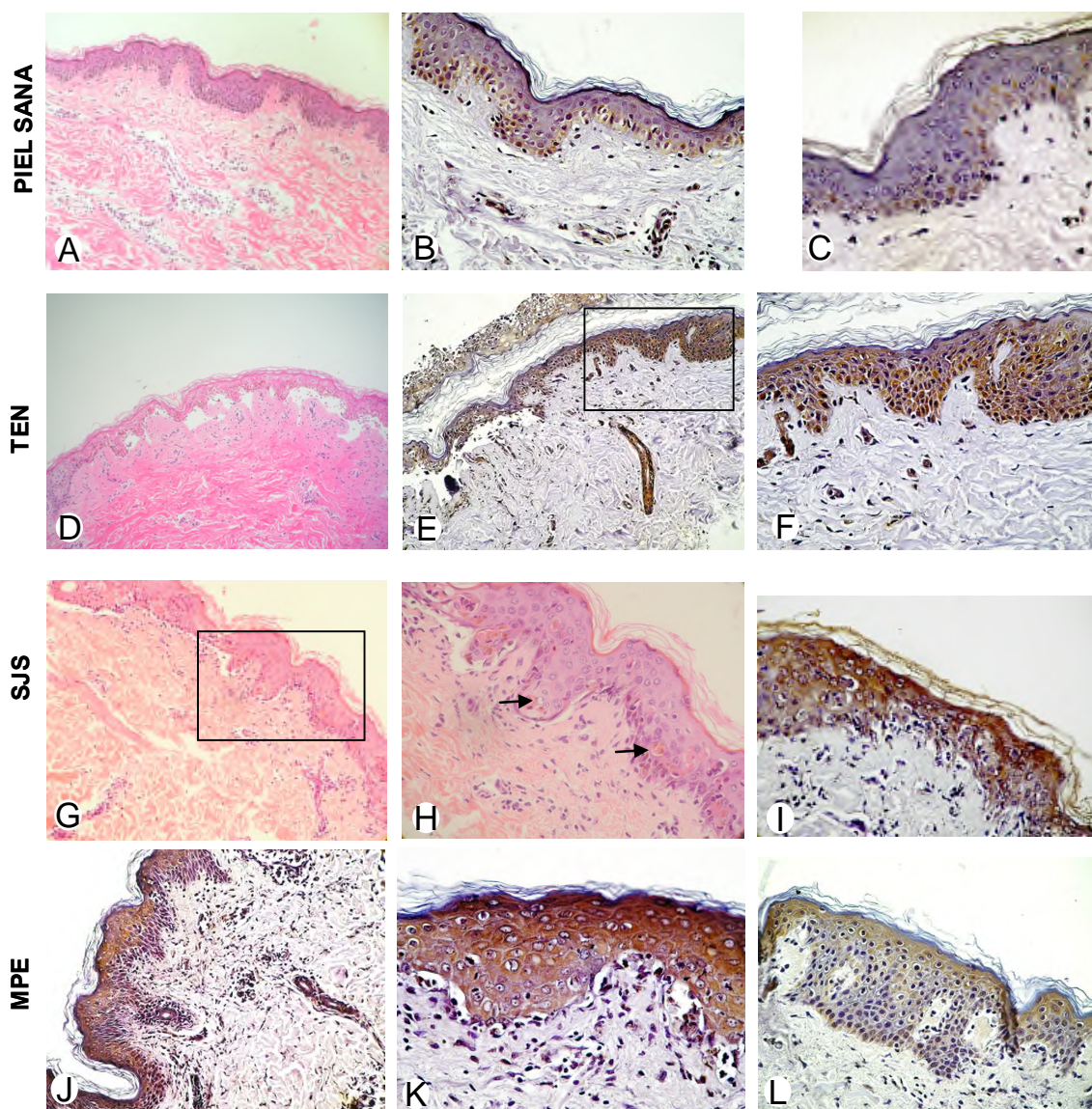
**Figura 7. Análisis de la expresión génica de los receptores CCR10 y CCR4 en biopsias de piel afectada de reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducida por fármacos.** Se extrajo ARN total de biopsias de piel procedentes de un total de 12 pacientes con exantema maculo-papular, DRESS, eritema exudativo multiforme, síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica (pacientes nº 8, 28, 30-38, 40; ver tabla II). El nº de moléculas de ARNm se determinó por RT-PCR cuantitativa y se normalizó con respecto al nº de moléculas de ARNm de  $\beta$ -2-microglobulina. Se representan los valores de inducción de la expresión, calculados como el cociente entre el nivel de expresión de receptor en piel afectada de cada paciente y el nivel de expresión en piel sana (media de tres donantes sanos). La cuantificación de CXCR4 se realizó como control. Se efectuó un análisis estadístico de los datos aplicando el test de *t*-Student # Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ).

## 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CTACK/CCL27.

### 2.1. Análisis inmunohistoquímico de CTACK/CCL27 en piel afectada:

Observado un aumento en los niveles de expresión génica de CTACK/CCL27 en piel afectada de las reacciones no inmediatas inducidas por fármacos, nos propusimos estudiar la expresión de la proteína en biopsias de piel de pacientes con estas enfermedades. La figura 8 muestra el análisis inmunohistoquímico realizado en biopsias de piel procedentes de un paciente con necrolisis epidérmica tóxica (fase aguda y tras la resolución), un paciente con síndrome de Stevens-Johnson, tres pacientes con exantema maculo-papular y un donante sano. La tinción con hematosilina-eosina de la piel afectada de necrolisis epidérmica tóxica (Fig 8: D) y síndrome de Stevens-Johnson (Fig 8: G, H) mostró la presencia de queratinocitos necrosados y el desprendimiento de la epidermis característico de estas reacciones. CTACK/CCL27 es producida constitutivamente por los queratinocitos del estrato basal de la epidermis (Homey B y col, 2000) como comprobamos en el análisis de piel sana de un individuo control (Fig 8: C) y en piel obtenida tras la resolución del cuadro clínico en el paciente con necrolisis epidérmica tóxica (Fig 8: B). En el análisis inmunohistoquímico de CTACK/CCL27 se detectó que la producción de esta quimioquina se extendía a los queratinocitos de las capas supra-basales de la epidermis de

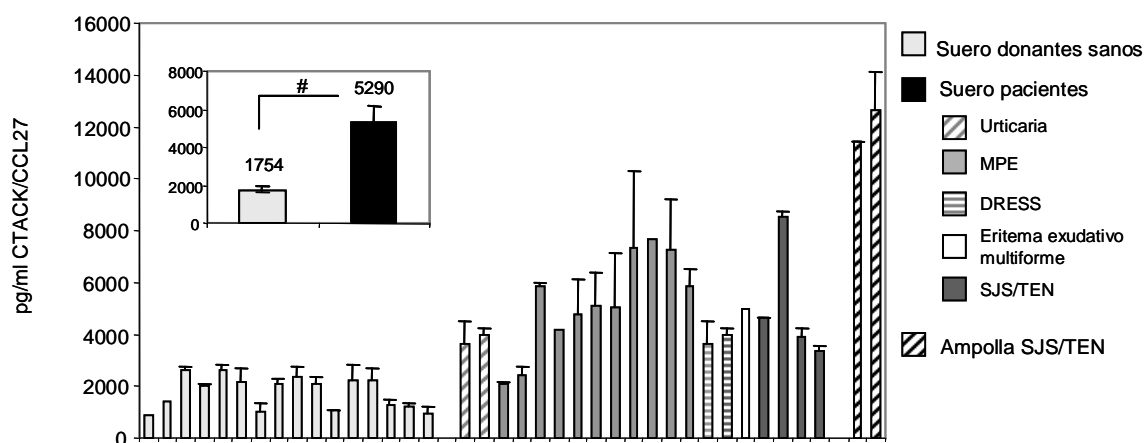
piel afecta de necrolisis epidérmica tóxica (Fig 8: E, F), síndrome de Stevens-Johnson (Fig 8: I) y exantemas maculo-papulares (Fig 8: J, K, L).



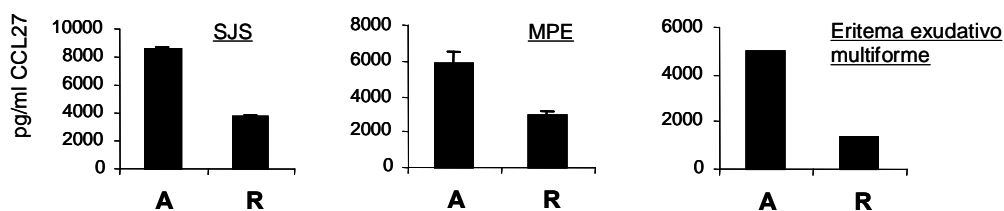
**Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CTACK/CCL27 en biopsias de piel procedentes de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.** Tinción con hematosilina-eosina de biopsias de piel procedentes de un paciente con necrolisis epidérmica tóxica (TEN) (paciente n° 3, tabla II) durante la fase aguda (D) y en fase de resolución (A), y de un paciente con síndrome de Stevens-Johnson (SJS) (n° 4, tabla II) durante la fase aguda (G y ampliación del cuadro en H). Las flechas indican los queratinocitos necrosados. Tinción de la proteína CTACK en biopsia de piel afecta de TEN durante la fase aguda (E y ampliación del cuadro en F) y la fase de resolución (B), y en piel afecta de SJS (I). Tinción de CTACK en biopsias de piel procedentes de pacientes con exantema maculo-papular (pacientes n° 14, 17, 30; tabla II) (J, K, L). Tinción de CTACK en piel sana (C). (A, D, E, G, J en aumento original de 200X; B, C, F, H, I, K, L en aumento original de 400X).

## 2.2. Análisis de los niveles de proteína CTACK/CCL27 en el suero y en el fluido de ampollas:

Las quimioquinas son proteínas que se secretan al medio para regular el tráfico leucocitario, por lo que la inducción en la expresión de CTACK/CCL27 que observamos en piel afecta de las reacciones estudiadas podría corresponder con un aumento en los niveles de esta quimioquina en el suero. Analizamos los niveles de la proteína CTACK/CCL27 en el suero de pacientes durante la fase aguda de la reacción mediante ELISA. Como se muestra en la figura 9 los niveles de CTACK/CCL27 en el suero de pacientes en fase aguda (5290 pg/ml; media n=16) resultaron significativamente superiores a los detectados en el suero de donantes sanos (1754 pg/ml; media n=16). El aumento de CTACK/CCL27 en suero se detectó en todas las entidades clínicas estudiadas (urticaria, exantema maculo-papular, DRESS, eritema exudativo multiforme y síndrome de Stevens-Johnson), sin embargo, no mostró correlación con la gravedad de la reacción (Fig 9). En el caso de los pacientes con síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica pudimos analizar los niveles de CTACK/CCL27 no sólo en el suero sino también en el fluido de las ampollas subepidérmicas donde los niveles de la quimioquina alcanzaron los 12000 pg/ml (Fig 9). Además se comprobó que los niveles de CTACK/CCL27 disminuían a niveles similares a los observados en donantes sanos en el suero obtenido de pacientes tras la resolución del cuadro clínico (Fig 10).



**Figura 9. Análisis de los niveles de CTACK/CCL27 en suero de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.** Se midieron los niveles de proteína CTACK/CCL27 mediante ELISA en muestras de suero procedentes de donantes sanos y pacientes con diversas entidades clínicas: urticaria, exantema maculo-papular (MPE), DRESS, eritema exudativo multiforme, síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y necrolisis epidérmica tóxica (TEN) (ver pacientes en tabla II); y en el fluido de ampollas de pacientes con SJS/TEN (n° 4,6; tabla II). Se representan las medias de triplicados de cada muestra. En la esquina superior izquierda se muestra las medias de los niveles de CTACK/CCL27 en suero de pacientes (n=20) y de donantes sanos (n=16). # Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ , test *t-Student*).

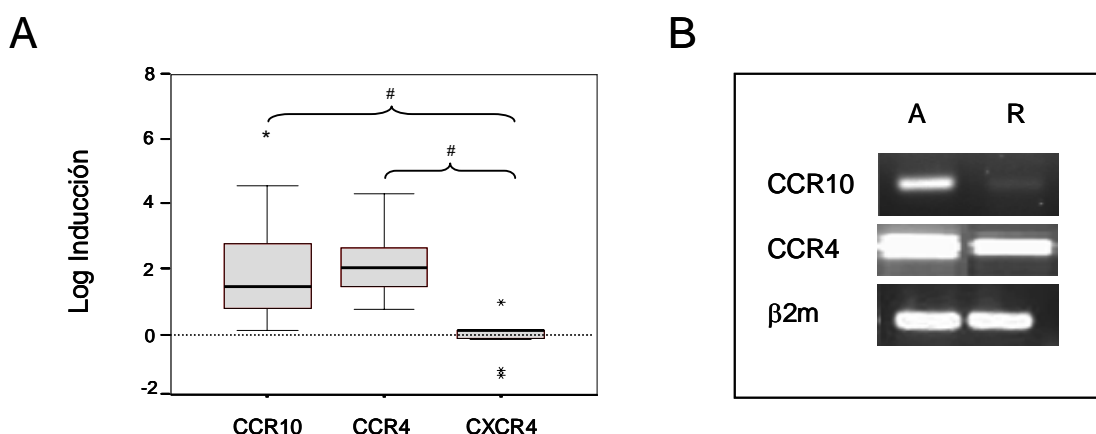


**Figura 10.** Análisis de los niveles de CTACK/CCL27 en el suero de pacientes durante la fase aguda (A) y tras la resolución del cuadro clínico (R) mediante ELISA. La figura muestra los resultados obtenidos en tres pacientes representativos con Síndrome de Stevens-Johnson (SJS), exantema maculo-papular (MPE) y eritema exudativo multiforme (pacientes n° 4, 33, 40; ver tabla II).

### 3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES CCR10 Y CCR4 EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA Y FLUIDO DE AMPOLLAS

#### 3.1 Análisis de la expresión génica de CCR10 y CCR4 en sangre periférica:

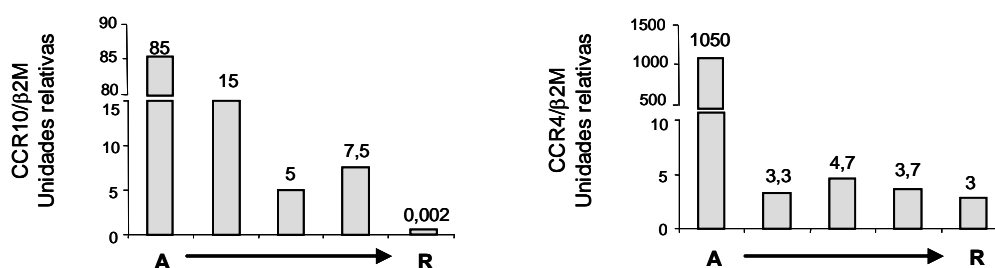
Con objeto de determinar si el aumento de la expresión de los receptores CCR10 y CCR4 en piel se correlacionaba con una inducción de la expresión de dichos receptores en linfocitos circulantes, analizamos los niveles de expresión génica en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas durante la fase aguda con respecto a la expresión tras la resolución del cuadro clínico (2-3 meses desde la recuperación total del paciente).



**Figura 11.** Análisis de la expresión génica de los receptores CCR10 y CCR4 en células mononucleares de sangre periférica durante la fase aguda de reacciones de hipersensibilidad no inmediatas por fármacos. **A)** Las células mononucleares se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente de densidad a partir de sangre periférica procedente de un total de 16 pacientes con exantema maculo-papular, DRESS, eritema exudativo multiforme, síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica (pacientes n° 3, 4, 11, 14, 16, 17, 21, 22, 23, 25, 27, 34, 35, 39, 40, 43; tabla II) durante la fase aguda y tras la resolución de la reacción. Se extrajo ARN total y se analizó la expresión de los receptores mediante RT-PCR cuantitativa. El n° de moléculas de ARNm de cada gen se normalizó con respecto al n° de moléculas de ARNm de β-2-microglobulina de la misma muestra. En la gráfica se muestra la inducción de la expresión del receptor durante la fase aguda con respecto a la expresión en fase de resolución en cada paciente. La cuantificación de CXCR4 se realizó como control. # Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ) según test de *t*-Student. **B)** Electroforesis de los productos de RT-PCR a partir de ARN de PBMCs procedente de un paciente con TEN (n° 3) durante la fase aguda (A) y tras la resolución (R) del cuadro clínico.



La figura 11A muestra la cuantificación realizada en un conjunto de pacientes con exantema maculo-papular, DRESS, síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica. Los resultados de la cuantificación muestran una inducción de la expresión de CCR10 y CCR4 en PBMCs durante la fase aguda de la reacción. Por el contrario, no se observó aumento de expresión de CXCR4. En la figura 11B se muestra el análisis por RT-PCR de la expresión de CCR10 y CCR4 en PBMCs obtenidas durante la fase aguda y tras la resolución de un caso de necrolisis epidérmica tóxica (incluido en figura 10A). Realizamos el estudio de la cinética de la expresión de CCR10 y CCR4 en PBMCs obtenidas de este paciente en fase aguda, 1 día, 7 días y 10 días desde el inicio de la reacción; y tras la resolución del cuadro clínico (2 meses desde la recuperación del paciente). Observamos cómo la expresión de los receptores desciende drásticamente durante los primeros 7 días desde la fase aguda de la reacción hasta alcanzar valores similares a los detectados en donantes sanos (Fig 12).

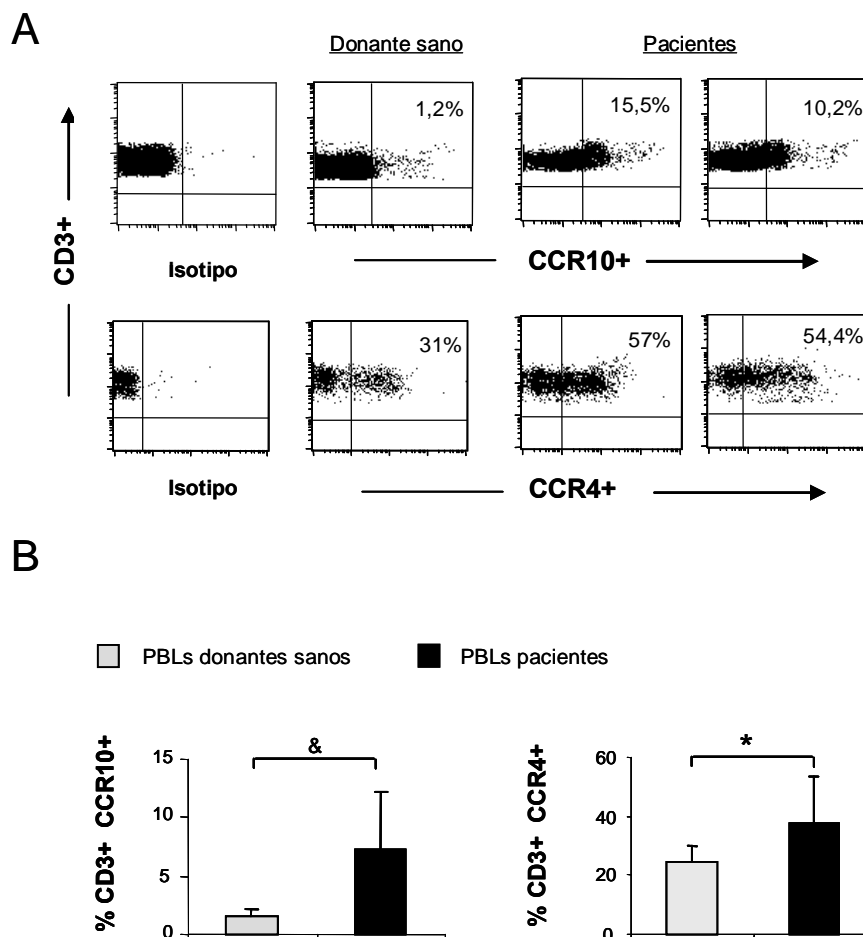


**Figura 12. Cinética de la expresión génica de CCR10 y CCR4 en PBMCs de un paciente con necrolisis epidérmica tóxica.** Se extrajeron muestras de sangre periférica de un paciente con TEN (n° 3) durante la fase aguda (A) (momento del ingreso del paciente), 1 día, 7 días, 10 días post-ingreso; y tras la resolución del cuadro clínico (R) (3 meses desde la reacción). Se obtuvieron las PBMCs, se extrajo ARN total y se analizó la expresión de CCR10 y CCR4 por RT-PCR cuantitativa. El n° de moléculas de ARNm de CCR10 y CCR4 se normalizó con respecto al n° de moléculas de ARNm de β-2-microglobulina. Los resultados se muestran como unidades relativas.

### 3.2 Análisis del porcentaje de linfocitos T CCR4+ y CCR10+ de sangre periférica:

Los niveles de ARNm no siempre reflejan la expresión de la proteína, por ello analizamos por citometría de flujo la expresión de CCR4 y CCR10 en la superficie de los linfocitos T de sangre periférica obtenida de pacientes en fase aguda. Como se muestra en la figura 13, el porcentaje de células CD3+ CCR4+ y CD3+ CCR10+ aumentó en sangre periférica durante la fase aguda de las reacciones de hipersensibilidad retardada inducidas por fármacos en comparación con el porcentaje detectado en donantes sanos. En algunos casos se pudo analizar la expresión de los

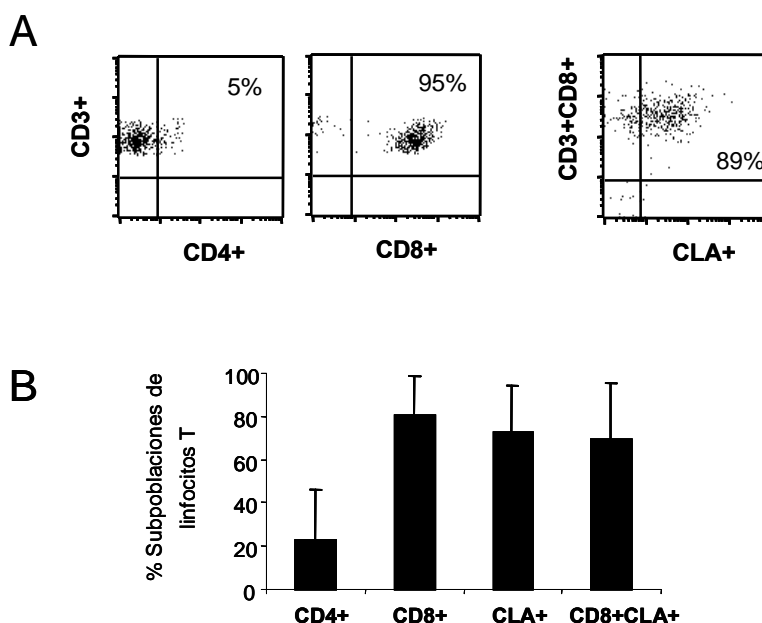
receptores en linfocitos de sangre periférica de pacientes obtenida tras la resolución del cuadro clínico, confirmándose que el porcentaje de células CD3+ CCR4+ y CD3+ CCR10+ era similar al detectado en donantes sanos (no mostrado).



**Figura 13. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CCR4 y CCR10 en linfocitos T de sangre periférica procedente de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducida por fármacos.** Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes durante la fase aguda y de donantes sanos, y se tiñeron con anti-hCD3-PerCP, anti-hCCR4 seguido de anti-IgG-FITC, y con anti-hCCR10 seguido de anti-IgG-PE. Se analizó el porcentaje de linfocitos CD3+ CCR4+ y CD3+ CCR10+. **A)** Diagrama de puntos del análisis del porcentaje de linfocitos CD3+ CCR10+ y CD3+ CCR4+ de un donante sano y dos pacientes representativos. **B)** Media del porcentaje de células CD3+ CCR10+ y CD3+ CCR4+ en sangre periférica de donates sanos (n=10) y pacientes (CCR4, n=29; CCR10 n=5; ver pacientes en tabla II). \* Diferencia estadísticamente significativa por el test *t-Student* ( $p < 0,05$ ). & Diferencia estadísticamente significativa por el test U-Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Análisis del fenotipo y expresión de CCR10 y CCR4 en linfocitos del fluido de ampollas:

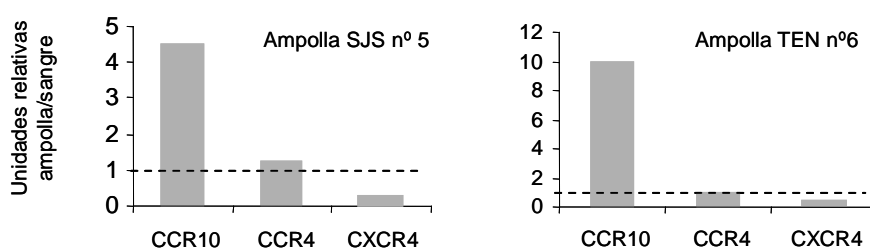
Las reacciones de hipersensibilidad no inmediata más graves inducidas por medicamentos son el síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y la necrolisis epidérmica tóxica (TEN), las cuales se caracterizan por la formación de ampollas y el desprendimiento de la epidermis (Roujeau y Stern, 1994). La mayoría de las células que se encuentran en el líquido de las ampollas son linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan el marcador “homing” de la piel CLA (Nassif y cols. 2002). Con objeto de confirmar en nuestros pacientes el fenotipo previamente descrito, analizamos mediante citometría de flujo las subpoblaciones de linfocitos T de las ampollas procedentes de los pacientes con SJS/TEN. Como se muestra en la figura 14 un elevado porcentaje de los linfocitos de la ampolla resultaron ser CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup>.



**Figura 14. Análisis por citometría de flujo de los linfocitos T del fluido de ampolla durante la fase aguda del síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y la necrolisis epidérmica tóxica (TEN).** Las células mononucleares obtenidas del líquido de ampollas de pacientes con SJS/TEN se tiñeron con anti-hCD3-PerCP, anti-hCD4-FITC, anti-hCD8-PE y anti-hCLA-FITC. Los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> se calcularon con respecto al total de linfocitos T CD3<sup>+</sup>. **A)** Se representa el porcentaje de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> de un paciente representativo (TEN n°6, tabla II) **B)** Se representa la media ± desviación standard del porcentaje de las subpoblaciones con respecto al total de células CD3<sup>+</sup> (n=4; pacientes n° 3, 4, 5, 6; tabla II).

A continuación analizamos los niveles de ARNm de CCR10 y CCR4 por RT-PCR cuantitativa en las células mononucleares de la ampolla y de sangre periférica obtenidas en el mismo

momento. Calculamos el nivel de expresión de los receptores en las células mononucleares de la ampolla (células que han migrado a la piel “in vivo”) con respecto al nivel de expresión en las células mononucleares de sangre periférica (células circulantes). Se observó un incremento en los niveles de expresión de CCR10 en las células de la ampolla (Fig 15), lo que confirma un reclutamiento selectivo de células CCR10+ a la piel en SJS/TEN. Curiosamente los niveles de ARNm de CCR4 resultaron ser similares o apenas mayores que los niveles en sangre periférica (Fig 15). La cuantificación de expresión de CXCR4 se realizó como control.

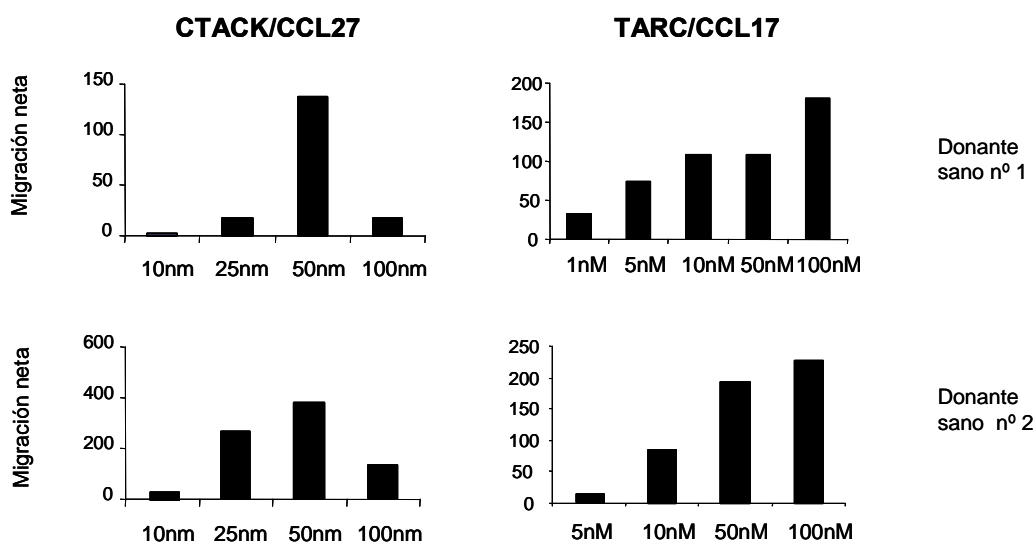


**Figura 15. Análisis de la expresión génica de CCR10 y CCR4 en células mononucleares de sangre periférica y del líquido de ampolla durante la fase aguda del síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y la necrolisis epidérmica tóxica (TEN).** Se extrajo ARN total de PBMCs y de células del líquido de ampolla procedentes de pacientes con SJS/TEN y se analizaron los niveles de ARNm de CCR10, CCR4 y CXCR4 mediante RT-PCR cuantitativa. El nº de moléculas de ARNm de cada receptor se normalizó con respecto al nº de moléculas de  $\beta$ -2-microglobulina. Los resultados de la cuantificación en dos pacientes representativos (nº 5, 6, ver tabla II) se muestran como unidades relativas del cociente entre el valor de la cuantificación en las células del fluido de la ampolla y el valor en sangre periférica.

#### 4. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA MIGRATORIA A CTACK/CCL27 Y TARC/CCL17 DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Con la finalidad de estudiar si el aumento de la expresión de CCR10 y CCR4 en células mononucleares de sangre periférica durante la fase aguda de las reacciones de hipersensibilidad retardada inducidas por fármacos se correlacionaba con una mayor capacidad de migración de los linfocitos en respuesta a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17, nos propusimos analizar mediante ensayos funcionales la respuesta migratoria de los linfocitos de sangre periférica (PBLs) procedente de pacientes con estas reacciones. En primer lugar se realizaron ensayos preliminares

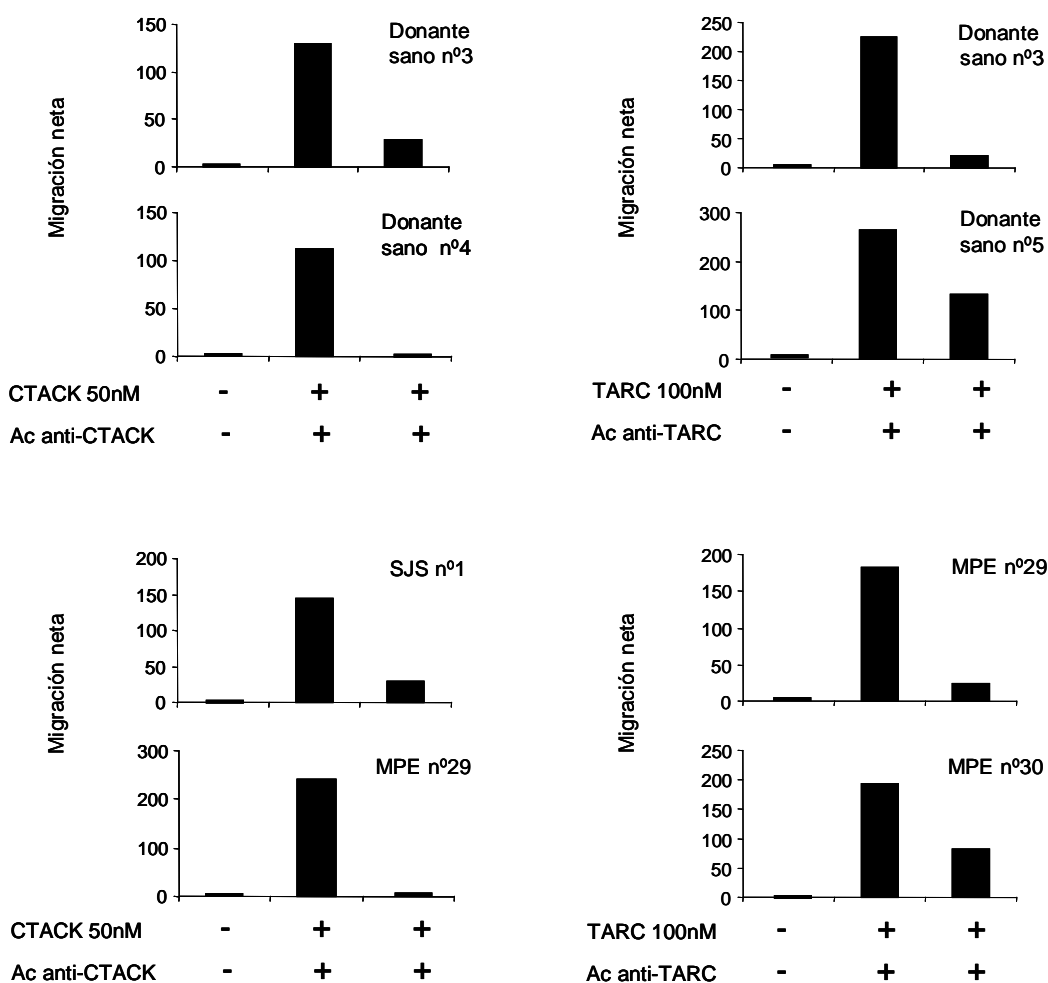
de migración celular frente a concentraciones crecientes de las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 con PBMCs procedentes de donantes sanos. La migración de los linfocitos de sangre periférica (PBLs) se analizó tal como se describe en el apartado de materiales y métodos. En base a los resultados de estos ensayos preliminares se determinó que las concentraciones óptimas para la realización de los ensayos de migración serían de 50nM para CTACK y 100nM para TARC. Para los ensayos de migración en respuesta a SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 se utilizó la concentración de 10nM (del Pozo y cols. 1999, Wright y cols. 2003). La figura 16 muestra los resultados obtenidos en dos donantes representativos.



**Figura 16. Migración de linfocitos de sangre periférica (PBLs) en respuesta a concentraciones crecientes de rh-CTACK/CCL27 y rh-TARC/CCL17.**

En la cámara superior del Transwell™ se añadieron PBMCs procedentes de donantes sanos, y en la cámara inferior se añadieron concentraciones crecientes de las siguientes quimioquinas humanas recombinantes: CTACK/CCL27 ( 10, 25, 50 y 100nM) y TARC/CCL17 ( 1, 5, 10, 50 y 100nM) en RPMI 0,5% BSA. El ensayo se realizó durante 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A continuación los PBLs, definidos según los parámetros de SSC y FSC, se contaron durante un minuto en un citómetro de flujo FACSCalibur. Los datos se representan como migración neta (diferencia entre PBLs que migran en presencia de la quimioquina y PBLs que migran en medio solo).

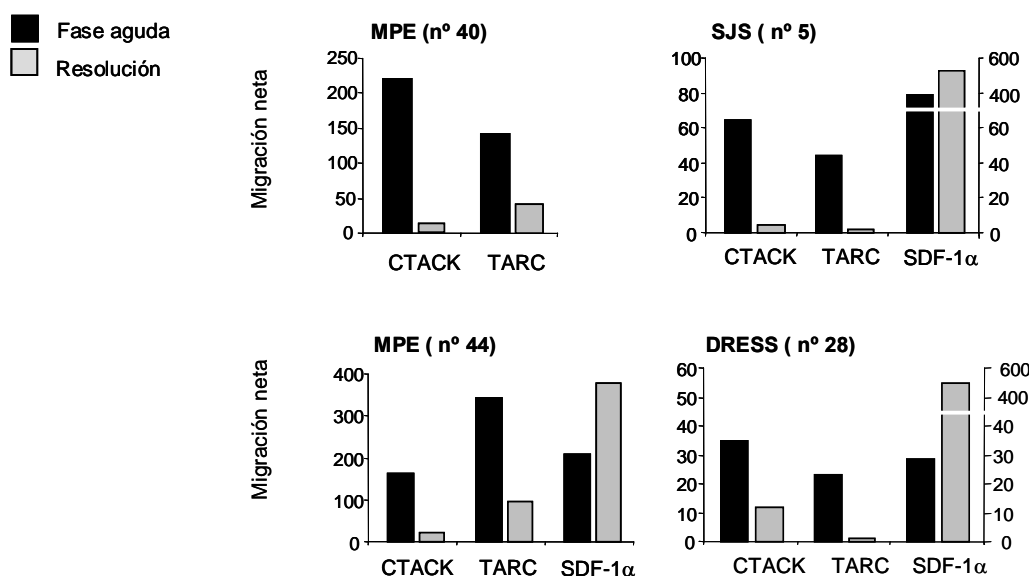
La mayoría de los ensayos se realizaron en presencia de un anticuerpo bloqueante anti-CTACK o anti-TARC con el fin de determinar la especificidad de la migración. En la figura 17 se muestran ensayos representativos, donde se observó que la migración en respuesta a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 de PBLs procedentes de pacientes en fase aguda de la reacción era específica.



**Figura 17. Especificidad de la migración de los linfocitos de sangre periférica (PBLs) en respuesta a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17.**

Los ensayos de migración con PBMCs se realizaron en presencia de concentraciones óptimas de quimioquina (50nM rhCTACK y 100nM rhTARC). La especificidad se midió mediante el uso de anticuerpo monoclonal anti-CTACK (5µg/ml) y anti-TARC (5µg/ml) respectivamente. La figura muestra ensayos de migración con PBMCs procedentes de donantes sanos y de pacientes representativos con síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y exantema maculopapular (MPE). Los datos se representan como migración neta (diferencia entre número de PBLs que migran en presencia de la quimioquina y número de PBLs que migran en medio solo).

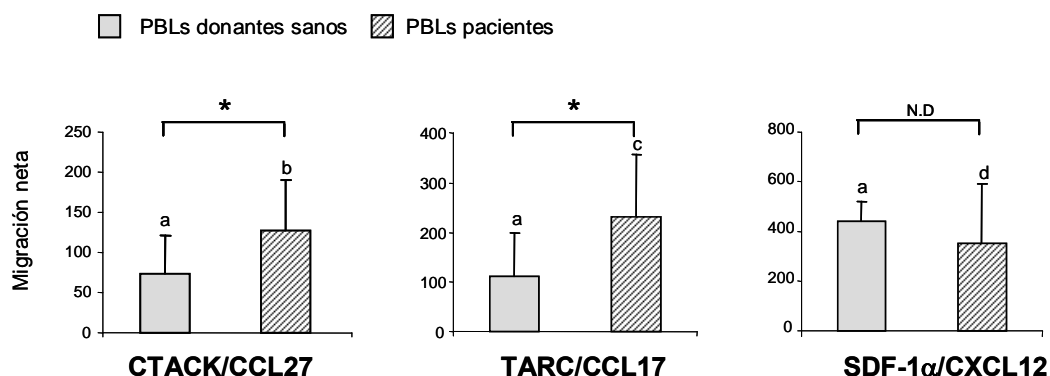
Realizamos ensayos de migración en presencia de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 con PBMCs procedentes de pacientes durante la fase aguda de la reacción, y se compararon los resultados con la respuesta migratoria tras la resolución del cuadro clínico. En todos los casos estudiados, los PBLs obtenidos durante la fase aguda de la reacción migraron mejor frente a ambas quimioquinas que los PBLs obtenidos una vez recuperado el paciente (Fig 18). Por el contrario, la respuesta frente a SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 fue similar en fase aguda y en la resolución del cuadro clínico.



**Figura 18. Migración en respuesta a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 de linfocitos de sangre periférica (PBLs) procedente de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos durante la fase aguda y tras la resolución del cuadro clínico.** Se realizaron ensayos de migración frente a rhCTACK (50nM), rhTARC (100nM) y rhSDF-1 $\alpha$  (10nM) en placas Transwell™ de 5 $\mu$ m con PBMCs obtenidas en fase aguda y tras la resolución de la reacción. Las células que migraron a la cámara inferior del Transwell se recogieron y se contaron los PBLs (seleccionados de acuerdo a los parámetros SSC y FCS) durante un minuto. Los resultados se muestran como migración neta (diferencia entre los PBLs que migran en medio con quimioquina y los PBLs que migran en medio solo).

Además, se comparó la respuesta migratoria a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 de PBLs procedentes de pacientes con SJS/TEN, MPE y DRESS con la respuesta de PBLs de donantes sanos. Como se muestra en la figura 19, se observó un aumento estadísticamente significativo de

la respuesta migratoria de PBLs de pacientes durante la fase aguda con respecto a PBLs de individuos control.



**Figura 19. Migración en respuesta a CTACK y TARC de linfocitos de sangre periférica (PBLs) procedentes de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos durante la fase aguda.** Se realizaron ensayos de migración frente a rhCTACK (50nM), rhTARC (100nM) y rhSDF1 $\alpha$  (10nM) en placas Transwell™ de 5 $\mu$ m con PBMCs obtenidas de pacientes en fase aguda y de donantes sanos. Las células que migraron a la cámara inferior del Transwell se recogieron y se contaron los PBLs (seleccionados de acuerdo a los parámetros SSC y FCS) durante un minuto. Los resultados se muestran como migración neta (diferencia entre los linfocitos migrados en medio con quimioquina y los linfocitos migrados en medio solo). a) n=8; b) n= 19 (5 SJS/TEN, 12 MPE, 2 DRESS; ver tabla II); c) n= 21 ( 3 SJS/TEN, 16 MPE, 2 DRESS; ver tabla II); d) n= 5 (1 SJS, 4 MPE). \* Diferencia estadísticamente significativa según el test *t-Sudent* ( $p < 0,05$ ). ND: No diferencia estadística.

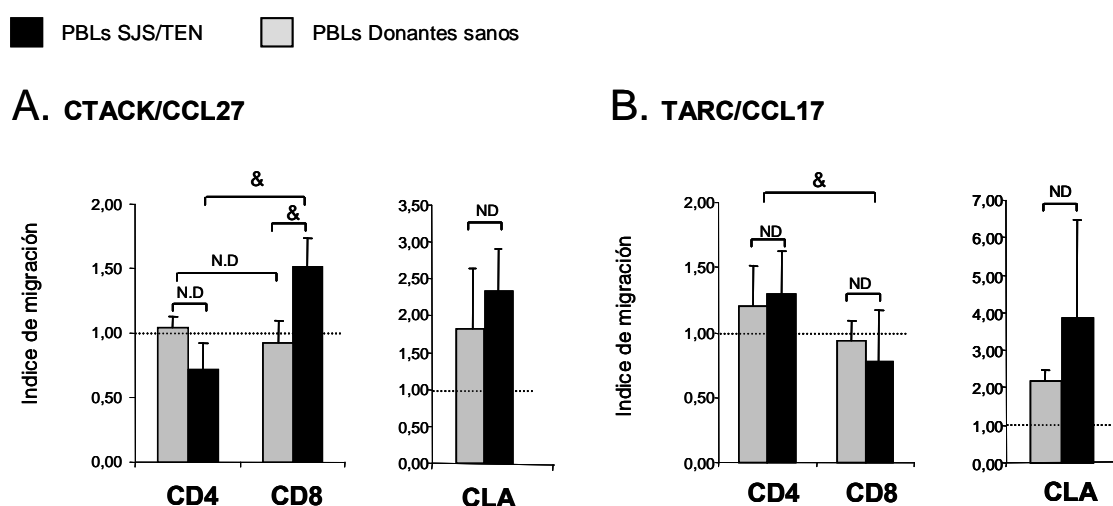
#### 4.1. Respuesta migratoria a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ de sangre periférica y fluido de ampolla en el síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidérmica tóxica:

Aunque está descrito que los linfocitos T son las células efectoras principales de las reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos (Roujeau y cols. 2005), es necesario recordar que hay una gran heterogeneidad entre las distintas entidades clínicas y por tanto en la subpoblación de linfocitos T que mayoritariamente está implicada en el daño tisular. Por ello, decidimos estudiar las subpoblaciones de linfocitos T que migran preferentemente a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en las reacciones ampollosas (síndrome de Stevens-Johnson/necrolisis epidérmica tóxica) e independientemente en las reacciones exantemáticas.

Realizamos ensayos de migración frente a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 con PBMCs de pacientes con reacciones ampollosas y de individuos sanos. Las células que migraron fueron recogidas y las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ se analizaron mediante citometría

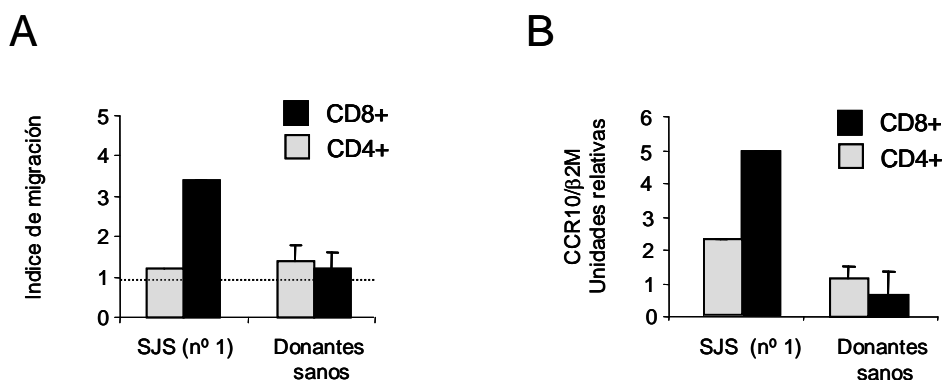


de flujo. Los resultados se representan como índices de migración expresados como el cociente entre el porcentaje de la subpoblación linfocitaria que ha migrado y el porcentaje de la subpoblación en la población de partida. De tal modo que un índice por encima de 1 supone que una subpoblación ha sido atraída preferentemente. En pacientes con síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> respondieron a CTACK/CCL27 significativamente mejor que los CD4<sup>+</sup> (Fig 20A), mientras que las células T CD4<sup>+</sup> fueron preferentemente atraídas por TARC/CCL17 (Fig 20B). En individuos sanos, CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 reclutaron principalmente a células T CD4<sup>+</sup> (Fig 20 A y B). Tanto en pacientes como en individuos sanos, CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 reclutaron mayoritariamente linfocitos T CLA<sup>+</sup> (Fig 20A y B), de acuerdo con la expresión de los receptores de ambas quimioquinas en dicha subpoblación (Soler y cols. 2003).



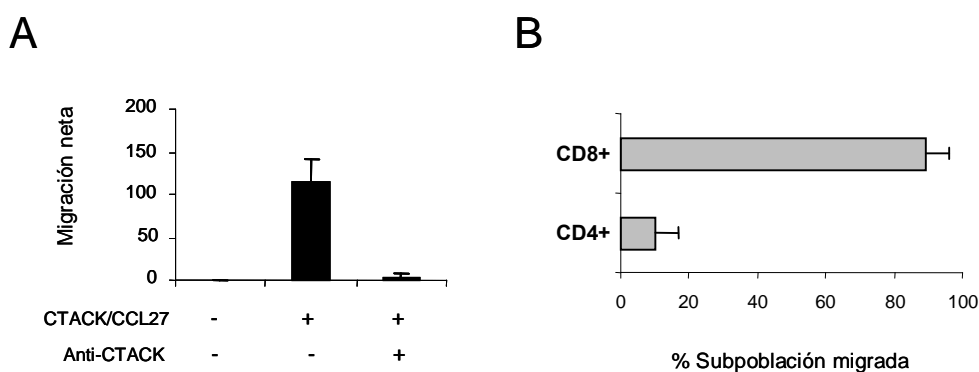
**Figura 20. Migración en respuesta a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 de linfocitos de sangre periférica procedente de pacientes con síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y necrolisis epidérmica tóxica (TEN).** Se realizaron ensayos de migración frente a rhCTACK (50nM) (A) y a rhTARC (100nM) (B) en placas Transwell™ de 5µm con PBMCs obtenidas de pacientes durante la fase aguda de SJS/TEN (A-n=5; B-n=3; ver tabla II) y de donantes sanos (n=8). Los linfocitos que migraron a la cámara inferior del Transwell se recogieron y se tiñeron con anti-hCD3-PerCP, anti-hCD4-FITC, anti-hCD8-PE y anti-hCLA-FITC. Se calculó el índice de migración de la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CLA<sup>+</sup> como el cociente entre el porcentaje de subpoblación (con respecto al total de linfocitos CD3<sup>+</sup>) que migra frente a la quimioquina y el porcentaje de subpoblación en medio sin quimioquina. & Diferencia estadísticamente significativa (p< 0,05) según el test U-Mann Whitney. ND: No diferencia estadística.

Con el fin de confirmar el reclutamiento selectivo de los linfocitos citotóxicos por CTACK/CCL27, realizamos ensayos de migración con poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ purificadas de sangre periférica de un paciente con síndrome de Stevens-Johnson y de individuos sanos. Como se muestra en la figura 21A, los linfocitos T CD8+ de sangre periférica del paciente presentaron una mejor respuesta migratoria frente a CTACK/CCL27 que los linfocitos T CD4+ del mismo paciente y que los linfocitos tanto CD4+ como CD8+ de los controles analizados. En paralelo, se extrajo ARN total de las poblaciones purificadas y se analizó la expresión de CCR10. Los niveles de ARNm de CCR10 en células CD8+ del paciente resultaron ser el doble de los observados en linfocitos CD4+ (Fig 21B). Cuando se comparó con la expresión en donantes sanos, se observó que tanto los linfocitos CD4+ como CD8+ del paciente expresaban mayores niveles de CCR10 que los de individuos sanos (Fig 21B), en consonancia con el aumento de expresión de CCR10 observado en sangre periférica durante la fase aguda de estas reacciones (Figs 11 y 13).



**Figura 21. Análisis de la respuesta migratoria a CTACK/CCL27 y de la expresión de CCR10 en células CD4+ y CD8+ aisladas de sangre periférica de un paciente con síndrome de Stevens-Johnson.** Las células T CD4+ y CD8+ de sangre periférica de un paciente en fase aguda con SJS (nº 1, tabla II) se purificaron mediante citometría de flujo. Las células T CD4+ y CD8+ de sangre periférica de donantes sanos (n= 6) se purificaron por separación magnética según se describe en materiales y métodos. **A)** Se realizaron ensayos de migración con los linfocitos T CD4+ y CD8+ frente a CTACK (50nM). El resultado se muestra como índice de migración que representa el cociente entre los linfocitos CD4+ o CD8+ que migra en respuesta a la quimioquina y los linfocitos que migran en medio solo. **B)** Se extrajo ARN total de los linfocitos T CD4+ y CD8+ purificados de sangre periférica del paciente y de donantes sanos. La expresión de CCR10 se analizó mediante RT-PCR cuantitativa. El nº de moléculas de ARNm de CCR10 se normalizó con respecto al nº de moléculas de  $\beta$ -2-microglobulina. Los resultados se representan como unidades relativas.

Por último realizamos ensayos de migración con las células mononucleares del fluido de las ampollas obtenidas de pacientes con SJS/TEN durante la fase aguda. Los resultados muestran que los linfocitos del fluido de las ampollas, la mayoría de los cuales son CD8<sup>+</sup> (Fig 14), son capaces de migrar en respuesta a CTACK/CCL27 (Fig 22), lo que se correlaciona con los niveles de expresión de CCR10 detectados (Fig 15) y el comportamiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de sangre periférica (Fig 20 y 21). Con objeto de comprobar que la subpoblación que preferentemente migra a CTACK/CCL27 son los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias (Fig 22).



**Figura 22. Análisis de la respuesta migratoria a CTACK/CCL27 de los linfocitos del líquido de ampolla durante la fase aguda del síndrome de Stevens-Johnson.** Se realizaron ensayos de migración en placas Transwell™ de 5µM frente a rh-CTACK (50nM) con células del fluido de ampollas de pacientes con SJS (pacientes nº 4, 5; tabla II). **A)** Las células que migraron a la cámara inferior del Transwell™ se recogieron y se contaron los linfocitos (seleccionados de acuerdo a los parámetros SSC y FCS) durante un minuto. Los resultados se muestran como migración neta. **B)** Los linfocitos que migraron a la cámara inferior del Transwell se recogieron y se tiñeron con anti-hCD3-PerCP, anti-hCD4-FITC y anti-hCD8-PE. Se muestra la media del porcentaje de las células CD3+CD4+ y CD3+CD8+

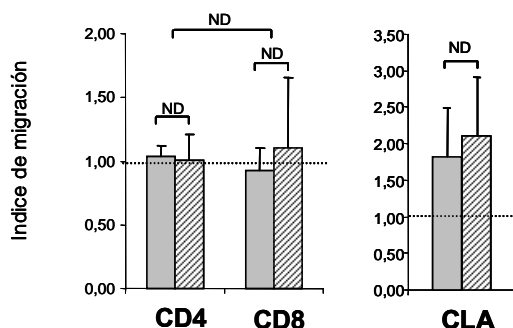
#### 4.2. Respuesta migratoria a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 de las subpoblaciones linfocitarias CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de sangre periférica en las reacciones exantemáticas:

Como se demuestra anteriormente, los PBLs procedentes de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos presentaban una mayor respuesta migratoria frente a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 que los PBLs de donantes sanos (ver Fig 19). Con el fin de elucidar si alguna subpoblación linfocitaria es atraída preferentemente por

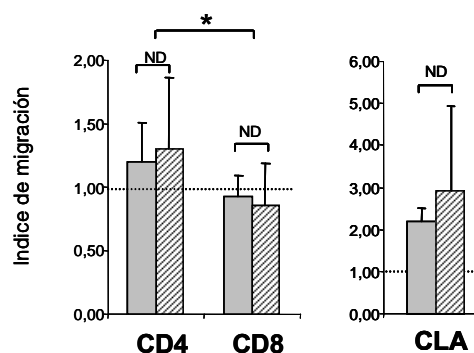
estas quimioquinas durante la fase aguda de exantemas inducidos por fármacos, analizamos mediante citometría de flujo las subpoblaciones que migraron específicamente. Se calcularon los índices de migración de las subpoblaciones de linfocitos T de sangre periférica procedentes de pacientes con exantemas y de individuos sanos. En pacientes con reacciones exantemáticas, CTACK/CCL27 reclutó por igual a células T CD4+ y CD8+; con cierta preferencia, aunque no significativa, sobre las CD8+ (Fig 23A). La subpoblación mayoritaria que migró en respuesta a TARC/CCL17 fueron las células T CD4+ (Fig 23B). Tanto en pacientes como en individuos sanos, los linfocitos T CLA+ representan la subpoblación reclutada preferentemente por CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 (Fig 23 A y B), de acuerdo con la expresión de los receptores de ambas quimioquinas en dicha subpoblación.

▨ PBLs Exantemas    □ PBLs Donantes sanos

### A. CTACK/CCL27



### B. TARC/CCL17

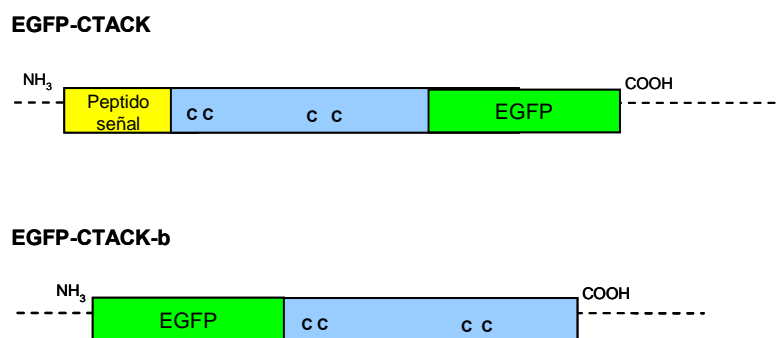


**Figura 23. Migración en respuesta a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 de linfocitos de sangre periférica procedente de pacientes con reacciones exantemáticas inducidas por fármacos.** Se realizaron ensayos de migración frente a rh-CTACK (50nM) (A) y rh-TARC (100nM) (B) en placas Transwell™ de 5µm con PBMCs obtenidas de pacientes con reacciones exantemáticas (A- n=14 y B- n= 18; pacientes con reacciones exantemáticas de la tabla II) y de individuos sanos (n=8). Las células que migraron a la cámara inferior del Transwell se recogieron y se tiñeron con anti-hCD3-PerCP, anti-hCD4-FITC, anti-hCD8-PE y anti-hCLA-FITC. Se calculó el índice de migración de la subpoblación de linfocitos T CD4+, CD8+ y CLA+ como el cociente entre el porcentaje de subpoblación (con respecto al total de linfocitos CD3+) que migra frente a la quimioquina y el porcentaje de subpoblación en medio sin quimioquina. \* Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) según el test *t*-Student. ND: No diferencia estadística.

## 5. ESTUDIO DE UNA FORMA NO SECRETADA DE CTACK/CCL27 (CTACK-b)

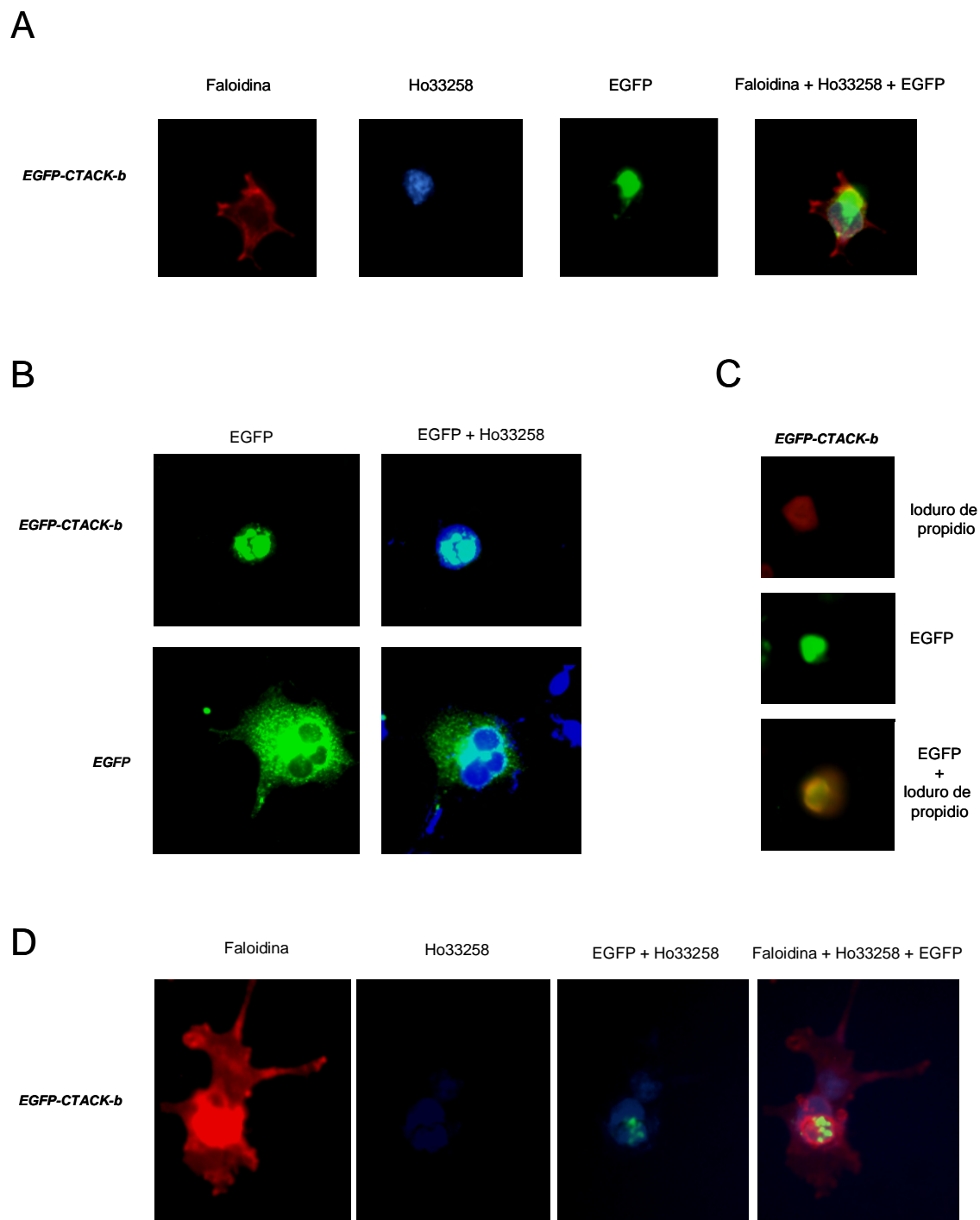
### 5. 1 Localización subcelular:

En ratón se ha descrito una isoforma de CTACK/CCL27, denominada PESKY (Baird y cols. 1999), que proviene de un procesamiento alternativo del ARNm de CTACK/CCL27 y se localiza en el núcleo. Esta proteína presenta la misma secuencia de aminoácidos que CTACK a excepción del péptido señal de secreción, y en su lugar posee un péptido específico que está ausente en CTACK. Gortz y cols (2002) demostraron que la señal de localización nuclear de PESKY se encuentra precisamente en la secuencia peptídica que comparte con CTACK, y describieron la translocación al núcleo de CTACK humana tras la interacción con su receptor. En nuestro trabajo, nos preguntamos si una forma no secretada de CTACK/CCL27 humana puede localizarse en el núcleo, y si ello tiene efectos biológicos. Para ello, realizamos construcciones de CTACK/CCL27 y CTACK-b (una forma truncada de CTACK, sin péptido señal de secreción, (Fig 24) como proteínas de fusión con EGFP.



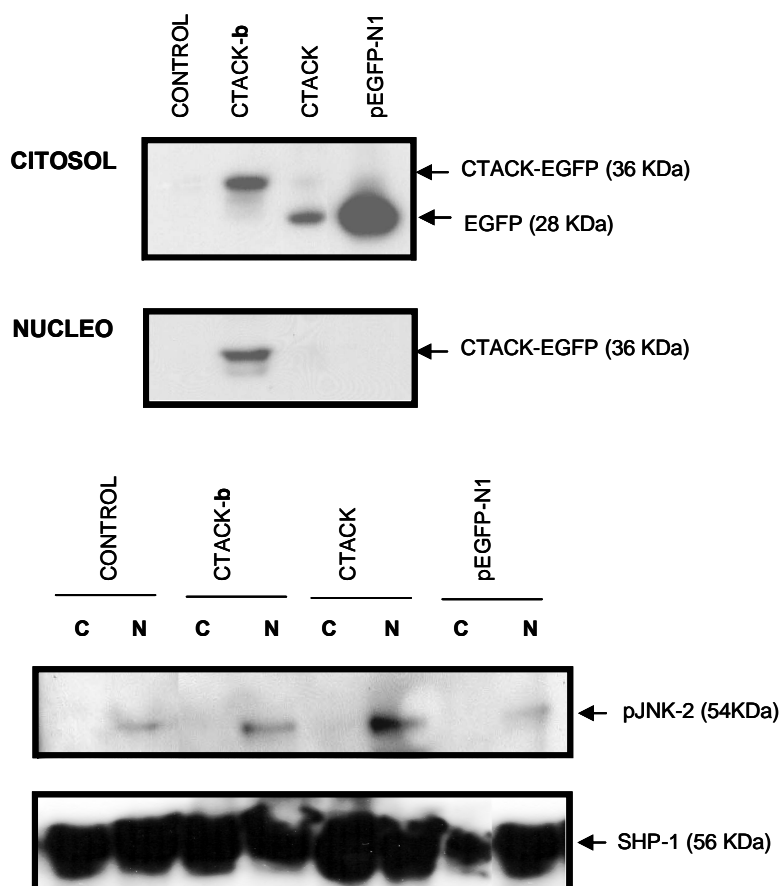
**Figura 24.** Esquema de las secuencias peptídicas de CTACK/CCL27 incluidas en las proteínas de fusión con EGFP.

Las construcciones y el vector vacío pEGFP-N1 se transfectaron en la línea celular COS-7 tal como se describe en el apartado de materiales y métodos. Observamos que la proteína de fusión EGFP-CTACK-b colocaliza con el núcleo de la célula (Fig 25). Por el contrario la proteína EGFP se distribuye por todo el citoplasma (Fig 25B). En algunas preparaciones pudimos observar un patrón de tinción característico que podría sugerir la presencia de CTACK-b en estructuras subcelulares dentro del núcleo (Fig 25D). No conseguimos obtener imágenes claras de la forma completa de CTACK unida a EGFP en células COS-7, en parte debido a su secreción al medio y al menor nivel de expresión de la construcción.



**Figura 25. Análisis por microscopía de fluorescencia de la localización subcelular de una forma truncada de CTACK (CTACK-b).** Las células COS-7 se transfectaron transitoriamente con pEGFP-CTACK-b y el vector pEGFP-N1. A las 48 horas se sembraron sobre cristales y se fijaron con metanol a -20°C. La actina (A, D) se detectó por incubación con faloidina marcada con rodamina y los núcleos por tinción con Ho33258 (A, B, D) o con Ioduro de propidio (C). **A, C, D)** COS-7 transfectadas con CTACK-b. **B)** COS-7 transfectadas con CTACK-b y pEGFP-N1.

Con objeto de confirmar lo observado por microscopía de fluorescencia, se analizó la localización de CTACK-b mediante ensayos de fraccionamiento subcelular y western-blot de las proteínas nucleares y citosólicas. Se realizó una cotransfección transitoria en células COS-7 con pSLV-SHP-1 y cada una de las construcciones EGFP-CTACK, EGFP-CTACK-b y EGFP. La unión del anticuerpo anti-EGFP detectó que CTACK-b, si bien se encontró en el citosol, también se localizaba entre las proteínas nucleares (Fig 26). Curiosamente, apenas observamos una leve banda correspondiente a la proteína de fusión EGFP-CTACK, probablemente debido a una proteólisis de esta proteína de fusión. La detección de SHP-1 verificó la carga de la misma cantidad de proteína transfectada ya que se expresa tanto en núcleo como en citosol (He y cols, 2005). La pureza de los extractos nucleares y citosólicos se comprobó mediante la detección de pJNK-2, proteína de localización nuclear.



**Figura 26. Western-blot de proteínas nucleares y citosólicas de Cos-7 transfectadas con EGFP-CTACK-b, EGFP-CTACK/CCL27 Y EGFP.** Las células Cos-7 se cotransfectaron transitoriamente con pSVL-SHP-1 y cada una de las construcciones pEGFP-CTACK-b, pEGFP-CTACK y el vector pEGFP-N1. A las 48 horas se analizó mediante western-blot la presencia de las proteínas de fusión EGFP-CTACK-b y EGFP-CTACK en extractos nucleares y citosólicos con un anticuerpo específico anti-GFP. Como control de la pureza de los extractos nucleares (N) y citosólicos (C) se analizó la presencia de pJNK. Como control de carga y transfección se analizó la presencia de SHP-1.

## 5. 2 Alteraciones en la expresión génica inducidas por CTACK-b:

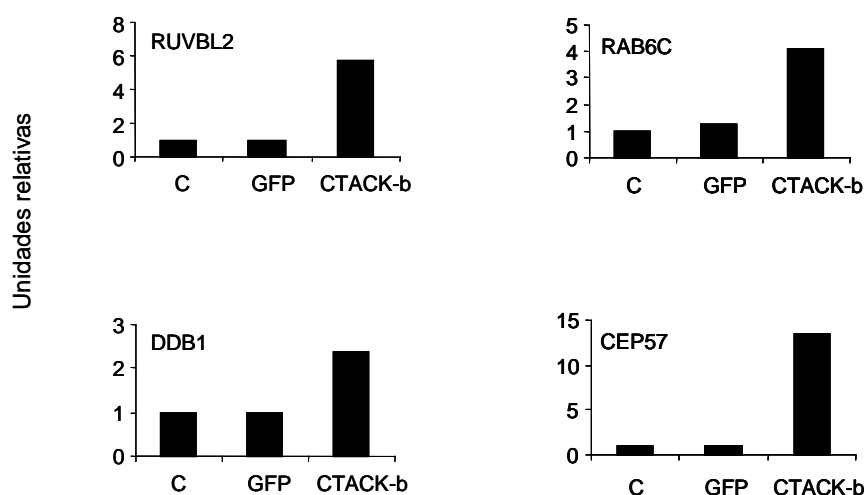
**Tabla III. Análisis de la expresión génica por arrays de ADNc en IMR90 transfectadas con EGFP-CTACK-b.** Los niveles de expresión génica en IMR90-CTACK-b se representan en tonalidades que indican el número de veces que se induce o se reprime normalizado con respecto al control (vector EGFP).

### GENES INDUCIDOS

	<0,1	0,1	0,2	1	2	4	6	>10	>100
<b>CCL27/CTACK</b>									
<b><u>Proliferación celular</u></b>									
RUVBL2/ RuvB-like 2									Regulación de la transcripción
CEP57/ Transloquina									Localizado en centrosoma durante mitosis
DDB1/ Damage DNA binding protein									Reparación de ADN dañado
TAF9/ (TBP)-associated factor-9									Regulación de la transcripción
CCND3/ Cyclin D3									Regula CDK-4 y 6, control del ciclo celular
TOB1/ transducer of ERBB2									Inhibe transcripción de ciclinas
Chromatin accessibility complex 1									Remodelación de la cromatina
TAF15/ (TBP)-associated factor-15									Regulación de la transcripción
<b><u>Migración y adhesión celular</u></b>									
Protocadherina-8									Unión célula-célula, célula-matriz
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF)12									Regula la proteína Rho
Integrina-β1									Adhesión celular, migración celular
Cadherina 23									Unión célula-célula, célula-matriz
Protocadherina-β1									Unión célula-célula, célula-matriz
RASGRP2/ RAS guanyl releasing protein 2									Activa pequeñas GTPasa, incluida Ras
Protocadherina-α 9									Unión célula-célula, célula-matriz
Actinina-α 2									Une actina y facilita su anclaje a membrana
Rho GTPasa activating protein 8									Activa Rho
<b><u>Familia de proteínas Rab</u></b>									
RAB 5B									Regulan la especificidad del tráfico vesicular
RAB 14									
RAB 6C									
RAB 31									
RAB 3B									
<b><u>Otros</u></b>									
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1									Procesamiento y transporte de pre-ARNm
CREBL-1/ cAMP responsive element binding protein- like 1									Factor de transcripción
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-α									Factor de transcripción
MAPKK-7/ Mitogen-activated protein kinase kinase 7									Señalización celular
<b>GENES REPRIMIDOS</b>									
CCL24/MPIF-2									Quimioquina
GRB10/ Growth factor receptor bound protein 10									Señalización celular
LPHN3/ G-protein coupled receptor									Receptor de la subfamilia Latrophilina
G-protein coupled receptor 91									Receptor de succinato
CCR11									Receptor de quimioquina
GRB-2 related adaptor protein									Señalización celular
Regulator of G-protein signaling 9									Inhibe proteína Gi heterotrimérica
G-protein coupled receptor 72									Receptor acoplado a proteína G



Con el fin de estudiar los posibles efectos biológicos de la expresión de CTACK-b, analizamos mediante arrays de ADNc las variaciones de la expresión génica en fibroblastos transfectados con CTACK-b. Para ello, se transfectó la construcción EGFP-CTACK-b y el vector EGFP en la línea humana de fibroblastos IMR-90. A las 48 horas se purificó ARNm-PolyA<sup>+</sup> y se procedió a su análisis mediante hibridación con una membrana en la que estaban representadas sondas de ADNc de 12.000 genes humanos. La expresión de CTACK-b con respecto al control (vector pEGFP-N1) provocó la inducción de la expresión génica de una gran cantidad de proteínas implicadas en proliferación, adhesión y motilidad celular; y la represión génica de apenas unos pocos proteínas (Tabla III). El aumento de expresión de algunos de los genes (RUVBL-2, DDB1, RAB6C, CEP57) se verificó por RT-PCR cuantitativa a partir de ARN total de transfecciones independientes en IMR90 (Fig 27) confirmándose que la inducción génica se debe a la expresión de CTACK-b. Entre las proteínas relacionadas con la proliferación celular destacamos RUVBL2 (RuvB-like 2), por su alto nivel de inducción (200 veces por encima del control). Otros genes que se indujeron fueron los de las proteínas que activan a Rho (Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF)12 y Rho GTPasa activating protein 8) y especialmente varios genes de las proteínas Rab, entre ellos RAB6C (Tabla III). Como control de la expresión de CTACK-b en las células transfectadas con pEGFP-CTACK-b observamos que ésta se indujo 400 veces por encima del nivel en las células transfectadas con el vector pEGFP-N1 (Tabla III). El análisis de la expresión génica sugiere que la sobreexpresión de CTACK-b parece favorecer la proliferación y la migración celular.



**Figura 27. Análisis de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa en IMR90 transfectadas con EGFP-CTACK-b Y EGFP.** Las células IMR90 se transfectaron transitoriamente con pEGFP-CTACK-b y el vector vacío pEGFP-N1. A las 48 horas se extrajo ARN total, a partir del cual se realizó RT-PCR cuantitativa de los genes RUVBL2, DDB1, CEP57 y RAB6C. El n° de moléculas de ARNm del gen específico se normalizó con respecto al n° de moléculas de ARNm de  $\beta$ -2-microglobulina. Se representa en unidades relativas la media de dos transfecciones independientes.

## *Discusión*

Las reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por medicamentos comprenden una amplia gama de entidades clínicas entre las cuales se incluyen desde la urticaria y los exantemas hasta las reacciones más graves como la necrolísis epidermica tóxica y el síndrome de Stevens-Johnson (Roujeau, 2005). Estas reacciones tienen en común la piel como principal órgano diana. Evidencias acumuladas a lo largo de los últimos años han demostrado que los linfocitos T son las principales células efectoras implicadas en la patogénesis de estas reacciones (Gerber y Pichler, 2004). Con el fin de elucidar los mecanismos moleculares que desencadenan las reacciones no inmediatas a medicamentos, muchos estudios se han centrado en el reconocimiento del fármaco por el linfocito T y en generar clones de células T con TCR específicos del fármaco (Mauri-Hellweg y cols. 1995; Pichler, 2002). Al mismo tiempo se han intentado clasificar la gran diversidad de reacciones no inmediatas inducidas por medicamentos no sólo desde un punto de vista clínico sino también desde un punto de vista molecular y celular, con especial interés en conocer el perfil de expresión de citoquinas y el fenotipo de las células responsables del daño en el tejido cutáneo. En este sentido se ha avanzado mucho en el conocimiento de la implicación de los linfocitos T en la patogénesis de estas reacciones. Sin embargo, han sido pocos los estudios acerca de los mecanismos que dirigen el reclutamiento específico de los linfocitos T a la piel. La migración linfocitaria es un proceso complejo. Entre las numerosas moléculas que intervienen, las quimioquinas desempeñan un papel esencial. Las quimioquinas se secretan al medio para regular el proceso de migración linfocitaria a través de la interacción específica con receptores que se expresan en la superficie de las células del sistema inmune (Homey y Zlotnik, 1999) y por tanto representan un papel clave en la homeostasis del sistema inmune y en la generación de la respuesta inmune. Recientemente se han implicado las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en diversas patologías cutáneas como dermatitis atópica y psoriasis (Homey y cols. 2002, Saeki y Tamaki, 2006). En nuestro trabajo nos propusimos estudiar si las interacciones entre las quimioquinas CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 con sus respectivos receptores CCR10 y CCR4 estarían implicadas en el reclutamiento de los linfocitos T a la piel en las reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por medicamentos, concretamente en los exantemas maculo-papulares, el síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidermica tóxica. El exantema maculo-papular es la entidad clínica más frecuente relacionada con las reacciones no inmediatas inducidas por medicamentos y cada vez presenta mayor incidencia en la población (Pichler, 2003; Yawalkar, 2005). El síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidermica tóxica son las reacciones más graves. Ambas se caracterizan por la formación de ampollas y desprendimiento de la epidermis. Se trata de

enfermedades raras con muy poca incidencia, aproximadamente 1 caso por millón de habitantes y por año. Aún no se conoce tratamiento eficaz y a menudo comprometen la vida del paciente (Roujeau y Stern, 1994). La presencia de un abundante infiltrado inflamatorio en el fluido de las ampollas hace que estas enfermedades representen un modelo humano muy interesante para el estudio de migración linfocitaria a la piel.

### **1. EXPRESIÓN GÉNICA DE CTACK/CCL27, TARC/CCL17, CCR10 Y CCR4 EN BIOPSIAS DE PIEL:**

En primer lugar, decidimos analizar la expresión génica de las quimioquinas en biopsias de piel procedentes de pacientes con diversas entidades clínicas: urticaria, exantema maculo-papular (MPE), DRESS (Drug-induced reaction with eosinophilia and systemic symptoms), eritema exudativo multiforme, síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y necrolisis epidérmica tóxica (TEN). Encontramos un aumento en la expresión de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en piel inflamada en todos los casos estudiados con respecto a piel sana que se correlacionaba con la gravedad de la reacción, alcanzándose los mayores niveles de expresión de ambas quimioquinas en la piel afectada de las reacciones ampollosas (SJS y TEN). En un caso de necrolisis epidérmica tóxica comparamos la expresión de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en la biopsia de piel obtenida durante la fase aguda de la reacción y una vez resueltos los síntomas, confirmándose que CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 se sobreexpresan durante la fase aguda de las reacciones ampollosas.

En segundo lugar estudiamos si la expresión de las quimioquinas en piel se correlacionaba con un aumento en la expresión de sus receptores específicos. Por un lado observamos un aumento de la expresión génica de CCR10 y CCR4 en las biopsias de piel de pacientes con reacciones no inmediatas inducidas por medicamentos con respecto a la expresión en piel sana. Dado que se ha descrito que en piel afectada de estas patologías el infiltrado inflamatorio está compuesto mayoritariamente por linfocitos T (Gerber y Pichler, 2004; Roujeau, 2005), es muy probable que el incremento de expresión de CCR10 y CCR4 se deba a un reclutamiento de linfocitos CCR10+ y CCR4+. Además este reclutamiento sería específico al no detectarse en las mismas muestras un aumento de CXCR4, que se expresa uniformemente en células de sangre periférica (granulocitos, monocitos, linfocitos T y B, y plaquetas) (Moser y Loetscher, 2001).

### **2. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CTACK/CCL27**

Los niveles de ARN mensajero no siempre son representativos de la expresión de proteína, por lo que analizamos la expresión de CTACK/CCL27 en piel mediante tinción inmunohistoquímica.

Comprobamos que en piel sana CTACK/CCL27 se expresa constitutivamente en el estrato basal de la epidermis tal como se había descrito previamente (Homey y cols. 2000), y se extiende por toda la epidermis durante la fase aguda de los exantemas maculo-papulares, el síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidérmica tóxica. Detectamos en algunos casos tinción de CTACK/CCL27 en zonas de la dermis y en el endotelio (ver figura 8: F y J). Puede ser debido a que esta quimioquina es secretada por los queratinocitos y en la dermis puede quedar anclada a la superficie de fibroblastos o de células endoteliales por su interacción con los glicosaminoglicanos (Homey y cols. 2000). Mientras que la producción de CTACK/CCL27 está restringida a los queratinocitos, la expresión de TARC/CCL17 es más dispersa. TARC/CCL17 es producida constitutivamente por células de Langerhans y dendríticas (Lieberman y Föster, 1999). Sin embargo, en piel inflamada TARC/CCL17 puede provenir no sólo de las células de Langerhans sino también de las células endoteliales de vénulas cutáneas (Campbell y cols. 1999) y de fibroblastos de la dermis (Fukuda y cols. 2003). Además los queratinocitos estimulados con IFN- $\gamma$  producen TARC/CCL17 (Horiwaka y cols. 2002). Desafortunadamente no pudimos elucidar la fuente de TARC en piel afecta de las reacciones no inmediatas a medicamentos ya que el anticuerpo comercial no resultó eficiente para realizar el análisis inmunohistoquímico. Es muy probable que durante la fase aguda de estas reacciones TARC/CCL17 sea producida por los tres tipos celulares, ya que en biopsias de piel afecta de psoriasis y dermatitis atópica se detecta TARC/CCL17 en queratinocitos (Vestergaard y cols. 2000) y en células endoteliales (Campbell y cols. 1999). Además, la presencia de IFN- $\gamma$  en las reacciones no inmediatas a medicamentos (Posadas y cols. 2000; Nassif y cols. 2004b) podría estar estimulando la producción de TARC/CCL17 por los queratinocitos.

El análisis por ELISA demostró que los niveles de la proteína CTACK/CCL27 aumentan en el suero de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos durante la fase aguda con respecto a los niveles en suero de individuos control y de pacientes tras la resolución del cuadro clínico.

En paralelo, analizamos la cantidad de CTACK/CCL27 en el fluido de las ampollas procedentes de pacientes con síndrome de Stevens-Johnson. El incremento observado en el suero y en el fluido de ampolla se correlaciona con el aumento de la expresión de la quimioquina en biopsias de piel. Ambos resultados apoyan la participación de CTACK/CCL27 en el reclutamiento linfocitario a la piel en estas patologías

**3. EXPRESIÓN DE CCR10 Y CCR4 EN SANGRE PERIFÉRICA Y FLUIDO DE AMPOLLAS:**

Mediante RT-PCR cuantitativa demostramos que la expresión génica de CCR10 y CCR4 aumenta en células mononucleares de sangre periférica durante la fase aguda de las reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos, lo que guarda relación con el aumento de expresión de dichos genes en las biopsias de piel afecta. En un caso de necrolisis epidérmica tóxica dispusimos de muestras de sangre periférica obtenidas a distintos tiempos desde la fase aguda de la reacción. En ningún momento el paciente fue tratado con corticoides, la interrupción de los medicamentos provocó la mejora paulatina. Curiosamente, la expresión de CCR4 recuperó niveles basales a las 24 horas desde la fase aguda, mientras que la expresión de CCR10 se mantuvo alta a lo largo de más días y no alcanzó los niveles basales hasta dos meses desde el inicio de la fase aguda. Este hecho estaría de acuerdo con la hipótesis postulada por Moed y cols. en el 2004, los cuales observaron que en dermatitis alérgica de contacto el aumento de la expresión de CTACK/CCL27 y CCR10 se mantenía a lo largo de 20 días desde la reacción. Los autores especulaban que este hecho podría tener como objeto la retención de las células de memoria en la piel. En este sentido hay que recordar que CCR10 se expresa en una subpoblación de linfocitos CLA<sup>+</sup> que corresponde a las células de memoria efectoras (Soler y cols. 2003).

El análisis mediante citometría de flujo de la expresión de CCR10 y CCR4 demostró que el porcentaje de linfocitos T CCR10<sup>+</sup> y CCR4<sup>+</sup> aumenta durante la fase aguda de la reacción con respecto al porcentaje en individuos sanos y tras la resolución del cuadro clínico (no mostrado). En algunos casos de exantema maculo-papular se observó un aumento del porcentaje de monocitos (CD3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>) que expresaban CCR4, pero no CCR10, durante la fase aguda (no mostrado).

El análisis de los linfocitos T presentes en el fluido de las ampollas subepidérmicas, formadas durante la fase aguda del síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidérmica tóxica, nos proporciona la ventaja de conocer el fenotipo de las células que han migrado “in vivo” a la piel. Comprobamos mediante citometría de flujo que el mayor porcentaje de las células mononucleares presentes en las ampollas son linfocitos T, en su mayoría CD8<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> de acuerdo con los datos previamente publicados (Nassif y cols. 2002). En paralelo analizamos mediante RT-PCR cuantitativa la expresión génica de los receptores CCR10 y CCR4 en las células mononucleares del líquido de ampolla. El nivel de expresión de CCR10 en las células del fluido de ampolla mostró un incremento entre 5 y 10 veces por encima del nivel de ARNm en PBMCs. Curiosamente, los niveles de expresión de CCR4 fueron similares a los detectados en sangre periférica, lo que hace suponer un reclutamiento específico de células CCR10<sup>+</sup> a la piel en las reacciones ampollosas.

#### **4. RESPUESTA MIGRATORIA FRENTE A CTACK/CCL27 Y TARC/CCL17 DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA:**

La expresión de los receptores no siempre se corresponde con la respuesta funcional a las quimioquinas (Rabin y cols. 1999), por ello consideramos importante estudiar mediante ensayos funcionales si un aumento en la expresión de los receptores CCR10 y CCR4 en linfocitos de sangre periférica se correlacionaba con una mayor respuesta funcional a sus ligandos respectivos CTACK/CCL27 y TARC/CCL17. En todos los casos de reacciones no inmediatas inducidas por medicamentos donde se realizaron ensayos de migración (19 a CTACK y 21 a TARC), los linfocitos obtenidos de sangre periférica durante la fase aguda presentaron una mejor respuesta frente a las quimioquinas que los linfocitos de sangre periférica obtenidos en fase de resolución o de individuos sanos.

Hasta el momento no se habían realizado ensayos de migración linfocitaria con linfocitos de pacientes con reacciones de hipersensibilidad inducidas por medicamentos. Tan solo el grupo de Cavani ha realizado ensayos funcionales con clones o líneas de células T que provienen de sangre periférica de pacientes alérgicos al níquel (Sebastiani y cols. 2002). Sin embargo, las líneas y clones fueron estimuladas y tratadas “in vitro” con níquel pudiendo perder su fenotipo de origen. En nuestro trabajo los ensayos de quimiotaxis se realizaron directamente con las células mononucleares obtenidas de sangre periférica en el momento de la reacción, sin estimulación previa con el fármaco o con citoquinas. En este sentido, las células se encuentran en un estado de activación y un nivel de expresión de receptores lo más parecido posible a cómo se encuentran durante la reacción.

Como mencionamos anteriormente, en el análisis por citometría de flujo de la expresión de CCR4 se observó en algunos pacientes un aumento del porcentaje de monocitos (CD3- CD4+) CCR4+ de sangre periférica obtenida durante la fase aguda de la reacción (no mostrado). Godiska y cols. (1997) describieron que los monocitos eran capaces de migrar en respuesta a MDC/CCL22, que también es ligando de CCR4. En nuestros ensayos de migración “in vitro” realizados con células mononucleares de sangre periférica de pacientes observamos que los monocitos responden a TARC/CCL17 a tiempos más largos, aproximadamente entre 3 y 6 horas de incubación (no mostrado). Sería interesante en un futuro profundizar en el posible reclutamiento de los monocitos por TARC/CCL17 en estas reacciones.

#### **4. 1. Migración de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en el síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica:**

No todas las subpoblaciones linfocitarias participan de la misma manera durante la patogénesis de las reacciones de hipersensibilidad inducidas por fármacos (Roujeau, 2005). Los análisis inmunohistoquímicos demuestran que en la piel afecta de SJS/TEN los linfocitos T CD8+ predominan en el infiltrado epidérmico y en el fluido de las ampollas mientras que los linfocitos T CD4+ se encuentran en la dermis (Miyachi y cols. 1991). Con objeto de elucidar la contribución de CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en el reclutamiento de las células T CD8+ y CD4+ a la piel en el síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidérmica tóxica, analizamos mediante citometría de flujo las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica que migraron en respuesta a dichas quimioquinas. Los linfocitos T CD8+ de sangre periférica de pacientes con SJS/TEN migraron preferentemente a CTACK/CCL27. Más aún, células CD8+ purificadas de sangre periférica de un paciente con síndrome de Stevens-Johnson presentaron mejor respuesta a CTACK/CCL27 y mayor nivel de expresión de CCR10 que las células CD4+ purificadas de la misma muestra. Estos datos sugieren que CTACK/CCL27 participa principalmente en el reclutamiento de las células T CD8+ durante la patogénesis del síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidérmica tóxica. Además, los resultados guardan relación con el incremento específico de la expresión de CCR10 y la respuesta a CTACK/CCL27 de las células del fluido de las ampollas en las que predomina la subpoblación CD8+.

Los linfocitos T CD4+ migraron a TARC/CCL17 significativamente mejor que los CD8+. Es probable que TARC/CCL17 participe en el reclutamiento de las células CD4+ que en las reacciones ampollosas predominan en la dermis (Miyachi y cols. 1991), y por ello aunque la expresión de CCR4 aumenta en el infiltrado cutáneo no detectemos apenas incremento de expresión de CCR4 en las células de la ampolla subepidérmica. Curiosamente, Soler y cols. (2003) describieron que prácticamente la totalidad de los linfocitos CCR10+ expresaban CCR4 en individuos sanos. En el análisis mediante citometría de flujo de la expresión de CCR10 y CCR4 en las células mononucleares de sangre periférica no sólo detectamos linfocitos CCR10+ CCR4+ sino también un porcentaje significativo de linfocitos CCR10+ CCR4- tanto en donantes sanos como en pacientes (no mostrado). Puede que la discrepancia se deba a la utilización de anticuerpos anti-hCCR10 distintos.

En base a nuestros resultados, sugerimos que es posible que durante la patogénesis de estas reacciones se genere una subpoblación de linfocitos T CD8+ citotóxicos que exprese específicamente CCR10 y no CCR4. Esta hipótesis explicaría que en los pacientes con reacciones ampollosas la respuesta de los linfocitos T CD8+ a CTACK/CCL27 sea mejor que la



respuesta de los CD4+, así como que no exista un incremento de expresión de CCR4 en las células del fluido de las ampollas. También es posible que puesto que la expresión basal de CCR10 es mucho menor que la de CCR4, el sistema sea más sensible para detectar los cambios en los niveles de ARNm de CCR10.

En el síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidérmica tóxica, las mucosas de ojos, labios y genitales están afectadas, y en los casos más graves el daño alcanza a la mucosa gastrointestinal, tráqueas y bronquios (Becker, 1998). El aumento de expresión de CCR10 en los linfocitos de sangre periférica no sólo podría estar implicado en la migración a la piel a través de su interacción con CTACK/CCL27 sino también a las mucosas mediante interacción con MEC/CCL28, recientemente identificado como ligando de CCR10 (Wang y cols. 2000). MEC/CCL28 se expresa en las mucosas de tráquea, colon y glándulas exocrinas, y se ha descrito su implicación en la inmunidad de estos tejidos (Hishima y cols. 2003; Hishima y cols. 2004). En individuos sanos está descrito que todos los linfocitos T CCR10+ expresan CLA (Soler y cols. 2003). Sin embargo la expresión de CLA no es exclusiva de los linfocitos que migran a la piel, ya que está descrito la presencia de células CLA+ en los epitelios de mucosas como la mucosa oral (Walton y cols. 1997).

#### **4. 2. Migración de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en reacciones exantemáticas:**

Realizamos el análisis de las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica que migraron en respuesta a CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 en un total de 12 pacientes con reacciones exantemáticas no ampollosas. Los resultados indicaron que CTACK/CCL27 reclutó por igual los linfocitos T CD4+ y CD8+ en estas reacciones, aunque en cuatro de los pacientes estudiados los linfocitos T CD8+ migraron mucho mejor a CTACK/CCL27 que los CD4+. Sería interesante confirmar mediante un análisis inmunohistoquímico si el infiltrado inflamatorio en la piel de estos pacientes presenta mayor porcentaje de linfocitos T CD8+ que en la piel afecta de reacciones exantemáticas de menor gravedad.

Según nuestros resultados, TARC/CCL17 atrae mayoritariamente a los linfocitos T CD4+ en todas las entidades clínicas de reacciones no inmediatas inducidas por fármacos, tanto en las reacciones ampollosas como en los exantemas. TARC/CCL17 comparte receptor con la quimioquina MDC/CCL22. Se ha descrito que ambos ligandos de CCR4 aumentan en el suero de pacientes con dermatitis atópica (Shimada y cols. 2004) y en biopsias de piel afecta de dermatitis atópica y psoriasis (Horikawa y cols. 2002). Nosotros hemos detectado que MDC/CCL22

también aumenta en biopsias de piel de pacientes con reacciones no inmediatas inducidas por medicamentos y que los niveles de expresión se correlacionan con una mejor respuesta funcional de los linfocitos T de sangre periférica de pacientes en ensayos de migración frente a MDC/CCL22 (no mostrado).

Las reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos se han asociado a un patrón de citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) (Posadas y cols, 2000); aunque algunos autores describen que en exantemas maculo-papulares inducidos por medicamentos existe un patrón heterogéneo de citoquinas donde se combinan IL-5, IL-4, IL-2 e IFN- $\gamma$  (Yawalkar y Pichler, 2001). Con frecuencia TARC/CCL17 se ha catalogado como una quimioquina que recluta a linfocitos Th2 debido a la expresión de CCR4 en células Th2 polarizadas “in vitro” (Bonicchi y cols. 1998; Sallusto y cols. 1998; D’Ambrosio y cols. 1998). Sin embargo, se ha demostrado que “in vivo” CCR4 se encuentra en la superficie de células tanto Th2 como Th1 (Andrew y cols. 2001). Por otro lado se ha descrito que las citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) inducen la producción de TARC/CCL17 por los queratinocitos mientras que las citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13) la inhiben (Yu y cols. 2002). Al contrario ocurre con la expresión de TARC/CCL17 en los fibroblastos de la dermis y en las células de Langerhans, la cual se estimula en presencia de IL-4 y TNF- $\alpha$  y se inhibe por IFN- $\gamma$  (Xiao y cols. 2003).

##### **5. POSIBLE IMPLICACIÓN TERAPÉUTICA:**

La interacción entre las quimioquinas y sus receptores es específica, de forma que permite controlar el acceso de determinadas poblaciones a los órganos linfoides o a los tejidos periféricos. Por ello, las quimioquinas son moléculas candidatas a ser dianas terapéuticas en el tratamiento de diversas enfermedades.

Experimentos “in vivo” con modelos murinos de hipersensibilidad retardada han demostrado que el reclutamiento de linfocitos a la piel se puede inhibir con anticuerpos anti-CTACK/CCL27. Reiss y cols (2001) bloquearon la migración linfocitaria en un modelo de hipersensibilidad no inmediata inducida por DNFB con anticuerpos anti-CTACK/CCL27 únicamente en ratones con linfocitos procedentes de un ratón CCR4<sup>-/-</sup>, lo que sugiere que CTACK/CCL27 y TARC/CCL17 cooperan en la migración linfocitaria a la piel. Sin embargo, Homey y cols (2002) demostraron que los anticuerpos anti-CTACK bloqueaban más del 90% del reclutamiento de los linfocitos a la piel en un modelo murino de hipersensibilidad retardada inducida por OVA. Algunos autores catalogan a CTACK/CCL27 como diana terapéutica idónea en el tratamiento de patologías cutáneas por su expresión restringida en la epidermis (Mackay, 2002).

En base a nuestros resultados podemos concluir que las interacciones CTACK/CCL27-CCR10 y TARC/CCL17-CCR4 pueden participar activamente en la migración de los linfocitos T a la piel en las reacciones no inmediatas inducidas por medicamentos, y proponemos la implicación de CTACK/CCL27 en el reclutamiento selectivo de las células citotóxicas a la piel en el síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidérmica tóxica.

#### **6. ESTUDIO DE UNA VARIANTE NO SECRETADA DE CTACK/CCL27 HUMANA:**

En 1999, Baird y cols. identificaron una variante de la proteína CTACK de ratón generada por un procesamiento alternativo del ARNm a la que llamaron PESKY. Esta isoforma carece de la secuencia del péptido señal y en su lugar presenta un péptido específico. Mediante experimentos de microscopía, los autores demostraron que PESKY se localiza en el núcleo. La secuencia de localización nuclear de PESKY se encuentra en la secuencia que comparte con CTACK (Gortz y cols., 2002). En humanos aún no se ha descrito ningún procesamiento alternativo del ARNm de CTACK. Sin embargo Gortz y cols. observaron que CTACK humana se translocaba al núcleo tras interactuar con su receptor. En nuestro trabajo nos propusimos avanzar en el estudio de la posible translocación al núcleo de CTACK. Generamos una proteína de fusión de CTACK humana con EGFP en la que eliminamos el péptido señal y que denominamos CTACK-b. Mediante microscopía de fluorescencia localizamos esta proteína de fusión EGFP-CTACK-b en el núcleo de células COS-7 transfectadas. Estas observaciones se confirmaron con el análisis mediante western-blot de las proteínas nucleares y citosólicas de células COS-7 transfectadas con EGFP-CTACK-b.

A continuación nos preguntamos si CTACK-b, como proteína localizada en el núcleo celular, podría ejercer algún efecto sobre la expresión de determinados genes. Por ello, decidimos analizar la expresión génica en células transfectadas con CTACK-b. Elegimos para ello las células IMR90 por ser una línea humana de fibroblastos poco diferenciada. Tras el análisis por arrays de ADNc encontramos un aumento en la expresión de genes implicados en proliferación, adhesión y migración celular principalmente. La inducción de algunos de estos genes (RUVBL-2, RAB6C, DDB1, CEP57) se comprobó por RT-PCR cuantitativa en dos transfecciones independientes. Es muy probable que las alteraciones en la expresión génica de algunos genes puedan no ser consecuencia directa de la interacción de CTACK-b con la cromatina o con factores de transcripción, sino que pueden ser una consecuencia indirecta de la sobreexpresión de CTACK-b. Entre los genes cuya expresión aumentó en las células transfectadas con CTACK-b destacamos el gen de RUVBL-2 por su alto nivel de inducción. RUVBL-2 es una proteína con actividad helicasa que funciona como cofactor esencial en procesos de remodelación de la

cromatina y regulación de la transcripción (Qiu y cols. 1998). RUVBL-2 participa en la activación de la transcripción durante el crecimiento celular mediante interacción con TBP y c-Myc (Bellosta y cols. 2005), mientras que regula negativamente la transcripción al unirse a  $\beta$ -catenina (Kim y cols. 2005). Otros genes que se indujeron fueron los de las proteínas que activan a Rho (Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF)12 y Rho GTPasa activating protein 8). Rho es una GTPasa que regula el citoesqueleto de actina durante la migración (del Pozo y cols. 1999) y es por tanto diana de la señalización por los receptores de quimioquinas (ver figura 2). Cabe destacar que se indujeron muchos genes de la familia de proteínas Rab, las cuales son pequeñas proteínas con actividad GTPasa, que unidas a GTP se encuentran ancladas a la membrana de endosomas y compartimentos celulares para regular la especificidad del tráfico vesicular (Novick y Zerial, 1997). Recientemente se ha descrito que algunas proteínas Rab (Rab 5, Rab 21, Rab4) están implicadas en el transporte y reciclaje de las integrinas durante la migración celular (Roberts y cols. 2001; Powelka y cols. 2004; Pellinen y cols. 2006). Nos llamó la atención la inducción de la expresión del gen que codifica CEP57/ Transloquina, una proteína asociada a la red de microtúbulos (Hoja y cols. 2000) que se localiza en el centrosoma durante la mitosis (Andersen y cols. 2003) y se ha visto implicada en la activación y translocación al núcleo del factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) (Bossard y cols. 2003). Esta proteína podría facilitar la translocación al núcleo de CTACK-b, además de estar implicada en la proliferación celular. Aunque CTACK-b apenas inhibió la expresión de algunos genes, destacamos la disminución de la expresión génica de la proteína RGS 9L (Regulator of G-protein signaling), la cual actúa como inhibidor de la proteína heterotrimérica  $G_i$  (Granneman y cols. 1998), precisamente la proteína G acoplada a los receptores de quimioquinas. La presencia de CTACK-b también supuso la represión génica de GRB-10 (Growth factor receptor-bound protein 10), proteína citosólica que interacciona e inhibe la acción de receptores con actividad tirosin quinasa, la mayoría receptores de factores de crecimiento (Liu y Roth, 1995; Moutoussamy y cols. 1998). Observamos también que la sobreexpresión de CTACK-b reprimió la expresión de varios receptores acoplados a proteínas G, entre ellos el receptor CCR11 el cual se ha identificado muy recientemente como receptor de la familia de quimioquinas MCP (Monocyte chemoattractant protein) (Schweickart y cols. 2000); y las quimioquinas CCL25/TECK, ELC y SLC (Gosling y cols. 2000). También encontramos una disminución en la expresión de la quimioquina CCL24/MPIF-2 (Myeloid progenitor inhibitor factor- 2) que recluta linfocitos T en reposo, y se ha descrito que suprime la acción del progenitor mielóide HPP-CFC (High proliferative potencial colony-fomation factor) (Patel y cols. 1997).

El análisis de la expresión génica por arrays de ADNc sugiere que CTACK-b podría aumentar la migración celular no sólo al inducir la expresión de genes relacionados con este proceso sino también a través de favorecer la señalización de los receptores de quimioquinas. Nuestros resultados obtenidos de fibroblastos transfectados con CTACK-b (humano), no difieren de lo observado por Gortz y cols (2002) en células 3T3 transfectadas de forma estable con PESKY (murino). Las células 3T3-PESKY presentaban cambios en el citoesqueleto de actina y una mayor motilidad que las no transfectadas. Sin embargo, aunque realizaron análisis por microarrays los autores no detectaron un aumento en la expresión génica de proteínas relacionadas con la migración celular.

Se ha descrito la implicación de CTACK/CCL27 en varios tipos de cáncer de piel. Los niveles de CTACK aumentan en el suero de pacientes con linfomas cutáneos (Fujita y cols. 2006; Kagami y cols. 2006) y con tumores epiteliales inducidos por radiación UV (Saul y cols. 2005). Las células de linfomas cutáneos y melanomas expresan CCR10 (Murakami y cols. 2003; Sokolowska y cols. 2005). Recientemente, se ha descrito la participación de CTACK/CCL27 en procesos de regeneración de piel mediante el reclutamiento de células madre epidérmicas de la médula ósea (Inokuma y cols. 2006).

En base a nuestros resultados del análisis de la expresión génica, la sobreexpresión de CTACK-b podría estar participando en un aumento en la proliferación y migración no sólo de linfocitos sino también de otros tipos celulares como células tumorales y células de la médula ósea.

Sería interesante estudiar la expresión de esta posible isoforma de CTACK/CCL27 en humanos, así como analizar la expresión de algunos de los genes que pudieran estar regulados por dicha isoforma en las biopsias de melanomas y linfomas cutáneos así como en piel afecta de reacciones de hipersensibilidad inducidas por medicamentos, donde hemos demostrado la implicación de CTACK/CCL27.

La señalización de los receptores de quimioquinas provoca un aumento en la proliferación celular, la reorganización del citoesqueleto, la adhesión y la migración celular (Wong y Fish, 2003). El hecho de que CTACK-b localizada en el núcleo pueda mimetizar gran parte de las acciones que señala a través de su receptor sugiere una nueva forma de acción de las quimioquinas.

## ***Conclusiones***

1. La expresión génica de CTACK/CCL27, TARC/CCL17, CCR10 y CCR4 aumenta en piel afecta de reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.
2. Los niveles de expresión de la proteína CTACK/CCL27 aumentan en piel y en suero de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.
3. La expresión génica y los niveles de proteína de los receptores CCR10 y CCR4, así como la respuesta migratoria frente a sus ligandos, aumentan en los linfocitos de sangre periférica procedentes de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducidas por fármacos.
4. CTACK/CCL27 podría participar significativamente en el reclutamiento de linfocitos T CD8+ a la piel durante la patogénesis del síndrome de Stevens-Johnson y la necrólisis epidérmica tóxica.
5. CTACK/CCL27 podría regular la expresión de genes implicados en proliferación, migración y adhesión celular.

## ***Bibliografia***



**A**

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996, 383: 787-793.

Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*. 2003. 426: 570-574.

Andrew DP., Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y, Murphy K, Campbell JJ, Butcher EC, and Wu L. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J. Immunol*. 2001; 166:103-111.

**B**

Baird JW, Nibbs RJB, Komai-Koma N, Connolly JA, Ottersbach K, Clark-lewis I, Liew FY y Graham GJ. ESKine, a novel  $\beta$ -chemokine, is differentially spliced to produce secretable and nuclear targeted isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274: 33496-33503.

Becker DS. Toxic epidermal necrolysis. *The Lancet*. 1998, 351: 1417-1420.

Bellosta P, Hulf T, Balla Diop S, Usseglio F, Pradel J, aragnol D, Gallant P. Myc interacts genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to control growth and proliferation during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci*. 2005; 102: 11799-11804.

Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A y Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 helper T cells (Th1s) and Th2s. *Journal of Experimental Medicine*. 1998, 5:129-134.

Bossard C, Laurell H, Van der Berghe L, Meunier S, Zanibellato C, Prats H. Translokina is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nat Cell Biol*. 2003; 5:433-439.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1974; 72:248-254.

Brander C, Mauri-Hellweg D, Bettens F, Rolli F, Goldman M, Pichler WJ. Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-structures are observed in penicillin allergic individuals. *Journal of immunology.* 1995, 155:2670-2678.

Britschgi M, Steiner UC, Schmid S, Depta JPH, Senti G, Bircher A, Burkhart N, Yawalkar N, Pichler WJ. T-cell involvement in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis. *Journal of Clinical Investigation.* 2001, 107: 1433-1441.

Butcher EC y Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996, 272:60-66.

## **C**

Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, and Butcher EC. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature.* 1999; 400: 776-780.

Coleman J.W and Blanca M. Mechanism of drug allergy. *Immunology today.* 1998, 19:196-198.

Coombs PR, Gell PG. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell RR, ed. *Clinical aspects of Immunology.* Oxford: Oxford Univ Pr. 1968, 575-596.

Cronstein BN y Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis and rheumatism.* 1993, 36:147-157.

## **D**

D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P y Sinigaglia F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *Journal of immunological methods.* 2003, 273:3-13.

Del Pozo MA, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Serrador JM, Sánchez- Madrid F. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1999; 29: 3609-3620.

## **E**

## **F**

Fujita H, Asahina A, Sugaya M, Nakamura K, Ping G, Fujiwara H y Tamaki K. Differential production of Th1 and Th2 type chemokines by mouse langerhans cells and splenic dendritic cells. *J Invest Dermatology.* 2005, 124: 343-350.

Fujita Y, Abe R, Sasaki M, Honda A, Furuichi M, Asano Y, Norisugi O, Shimizu T, Shimizu H. Presence of circulating CCR10+ T cells and elevated serum CTACK/CCL27 in the early stage of mycosis fungoides. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 2670-2675.

Fukuda K, Fujitsu Y, Seki K, Kumagai N, Nishida T. Differential expression of thymus and activation-regulated chemokine (CCL17) and macrophage-derived chemokine (CCL22) by human fibroblasts from cornea, skin and lung. *J Allergy and Clini Immunol.* 2003, 111:520-526.

Fullbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D y Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin homing T cells. *Nature.* 1997, 389:978-981.

## **G**

Gerber B.O and Pichler W.J. Cellular mechanism of T cell mediated drug hypersensitivity. *Current Opinion in Immunology.* 2004, 16:732-737.

Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, Mantovani A y Gray PW. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte derived dendritic cells and natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine.* 1997; 185: 1595-1604.

Gombert M, Dieu-Nosjean MC, Winterberg F, Bünemann E, Kubitza RC, Da Cunha L, Haahtela A, Lehtimäki S, Müller A, Rieker J, Meller S, Pivarrcsi A, Koreck A, Fridman WH, Zentgraf HW, Pavenstädt H, Amara A, Caux C, Kmeny L, Alenius H, Lauerma A, Ruzicka, Zlotnik A y

Homey B. CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *The Journal of Immunol.* 2005, 174:5082-5091.

Gonzalez FJ, Leyva L, Posadas S, Luque I, Blanca M, Santamaría L and Juárez C. Participation of T lymphocytes in cutaneous allergy reactions to drugs. *Clinical Experimental Allergy.* 1998, 4:3-6.

Gortz A, Nibbs RJB, McLean P, Jarmin D, Lambie W, Baird J, Graham GJ. The chemokine ESKine displays novel models of intracrine and paracrine function. *Journal of Immunology.* 2002; 169: 1387-1394.

Gosling J, Dairaghi DJ, Wang Y, Hanley M, Talbot D, Miao Z, Schall TJ. Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK. *J Immunol.* 2000; 164: 2851-2856.

Granneman JG, Zhai Y, Zhu Z, Bannon MJ, Burchett SA, Schmidt CJ, Andrade R, Cooper J. Molecular characterization of human and rat RGS9L, a novel splice variant enriched in dopamine target regions, and chromosomal localization of the RGS 9 gene. *Mol Pharmacol.* 1998; 54:687-694.

Griem P, Wulferink M, Sachs B, González JB and Gleichmann E. Allergy and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise?. *Immunology today.* 1998,19:133-141.

## **H**

He D, Song X, Liu L, Burk DH, Zhou GW. EGF-stimulation activates the nuclear localization signal of SHP-1. *J Cell Biochem.* 2005; 94:944-953.

Hertl M y Merk HF. Lymphocyte activation in cutaneous drug reactions. *Journal of investigative Dermatology.* 1995, 105: 95S-98S.

Hishima K, Kawasaki Y, Hanmoto H, Nakayama T, Nagakubo D, Kanamaru A, y Yoshie O. CC Chemokine ligands 25 and 28 plays essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells. *J Immunol.* 2004, 173: 3668-3675.

Hishima K, Ohtani H, Shibano M, Izawa D, Nakayama T, Kawasaki Y, Shiba F, Shiota M, Katou F, Saito T, y Yoshie O. CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad spectrum antimicrobial activity. *J Immunol.* 2003, 170: 1452-1461.

Hoja MR, Wahlestedt C, Hoog H. A visual intracellular classification strategy for uncharacterized human proteins. *Exp Cell Res.* 2000; 259: 239-246.

Homey B y Zlotnik A. Chemokines in allergy. *Current opinion in immunology.* 1999, 11:626-634.

Homey B, Alenius H, Müller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bünnemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, and Zlotnik A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nature Medicine.* 2002, 8:157-165.

Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Müller A, Malefyt RD, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C y Zlotnik A. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ /CCL20 and CC Chemokine receptor 6 in Psoriasis. *The Journal of immunology.* 2000, 164:6621-6632.

Horikawa T, Nakayama T, Hikita I, Yamada H, Fujisawa R, Bito T, Harada S, Fukunaga A, Chantry D, Gray PW, Morita A, Suzuki R, Tezuka T, Ichihashi M and Yoshie O. IFN-g-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *International Immunology.* 2002; 14: 767-773.

Hromas R, Broxmeyer HE, Kim C, Christopherson K, and Hou YH. Isolation of ALP, a novel divergent murine CC chemokine with a unique carboxy terminal extension. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1999, 258: 737-740.

Hudak S, Hagen M, Liu Y, Catron D, Oldham E, McEvoy LM, Bowman EP. Immune surveillance and effector functions of CCR10<sup>+</sup> skin homing T cells. *J. Immunol.* 2002, 169:1189-1196.

## **I**

Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S y O. Yoshie. The T cell direct CC Chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC Chemokine receptor 4. *The Journal of biological Chemistry.* 1997, 272:15036-15042.

Imai, T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, y Yoshie O. Molecular Cloning of a Novel T Cell-directed CC Chemokine. Expressed in Thymus by Signal Sequence Trap Using Epstein-Barr Virus Vector. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 21514–21521.

Inokuma D, Abe R, Fujita Y, Sasaki M, Shibaki A, Nakamura H, McMillan JR, Shimizu T, Shimizu H. CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow derived-keratinocytes. *Stem Cells.* 2006, on line Agosto 24.

Ishikawa-Mochizuki I, Kitaura M, Baba M, Nakayama T, Izawa D, Imai T, Yamada H, Hieshima K, Suzuki R, Nomiyama H, y Yoshie O. Molecular cloning of a novel CC chemokine, interleukin-11 receptor- $\alpha$ -locus chemokine (ILC), which is located in chromosome 9p13 and a potential homologue of a CC chemokine encoded by molluscum contagiosum virus. *FEBS letters.* 1999, 460:544-548.

## **J**

Jarmin DI, Rits M, Bota D, Gerard NP, Graham GJ, Clark-Lewis I y Gerard C. Cutting edge: Identification of the orphan receptor G-protein-coupled receptor 2 as CCR10, a specific receptor for the chemokine ESKine. *The Journal of Immunology.* 2000, 164: 3460-3664.

Jeremy Ono S, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M y Toda M. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy and Clinical Immunology.* 2003, 111:1185-1199.

## **K**

Kagami S, Sugaya M, Minatani Y, Ohmatsu H, Kakinuma T, Fujita H, Tamaki K. Elevated serum CTACK/CCL27 levels in CTCL. *J Invest Dermatol.* 2006; 126:1189-1191.

Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Asano N, Mitsui H, Tada Y, Wakugawa M, H, Watanabe T, Torii H, Komine M, Asahina A, Nakamura M, Tamaki K. Increased serum cutaneous T-cell attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Allergy and Clin Immunol.* 2003, 111: 592-597.

Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Asahina A, Onai N, Matsushima K, and Tamaki K. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: serum thymus and activation regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107:535-541.

Keeney S, Chang GJ, Linn S. Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E. *J Biol Chem.* 1993; 268: 21293-21300.

Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C, Chen C, Chung CH, Huber O, Rose DW, Sawyers CL, Rosenfeld MG, Baek SH. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature.* 2005; 434: 921-926.

Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L, and Butcher EC. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest.* 2001; 108:1331-1339.

Kunkel EJ y Butcher EC. Chemokines and the tissue specific migration of lymphocytes. *Immunity.* 2002, 16:1-4.

## **L**

Ledee DR, Chen J, Tonelli LH, Takase H, Gery I, Zelenka PS. Differential expression of spliced variants of chemokine CCL27 mRNA in lens, cornea, and retina of the normal mouse eye. *Molecular Vision.* 2004; 10:663-667.

Leyva L, Torres MJ, Posadas S, Blanca M, Besso G, O'Valle F, García del Moral R, Santamaría LF, Juárez C. Anticonvulsant induced toxic epidermal necrolysis: monitoring the immunologic response. *J Allergy and Clinical Immunology*. 2000, 105: 157-65.

Leyva L, Torres MJ, Posadas S, Luque I, Gonzalez L, Blanca M, Juárez C and Santamaría LF. Preferential expresión of the skin homing receptor CLA in peripheral T lymphocytes from patients with drug allergic reactions. *Int Arch Allergy Immunology*. 1999, 118:355-357.

Lieberman I y Förster I. The murine  $\beta$ -chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4<sup>+</sup> T cells. *Euro J Immunol*. 1999, 29: 2684-2694.

Liu F, Roth RA. Grb-IR: a SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function. *Proc Natl Acad Sci*. 1995; 92: 10287-10291.

## M

Mackay CR. New avenues for anti-inflammatory therapy. *Nature Medicine*. 2002; 8:117-118.

Mason D y Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*. 1998; 10:649-655.

Mauri-Hellweg D, Bettens F, Mauri D, Brander C, Hunziker T and Pichler WJ. Activation of drug specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin and carbamazepine. *Journal of immunology*. 1995, 155(1):462-472.

Moed H, Boorsma DM, Stoof TJ, Von blogmberg BME, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S y Rustemeyer T. Nickel-responding T cells are CD4<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> and express chemokine receptors CXCR3, CCR4 and CCR10. *British Journal of Dermatology*. 2004, 151: 32-41.

Moed H, Boorsma DM, Tensen CP, Flier J, Jonker MJ; Stoof TJ, E von Blomberg BM, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Rustemeyer T, Gibbs S. Increased CCL27-CCR10 expression in allergic contact dermatitis: implications for local skin memory. *Journal of Pathology*. 2004; 204: 39-46.



Morales, J., B. Homey, A.P.Vicari, S. Hudak, E. Oldham, J. Hedrick, R. Orozco, N.G.Copeland, N.A. Jenkins, L. McEvoy, and A. Zlotnik.. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999, 96:14470-14475.

Moser B y Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature immunology.* 2001, 2:123-128.

Moutoussamy S, Renaudie F, Lago F, Kelly PA, Finidori J. Grb-10 identified as a potential regulator of growth hormone (GH) signaling by cloning of GH receptor target proteins. *J Biol Chem.* 1998; 273: 15906-15912.

Murakami T, Cardones AR, Finkelstein SE, Restifo NP, klaunberg BA, Nestle FO, Castillo SS, Dennis PA, y Hwang ST. Immune evasion by murine melanoma mediated through CC chemokine receptor-10. *J Exp Med.* 2003, 198:1337-1347.

Murdoch C y Finn A. Chemokie receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood.* 2000, 95: 3032-3043.

## **N**

Naisbitt DJ, Gordon SF, Pirmohamed M, Park BK. Immunological principles of adverse drug reactions: the initiation ana propagation of immune responses elicited by drug treatment . *Drug Saf.* 2000, 23:483-507.

Nassif A, Benssusan A, Boumsell L, Deniaud A, Moslehi H, Wolkenstein P, Bagot M, Roujeau JC. Toxic epidermal necrolysis: effector cells are drug specific cytotoxic T cells. *J Allergy and Clinical Immnology.* 2004, 114: 1209-1215. a

Nassif A, Benussan A, Dorothée G, Mami-Chouaib F, Bachot N, Bagot M, Boumsell L, Roujeau C. Drug specific cytotoxic T cells in the skin lesions of a patient with toxic epidermal necrolysis. *J Investigative Dermatology.* 2002, 118: 728-733.

Nassif A, Moslehi H, Le Gullevo S, Bagot M, Lyonnet L, Michel L, , Boumsell L, Benssusan A, Roujeau JC. Evaluation of the potential role of cytokines in toxic epidermal necrolysis. *J Inves Dermatology*. 2004, 123: 850-855.b

Notohamiprodjo M, Segerer S, Huss R, Hildebrandt R, Soler D, Djafarzadeh R, Buck W, Nelson PJ, y Luettichau I. CCR10 is expressed in cutaneous T cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2005, 115: 641-647.

Novick P, Zerial M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr opin Cell Biol*. 1997; 9: 496-504.

## **O**

Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pita O, Girolomoni G, Cavani A. CD56 bright CD16- NK cells acumúlate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exarcebate skin inflammation. *European Journal of immunology*. 2006, 36: 118-128.

## **P**

Padial, M.A., J. Alvarez-Ferreira, B. Tapia, R. Blanco, C. Mañas, M. Blanca, and T. Bellón. Acute generalized exanthematous pustulosis associated with pseudoephedrine. *Br. J. Dermatol*. 2004, 150:139-42.

Pan J, Kunkel E, Gossler U, Lazarus N, Langdon P, Broadwell K, Vierra MA, Genovese MC, Butcher EC and Soler D. A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J. Immunol*. 2000,165:2943-2949.

Patel VP, Kreider BL, Li Y, li H, Leung K, Salcedo T, Nardelli B, Pippalla V, Gentz S, Thotakura R, Parmelee D, Gentz R, Garotta G. Molecular and functional chracterization of two novel human C-C chemokines as inhibitors of two distinct classes of myeloid progenitors. *J Exp Med*. 1997; 185: 1163-1172.

Paul C, Wolkenstein P, Adle H, Wechsler J, Garchon HJ, Revuz J, Roujeau JC. Apoptosis as a mechanism of keratinocyte death in toxic epidermal necrolysis. *British Journal of Dermatology*. 1996, 134:710-714.

Pellinen T, Arjonen A, Vuoriluoto K, Kallio K, Fransén JA, Ivaska J. Small GTPase Rab 21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta-1-integrins. *J Cell Biol.* 2006, 173: 767-780.

Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S y Adorini L. Cutting edge: Differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of Immunol.* 2002, 169:6673-6676.

Pichler W.J. Deciphering the immune pathomechanism of cutaneous drug reactions. *Allergy.* 2002, 57:34-36.

Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Annals of Internal Medicine.* 2003, 139: 683-693.

Posadas SJ, Leyva L, Torres MJ, Rodríguez JL, Bravo I, Rosal M, Fernández J, Juárez C, Blanca M. Subjects with allergic reactions to drugs show in vivo polarized patterns of cytokine expression depending on the chronology of the clinical reaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2000, 106: 769-776.

Posadas SJ, Padial A, Torres MJ, Mayorga C, Leyva L, Sánchez E, Álvarez J, Romano A, Juárez C and Blanca M. Delayed reactions to drugs show levels of perforin, granzyme B, and FasL to be related to disease severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2002, 109:155-161.

Postigo AA, Sánchez-Madrid F. Adhesion and homing molecules. *Transplantation proceedings.* 1993, 25:65-69.

Powelka AM, Sun J, Li J, Gao M, Shaw LM, Sonnenberg A, Hsu VW. Stimulation-dependent recycling of integrin-beta-1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic.* 2004; 5: 20-36.

## Q

Qiu XB, Lin YL, Thome KC, Pian P, Schlegel BP, Weremowicz S, Parvin JD, Dutta A. An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *J Biol Chem.* 1998; 273:27786-27793.

## R

Rabin, R.L., M.K. Park, F. Liao, R. Swofford, D. Stephany, and J.M. Farber. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J. Immunol.* 1999; 162:3840-3850.

Reiss, Y., A.E. Proudfoot, C.A. Power, J.J. Campbell, and E.C. Butcher. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J. Exp. Med.* 2001, 194:1541-1547.

Robert C y Kupper TS. Immflamatory skin diseases, T cells, and Immune surveillance. Mechanism of disease. 1999, 341: 1817-1828.

Roberts M, Barry S, Woods A, Van der Sluijs P, Norman J. PDGF- regulated rab-4-dependent recycling of alphavbeta3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading. *Curr Biol.* 2001; 11: 1392-1402.

Roujeau JC, Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. *The New England Journal of Medicine.* 1994, 331: 1272-1285.

Roujeau JC. Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. *Toxicology.* 2005, 209:123-129.

## S

Saeki H y Tamaki K. Thymus activation regulated chemokine (TAARC)/CCL17 and skin diseases. *Journal of Dermatological Science.* 2006, 43:75-84.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 1998, 187:875-883.

Saul AN, Oberyszyn TM, Daugherty C, Kusewitt D, Jones S, Jewell S, Malarkey WB, Lehman A, Lemeshow, Dhabhar FS. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 1760-1767.

Schon MP, Zollner TM y Boehncke WH. The molecular basis of lymphocyte recruitment to skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J Invest Dermatol.* 2003, 121:951-962.

Schweickart VL, Epp A, Raport CJ, Gray PW. CCR11 is a functional receptor for the monocyte chemoattractant protein family of chemokines. *J Biol Chem.* 2000; 275: 9550-9556.

Sebastiani S, Albanesi C, Nasirri F, Girolomoni G, and Cavani A.. Nickel-specific CD4(+) and CD8(+) T cells display distinct migratory responses to chemokines produced during allergic contact dermatitis. *J. Invest Dermatol.* 2002, 118:1052-1058.

Shimada Y, Takehara K, Sato S. Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2004; 34: 201-208.

Sigala B, Edwards M, Puri T, Tsaneva IR. Relocalization of human chromatin remodeling cofactor TIP48 in mitosis. *Exp Cell Res.* 2005; 310: 357-369.

Sokolowska-Wojdylo M, Wenzel J, Gaffal E, Lenz J, Speuser P, Erdmann S, Abuzahra F, Bowman E, Roszkiewicz J, Bieber T, Tuting T. Circulating clonal CLA(+) T cells in Sezary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7. *Br J Dermatol.* 2005; 152:258-264.

Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ. CCR4 versus CCR10 in human cutaneous T<sub>H</sub> lymphocyte trafficking. *Blood.* 2003, 101:1677-1683.

## **T**

Teraki Y, Miyake A, Takebayashi R and Shiohara T. Homig receptor and chemokine receptor on intraepidermal T cells in psoriasis vulgaris. *Clinical and Experimental Dermatol.* 2004; 29:658-663.

## **V**

Vestergaard C , Deleuran M, Gesser B, Larsen CG. Thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) induces a Th2-dominant inflammatory reaction on intradermal injection in mice. *Experimental Dermatology.* 2004a; 13:265-271.

Vestergaard C, Johansen C, Christensen U, Just H, Hohwy T, Deleuran M. TARC augments TNF- $\alpha$ -induced CTACK production in keratinocytes. *Experimental Dermatology.* 2004b; 13:551-557.

Vestergaard C, deleuran M, Gesser B, y Larsen CG. Expresión of the T helper 2- specific chemokine receptor CCR4 on CCR10 positive lymphocytes in atopic dermatitis skin but not in psoriasis skin. *British J Dermatol.* 2003, 149: 457-463.

Vestergaard C, Johansen C, Otkjaer K, Deleuran M, Iversen L. Tumor necrosis factor- $\alpha$ - induced CTACK/CCL27 (cutaneous T-cell attracting chemokine ) production in keratinocytes is controlled by nuclear factor  $\kappa\beta$ . *Cytokine.* 2005;29:49-55.

Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, y Larsen CG. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J. Invest. Dermatol.* 2000, 115:640-646.

Viard I, Werhrlí P, Bullani R, Schneider P, Holler N, Salomon D, Hunziker T, Saurat JH, Tschopp J, French LE. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science.* 1998, 282: 490-493.

Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struffy S, Transidito P, Bonecchi R, Del Petre A, Allavena P, Ruco LP, Chiabrando C, Girolomoni G, mantovani A and Sozzani S. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol.* 2001; 31:812-822.

## **W**

Wakugawa M, Nakamura M, Kakinuma T, Onai N, Matushima K, y Tamaki k. CC Chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4+ Tcells reflects disease activity of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2001, 117: 188-196.

Walton LJ, Thornhill MH, Macey MG, Farthing PM. Cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) and alpha e beta 7 integrins are expressed by mononuclear cells in skin and oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26:402-407.

Wang, W., H. Soto, E.R. Oldham, M.E. Buchanan, B. Homey, D. Catron, n. Jenkins, N.G. Copeland, D.J: Gilbert, N. Nguyen, J. Abrams, D. Kershenovich, K. Smith, T. McClanahan, A.P. Vicari y A. Zlotnik.. Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J. Biol. Chem.* 2000, 275:22313-22323.

Wenzel J, Henze S, Wörenkämper E, Basner-Tschakarjan E, Sokolowska-Wojdylo M, Steitz, J, Bieber T, Túting T. Role of the chemokine receptor CCR4 and its ligand thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 2005; 124:1241-1248.

Wong MM, Fish EN. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Seminars in immunology.* 2003, 15: 5-14.

Wood MA, McMahon SB, Cole MD. An ATPase/ helicase complex is an essential cofactor for oncogenin transformation bu c-Myc. *Mol Cell.* 2000; 5: 321-330.

Wright N, Laín de Lera T, García-Moruja C, illo R, García-Sánchez F, Caruz A, and Teixidó J. Transforming growth factor-b1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood.* 2003, 102: 1978-1984.

## **X**

Xiao T, Fujita H, Saeki H, Mitsui H, Sugaya M, Tada Y, Kakinuma, Torii H, Nakamura K, Asahina A, Tamaki K. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) produced

by mouse epidermal Langerhans cells is upregulated by TNF- $\alpha$  and IL-4 and downregulated by IFN- $\gamma$ . *Cytokine*. 2003; 23: 126-132.

## Y

Yawalkar N, Pichler WJ. Immunohistology of drug-induced exanthemas: clues to pathogenesis. *Current Opinion Allergy Clin Immunol*. 2001, 1 (4): 299-303.

Yawalkar N. Drug induced exanthemas. *Toxicology*. 2005a, 209: 131-134.

Yawalkar N, Shrikhande M, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ. Evidence for a role of Il-5 and eotaxin in activating and recruitment of eosinophils in drug-induced cutaneous eruptions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005b, 106:1171-76.

Yu B, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Maeda S, Yanagihara Y, Furue M. Differential regulation of thymus and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF-alpha and IFN-gamma in human keratinocyte and fibroblast. *J Dermatol Sci*. 2002; 30: 29-36.

## Z

Zheng X, Nakamura K, Tojo M, Oyama N, Nishibu A, Satoh M, Kakinuma T, Wakgaba M, Tamaki K, Kaneko F. TGF- $\beta$ -1-mediated reactivation of thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) synthesis and secretion by HaCat cells co-stimulated with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . *Journal of Dermatological Science*. 2002, 30:154-160.



*Anexos*

#### **PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS:**

- Beatriz Tapia, Antonia Padial, Elena Sanchez-Sabaté , Javier Álvarez Ferreira, Esther Morel, Miguel Blanca y Teresa Bellón. Involvement of CCL27-CCR10 interactions in drug-induced cutaneous reactions. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004; 114:335-340.
- Beatriz Tapia, Esther Morel, Maria Ángeles Martín-Díaz, Rosa Díaz, Antonia Padial y Teresa Bellón. TARC/CCL17 and MDC/CCL22 mediate lymphocyte trafficking to skin in drug-induced maculo-papular exanthemas. Clinical Experimental Allergy. En actual revision.

#### **OTRAS PUBLICACIONES**

- Antonia Padial, Javier Álvarez-Ferreira, Beatriz Tapia, Rosa Blanco, Carlos Mañas, Miguel Blanca y Teresa Bellón. Acute generalized exanthematous pustulosis associated with pseudoephedrine. Br. J. Dermatol. 2004, 150:139-42.

# Involvement of CCL27-CCR10 interactions in drug-induced cutaneous reactions

Beatriz Tapia, BS,<sup>a</sup> Antonia Padial, MD,<sup>b</sup> Elena Sánchez-Sabaté, MD, PhD,<sup>a</sup> Javier Alvarez-Ferreira, MD,<sup>c</sup> Esther Morel, BS,<sup>a</sup> Miguel Blanca, MD, PhD,<sup>d</sup> and Teresa Bellón, PhD<sup>a,b</sup> Madrid and Málaga, Spain

**Background:** Drug-induced skin reactions, including toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome, are severe bullous cutaneous diseases of uncertain etiology, although cytotoxic T cells seem to be involved. Cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK/CCL27) is selectively expressed in skin and attracts CCR10-expressing cells. Exclusive CTACK expression by keratinocytes suggests its involvement in inflammatory skin diseases.

**Objective:** We addressed whether CTACK/CCL27 production by the epidermis and CCR10<sup>+</sup> lymphocytes are involved in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome.

**Methods:** We measured CTACK expression by epidermal cells in 2 patients with drug-induced bullous skin reactions and compared it to lesional skin from several drug-induced exanthemas. In parallel we measured CCR10 mRNA in peripheral blood mononuclear cells from the patients during the course of the disease and in lymphocytes infiltrating the skin.

**Results:** CTACK expression levels in skin biopsies from the 2 patients with drug-induced bullous reactions were higher than those found in healthy subjects or in other drug-induced exanthemas. CCR10 mRNA levels were also elevated in peripheral blood lymphocytes and in lesional skin during the acute phase of the disease. Moreover, resolution was associated with a return to baseline of both CTACK and CCR10 receptor expression.

**Conclusion:** CTACK-CCR10 interactions may be involved in the selective recruitment to the skin of cytotoxic lymphocytes in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome, as well as in less severe drug-induced cutaneous diseases. (J Allergy Clin Immunol 2004;114:335-40.)

**Key words:** Stevens-Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis, drug allergy, chemokine, CTACK, CCL27, CCR10, exanthema

Toxic epidermal necrolysis (TEN) and Stevens-Johnson syndrome (SJS) are 2 related drug-induced disorders characterized by erythema, blister formation, full-thickness epidermal detachment that often affects the

## Abbreviations used

CLA: Cutaneous lymphocyte antigen  
CTACK: Cutaneous T cell-attracting chemokine  
GPR-2: G protein coupled receptor 2  
ILC: IL-11 receptor  $\alpha$  locus chemokine  
PBMC: Peripheral blood mononuclear cell  
PCR: Polymerase chain reaction  
RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction  
SJS: Stevens-Johnson syndrome  
TEN: Toxic epidermal necrolysis  
TNF: Tumor necrosis factor  $\alpha$

mucous membranes, and extensive shedding of the epidermis. The similar histopathologic findings in both entities suggest they form part of a single spectrum.<sup>1,2</sup>

The molecular mechanisms associated with SJS and TEN remain poorly understood, but Th1/Tc1 lymphocytes seem to be involved.<sup>3,4</sup> Some studies show that there is a poor T-cell skin inflammatory infiltrate, composed primarily of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in the dermis and CD8<sup>+</sup> cells in the epidermis.<sup>5</sup> In contrast, the blister fluid is rich in CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> T cells.<sup>6-8</sup> T lymphocytes in inflamed skin express the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA).<sup>9,10</sup> CLA expression is not enough to explain the tissue specificity of lymphocyte migration in cutaneous reactions. Initial adhesion through E-selectin<sup>11</sup> must be followed by lymphocyte activation by chemokines to provide firm adhesion of the leukocyte to the endothelium and the consequent diapedesis.<sup>12</sup>

Because chemokines contribute to lymphocyte extravasation and localization and retention within tissues, we suspect that they may play an important role in the pathogenesis of SJS, TEN, and other drug-induced exanthemas. To date, few cytokines and chemokines have been seen to be involved in the specific migration of leukocytes to skin in drug-induced adverse cutaneous reactions. IL-8/CXCL8 is involved in neutrophil migration in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis<sup>13,14</sup> and IL-5 and eotaxin/CCL11 are associated with eosinophilia in drug-induced reactions with eosinophilia and systemic symptoms and maculopapular exanthemas.<sup>15</sup> Nonetheless, in severe bullous reactions, such as TEN and SJS, neutrophils and eosinophils are not involved as they are CLA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells, the main population found in blister fluid. Chemokines directly attracting cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells to the skin have not yet

From <sup>a</sup>the Research Unit, <sup>b</sup>the Allergy Department, and <sup>c</sup>the Pathology Department, Hospital Universitario "La Paz"; and <sup>d</sup>the Allergy Department, Hospital Carlos Haya.

This work was supported by grants FIS PI02/1027, FIS 01401, and CAM 08.3/0020/20031.

Received for publication February 24, 2004; revised April 21, 2004; accepted for publication April 21, 2004.

Reprint requests: Dr Teresa Bellón, Research Unit, Hospital Universitario "La Paz," PO Castellana 261, 28046 Madrid, Spain. E-mail: tbellonhulp@sahud.madrid.org.

0091-6749/\$30.00

© 2004 American Academy of Allergy, Asthma and Immunology

doi:10.1016/j.jaci.2004.04.034

**TARC/CCL17 and MDC/CCL22 mediate lymphocyte trafficking to skin in drug-induced maculopapular exanthema**

**CONDENSED TITLE:** CCL17 and CCL22 in drug-induced exanthema

**AUTHORS:** Beatriz Tapia\*, Esther Morel\*, María Ángeles Martín-Díaz<sup>†</sup>, Rosa Díaz<sup>†</sup>, Antonia Padial<sup>‡</sup> and Teresa Bellón\*.

**AFFILIATIONS:**

\* Research Unit. Hospital Universitario “La Paz”. Madrid, Spain.

<sup>†</sup> Dermatology Department. Hospital Universitario “La Paz”. Madrid, Spain.

<sup>‡</sup> Allergy Department. Hospital Universitario “La Paz”. Madrid, Spain.

**CORRESPONDING AUTHOR:**

Dr. Teresa Bellón

Research Unit

Hospital Universitario “La Paz”

Pº Castellana 261, 28046 Madrid, Spain.

Telephone: 34 912071511

Fax: 34 912071512

e-mail: [tbellon.hulp@salud.madrid.org](mailto:tbellon.hulp@salud.madrid.org)

## **ABSTRACT**

**Background:** Maculopapular exanthema has been reported to be the most frequently drug-induced cutaneous reaction. Although T lymphocytes are involved in the pathomechanism of this disease, little is known about the recruitment of these cells to skin.

**Objective:** The aim of this work is to study the role of the chemokines TARC/CCL17 and MDC/CCL22 in the lymphocyte trafficking to skin affected to drug-induced exanthema.

**Methods:** Real time PCR was performed to quantify gene expression levels of TARC, MDC and their receptor CCR4 in lesional skin biopsies and in peripheral blood mononuclear cells from patients. Protein expression of CCR4 was determined by flow cytometry in peripheral blood lymphocytes. Functional migration assays to TARC and MDC were assessed to compare migratory responses of peripheral blood lymphocytes from patients and healthy subjects.

**Results:** TARC, MDC and CCR4 gene expression is upregulated in inflamed skin affected to maculopapular exanthema. CCR4 mRNA levels and protein expression are increased in peripheral blood mononuclear cells during the acute phase of the disease. The increased expression of the receptor correlates with a higher response of peripheral blood lymphocytes to TARC and MDC compared to the migratory response in healthy donors.

**Conclusion:** TARC/CCL17 and MDC/CCL22 cooperate in attracting T lymphocytes to skin in drug-induced maculopapular exanthema.

**KEY WORDS:** Chemokines, Drug allergy, Skin, Lymphocytes, Migration

## CASE REPORT

# Acute generalized exanthematous pustulosis associated with pseudoephedrine

M. A. PADIAL, J. ALVAREZ-FERREIRA,\* B. TAPIA, R. BLANCO, C. MAÑAS, M. BLANCA† AND T. BELLÓN

Departments of Allergy and \*Pathology, Hospital Universitario 'La Paz', P °Castellana 261, 28046 Madrid, Spain  
†Department of Allergy, Hospital Carlos Haya, Málaga, Spain

Accepted for publication 25 July 2003

### Summary

Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) is an uncommon skin disorder most often caused by drugs. Few adverse reactions to sympathomimetic drugs have been reported, despite their extensive use. Although the aetiology of AGEP remains uncertain, recent data have reported involvement of drug-specific T cells and interleukin (IL)-8 production. We characterized an adverse reaction to pseudoephedrine both clinically and immunologically. Histological analysis of skin biopsies confirmed the clinical entity as AGEP, while epicutaneous tests confirmed the specificity of the reaction to the drug. Moreover, immunohistochemical studies showed a mononuclear infiltrate consisting of activated memory T cells in addition to polymorphonuclear cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction revealed an increased expression of IL-8 in AGEP-affected skin.

**Key words:** acute generalized exanthematous pustulosis, interleukin-8, lymphocytes, pseudoephedrine, pustulosis

Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) is an uncommon skin disease involving sterile pustules on an erythematous background. It is mainly caused by drugs, particularly antibacterial drugs such as aminopenicillins and macrolides, by acute infection with enteroviruses, or by mercury.<sup>1</sup> Positive skin patch tests and lymphocyte transformation tests suggest involvement of T cells in AGEP.<sup>2</sup> Moreover, a high expression of the potent neutrophil-attracting chemokine interleukin (IL)-8 has been detected in keratinocytes and infiltrating mononuclear cells in positive patch-test samples from patients with AGEP.<sup>2</sup>

Pseudoephedrine is a sympathomimetic drug widely found in pharmacological preparations for the common cold. Adverse reactions to sympathomimetic drugs are rare despite extensive use. Nonpigmented fixed exanthema,<sup>3,4</sup> and generalized scarlatiniform<sup>5</sup> or eczematous eruptions<sup>6</sup> have been reported.

We describe a woman who presented with AGEP after administration of pseudoephedrine. Patch testing with pseudoephedrine and other sympathomimetic drugs was performed to identify cross-reactivity. The immunohistochemical study of the positive patch test and analysis of cytokine profiles and lymphocyte proliferation results are reported.

### Case report

A 42-year-old woman with no relevant medical history was referred because of a suspected adverse drug reaction. Two months previously she had had an upper airway infection, for which her physician prescribed Vincigrip (Salvat Laboratory, Barcelona, Spain) containing paracetamol, pseudoephedrine, chlorphenamine and several excipients. Ten hours after the first dose she developed fever above 38 °C and a pustular eruption with erythema located on the face, trunk and proximal extremities. She was admitted by the dermatologist to the emergency room where a skin biopsy was performed and treatment was commenced with oral

Correspondence: Dr Teresa Bellón.  
E-mail: tbellon.hulp@salud.madrid.org

