

**Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**

**IMPLICACIÓN DE CÉLULAS CITOTÓXICAS EN
REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A
MEDICAMENTOS Y REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN
DE IFN-MEDIADA POR CÉLULAS NK**

Memoria presentada por Esther Morel Bárcena, licenciada en Ciencias Biológicas,
para optar al grado de Doctor.

Directora:
Dra. Teresa Bellón Heredia

Tutora:
Dra. Ángeles Juarranz de la Fuente

Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz
Madrid, 2009

TERESA BELLÓN HEREDIA, Doctora en Biología, Investigadora de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

CERTIFICA:

Que **Esther Morel Bárcena**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “**IMPLICACIÓN DE CÉLULAS CITOTÓXICAS EN REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A MEDICAMENTOS Y REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- MEDIADA POR CÉLULAS NK**”, que presenta como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a 12 de Enero de 2009.

Fdo.: Dra. Teresa Bellón Heredia

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Se ha llevado a cabo mediante financiación concedida por la Fundación del Hospital Universitario La Paz, el Fondo de Investigaciones Sanitarias (proyectos PI 021027 y PI 060441) y la Fundación Mutua Madrileña para la Investigación Biomédica.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

¿Y cómo empiezo?, me resulta realmente difícil escribir este apartado. Me siento delante del ordenador y me vienen mil imágenes, muchas historias, mucha gente... Espero con estas líneas poder reflejar lo agradecida que me siento...

A ti, Teresa, porque un día me diste la oportunidad de poder trabajar contigo, por tu infinita paciencia y disponibilidad, por tu cercanía y comprensión... Gracias por enseñarme qué es la ciencia y cómo se debe hacer ciencia, gracias por muchas otras cosas no menos importantes... Siempre te estaré agradecida...

A mis compañeros de laboratorio que un día se fueron, a los que siguen y a los que acaban de llegar... Gracias Marti, Silvi y VirVir por estar siempre pendientes, por ser tan increíblemente especiales, por vuestro enorme cariño, porque sinceramente esto no habría sido lo mismo sin vosotras... Gracias Carol por ser una flor tan auténtica de la que tanto se puede aprender, gracias por tus cuidados... Gracias Bea por tantos recuerdos buenos de mil momentos compartidos, Salva por tus importantísimas ayudas con los programas de ordenador y por hacerme reír tantísimo, Arancha porque aunque acabas de llegar el índice “inteligente” te lo debo a ti... Gracias Gemix por hacer tan bien tu trabajo y favorecer con ello a los demás, por tantas charlas y tantos momentos, porque te debo llevarte a Malasaña... Gracias Laurix por ser siempre tan cariñosa con La Peque, Patxi por escuchar mis charlas de ciencia y echarme un cable siempre que lo he necesitado con la informática, Iker por ser tan buen vecino y tan buena persona, Merche por derrochar positividad, ¡viva el mundo de color rosa!... Gracias Pedrito por los comienzos y por ser aún más guapo por dentro de lo que eres por fuera, Miriam y Lourdes por vuestras eternas sonrisas, CrisCris1 por tantos buenos momentos en el edificio antiguo, Elena por ser una valenciana tan especial, Pi por estar siempre dispuesta a echar una mano con una sonrisa, y por maja..., Luis por tu enorme amabilidad, Nuria por todas las risas que nos hemos echado, Alba, Ale, Vanesa, Miguel Ángel, CrisCris2, Alberto, Javi (el asturiano), Javi (el primo de Marti ;-)), Cynthia (¡siempre nos quedará París!), Tiho (por superPapaNoel), Rocío (¡qué frío!), Yolanda, Carlos, Loli, Elena, Susana (una secretaria muy especial...), Raúl (el artista), Pablo (el salvador)...

Mil gracias a todos aquellos que desinteresadamente me habéis dado unos mililitros de vuestra sangre, ¡gracias!

A mis amigos de la facultad Rebe, Carmen, Istar, Quas... por empezar conmigo en esto de la Biología y por seguir acompañándome hoy. A mis amigos los no biólogos Marta, Javitxu, Espe, Afri, Esther, Alex, Nuri, David, Dani, Marisol... por tratar de entender lo que hago y, más importante aún, por estar siempre cerca y quererme tanto.

A Javi “Inquilino” por estar siempre pendiente animándome en “esto de pinchar la oreja al ratón” y a Pilar por su enorme curiosidad, habrías sido una gran bióloga...

Al Servicio de Dermatología, de Alergia y de Radioprotección, en especial a Jesús Vidal y a Rafael por su enorme amabilidad.

A Blanca y Miguel por ayudarme a decidir el camino en los comienzos...

A mi tutora, Ángeles Juaranz, porque con ella empecé a “cacharear” por primera vez, porque siempre que la he necesitado ha estado pendiente. A Ángeles Villanueva y Magdalena Cañete por lo bien que os portásteis el poquito tiempo que estuve en vuestro laboratorio.

A mi futuro sobrino por llenarme de alegría justo en el final de mi Tesis.

A mi familia y a Miguel porque sois mis pilares, porque todo lo bueno que tengo os lo debo a vosotros...

¡MIL GRACIAS A TODOS!

RESUMEN/SUMMARY

Las reacciones adversas a medicamentos no inmediatas, en las que parecen estar implicados linfocitos T citotóxicos (CTLs) que expresan receptores de células NK (NKR), comprenden una amplia gama de manifestaciones clínicas que van desde urticarias hasta reacciones más graves como el Síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y la necrolisis epidérmica tóxica (TEN). Los datos publicados sugieren que el IFN- juega un papel importante en el desarrollo de estas reacciones más graves y recientemente se ha descrito que la secreción de esta citoquina por parte de células NK puede determinar respuestas inmunes adaptativas. Aunque muchos trabajos se han centrado en el estudio de la regulación de la citotoxicidad por parte de NKRs inhibidores (iNKRs), existen pocos datos acerca de su posible implicación en la regulación de la producción de citoquinas y, en concreto, sobre el posible papel que ILT2/CD85j pudiera tener sobre la secreción de IFN- en NKs.

En nuestro trabajo se decidió estudiar la posible función que los NKRs y las moléculas HLA pudieran tener sobre el establecimiento y la fisiopatología de reacciones de hipersensibilidad a fármacos, al igual que la posible influencia que el medicamento (hapteno) pudiera ejercer sobre las interacciones receptor-ligando y, por tanto, sobre el umbral de activación celular. Además se analizó la participación que las moléculas HLA-I pudieran tener sobre la regulación de la producción de IFN- a través de la unión con el iNKR ILT2/CD85j.

La expresión de CD8 y de NKRs en linfocitos de sangre periférica y líquido de ampollas de pacientes en fase aguda, así como la expresión de HLA-E en queratinocitos de biopsias de piel afecta, se analizó mediante citometría de flujo y se comparó con la de muestras de los mismos pacientes recogidas una vez resuelto el cuadro clínico y/o de individuos control. Se realizaron ensayos de citotoxicidad con ^{51}Cr y de degranulación mediante la detección de CD107a con células mononucleares de sangre periférica y de ampollas frente a la línea celular 721.221 deficiente en moléculas HLA-I y su transfectante estable para HLA-E (221 .AEH) o queratinocitos humanos alogénicos. El posible papel que la presencia del fármaco pudiera ejercer sobre las interacciones receptor-ligando se estudió en ensayos *in vitro* usando como modelo la amoxicilina (AX), que se une de forma espontánea a proteínas celulares o del suero para ser presentada a los linfocitos T en el contexto de moléculas HLA de clase I y de clase II. La citotoxicidad mediada por células NKL se midió en ensayos de liberación de ^{51}Cr frente a la línea 721.221 y transfectantes estables de esta línea preincubados o no con el fármaco, y se realizaron ensayos de conjugación para evaluar la fosforilación de ILT2/CD85j y el reclutamiento de la fosfatasa SHP-1. Por último, se determinó el posible papel regulador que ILT2/CD85j pudiera tener sobre la producción de IFN- en células NK-92 y NKs de sangre periférica tras la interacción con células diana, productos virales y células dendríticas inmaduras (iDCs) mediante la determinación de la concentración de IFN- secretada al medio y mediante citometría de flujo intracelular.

Se observó un elevado porcentaje de células $CD3^+CD8^+$ y $CD3^+NKR^+$ ($ILT2/CD85j^+$, $CD94/NKG2C^+$ y $KIR2DL2/L3/S2^+$) en sangre periférica y líquido de ampollas así como expresión de HLA-E en queratinocitos de piel afecta de pacientes con reacciones de hipersensibilidad en fase aguda. Los ensayos de citotoxicidad y degranulación demostraron la presencia de células T y NK capaces de lisar células que expresan HLA-E a través del receptor $CD94/NKG2C$ en sangre periférica y en fluido de ampollas de pacientes con reacciones ampollosas en fase aguda. Por otra parte, se demostró que la preincubación de dianas con AX reducía el reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 al receptor $ILT2/CD85j$ tras la interacción con moléculas HLA-I específicas. En lo que respecta al posible papel regulador que $ILT2/CD85j$ pudiera tener sobre la secreción de IFN- en NKs, se demostró una inhibición de la expresión de mRNA, de la producción de proteína y de la secreción de la misma consistente con el reconocimiento específico de moléculas HLA-I por parte de $ILT2/CD85j$. Además, la activación de $ILT2/CD85j$ inhibió la producción de IFN- en respuesta a poly (I:C) y el bloqueo de las interacciones $ILT2/CD85j$ -HLA-I incrementó la secreción de la citoquina tras el encuentro de células NK con iDCs.

Los resultados sugieren que los CTLs que expresan NKRs podrían jugar un papel importante en reacciones de hipersensibilidad a medicamentos no inmediatas y que la regulación de la activación celular a través de receptores específicos de moléculas HLA podría ser un mecanismo implicado en la fisiopatología de estas reacciones. Por último, los datos obtenidos apoyan un papel regulador de las moléculas HLA-I en la producción de IFN- por parte de células NK a nivel de mRNA y proteína tras la interacción con el receptor $ILT2/CD85j$.

Non-immediate adverse drug reactions, in which cytotoxic T lymphocytes (CTLs) expressing NK receptors (NKR) seem to be involved, give rise to different pathological entities ranging from mild skin rashes to severe cutaneous reactions such as toxic epidermal necrolysis (TEN) and Stevens Johnson's Syndrome (SJS). IFN- γ seems to play an important role in the development of SJS and TEN and recent advances support an important role for NK-derived IFN- γ in shaping adaptive immune responses. Although the role of the inhibitory NKRs (iNKRs) in the regulation of cytotoxicity has been widely explored, their involvement in the control of cytokine production has been scarcely analysed and no data are available referring to the role of the iNKR ILT2/CD85j in the regulation of IFN- γ secretion by NK cells.

In the present work, we sought to study the potential role of NKRs and of HLA molecules in the establishment and physiopathology of these diseases, as well as the influence of the presence of the drug (hapten) in receptor-ligand interactions and, therefore, in the threshold of cellular activation. On the other hand, we also analysed the involvement of HLA class I molecules in the regulation of IFN- γ production through binding to ILT2/CD85j.

CD8 and NKR expression in peripheral blood and blister fluid lymphocytes from patients in acute phase, as well as HLA-E expression in keratinocytes from skin eruptions, was analyzed by flow cytometry and compared with samples from the same patients upon resolution and/or control subjects. Cytotoxicity and CD107a degranulation assays were carried out with peripheral blood and blister fluid mononuclear cells against HLA class I-deficient 721.221 and HLA-E transfectant 221 .AEH cell lines or human allogenic keratinocytes. The potential role of the presence of the drug in receptor-ligand interactions was studied by *in vitro* assays using amoxicillin (AX), that spontaneously binds to serum or cellular proteins in order to be recognized by specific T cell-receptors (TCRs) in the context of HLA class II or I molecules. NKL cell line mediated cytotoxicity was measured in 4-h ^{51}Cr -release assays against 721.221 cells and HLA transfectants of the same cell line preincubated or not with the drug and conjugation assays were also carried out to evaluate the phosphorylation of ILT2/CD85j receptor and the recruitment of SHP-1 phosphatase. Finally, we determined the potential role of ILT2/CD85j in the regulation of IFN- γ production by NK-92 and primary NK cells after interaction with target cells, viral products, and immature dendritic cells (iDCs) by measuring the concentration of IFN- γ secreted to the culture supernatants and by intracellular flow cytometry.

We found a high percentage of CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ and CD3 $^{+}$ NKR $^{+}$ (ILT2/CD85j $^{+}$, CD94/NKG2C $^{+}$ and KIR2DL2/L3/S2 $^{+}$) cells in peripheral blood and blister fluid as well as HLA-E expression in keratinocytes from skin biopsies from patients with delayed adverse drug reactions in the acute phase. Cytotoxicity and CD107a degranulation assays proved the presence of T and NK cells able to kill HLA-E-expressing cells through recognition of activating CD94/NKG2C

receptor in peripheral blood and blister fluid from patients with bullous reactions in the acute phase. In the other hand we also found that target preincubation with the drug reduced the recruitment of SHP-1 phosphatase to ILT2/CD85j receptor upon the interaction with HLA. In regards to the role of ILT2/CD85j in the regulation of IFN- secretion by NK cells we found specificities of HLA class I-mediated inhibition of IFN- mRNA expression, protein production, and secretion consistent with the specific recognition by ILT2/CD85j. Furthermore, ligation of ILT2/CD85j inhibited the production of the cytokine in response to poly (I:C), and blocking of ILT2/CD85j-HLA class I interactions increased the secretion of IFN- in NK/iDC cell cocultures. The results suggest that CTLs expressing NKRs could play an important role in nonimmediate adverse drug reactions. The regulation of cellular activation through these HLA receptors could be a mechanism implicated in the pathophysiology of these diseases. Moreover, our data support a role in the regulation of IFN- secretion by NK cells for self HLA class I at the mRNA and protein levels by interacting with the iNKR ILT2/CD85j.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	- 1 -
---------------------------	--------------

INTRODUCCIÓN.....	- 5 -
--------------------------	--------------

1. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDAS POR MEDICAMENTOS	- 7 -
---	-------

2. IMPLICACIÓN DE LINFOCITOS T EN REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDAS POR MEDICAMENTOS	- 9 -
--	-------

3. RECONOCIMIENTO DEL FÁRMACO POR EL TCR	- 10 -
--	--------

4. IMPLICACIÓN DE CÉLULAS CITOTÓXICAS QUE EXPRESAN NKR _s	- 12 -
---	--------

5. CÉLULAS CITOTÓXICAS	- 12 -
------------------------------	--------

5.1. LINFOCITOS T CITOTÓXICOS	- 12 -
-------------------------------------	--------

5.2. CÉLULAS NK	- 12 -
-----------------------	--------

5.3. RECEPTORES DE CÉLULAS NK	- 13 -
-------------------------------------	--------

6. HLA-E	- 19 -
----------------	--------

OBJETIVOS	- 21 -
------------------------	---------------

MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 25 -
----------------------------------	---------------

1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE, DE LÍQUIDO DE AMPOLLAS Y DE PIEL	- 27 -
---	--------

2. OBTENCIÓN DE PBMCS, SUEROS, QUERATINOCITOS, LÍQUIDOS DE AMPOLLA E INFILTRADO DE PIEL AFECTA	- 27 -
--	--------

3. LÍNEAS CELULARES, CULTIVOS PRIMARIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	- 28 -
---	--------

4. ANTICUERPOS	- 29 -
----------------------	--------

5. SEPARACIÓN MAGNÉTICA Y OBTENCIÓN DE CLONES O CULTIVOS PRIMARIOS	- 30 -
--	--------

6. CITOMETRÍA DE FLUJO	- 30 -
------------------------------	--------

7. HAPTENIZACIÓN CELULAR	- 31 -
--------------------------------	--------

8. TRATAMIENTO CON PERVANADATO.....	- 31 -
-------------------------------------	--------

9. TRATAMIENTO CON IFN-.....	- 31 -
------------------------------	--------

10..... I NMUNOPRECIPITACIÓN E INMUNOBLOT.....	- 31 -
---	--------

11. COCULTIVOS DE PBMCS Y CÉLULAS NK-92 CON DIANAS NK. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- Y TNF-	- 32 -
--	--------

12. ESTIMULACIÓN CON POLY (I:C) Y NKp30	- 33 -
13. COCULTIVOS DE NKs E iDCs.....	- 34 -
14. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y LISIS REDIRIGIDA	- 34 -
15. ENSAYOS DE MOVILIZACIÓN DE CD107a	- 35 -
16. EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR CUANTITATIVA	- 36 -
17. EXTRACCIÓN DE DNA Y SECUENCIACIÓN.....	- 36 -
18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 37 -

RESULTADOS - 39 -

1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DEL INFILTRADO DE PIEL AFECTA O AMPOLLAS EN PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A MEDICAMENTOS	- 41 -
1.1. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES LINFOIDES EN SANGRE PERIFÉRICA	- 41 -
1.1.1. Linfocitos T CD8 ⁺	- 41 -
1.1.2. Linfocitos T NKR ⁺	- 43 -
1.2. INFILTRADO DE PIEL AFECTA Y LÍQUIDO DE AMPOLLAS	- 46 -
2. DISMINUCIÓN DEL UMBRAL DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES QUE EXPRESAN NKRs TRAS LA HAPTENIZACIÓN DE MOLÉCULAS HLA-I EN CÉLULAS DIANA - 48 -	
2.1. COMPORTAMIENTO DE LA AMOXICILINA COMO HAPTENO SOBRE PROTEÍNAS DE MEMBRANA	- 48 -
2.1.1. Unión de la amoxicilina a la región extracelular de proteínas de membrana	- 48 -
2.1.2. Unión covalente de la amoxicilina a moléculas HLA-I	- 49 -
2.2. EFECTOS DE LA HAPTENIZACIÓN DE DIANAS NK SOBRE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CÉLULAS EFECTORAS.....	- 50 -
2.2.1. Incremento de la actividad citotóxica de la línea NKL frente a la diana 221 .B*2705 haptениzada	- 50 -
2.2.2. Menor reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 al iNKR ILT2/CD85j tras la interacción con moléculas HLA-I haptениzadas	- 50 -
3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DEL INFILTRADO DE AMPOLLAS EN REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS NO INMEDIATAS - 53 -	
3.1. EXPRESIÓN EN SUPERFICIE Y LIBERACIÓN DE HLA-E.....	- 53 -
3.1.1. Expresión de HLA-E en queratinocitos de piel afecta	- 53 -
3.1.2. Liberación de HLA-E soluble al líquido de las ampollas	- 55 -

3.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DEL LÍQUIDO DE AMPOLLAS	- 56 -
3.2.1. Citotoxicidad de clones T CD8 ⁺ CD56 ⁺ frente a queratinocitos	- 56 -
3.2.2. Citotoxicidad de PBMCs y BFMCs	- 58 -
3.2.3. Expresión y funcionalidad del receptor activador CD94/NKG2C en PBLs y en linfocitos del líquido de ampollas de pacientes con reacciones con afectación mucocutánea	- 59 -
4. PAPEL REGULADOR DE ILT2/CD85j SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IFN- Y LA CITOTOXICIDAD INDUCIDAS POR DISTINTOS ESTÍMULOS EN CÉLULAS NK	- 64 -
4.1. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- INDUCIDA TRAS EL ENCUENTRO DE CÉLULAS NK CON DIANAS	- 64 -
4.1.1. Caracterización funcional de ILT2/CD85j en la línea NK-92	- 64 -
4.1.2. Inhibición de la síntesis de IFN- y TNF- en la línea NK-92	- 66 -
4.1.3. Inhibición de la expresión del mRNA de IFN- en la línea NK-92	- 70 -
4.1.4. Modulación de la síntesis de IFN- en NKs y LT	- 71 -
4.2. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- Y LA CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS NK INDUCIDA POR PRODUCTOS VIRALES	- 75 -
4.2.1. Regulación de la síntesis de IFN-	- 75 -
4.2.2. Regulación de la citotoxicidad	- 78 -
4.3. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- Y DE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA TRAS EL ENCUENTRO DE NKs CON iDCs	- 79 -
4.3.1. Modulación a través de ILT2/CD85j de la producción de IFN- y la citotoxicidad inducidas por NKp30	- 79 -
4.3.1.a. En líneas celulares NK	- 79 -
4.3.1.b. En células NK de sangre periférica	- 81 -
4.3.2. Cooperación de CD94/NKG2A e ILT2/CD85j sobre la regulación de la producción de IFN- y la citotoxicidad en NKs estimuladas por iDCs	- 82 -
DISCUSIÓN.....	- 85 -
CONCLUSIONES	- 105 -
BIBLIOGRAFÍA	- 109 -
ANEXO	- 125 -

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo.

AGEP: Pustulosis exantemática generalizada aguda (*A cute generalizad exanthematous pustulosis*).

AMV-RT: transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (*Aviar myeloblastosis virus reverse transcriptase*).

APC: Célula presentadora de antígeno (*Antigen-presenting cell*).

AX: Amoxicilina.

BFMCs: Células mononucleares de líquido de ampollas (*Blister fluid mononuclear cells*).

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario (*complementary Deoxyribonucleic Acid*).

CMV: Citomegalovirus.

cpm: Cuentas por minuto.

CTL: Linfocito T citotóxico (*Cytotoxic T lymphocyte*).

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*).

DRESS: Reacción a medicamentos con eosinofilia y síntomas sistémicos (*Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms*).

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EM: Eritema multiforme (*Erythema multiforme*).

FBS: Suero de ternera fetal (*Fetal bovine serum*).

FDE: Exantema fijo (*Fixed drug eruption*).

Gy: gray.

HA: Hemaglutinina (*Hemagglutinin*).

HLA: Antígeno leucocitario humano (*Human Leukocyte Antigen*).

HLA-Es: Antígeno leucocitario humano E soluble.

HLA-I: Antígeno leucocitario humano clase I (*Class I Human Leukocyte Antigen*).

iDC: Célula dendrítica inmadura (*Inmature dendritic cell*).

IFN-: Interferón gamma.

IL: Interleuquina.

ILT: *Immunoglobulin-like transcripts*.

IMF: Intensidad media de fluorescencia.

iNKR: Receptor inhibidor de célula citotóxica natural (*Inhibitory natural killer receptor*). **Io:** Ionomicina.

IP: Inmunoprecipitación.

ITAM: Motivo de activación del inmunorreceptor vía tirosina (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*).

ITIM: Motivo de inhibición del inmunorreceptor vía tirosina (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*).

kDa: kilodalton.

KIR: *Killer cell inhibitory receptor*.

LPS: Lipopolisacárido (*Lipopolisacaride*).

LT: Linfocito T.

mA: Miliamperio.

mDC: Célula dendrítica madura (*Mature dendritic cell*).

MPE: Exantema maculopapular (*Maculopapular exanthema*). **mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero (*Messenger ribonucleic acid*).

NK: Célula citotóxica natural (*Natural killer cell*).

NCR: Receptor de citotoxicidad natural (*Natural cytotoxicity receptor*).

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*).

pb: Pares de bases.

PBLs: Linfocitos de sangre periférica (*Peripheral blood lymphocytes*).

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells*).

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PHA: Fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin*).

PMA: *Phorbol myristate acetate*.

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro (*Phenyl methane sulfonyl fluoride*).

PVDF: *Polyvinylidene fluoride*.

PY: Fosfotirosina (*Phosphotyrosine*).

rh-IL: Interleuquina humana recombinante (*Recombinant human interleukin*).

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*).

RT-PCR: Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*).

SCID: *Severe combined immunodeficient*.

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.

SEB: Enterotoxina B de estafilococo (*Staphylococcal enterotoxin B*). **SJS:** Síndrome de Stevens-Johnson (*Stevens-Johnson Syndrome*).

TCR: Receptor del linfocito T (*T Cell Receptor*).

TEN: Necrolisis epidérmica tóxica (*Toxic epidermal necrolysis*).

TLR: *Toll-like receptor*.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa (*Tumor necrosis factor- alpha*).

V: Voltio.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

WB: Inmunoblot (*Western blot*).

INTRODUCCIÓN

1. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDAS POR MEDICAMENTOS

Las reacciones adversas a xenobióticos (medicamentos, metales y otros agentes químicos) pueden dar lugar a fenómenos de hipersensibilidad y/o autoinmunidad (Griem et al., 1998). Dentro de éstas, las reacciones adversas a medicamentos constituyen el grupo más relevante siendo entre la 4ª y la 6ª causa de mortalidad en los EEUU (Ingelman-Sundberg, 2001).

Los fármacos pueden producir dos tipos de reacciones adversas (Pirmohamed et al., 1998); las llamadas reacciones de tipo A, ligadas a las propiedades del medicamento y en general relacionadas con la dosis como son los efectos colaterales, la sobredosis o los efectos secundarios; y las de tipo B, ligadas a la respuesta que el paciente desarrolla y basadas en los mecanismos propios de éste, bien sean de naturaleza inmunológica u otros mecanismos idiosincrásicos. Estas últimas son impredecibles.

Las reacciones adversas a medicamentos mediadas por el sistema inmunológico se incluyen dentro de las reacciones de hipersensibilidad. Según Coombs y Gell las reacciones de hipersensibilidad se clasifican en cuatro categorías:

- Tipo I. Reacción de hipersensibilidad inmediata: Respuesta inmune humoral mediada por IgE específica, y por tanto de tipo Th2, que ocurre en un plazo de minutos a una hora desde la administración del medicamento. Las entidades clínicas más relevantes de este grupo son anafilaxia, asma, angioedema y urticaria inmediata.
- Tipo II. Reacción citotóxica debida a la acción del sistema de complemento y de 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 a la activación del sistema de complemento. Dentro de este grupo se incluyen la enfermedad del suero, enfermedades hematológicas y la vasculitis sistémica y cutánea.
- Tipo IV. Reacción de hipersensibilidad no inmediata: Respuesta inmune celular que ocurre entre las 2 y las 72 horas o varios días después de la ingesta del medicamento.

Las reacciones adversas a medicamentos de tipo B suelen ser reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo I) o no inmediata (tipo IV). Estas últimas comprenden una amplia gama de manifestaciones clínicas cuya característica común es que todas cursan con afectación cutánea.

Pueden ocurrir con independencia del tipo de medicamento y de la edad, sexo y raza del individuo.

Dentro de las reacciones tipo IV se pueden distinguir las siguientes entidades clínicas (Roujeau, 2005):

- **Urticaria:** erupción cutánea que cursa con eritema y edema, asociada frecuentemente a prurito.
- **Exantema maculopapular (MPE):** es la entidad clínica más frecuente, comprende más del 90% de los casos de hipersensibilidad no inmediata a medicamentos. Consiste en la formación de máculas o pápulas eritematosas normalmente simétricas que se presentan en tronco y extremidades. Con frecuencia se asocia a prurito y fiebre leve.
- **Pustulosis exantemática aguda generalizada (AGEP):** es una enfermedad con poca incidencia y causada por fármacos en el 90% de los casos. Se caracteriza por la aparición de numerosas pústulas estériles y fiebre alta.
- **Síndrome de hipersensibilidad/ DRESS (*Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms*):** reacción exantemática con eosinofilia que puede ser grave y a la que se asocian afectaciones del hígado, pulmón o riñón así como anormalidades hematológicas y fiebre alta.
- **Exantema fijo (FDE):** consiste en la formación de placas eritematosas con edema y frecuentemente se desarrolla una ampolla central. Pueden verse afectadas las mucosas. Se le conoce con el nombre de “fijo” ya que una nueva exposición al fármaco causante de la enfermedad provoca la lesión en la misma zona.
- **Eritema multiforme (EM):** reacción que a menudo se confunde con el Síndrome de Stevens-Johnson ya que presenta lesiones ampollosas y en algunos casos existe afectación de mucosas. Pocas veces esta reacción se asocia a medicamentos, por lo general se relaciona con infecciones por el virus herpes simple.
- **Síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y necrolisis epidérmica tóxica (TEN):** son las reacciones adversas a medicamentos más graves, con una elevada mortalidad (10% en pacientes con SJS y 30% en pacientes con TEN) y una baja incidencia (0.4-1.2 y 1-2 casos de TEN y SJS respectivamente por millón de habitantes al año). La reacción comienza con eritema en cara y tronco, la piel afecta desarrolla ampollas (figura 1, panel izquierda) y se produce un desprendimiento de la epidermis (figura 1, panel derecha). Existe afectación de mucosas, generalmente 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 que pueden provocar la muerte del paciente. SJS y TEN se diferencian en el porcentaje de superficie corporal afectada; la reacción se diagnostica como SJS cuando el desprendimiento de la epidermis es menor del 10% y como TEN cuando es mayor del 30%. Se ha descrito que la infección por VIH o padecer lupus eritematoso sistémico son factores de riesgo para padecer estas reacciones más graves. Los fármacos son los responsables de la aparición de estas enfermedades en al menos el 70% de los casos.



Figura 1: Necrolisis epidérmica tóxica en relación a tegretol (izquierda) y eritromicina (derecha)

2. IMPLICACIÓN DE LINFOCITOS T EN REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDAS POR MEDICAMENTOS

Mientras que las reacciones adversas a medicamentos inmediatas están mediadas por IgE específica, existen evidencias que demuestran la implicación los linfocitos T (LT) en la patogénesis de reacciones de hipersensibilidad retardada inducidas por diversos agentes químicos (Griem et al., 1998) y parece que las reacciones adversas a medicamentos no inmediatas también son iniciadas y mantenidas por LT (Coleman and Blanca, 1998).

Así, experimentos *in vitro* han demostrado la existencia de receptores de LT (TCRs) específicos de diversos fármacos (von Greyerz et al., 1999; Zanni et al., 1997) y se ha comprobado que células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) pueden estimularse en presencia del fármaco causante de la enfermedad (Luque et al., 2001) lo que demuestra la existencia de memoria inmunológica. En general los datos son contradictorios en lo que se refiere al fenotipo de las poblaciones linfocitarias que se expanden como respuesta al fármaco. Diversos estudios sugieren que la respuesta es oligoclonal (Komatsu et al., 1996) habiéndose encontrado clones específicos del fármaco tanto CD4 como CD8 (Mauri-Hellweg et al., 1995) y restringidos bien por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad humano (HLA) de clase I o de clase II (Brander et al., 1995; Zanni et al., 1998), algunos de ellos con demostrada actividad citotóxica (Hertl et al., 1993).

Además de trabajos *in vitro* existen estudios inmunohistoquímicos de biopsias de piel de pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediatas que demuestran la existencia mayoritaria de células T en el infiltrado inflamatorio (Britschgi et al., 2001; Gonzalez et al., 1998; Leyva et al., 2000; Yawalkar et al., 2000). Además, se ha determinado un incremento en la expresión de marcadores de activación celular, proteínas responsables de la citotoxicidad (granzima B, perforina y Fas ligando (FasL)) (Posadas et al., 2002) y del marcador linfocitario del *homing* a la piel CLA (Gonzalez et al., 1998; Leyva et al., 2000) en PBMCs de pacientes con estas reacciones en fase aguda.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* ponen al descubierto la existencia de distintos patrones de citoquinas y quimioquinas producidas por linfocitos T que explican la enorme diversidad fenotípica de estas reacciones no inmediatas. Actualmente se sabe que la respuesta inmune celular es bastante más heterogénea de lo que se pensaba en un principio, por lo que recientemente las reacciones de tipo IV de Coombs y Gell se han subclasificado en las siguientes categorías (Lerch and Pichler, 2004):

- Tipo IVa: reacciones de tipo Th1 en las que las células T activan y reclutan a monocitos mediante la secreción de IFN- γ .
- Tipo IVb: son reacciones de tipo Th2 en las que las células T secretan citoquinas tales como IL-4, IL-13 e IL-5 que promueven la activación de eosinófilos (ej: MPE con eosinofilia).
- Tipo IVc: las células T actúan como células efectoras o citotóxicas, migran a la piel y lisan a los queratinocitos a través de la liberación de perforina y granzima B y/o mediante mecanismos dependientes de FasL (ej: MPE, SJS y TEN).
- Tipo IVd: las células T reclutan neutrófilos mediante la secreción de IL-8 y previenen la apoptosis de los mismos a través de la producción de GM-CSF. (ej: AGEPE).

No obstante, varios mecanismos pueden concurrir en una misma reacción (Posadas and Pichler, 2007).

3. RECONOCIMIENTO DEL FÁRMACO POR EL TCR

El desarrollo de respuestas inmunes inmediatas o no inmediatas a medicamentos es el resultado del reconocimiento de los fármacos (o de metabolitos derivados de los mismos) por TCRs específicos en el contexto de moléculas HLA. Los fármacos son compuestos químicos de bajo peso molecular que pueden ser reconocidos por el TCR a través de varios mecanismos (Gerber

and Pichler, 2004; Griem et al., 1998; Hertl and Merk, 1995; Schnyder et al., 2000; von Greyerz et al., 1998) (figura 2):

- Cuando el fármaco contiene grupos químicos reactivos se puede comportar como un **hapteno**. Un hapteno es un compuesto de bajo peso molecular incapaz de desencadenar una respuesta inmune específica que se vuelve inmunogénico al unirse mediante enlaces covalentes a péptidos o proteínas. Así, los LT reconocen a través del TCR el péptido haptenizado que proviene de un procesamiento intracelular del complejo proteínahapteno y que es presentado en el contexto de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) por células presentadoras de antígeno (APCs). Otra posibilidad es que los haptenos se unan directamente al péptido antigénico presentado en la membrana celular en el contexto de una molécula del MHC. Un ejemplo de este tipo de medicamentos es la penicilina G, cuyo anillo -lactámico se une mediante un ataque nucleofílico a los grupos amino de los residuos de lisina de las proteínas (Batchelor et al., 1965).
- Cuando el fármaco no es químicamente reactivo y necesita del metabolismo celular para adquirir grupos reactivos que permitan la unión a proteínas o péptidos intracelulares y ser así reconocido por los LT se dice que se comporta como un **prohapteno**.
- Por último existen evidencias de que algunos fármacos “químicamente inertes” son capaces de ser reconocidos específicamente por LT. Diversos estudios (Schnyder et al., 2000; von Greyerz et al., 1998) han demostrado que estos medicamentos pueden interactuar directamente mediante una unión lábil no covalente con moléculas HLA y el péptido presentado por éstas. Este tipo de unión se conoce como “**interacción farmacológica**” o **concepto “p-i”** (*pharmacologic-interaction*). Algunos de los fármacos que se comportan de este modo son sulfametoxazol, lidocaína y carbamazepina.



Figura 2: Distintas formas de presentación del fármaco a los LT

4. IMPLICACIÓN DE CÉLULAS CITOTÓXICAS QUE EXPRESAN NKRs

Además de involucrar a los LT existen trabajos que implican a las células citotóxicas naturales (células NK) en patologías relacionadas con reacciones de hipersensibilidad (Seo et al., 2000). Así, en el líquido de las ampollas de pacientes con TEN se ha encontrado un elevado porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CTLs) que expresan receptores de células NK (NKRs) (Le Cleach et al., 2000). Por otra parte, estudios inmunohistoquímicos realizados por nuestro grupo mostraron la presencia de células NK en el infiltrado de biopsias cutáneas de pacientes con exantemas inducidos por medicamentos (datos no publicados), y se ha descrito que LT NKR⁺ pueden provocar directamente alteraciones cutáneas ligadas a un patrón de tipo Th1 en ratones SCID (Nickoloff et al., 2000). Además, estudios recientes sugieren que células NK pueden ser portadoras de memoria inmunológica frente a determinados haptenos (O'Leary et al., 2006).

5. CÉLULAS CITOTÓXICAS 5.1.

LINFOCITOS T CITOTÓXICOS

Los CTLs son LT CD8⁺ efectores capaces de lisar células autólogas tras el reconocimiento de péptidos antigénicos en el contexto de moléculas HLA-I. Los CTLs secretan IFN- que incrementa tanto la actividad de las proteínas transportadoras de péptidos como la expresión de HLA-I, de forma que las células infectadas se vuelven más susceptibles de ser lisadas por los CTLs. La citotoxicidad puede ocurrir mediante la exocitosis de gránulos de granzima B y perforina o bien mediante apoptosis mediada por la interacción de FasL en la célula efectora con su receptor Fas en la célula diana. Diversos estudios correlacionan la expresión del receptor CD56 (Pittet et al., 2000) y de NKRs con la función efectora citolítica de los LT CD8⁺ (Arlettaz et al., 2004a; Arlettaz et al., 2004b; Baars et al., 2000; Mingari et al., 1997; Young et al., 2001).

5.2. CÉLULAS NK

Las células NK se identificaron en un principio por su función ya que son células capaces de lisar determinadas líneas tumorales sin la necesidad de que exista una estimulación previa (Moretta et al., 1994). Las NKs forman parte de la respuesta innata y debido a que derivan de la médula ósea mantienen un progenitor común con células T (Spits et al., 1995). A diferencia de los linfocitos T y B, las NKs no requieren de un reordenamiento genético para su diferenciación y función. En condiciones normales suelen encontrarse en sangre periférica, bazo, ganglios y

médula ósea, aunque también pueden migrar a tejidos inflamados en respuesta a moléculas quimioatrayentes (Gregoire et al., 2007; Morris and Ley, 2004).

Las células NK se definen como linfocitos CD3CD56⁺ aunque recientemente se ha demostrado la existencia de diferentes poblaciones NK con distintas características funcionales: las células NK CD56⁺⁺⁺CD16 (que expresan con alta intensidad el receptor CD56 y no expresan, o lo hacen con muy baja intensidad, el receptor CD16), se localizan principalmente en los ganglios linfáticos y están especializadas en la producción de citoquinas, y las NKs CD56⁺CD16⁺⁺, que predominan en sangre periférica y en tejidos inflamados y presentan una elevada actividad citotóxica (mediada por la liberación de proteínas entre las que destacan perforinas y granzimas) y una baja capacidad de producción de citoquinas (Cooper et al., 2001a).

Las funciones efectoras principales de las células NK son la citólisis de células diana y la producción de quimioquinas y citoquinas tales como IFN- γ , GM-CSF y TNF- α (Trinchieri, 1989). Diversos estudios han demostrado que las NKs juegan un papel importante en la defensa contra infecciones virales y contra células tumorales (Cerwenka and Lanier, 2001b; Papazahariadou et al., 2007). Sin embargo, en los últimos años se ha determinado que el papel de las células NK no se limita a la destrucción de células infectadas por virus o tumorales sino que dependiendo de las interacciones que establezcan con otras células del sistema inmune y del tipo de citoquinas que se liberen en las distintas respuestas que se lleven a cabo, pueden ejercer una función reguladora. Así, principalmente a través de la liberación IFN- γ , las NKs juegan un importante papel en la determinación de respuestas inmunes adaptativas (Moretta et al., 2008).

5.3. RECEPTORES DE CÉLULAS NK

• Receptores activadores

- o **CD16:** se expresa en la mayor parte de células NK y también en monocitos activados y en algunas subpoblaciones de LT (Lanier, 1998). Su ligando específico es la IgG.
- o **NKG2D:** se expresa en todas las células NK, LT α y LT CD8⁺ (Cerwenka and Lanier, 2001a). Sus ligandos son proteínas de estrés celular como MIC-A, MIC-B y ULBPs (Long and Rajagopalan, 2002).
- o **Receptores de citotoxicidad natural (NCRs):** Dentro de este grupo se encuentra los receptores **NKp30**, **NKp44** y **NKp46**. Los NCRs juegan un papel importante en la actividad antitumoral de células NK. Se ha determinado que la presencia de anticuerpos bloqueantes anti-NCR inhibe la lisis de distintas líneas tumorales por parte de células NK (Byrd et al., 2007). Además existen trabajos que demuestran la implicación del receptor NKp30 en los procesos de maduración o lisis de células dendríticas (DCs) inmaduras (iDCs) tras el encuentro con NKs (Ferlazzo et al., 2002; Vitale et al., 2005).

La capacidad de las células NK para lisar distintos tipos de células tumorales se correlaciona con la expresión de NCRs (Sivori et al., 1999) por lo que, aunque desconocidos, sus ligandos celulares deben estar ampliamente distribuidos en los diferentes linajes celulares. Estudios recientes han identificado el factor nuclear liberado por células tumorales BAT3 como un posible ligando del receptor NKp30 (Pogge von Strandmann et al., 2007) y la hemaglutinina (HA) viral como ligando de NKp44 y NKp46 (Arnon et al., 2001; Mandelboim et al., 2001). A diferencia de los otros receptores, los NCRs parecen expresarse de forma exclusiva en células NK. Mientras que NKp30 y NKp46 se expresan en células NK activadas o no, NKp44 se expresa sólo en NKs activadas.

Los NCRs y los receptores CD16 y NKG2D poseen un aminoácido cargado positivamente en su región transmembrana a través del cual se asocian a moléculas señalizadoras que contienen motivos ITAM (motivo de activación del inmunorreceptor vía tirosina) que intervienen en la cascada de señalización de la activación de la lisis por células NK (figura 3).

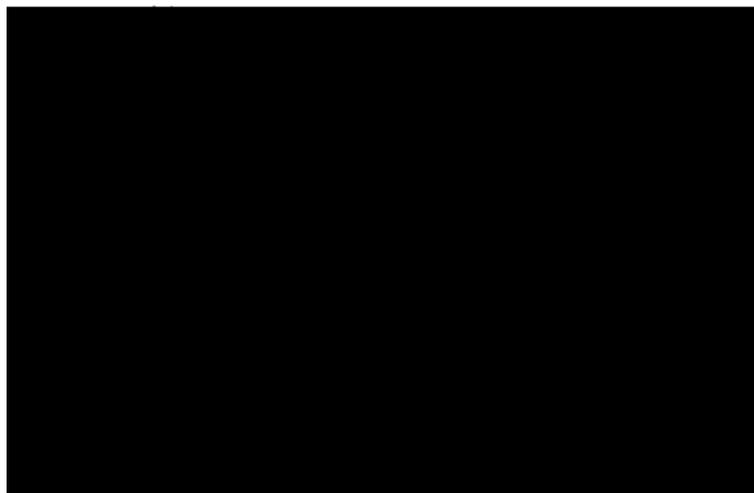


Figura 3: Receptores activadores de citotoxicidad natural

• Otros receptores activadores

- **DNAM-1:** se expresa prácticamente en todas las células NK, LT y monocitos y reconoce específicamente el receptor de poliovirus (PVR) y la nectina-2 (CD 112) (Pende et al., 2006).
- **2B4 (CD244):** se expresa en todas las células NK y en subpoblaciones de LT. Su ligando específico es la molécula CD48 (Nakajima and Colonna, 2000).

- o **NTB-A:** se expresa en todas las células NK y en subpoblaciones de LT. Presenta interacciones homofílicas (Flaig et al., 2004).
- o **NKp80:** se expresa en todas las células NK y en subpoblaciones de LT CD8⁺. Se une específicamente a la lectina AICL (Kuttruff et al., 2008).
- o **TLRs (*Toll-like receptors*):** se expresan en monocitos, DCs y NKs y reconocen PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). Recientemente se ha demostrado que las NKs pueden reconocer directamente productos virales a través de estos receptores (Schmidt et al., 2004; Sivori et al., 2004).

• Receptores inhibidores y activadores específicos de moléculas HLA-I

Debido a la amplia distribución de los ligandos para NCRs en los diferentes linajes celulares cualquier célula debería ser susceptible de la lisis por NKs. Sin embargo, el reconocimiento de moléculas HLA-I por parte de NKRi inhibidores (iNKRi) bloquea la autoreactividad de las NKs frente a células normales y permite la de aquellas que han perdido la expresión de moléculas HLA-I y que escapan de la lisis por CTLs. Así, las NKs identifican a sus dianas a través de una serie de receptores activadores e inhibidores y la activación de las mismas será el resultado del balance entre estas señales activadoras e inhibidoras. Se asume que ante estas señales opuestas las de inhibición tienen mayor fuerza (Moretta et al., 1995). Según la hipótesis *Missing-self* (Karre et al., 1986) actualmente se admite que todas las NKs funcionalmente activas de un individuo deben portar, al menos, un iNKR para una molécula HLA-I propia. Cuando la transmisión de señales a través de iNKRi es insuficiente o nula debido a una disminución en la densidad de HLA-I en superficie (ej: infección viral) o a la presencia de moléculas HLA-I no propias (ej: transplantes alogénicos) la célula NK ejercerá sus funciones efectoras de citolisis y producción de citoquinas.

Se han descrito varios NKRi específicos de moléculas HLA-I. Estos receptores se identificaron originalmente en células NK aunque se expresan en otras subpoblaciones linfoides y se agrupan en tres familias de proteínas diferentes: **KIRs** (*Killer cell inhibitory receptors*) e **ILTs/LIRs/CD85** (*Immunoglobulin-like transcripts/ Leukocyte Immunoglobulin-like receptors*) que pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas y se agrupan en el LRC (*Leukocyte Receptor Complex*) en el cromosoma 19 (Suto et al., 1998; Wilson et al., 2000), y los heterodímeros **CD94/NKG2**, también conocidos como **KLRs** (*Killer lectin-like receptors*), que pertenecen a la familia de las lectinas de tipo C (Borrego et al., 2002) agrupadas en el NKC (*NK gene complex*) en el cromosoma 12 (Yabe et al., 1993). Dentro de cada familia existen receptores con capacidad activadora e inhibidora de la función celular tras la interacción con el ligando (Lopez-Botet and Bellon, 1999). Aunque aún está por resolver la función que tienen los receptores activadores específicos de HLA-I,

el papel que desempeñan los iNKRs está bien establecido, habiéndose demostrado que regulan la actividad citotóxica de células NK (Lopez-Botet et al., 2000) y el umbral de activación de células T (Mingari et al., 2005; Ugolini and Vivier, 2000).

Aunque los receptores activadores e inhibidores pertenezcan a familias de proteínas estructuralmente diferentes comparten los mismos mecanismos de transducción de señales tanto de inhibición como de activación de la función citotóxica. Así, los iNKRs poseen en su tallo citoplasmático una o varias copias de un motivo estructural denominado ITIM (motivo de inhibición del inmunorreceptor vía tirosina) de forma que cuando se produce el reconocimiento de la molécula HLA-I específica, las tirosinas de estos motivos ITIM se fosforilan y se produce el reclutamiento de la fosfatasa SHP- 1, responsable de la atenuación o eliminación de la señal activadora de la citotoxicidad (Blery et al., 2000). Los receptores activadores específicos de HLA-I, al igual que los que reconocen ligandos que no son moléculas HLA-I, poseen un aminoácido cargado positivamente en la región transmembrana a través del cual se asocian a distintas moléculas adaptadoras dependiendo de la familia a la que pertenezcan. Los receptores activadores de la familia de los ILTs/LIRs/CD85 se asocian a homodímeros de la cadena gamma del receptor Fc de IgE (FcRI) y los de las familias de los KIRs y CD94/NKG2 a homodímeros de la molécula adaptadora DAP-12 (Lanier and Bakker, 2000) (figuras 4-6).



Figura 4: Receptores activadores e inhibidores de la familia de los heterodímeros CD94/NKG2

En lo referente a los ligandos (tabla 1), los receptores de la familia de los KIRs reconocen moléculas HLA-I clásicas (HLA-A, HLA-B y HLA-C) con distintas especificidades (Long et al., 1997) y los heterodímeros CD94/NKG2 tanto activadores como inhibidores reconocen la molécula no clásica HLA-E (Braud et al., 1998; Lee et al., 1998b). Dentro de la familia de los ILTs/LIRs/CD85 se ha demostrado que ILT2/CD85j e ILT4/CD85d

reconocen moléculas HLA-I tanto clásicas como no clásicas (HLA-E, HLA-G y HLA-F) (Colonna et al., 1997; Lepin et al., 2000). Además, se ha demostrado que ILT2/CD85j puede interactuar también con la proteína de citomegalovirus (CMV) humano UL1 8 (homóloga a HLA-I) a través de su dominio de inmunoglobulina N-terminal (Cosman et al., 1997).

Como se ha comentado anteriormente, se ha descrito que los receptores activadores e inhibidores específicos de HLA-I se expresan tanto en NKs como en subpoblaciones de LT. Sin embargo, los receptores de la familia de los ILTs/LIRs/CD85 tienen una distribución bastante más amplia. Por ejemplo, ILT2/CD85j también se expresa en linfocitos B, monocitos y DCs (Colonna et al., 1997).

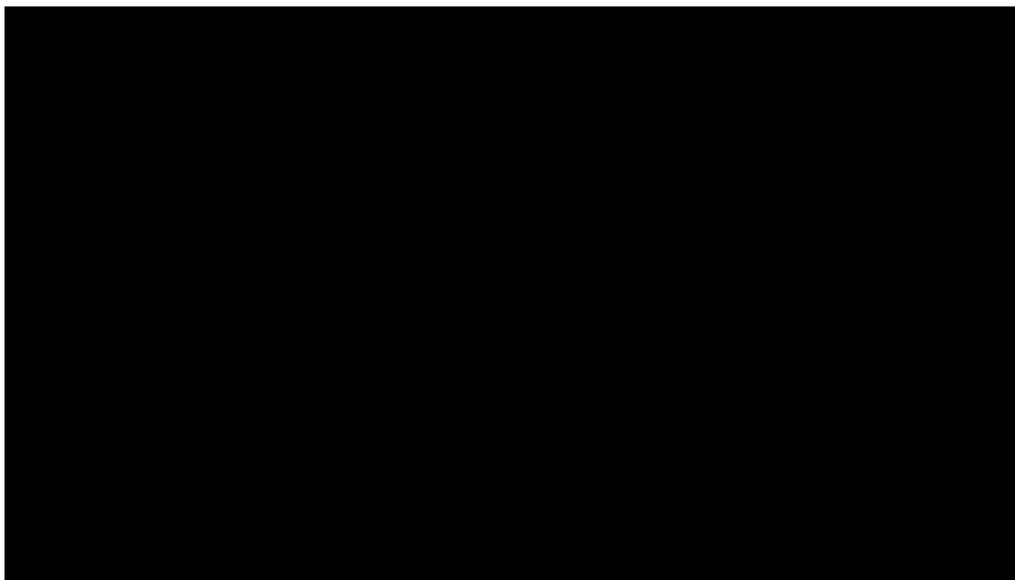


Figura 5: Receptores activadores e inhibidores de la familia de los KIRs

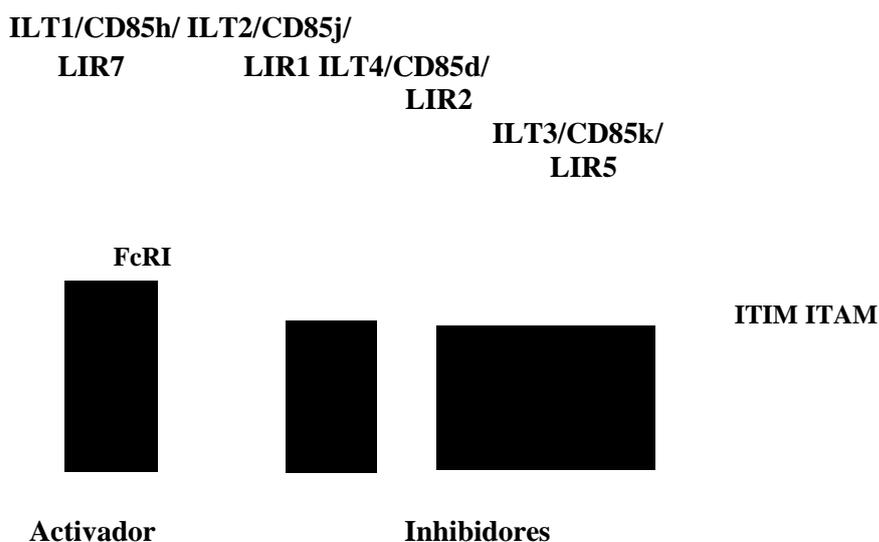


Figura 6: Receptores activadores e inhibidores de la familia de los ILTs/LIRs

Tabla 1: Receptores de células NK

Receptor	Designación CD	Función	Ligando
Receptores específicos de moléculas de HLA de clase I			
KIRs (“Killer cell inhibitory receptors”)			
KIR2DL1	CD158a	inhib	HLA-C2 ^{Lys80} (ej: HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6)
KIR2DL2	CD158b1	inhib	HLA-C1 ^{Asn80} (ej: HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8)
KIR2DL3	CD158b2	inhib	HLA-C1 ^{Asn80} (ej: HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8)
KIR2DL4	CD158d	activ e inhib	HLA-G
KIR2DL5	CD158f	inhib	Desconocido
KIR2DS1	CD158h	activ	HLA-C2 ^{Lys80}
KIR2DS2	CD158j	activ	(HLA-C1 ^{Asn80})?
KIR2DS3	-	activ	Desconocido
KIR2DS4	CD158l	activ	Desconocido
KIR2DS5	CD158g	activ	Desconocido
KIR3DL1	CD158e1	inhib	HLA-B ^{Bw4} (ej: HLA-B27)
KIR3DL2	CD158k	inhib	HLA-A3, -A11
KIR3DL3	CD158z	inhib	Desconocido
KIR3DS1	CD158e2	activ	Desconocido
Heterodímeros CD94/NKG2			
CD94/NKG2A		inhib	HLA-E
CD94/NKG2B		inhib	HLA-E
CD94/NKG2C		activ	HLA-E
CD94/NKG2E		activ	Desconocido
CD94/NKG2H		activ	Desconocido
ILTs/LIRs (“Immunoglobulin-like transcripts/ Leukocyte Immunoglobulin-like receptors”)			
ILT5/LIR3	CD85a	inhib	Desconocido
ILT8	CD85b	activ	Desconocido
LIR8	CD85c	inhib	Desconocido
ILT4/LIR2	CD85d	inhib	HLA de clase I
ILT1 1	CD85f	activ	Desconocido
ILT7	CD85g	activ	Desconocido
ILT1/LIR7	CD85h	activ	Desconocido
LIR6	CD85i	activ	HLA-B
ILT2/LIR1	CD85j	inhib	HLA de clase I
ILT3/LIR5	CD85k	inhib	Desconocido
ILT9	CD85l	activ	Desconocido
ILT10	CD85m	activ	Desconocido
Receptores activadores no específicos de moléculas de HLA de clase I			
NKG2D		activ	MICA, MICB, ULBPs
NKp30		activ	Ligando celular desconocido, BAT3
NKp44		activ	Ligando celular desconocido, HA viral
NKp46		activ	Ligando celular desconocido, HA viral
CD 16		activ	IgG
DNAM- 1		activ	PVR, nectina 2
NKp80		activ	AICL
NTB-A		activ	NTB-A
2B4 (CD244)		activ	CD48
TLR		activ	PAMPs

6. HLA-E

HLA-E pertenece, junto con HLA-G y HLA-F, al grupo de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I no clásicas. Son moléculas muy poco polimórficas (Geraghty et al., 1992; Grimsley and Ober, 1997) y con un patrón de expresión bastante restringido (Carosella et al., 2000). En el caso de HLA-E sólo existen dos variantes alélicas que se diferencian en el aminoácido de la posición 107 del dominio 2: HLA-E*0101 y HLA-E*0301 (Geraghty et al., 1992). Al igual que las moléculas de MHC de clase I, HLA-E se expresa en la superficie celular como un complejo heterotrimérico que consiste en la asociación de una cadena pesada unida de forma no covalente a 2m y, por lo general, un péptido antigénico noamérico. Este péptido antigénico generalmente deriva de las secuencias señal de varias moléculas HLA-I que incluyen HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-G (Braud et al., 1997; Lee et al., 1998a), por lo que aunque la transcripción de HLA-E se haya detectado en muchos tipos celulares (Ulbrecht et al., 1992) la expresión de la proteína en superficie requiere de la disponibilidad de estos péptidos. Este hecho sugiere que la expresión de HLA-E podría estar limitada a algunos tipos celulares y/o a procesos de activación celular.

Como se ha comentado anteriormente, HLA-E es el ligando de los receptores CD94/NKG2A y CD94/NKG2C (Braud et al., 1998; Lee et al., 1998b). Se ha descrito que el tipo de péptidos que se unen a HLA-E, además de influir en la estabilización de esta molécula en superficie, también influyen en el reconocimiento por parte de los receptores CD94/NKG2 activadores o inhibidores (Llano et al., 1998; Valés-Gomez et al., 1999). Por otra parte, estudios de unión de diferentes formas mutadas de HLA-E a CD94/NKG2A sugieren que el iNKR interacciona con HLA-E preferentemente a través de residuos en el dominio 1 / 2 (Wada et al., 2004). Es poco frecuente encontrar TCRs específicos de HLA-E aunque sí se han identificado linfocitos T restringidos por esta molécula (Moretta et al., 2003).

OBJETIVOS

1. Caracterización fenotípica de subpoblaciones linfoides en sangre periférica de pacientes con reacciones de hipersensibilidad retardada a medicamentos en fase aguda y comparación con muestras recogidas una vez resuelto el cuadro clínico e individuos sanos.
2. Caracterización fenotípica de subpoblaciones linfoides de biopsias de piel afecta de pacientes con reacciones exantemáticas sin afectación de mucosas (MPE y DRESS) y comparación con las de líquido de ampollas de pacientes con SJS y TEN.
3. Análisis del reconocimiento de moléculas HLA de clase I haptenizadas por parte de ILT2/CD85j.
4. Análisis de la actividad citotóxica mediada por HLA-E en linfocitos de sangre periférica y del infiltrado de ampollas de pacientes con reacciones de hipersensibilidad retardada a medicamentos.
5. Análisis del posible papel regulador de ILT2/CD85j sobre la citotoxicidad y/o producción de IFN- inducida en células NK tras la estimulación con células diana, iDCs o productos virales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE, DE LÍQUIDO DE AMPOLLAS Y DE PIEL

Un total de 88 pacientes (Tabla 1) con reacciones de hipersensibilidad no inmediata inducida por medicamentos fueron evaluados y seleccionados en el Servicio de Alergia y en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario La Paz, Madrid. Todos los pacientes tenían una serología negativa para la infección por VIH y carecían de desórdenes hematológicos. En todos los casos los síntomas aparecieron por lo menos transcurridas 24 horas después de la administración del fármaco y en aquellos pacientes que sobrevivieron se resolvieron una vez eliminado el mismo. Se recogieron al menos 10 ml de sangre periférica de los pacientes al inicio de la reacción (fase aguda) y en algunos casos se obtuvo una segunda muestra (fase basal) una vez resuelto el cuadro clínico y transcurrido por lo menos 1 mes tras la fase aguda. De acuerdo a la clasificación más aceptada (Roujeau, 2005) las reacciones estudiadas comprendieron: urticaria no inmediata (n=15), MPE (n=47), DRESS (n=5), EM (n=4), SJS (n=13) y TEN (n=4). Las muestras de sangre periférica de individuos sanos anónimos (n=72) se obtuvieron del Banco de Sangre del Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Los líquidos de ampollas de pacientes con SJS (n=5), TEN (n=2) y de un test cutáneo que desarrolló una ampolla en un paciente que había sufrido un MPE se obtuvieron mediante aspiración con jeringa de insulina. Las muestras de piel de pacientes (n=9) y de individuos sanos (n=6) se obtuvieron a partir de biopsias de piel afecta al inicio de la reacción o de intervenciones quirúrgicas respectivamente.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz. Todas las muestras se obtuvieron tras el consentimiento informado de los pacientes y controles.

2. OBTENCIÓN DE PBMCs, SUEROS, QUERATINOCITOS, LÍQUIDOS DE AMPOLLAS E INFILTRADO DE PIEL AFECTA

Se obtuvieron PBMCs y sueros a partir de muestras de sangre periférica de individuos sanos y pacientes en fase aguda y/o tras la resolución del cuadro clínico. Las PBMCs se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (*Amersham Biosciences*) y los sueros se obtuvieron mediante centrifugación de 5 ml de sangre periférica en tubos de coagulación.

Las células mononucleares de líquido de ampollas (BFMCs) y los líquidos de las mismas se recogieron mediante centrifugación. Los queratinocitos de pacientes y controles así como las células mononucleares que infiltran la piel afecta de pacientes en fase aguda se aislaron

mediante dos digestiones de 20 minutos con tripsina al 0.1% en tampón fosfato salino (PB S)/ 5mM EDTA de las biopsias de piel.

3. LÍNEAS CELULARES, CULTIVOS PRIMARIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Tanto las líneas celulares como los cultivos primarios se incubaron en medio de cultivo suplementado con suero de ternera fetal (FBS) inactivado por calor. Todas las citoquinas que se usaron para el estudio fueron humanas recombinantes.

- 721.221: línea linfoblastoide B humana deficiente en moléculas HLA-I. Se cultivó en medio RPMI-1640 con 5% de FBS.
Y los siguientes transfectantes estables de la misma línea cultivados en el mismo medio.
 - 221.B*2705, 221.AEH y 221.Cw07: transfectantes de HLA-B*2705, HLA-E y HLA-Cw07 respectivamente. El medio se suplementó con 300 g/ml de higromicina B (*Calbiochem*).
 - 221.G1 y 221.G1m: transfectantes de HLA-G1. La línea celular 221.G1m presenta mutado el péptido señal de HLA-G1 de forma que se impide la estabilización de HLA-E en la membrana. El medio de 221 .G1m se suplementó con 0.5 mg/ml de G4 18 (*Invitrogen*).
- NKL: línea NK humana. Se cultivó en medio RPMI- 1640 con 10% FBS, IL-2 (100 U/ml) y 1% de piruvato sódico.
- NK-92: línea NK humana. Se cultivó en medio MEM- (con ribonucleótidos y desoxinucleótidos) con 10% de FBS, 10% de suero de caballo inactivado por calor, 1% de piruvato sódico, 1% de aminoácidos no esenciales e IL-2 (200 U/ml).
- NK3.3: línea NK humana. Se cultivó en medio RPMI-1640 con 10% FBS, 10% de “Killer Cult” (Kahle et al., 1981) e IL-2 (100 U/ml).
- RBL.ILT2: línea de basófilos de rata RBL transfectada con el receptor ILT2/CD85j. Se cultivó en medio RPMI-1640 con 10% FBS y G418 (1 mg/ml).
- P815: línea de mastocitos murinos. Se cultivó en medio RPMI- 1640 con 5% de FBS.
- HaCaT: línea de queratinocitos humanos. Se cultivó en medio DMEM con 5% de FBS.
- 3T3-J2: línea de fibroblastos de ratón. Se cultivó en medio DMEM con 5% de FBS.
- Queratinocitos primarios: los queratinocitos obtenidos de biopsias se cultivaron sobre células “*feeders*” 3T3-J2 irradiadas en una proporción 1:10 (queratinocitos: “*feeders*”) en medio de cultivo de queratinocitos: 60% DMEM, 30% Hams F12 y 10% FBS suplementado con toxina colérica (0.1 nM), hidrocortisona (0.4 g/ml), insulina (5

g/ml), triiodo-L-tironina (T3) (2 nM), penicilina-estropomicina (100 g/ml) y fungizona. Transcurridas 48 horas se añadió medio fresco suplementado con factor de crecimiento epidérmico (EGF) (10 ng/ml).

- Células NK primarias: se cultivaron en medio RPMI- 1640 con 20% de FBS e IL-2 (50-100 U/ml).
- iDCs: se cultivaron en medio RPMI-1640 con 10% FBS, GM-CSF (500 U/ml) e IL-4 (500 U/ml).

4. ANTICUERPOS

Se usaron los siguientes anticuerpos: HP-3B 1 (anti-CD94), HP- 1F7 (anti-HLA-I), HP-F1 (anti-ILT2/CD85j), HP-3E4 (anti-KIR2DL1/2DS1/2DS4) y anti-CD7 cedidos por el Dr. López-Botet (Universidad Pompeu Fabra, Barcelona, España); Z 199 (anti-NKG2A), C2 18 (anti-CD56) y KD 1 (anti-CD 16) cedidos por el Dr. Moretta (Universidad de Genova, Genova, Italia); el anticuerpo monoclonal 3D12 (anti-HLA-E) cedido por el Dr. Geraghty (Universidad de Washington, Seattle, WA); D3/9 (anti-CD45) cedido por el Dr. Sánchez-Madrid (Hospital de La Princesa, Madrid, España); DX9 (anti-KIR3DL1) cedido por el Dr. Lanier (Cancer Research Institute, Universidad de California, San Francisco, CA); 5.133 (anti-KIR3DL2) cedido por el Dr. Colonna (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO) y MR-1 (anti-DCSIGN) cedido por el Dr. Corbí (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España). Los anticuerpos monoclonales específicos anti-amoxicilina (anti-AX) (Mayorga et al., 1995) fueron cedidos por la Dra. Mayorga (Hospital Carlos Haya, Málaga, España).

Los anticuerpos monoclonales CD3-PerCP, CD85j-FITC (anti-ILT2-FITC), CH-L (anti-KIR2DL2/2DL3/2DS2), CD80-PE, CD28-FITC, CD69-PE, HLA-DR-PE, CD8-FITC, CD56-FITC y CD107a-PE se obtuvieron de BD Biosciences (San José, CA). Los anticuerpos monoclonales CD8-PE, CD14-FITC, anti-IFN--PE, anti-TNF--PE y anti-NKp30 se obtuvieron de Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Germany). El anticuerpo monoclonal MEM-E/02 específico de HLA-E se obtuvo de Exbio (Praga, República Checa), el anticuerpo monoclonal MAB 1381 (anti-NKG2C) de R&D Systems y el anticuerpo anti-HLA-I (W6/32) de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, Francia). El anticuerpo monoclonal 4G10 (antifosfotirosina (anti-PY)) y el anticuerpo policlonal anti-SHP- 1 se obtuvieron de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA).

Los anticuerpos secundarios usados fueron: un anticuerpo policlonal de conejo F(ab')₂ antiratón conjugado a FITC de Dako Cytomation (Glostrup, Denmark), un anticuerpo anti-ratón IgG (H+L) de cabra conjugado APC de Molecular Probes, y los anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa y anti-IgG de conejo de Pierce (Rockford, IL, USA).

5. SEPARACIÓN MAGNÉTICA Y OBTENCIÓN DE CLONES O CULTIVOS PRIMARIOS

- *Separación magnética de células CD56⁺ y obtención de clones CD56⁺*: Se cultivaron PBMCs de donantes sanos en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS. Transcurrida 1 hora a 37°C, se recogió la fracción celular no adherente y se incubó con microesferas magnéticas asociadas a anticuerpos anti-CD56 humano (*Miltenyi Biotec*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células CD56⁺ se cultivaron, en condiciones de dilución límite, en placas de 96 pocillos con fondo en U en medio RPMI-1640 suplementado con 20% de FBS en presencia de PBMCs alogénicos irradiados (40 Gy) de al menos tres donantes distintos (3×10^4 células/pocillo), IL-2 (20 U/ml) y fitohematoglutina (PHA) (1 g/ml). Los clones generados se analizaron en un citómetro de flujo y se seleccionaron aquellos con fenotipo CD3⁺CD8⁺CD56⁺.
- *Separación magnética y obtención de células NK*: Células NK se aislaron por selección negativa a partir de PBMCs de donantes sanos con el kit de aislamiento de células NK humanas (*Miltenyi Biotec*) siguiendo las recomendaciones del fabricante.
- *Separación magnética de células CD14⁺ y obtención de iDCs*: Se purificaron células CD14⁺ a partir de PBMCs de donantes sanos utilizando microesferas magnéticas asociadas a anticuerpos anti-CD14 humano (*Miltenyi Biotec*). Las células CD14⁺ se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% FBS, GM-CSF (500 U/ml) e IL-4 (500 U/ml). Transcurridos tres días se añadió medio fresco con las mismas concentraciones de GM-CSF e IL-4 y se prolongó la incubación durante 2-3 días más. Se verificó mediante citometría de flujo que la población obtenida presentaba un fenotipo de iDCs caracterizado por la pérdida de expresión del receptor CD14 y la adquisición de los marcadores celulares CD80 y DC-SIGN.

Todas las separaciones magnéticas se realizaron en el sistema AutoMacs (*Miltenyi Biotec*). El análisis por citometría de flujo mostró, en todos los casos, una pureza superior al 90% en las fracciones celulares separadas.

6. CITOMETRÍA DE FLUJO

El análisis mediante citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur mediante el *software* CellQuest (BD Bioscience, San José, CA, USA). Las células se trataron con globulina (50 g/ml), se lavaron y se procedió a la inmunofluorescencias directa o indirecta. Para la inmunofluorescencia directa las células se incubaron con anticuerpos conjugados directamente a fluorocromos. Para las inmunofluorescencias indirectas se incubaron con

concentraciones saturantes de varios anticuerpos específicos, se lavaron, se tiñeron con un anticuerpo policlonal de conejo F(ab')₂ anti-ratón conjugado a FITC o un anticuerpo de cabra IgG (H+L) anti-ratón conjugado APC y en algunos casos a continuación se bloqueó el exceso de anticuerpo secundario con suero de ratón y se añadieron anticuerpos conjugados directamente a fluorocromos.

7. HAPTENIZACIÓN CELULAR

Para la haptениización celular se incubaron las líneas 721.221 y sus transfectantes estables (221.AEH, 221.G1 y 221.B*2705) durante 12 horas a una concentración de 2.5×10^5 células/ml en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de FBS y AX (1 mg/ml).

La haptениización celular se comprobó mediante citometría de flujo tras la incubación de las células con anticuerpos monoclonales específicos anti-AX y la tinción de las mismas con un anticuerpo policlonal de conejo F(ab')₂ anti-ratón conjugado a FITC.

8. TRATAMIENTO CON PERVANADATO

La línea celular RBL.ILT2 (10^6 células) se incubó en 1 ml de medio RPMI-1640 suplementado con pervanadato sódico (0.1 mM Na₂VO₄ y 10 mM H₂O₂) durante 10 minutos a 37°C.

9. TRATAMIENTO CON IFN-

Se trató la línea HaCaT y queratinocitos primarios de individuos sanos con 2.5 o 10 ng/ml de IFN- respectivamente durante 48 horas a 37°C.

10. INMUNOPRECIPITACIÓN E INMUNOBLOT

- *Unión de la amoxicilina a HLA-I:* 10⁶ células 721.221, 221.B*2705 y 221.G1 haptениizadas con AX se lisaron durante 45 minutos en hielo con 250 μ l de buffer de lisis frío (Tritón X-100 (1%) y Tris-HCl pH 7.5 (20 mM), NaCl (150 mM), PMSF (100 g/ml), aprotinina (1 g/ml), leupeptina (1 g/ml), Na₂VO₄ (1 mM) y NaF (1 mM)). Los lisados se centrifugaron y se inmunoprecipitaron las moléculas HLA-I con anticuerpos específicos anti-HLA-I (HP-1F7) unidos a proteína A sefarosa (Amersham Biosciences). Los inmunocomplejos se resolvieron en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF que se incubaron con una mezcla de anticuerpos específicos anti-AX.

- *Reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 al receptor ILT2/CD85j*: 2×10^6 células RBL.ILT2 se incubaron con 10^6 células 221.AEH haptenizadas con AX durante 2 minutos a 37°C , se lisaron en el mismo buffer de lisis descrito anteriormente y se inmunoprecipitaron los receptores ILT2/CD85j con anticuerpos específicos anti-ILT2 (HP-F1) unidos a proteína A sefarosa. Los inmunocomplejos se resolvieron en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF que se incubaron secuencialmente con los anticuerpos específicos anti-SHP-1, anti-PY y anti-ILT2.
- *Detección de moléculas de HLA-E soluble (HLA-Es) en los líquidos de ampollas*: la cantidad de proteína total en sueros y líquidos de ampollas se cuantificó en un espectrofotómetro con *Bradford Protein Assay (Bio-Rad)*. Se cargaron 50 g de proteína total de sueros y líquidos de ampollas de pacientes con SJS y TEN en SDSPAGE con 10% de acrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF que se incubaron con anticuerpos específicos anti-HLA-E (MEM-E/02). Como control negativo y positivo se cargaron 20 l de sobrenadante de cultivo de las líneas celulares 721.221 y 221.AEH. Así mismo, se cargaron también 50 g de proteína total de sueros de individuos sanos.

Tras la incubación de las membranas de PVDF con los anticuerpos primarios se procedió a la incubación con anticuerpos IgG de cabra anti-ratón conjugados a peroxidada. La detección de los mismos se realizó por reacción quimioluminiscente de la peroxidada usando el kit de detección *ECL Advance (Amersham Biosciences)*.

11. COCULTIVOS DE PBMCs Y CÉLULAS NK-92 CON DIANAS NK. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- Y TNF-

- *Cocultivos NK-92 y dianas NK*: $1.5-3 \times 10^5$ células NK-92 se cultivaron con células 721.221, 221.Cw07, 221.B*2705 y 221.G1m en medio de cultivo de la línea NK-92 (apartado 3) en una proporción 2:1 (efectora:diana). Para los ensayos de bloqueo la línea NK-92 se preincubó con anticuerpos específicos anti-ILT2 (HP-F1) y las dianas con anticuerpos específicos anti-HLA-I (HP-1F7).
- *Cocultivos PBMCs y dianas NK*: 1.5×10^5 PBMCs estimuladas durante 18h con IL-2 (25-100 U/ml) se cultivaron con células diana en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS e IL-2 (25-100 U/ml) en una proporción 1:1 o 2:1 (efectora:diana). Para el estudio de la producción de IFN- en linfocitos T se pretrataron las células diana durante 30 minutos a 37°C con enterotoxina B de estafilococo (SEB) (10 ng/ml) (*Sigma-Aldrich*).

Todos los cocultivos se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo en U. Como control positivo de la producción de IFN- y TNF- se estimularon las células efectoras (NK-92 o PBMCs) con PMA (10 ng/ml) (*Sigma-Aldrich*) e ionomicina (Io) (500 ng/ml) (*Sigma-Aldrich*). Para la detección de las citoquinas mediante citometría intracelular se realizaron los cocultivos en presencia de brefeldina A (10 g/ml) (*Sigma-Aldrich*) durante 6 horas. Transcurrido este periodo de estimulación, se recogieron las células y se marcaron extracelularmente. A continuación se fijaron y permeabilizaron con Solución Permeabilizante (*BD Biosciences*) siguiendo las recomendaciones del fabricante durante 10-15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se marcaron intracelularmente con anticuerpos específicos anti-IFN- o anti-TNF-conjugados a PE.

Para la cuantificación de IFN- liberado al medio los cocultivos se mantuvieron durante 20 horas en ausencia de brefeldina A. Transcurrido este periodo de estimulación se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la cantidad de citoquina secretada mediante citometría de flujo usando *Human IFN- cytometric bead array (CBA) Flex Set (BD Biosciences)* y siguiendo las indicaciones del fabricante.

12. ESTIMULACIÓN CON POLY (I:C) Y NKp30

Las células NK-92, NK3.3 y NKs purificadas que expresaban un elevado porcentaje de los iNKRs ILT2/CD85j, CD94/NKG2A o KIR3DL1 se cultivaron durante 20 horas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS e IL-2 (100 U/ml) en placas de 96 pocillos con fondo plano recubiertas con anticuerpos F(ab₂) de cabra anti-ratón (20 g/ml) y 10 g/ml de los anticuerpos específicos anti-CD7, anti-CD 16 y anti-NKp30 o 50 l de sobrenadante de hibridoma HP-F1 (anti-ILT2), Z199 (anti-NKG2A) y DX9 (anti-KIR3DL1).

En algunos casos el medio además se suplementó con IL-12 (1 U/ml) (*Pepto-Tech*).

Para la estimulación con poly (I:C) las células NK-92 y NK de sangre periférica se incubaron con poly (I:C) (100 g/ml) (*Sigma-Aldrich*) durante 20 horas.

Se midió la concentración de IFN- liberado al medio mediante citometría de flujo usando el kit *Human IFN- cytometric bead array (CBA) Flex Set (BD Biosciences)*.

Las células NK se preincubaron durante 24 horas con poly (I:C) (100 g/ml) previas a la realización de los ensayos de liberación de ⁵¹Cr frente a las dianas.

13. COCULTIVOS DE NKs E iDCs

Se realizaron cocultivos de células NK-92 y NKs purificadas con iDCs alogénicas en placas de 96 pocillos con fondo en U en medio RPMI- 1640 suplementado con 10% de FBS e IL-2 (100 U/ml). Para los estudios de bloqueo las células efectoras se preincubaron durante 15 minutos con concentraciones saturantes (10 g/ml) de anticuerpos específicos F(ab')₂ anti-CD94 (HP-3B1), anti-ILT2 (HP-F1) y anticuerpos control. $1.5-1 \times 10^5$ células efectoras se cultivaron con iDCs en una proporción de 2:1 (NK:iDC). Como control negativo se realizaron cultivos de las NKs en ausencia de iDCs. Para obtener muestras control de la producción de IL-12 se estimularon las iDCs con LPS (1 g/ml). Tras 20 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se procedió a la cuantificación de IFN- e IL-12 liberado al medio mediante citometría de flujo usando los kits *Human IFN-* y *Human IL-12p70 CBA Flex Set (BD Biosciences)*.

Para determinar la citotoxicidad de células NK frente a iDCs se realizaron ensayos de liberación de ⁵¹Cr en presencia o no de anticuerpos bloqueantes en diferentes proporciones (NK:iDC).

14. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y LISIS REDIRIGIDA

Se realizaron ensayos de liberación de ⁵¹Cr en los que se enfrentaron distintas células efectoras a distintas dianas en diferentes proporciones (efectora:diana). En todos los casos las dianas se marcaron con ⁵¹Cr (*Amersham Biosciences*) y se cocultivaron con las células efectoras en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes durante 4 horas por triplicado en un volumen final de 200 l en placas de 96 pocillos con fondo en U. Transcurrido este periodo de estimulación se recogieron 100 l de sobrenadante de cultivo y se calculó el porcentaje de lisis como $100 \times (\text{liberación de } ^{51}\text{Cr específica (cpm)} - \text{liberación de } ^{51}\text{Cr espontánea (cpm)}) / (\text{liberación máxima de } ^{51}\text{Cr (cpm)} - \text{liberación de } ^{51}\text{Cr espontánea (cpm)})$. Se entiende por liberación máxima y espontánea aquella resultante de cultivos en ausencia de células efectoras con o sin Tritón X-100 (1%) respectivamente. La liberación de ⁵¹Cr espontánea nunca superó el 20% de la liberación máxima.

- *Citotoxicidad de la línea NKL frente a dianas NK haptenizadas*: se enfrentó la línea NKL a las dianas 721.221 y 221 .B*2705 haptenizadas o no con AX en diferentes proporciones (efectora:diana).
- *Citotoxicidad de clones T CD8⁺CD56⁺*: se enfrentaron clones T CD8⁺CD56⁺ a las líneas 721.221, 221 .AEH y HaCaT (preincubada o no con IFN-) en presencia o ausencia de anticuerpos específicos (10 g/ml) anti-HLA-I (W6/32) y anti-HLA-E (3D12).

- o *Citotoxicidad de PBMCs de pacientes y controles:* se enfrentaron PBMCs de controles o pacientes con MPE, SJS y TEN en fase aguda a las dianas 721.221 y 221.AEH en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C (10 g/ml) en una proporción de 50:1 (efectora:diana).
- o *Citotoxicidad de BFMCs:* se enfrentaron BFMCs de pacientes con reacciones ampollosas a las líneas 721.221 y 221 .AEH o a queratinocitos alogénicos de controles tratados o no con IFN- en una proporción de 20:1 (efectora:diana).
- o *Citotoxicidad de la línea NK-92 frente a dianas NK:* se enfrentaron células NK-92 a las dianas 721.221, 221.Cw07, 221.G1m y 221.B*2705 en presencia o ausencia de 50 l de sobrenadante de hibridoma HP-1F7 (anti-HLA-I), HP-3B1 (anti-CD94) o HP-F1 (anti-ILT2) en diferentes proporciones (efectora:diana).
- o *Citotoxicidad mediada por poly (I:C):* se enfrentaron NKs aisladas de sangre periférica preincubadas o no con poly (I:C) (100 g/ml) durante 24 horas a las dianas 721.221, 221 .B*2705 y 221 .AEH en diferentes proporciones (efectora:diana) en presencia o ausencia de 50 l de sobrenadante de hibridoma HP-F1 (anti-ILT2) o Z199 (anti-NKG2A).
- o *Lisis redirigida de células NK:* se enfrentaron las líneas NK-92 y NK3.3 así como NKs de sangre periférica a la línea P815 preincubada con concentraciones saturantes (5 g/ml) de anticuerpos específicos anti-CD7, anti-NKp30 y anti-CD16 en combinación o no con anticuerpos específicos anti-ILT2 (HP-F1) en diferentes proporciones (efectora:diana).
- o *Citotoxicidad de células NK frente a iDCs:* se enfrentó la línea NK-92 y células NK de sangre periférica a iDCs alogénicas en presencia o ausencia de anticuerpos F(ab^γ)₂ específicos (5 g/ml) anti-ILT2 (HP-F1) y anti-CD94 (HP-3B 1) o anticuerpos control en diferentes proporciones (efectora:diana).

15. ENSAYOS DE MOVILIZACIÓN DE CD107a

Se realizaron cocultivos de PBMCs y BFMCs de pacientes con reacciones ampollosas con afectación de mucosas (EM, SJS y TEN) en fase aguda en proporciones de 2:1 (efectora:diana) con las dianas 721.221 y 221.AEH. Los cocultivos se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% FBS durante 4 horas a 37°C en presencia de anticuerpos específicos anti-CD107a-PE y monensina A (2 M) (*Sigma-A ldrich*). En algunos casos se añadieron anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C (10 g/ml). Tras el periodo de estimulación, se incubaron las células con anticuerpos específicos CD3-PerCP y/o CD8-FITC y/o anti-NKG2C. Para la detección del

receptor CD94/NKG2C se marcaron las células con anticuerpos F(ab')₂ de conejo anti-ratón conjugados a FITC.

16. EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR CUANTITATIVA

La línea NK-92 se cultivó durante 3 horas con las dianas 721.221, 221.Cw07, 221.B*2705 y 221.G1m. Transcurrido este periodo de estimulación se recogieron las células y se extrajo el RNA total mediante *High Pure RNA Isolation kit (Roche)*. Como control positivo se estimularon células NK-92 con PMA (10 ng/ml) e Io (500 ng/ml). Los RNAs se cuantificaron en un espectrofotómetro y se procedió a la retrotranscripción de 1 g de RNA total mediante la incubación con la enzima transcriptasa inversa AMV-RT (*Roche*) durante 1 hora a 42°C en presencia de hexanucleótidos (*Random hexamers*) en un volumen final de 20 l.

Transcurrido el tiempo de incubación se obtuvo el DNA complementario (cDNA) y se cuantificaron los niveles de expresión génica de IFN- y CD94 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en un termociclador a tiempo real *Light Cycler (Roche)* con el kit *FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)*.

Los oligonucleótidos usados fueron: **CD94** 5'-TCT GAC TGC TGT TCT TGC CAA G-3' y 5'-GGT GTG CTC CTC ACT GTA AGA-3' e **IFN-** 5'-CAG ATG TAG CGG ATA ATG GA-3' y 5'-ACC TTG AAA CAG CAT CTG AC-3'.

La cuantificación del número de moléculas de RNA mensajero (mRNA) específico se obtuvo en el programa *Light Cycler (Roche)* mediante la interpolación en las rectas patrón previamente realizadas a partir de la amplificación de diluciones 1/10 seriadas de cantidades de productos específicos de PCRs de IFN- o CD94. Las unidades relativas estimadas de la cuantificación representan el ratio entre las moléculas de mRNA de IFN- y las moléculas de mRNA de CD94 en la misma muestra de cDNA.

17. EXTRACCIÓN DE DNA Y SECUENCIACIÓN

Se purificó el DNA a partir de PBMCs con *High Pure DNA Isolation kit (Roche)* y se cuantificó en un espectrofotómetro. Para amplificar KIR2DL4 genómico se realizó una PCR usando los oligonucleótidos: **KIR2DL4** (600 pb) 5'-CCA GAC ACC TGC ATG CTG-3' y 5'-TCC CTG TTC ACT GTT CTG TGT-3'. Tras comprobar en un gel de agarosa que se amplificaba una banda única específica se procedió a la amplificación por PCR de la secuencia en un volumen final de 10 l con: 2 l de BigDye Terminator v 3.1 (*Applied Biosystems*), 1 l de oligonucleótidos KIR2DL4 5'-CCA GAC ACC TGC ATG CTG-3' o 5'-TCC CTG TTC ACT GTT CTG TGT-3' a 10 ng/ml, 0.5 l de DMSO, 1.5 l de DNA diluído a 0.2 g/ml y 5 l de

agua. La reacción de PCR consistió en 3 min-94°C; 25 ciclos (20 sg-94°C, 15 sg-55°C, 4 min-60°C); 15 min-72°C; 4°C.

La secuencia amplificada se precipitó con etanol 95% y acetato sódico 3 M (pH 5.2) durante 15 minutos a -20°C y se lavó con etanol 70% frío. La secuencia fue procesada en ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los porcentajes de LT CD8⁺ y LT NKR⁺ de pacientes en fase aguda según el agrupamiento de reacciones ampollas con afectación de mucosas (EM, SJS y TEN), exantemáticas sin afectación de mucosas (MPE y DRESS) y urticarias no inmediatas frente a individuos control se realizó mediante el test *t*-Student. El análisis estadístico de los porcentajes de LT CD8⁺ y LT NKR⁺ de muestras de pacientes en fase aguda respecto de aquellas recogidas una vez resuelto el cuadro clínico, así como de pacientes en fase aguda según la entidad clínica respecto de individuos sanos se realizó mediante el test Wilcoxon.

Se aplicó el test U Mann-Whitney para el análisis estadístico de los porcentajes de lisis de la línea NKL frente a la diana 221 .B*2705 haptenizada o no con AX, para el estudio de la inhibición de la producción de IFN- a través de ILT2/CD85j en la línea NK-92 tras la unión con sus moléculas HLA-I específicas y para el análisis estadístico de los porcentajes de LT CD8⁺ y LT NKR⁺ de pacientes en fase aguda y tras la resolución del cuadro clínico según la entidad clínica.

Tabla 1: Pacientes con reacciones de hipersensibilidad a medicamentos incluidos en el estudio: La tabla recoge todas las muestras de sangre periférica, de biopsias de piel y de ampollas de los pacientes en fase aguda (A) o tras la resolución del cuadro clínico (R).

<i>Reacciones ampollosas con afectación de mucosas</i>			<i>Reacciones no ampollosas sin afectación de mucosas</i>			<i>Urticarias no inmediatas</i>	
SJS1	A		MPE1	A		U1	A
	R			R		U2	A
	Ampolla		MPE2	A		U3	A
SJS2	A		MPE3	A		U4	A
	R		MPE4	A		U5	A
	Ampolla		MPE5	A		U6	A
SJS3	A		MPE6	A		U7	A
	R		MPE7	A			A
SJS4	A		MPE8	Ampolla		U8	A
	Ampolla		MPE9	A			A
SJS5	A		MPE10	A		U9	A
	Ampolla		MPE11	A			A
SJS6	A		MPE12	A		U10	A
	R		MPE13	A			A
	Ampolla		MPE14	A			A
SJS7	A		MPE15	A		U11	A
SJS8	A		MPE16	A			A
SJS9	A		MPE17	A		U12	A
SJS10	A		MPE18	A			A
SJS11	A			R		U13	A
	R		MPE19	A			A
SJS12	A			R		U14	A
SJS13	A		MPE20	A			A
TEN1	A			R		U15	A
	Ampolla		MPE21	A			A
TEN2	A			R		U15	A
	Ampolla		MPE22	A			A
TEN3	A		MPE23	A		U15	A
	R			R			A
TEN4	A		MPE24	A		U15	A
EM1	A			R			A
EM2	A		MPE25	A		U15	A
EM3	A		MPE26	A			A
EM4	A		MPE27	A		U15	A
	R		MPE28	A			A
			MPE29	A		U15	A
			MPE30	A			A
			MPE31	A		U15	A
			MPE32	A			A
			MPE33	A		U15	A
			MPE34	A			A
			MPE35	A		U15	A
			MPE36	A			A
			MPE37	A		U15	A
			MPE38	A			A
			MPE39	A		U15	A
			MPE40	A			A
			MPE41	A		U15	A
				R			A
			MPE42	A		U15	A
				R			A
			MPE43	A		U15	A
				R			A
			MPE44	A		U15	A
			MPE45	A			A
			MPE46	A		U15	A
				R			A
			MPE47	A		U15	A
			DRESS1	A			A
			DRESS2	A		U15	A
				R			A
			DRESS3	A		U15	A
				R			A
			DRESS4	A		U15	A
			DRESS5	A			A

	Citometría linfocitos
	Citometría queratinocitos
	Inmunoblot HLA-E soluble
	Ensayo de citotoxicidad
	Movilización de CD107a

SJS: Síndrome de Stevens-Johnson; **TEN:** necrolisis epidérmica tóxica; **EM:** eritema multiforme; **MPE:** exantema maculopapular; **DRESS:** Reacción de hipersensibilidad a fármacos con eosinofilia y síntomas sistémicos; **U:** urticaria no inmediata.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DEL INFILTRADO DE PIEL AFECTA O AMPOLLAS EN PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A MEDICAMENTOS

Se ha descrito que las células mononucleares de líquido de ampolla (BFMCs) de pacientes con TEN son mayoritariamente CD3⁺CD8⁺ (LT CD8⁺) activados (Correia et al., 1993). Estudios posteriores han determinado que se trata de CTLs con actividad NK que expresan NKR₁ (Le Cleach et al., 2000; Nassif et al., 2002). Aunque no existen datos acerca de si las células que infiltran la piel en reacciones menos severas pertenecen a esta subpoblación, sí se han generado clones y líneas T (CD3⁺) con características fenotípicas y funcionales de células NK a partir de PBMCs de pacientes con MPE y AGEP (Kuechler et al., 2004). Sin embargo, debido a que estos clones o líneas T procedían de cultivos primarios que habían permanecido un largo periodo de tiempo en cultivo, no podía conocerse la frecuencia real de estas células en sangre periférica de pacientes con reacciones no ampollosas. Se ha descrito que los linfocitos de sangre periférica (PBLs) que expresan NKR₁ representan sólo entre un 1 y un 8% del total de linfocitos en individuos sanos; sin embargo no hay datos publicados sobre el porcentaje de células CD3⁺CD8⁺NKR₁⁺ en sangre periférica de pacientes con reacciones de hipersensibilidad a medicamentos no inmediatas.

1.1. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES LINFOIDES EN SANGRE PERIFÉRICA

Para determinar si en sangre periférica de los pacientes en fase aguda existía un enriquecimiento de la población descrita en las ampollas subepidérmicas de pacientes con TEN, se analizó el porcentaje de células CD8⁺ y NKR₁⁺ en la población de PBLs CD3⁺.

1.1.1. Linfocitos T CD8⁺

Se recogieron PBMCs de pacientes en fase aguda y tras la resolución del cuadro clínico así como de individuos sanos y se analizaron mediante citometría de flujo los porcentajes de células CD8⁺ en el total de PBLs CD3⁺. Como muestra la figura 7A, se observó un incremento significativo del porcentaje de células CD3⁺CD8⁺ en fase aguda de pacientes con reacciones ampollosas con afectación de mucosas (EM, SJS y TEN) (42.3±2.5) y con reacciones exantemáticas sin afectación de mucosas (MPE y DRESS) (40.2±1.7) respecto de aquellos con urticarias no inmediatas (36±2.3) e individuos control (34.9±1). A continuación se analizó si

disminuía la población de células CD3⁺CD8⁺ una vez se había resuelto el cuadro clínico. No se observaron diferencias significativas al comparar muestras de fase aguda (35.1±2.8) y basal (32.2±2.5) de pacientes con urticarias no inmediatas (figura 7B, gráfico derecha). Sin embargo, al comparar muestras agudas con basales de los mismos pacientes con reacciones ampollasas (EM, SJS y TEN) y exantemáticas (MPE y DRESS) se determinaron dos patrones de comportamiento diferentes; los porcentajes de células CD8⁺ en PBLs CD3⁺ de muestras basales de pacientes con reacciones exantemáticas disminuyeron significativamente (34.8±2.7) respecto de muestras agudas (39.7±3.7), sin embargo no se observaron diferencias significativas al comparar muestras agudas (42.1±3.4) y basales (41±1.9) de pacientes con reacciones ampollasas (figura 7B).

El análisis estadístico de las entidades clínicas por separado (tabla 2) mostró resultados similares y permitió determinar diferencias entre los distintos tipos de reacciones de hipersensibilidad que concordaban con el grado de gravedad. En este sentido, se observó que el mayor porcentaje de células CD8⁺ en el total de PBLs CD3⁺, así como la mayor diferencia estadística con respecto a las muestras de individuos sanos, correspondía a las muestras de pacientes con TEN en fase aguda (51±4; p=0.0001).

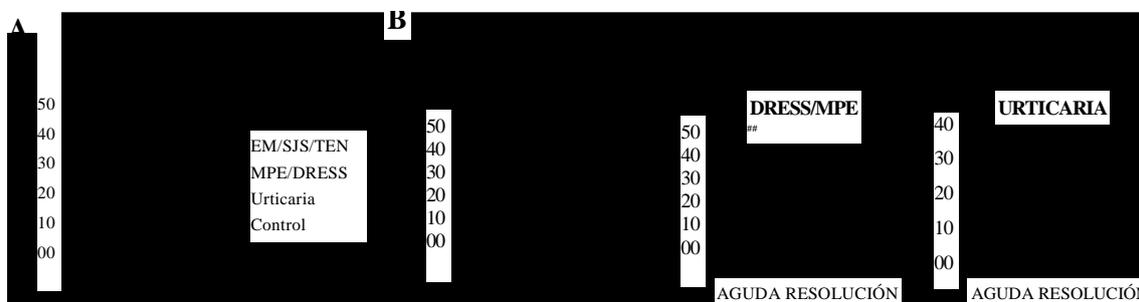


Fig 7. Porcentajes de células CD8⁺ en PBLs CD3⁺ de pacientes y controles. Análisis mediante citometría de flujo del porcentaje de linfocitos CD8⁺ en PBMCs de individuos sanos y pacientes con distintas reacciones de hipersensibilidad a medicamentos. **(A)** Porcentajes de células CD8⁺ en el total de PBLs CD3⁺ de pacientes en fase aguda e individuos sanos. Las barras representan la media y el error estándar de varios pacientes con TEN, SJS y EM (n=20), DRESS y MPE (n=43) o urticarias (n=15) y controles (n=56). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test *t*-Student. *, p<0.05 respecto de pacientes con urticaria y controles. **(B)** Porcentajes de células CD8⁺ en el total de PBLs CD3⁺ de pacientes en fase aguda y tras la resolución del cuadro clínico. Las barras representan la media y el error estándar de varios pacientes con TEN, SJS y EM (n=8), DRESS y MPE (n=13) o urticarias (n=11). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test Wilcoxon. #; p<0.05 respecto de la muestra basal (resolución).

1.1.2. Linfocitos T NKR⁺

La expresión de NKRs en células T (CD3⁺) está restringida casi exclusivamente a la subpoblación CD8⁺ (Arlettaz et al., 2004a; Arlettaz et al., 2004b; Baars et al., 2000; Mingari et al., 1997; Young et al., 2001). Para determinar si existía un enriquecimiento de células CD3⁺CD8⁻NKR⁻ en sangre periférica de fase aguda de pacientes con reacciones de hipersensibilidad, se analizaron los porcentajes de células KIR⁺, CD94⁺ e ILT2/CD85j⁺ en el total de PBLs CD3⁺ de muestras de fase aguda y se compararon con los de muestras de los mismos pacientes recogidas una vez resuelto el cuadro clínico e individuos sanos. Se observó un incremento significativo del porcentaje de células CD3⁺KIR2DL2/2DL3/2DS2⁺, pero no del porcentaje de células positivas para otros KIRs, en fase aguda de pacientes con reacciones ampollasas con afectación de mucosas (EM, SJS y TEN) (8.2±2.3) y exantemáticas sin afectación de mucosas (DRESS y MPE) (5.4±0.7) respecto de aquellos con urticarias no inmediatas (2.5±1) y controles (3.9±0.7) (figura 8A, gráfico superior). El mismo tipo de análisis determinó un incremento significativo de los porcentajes de células CD94⁺ e ILT2/CD85j⁺ en PBLs CD3⁺ de fase aguda de pacientes con reacciones ampollasas (CD3⁺CD94⁺: 12.1±2.1; CD3⁺ILT2⁺: 17±4.1) y exantemáticas no ampollasas (CD3⁺CD94⁺: 11.7±1.2; CD3⁺ILT2⁺: 17±2.1) respecto de aquellos con urticarias no inmediatas (CD3⁺CD94⁺: 8.7±1.6; CD3⁺ILT2⁺: 6.8±1.6) e individuos sanos (CD3⁺CD94⁺: 8.6±0.7; CD3⁺ILT2⁺: 7±0.9) (figura 8A, gráficos inferiores).

Una vez determinada la existencia de un mayor porcentaje de células KIR2DL2/2DL3/2DS2⁺, CD94⁺ e ILT2/CD85j⁺ en linfocitos T de pacientes en fase aguda respecto de controles, se estudió si estas poblaciones disminuían una vez superado el cuadro clínico. Como muestra la figura 8B, se observó una disminución en la frecuencia de células CD3⁺CD94⁺ y CD3⁺KIR2DL2/2DL3/2DS2⁺. Sin embargo, las diferencias observadas entre muestras agudas y basales de pacientes con reacciones ampollasas (CD3⁺CD94⁺: aguda 8.8±1.5 y resolución 7.2±0.6, p=0.62; CD3⁺KIRs⁺ aguda 5.5±1.2 y resolución 3±0.6, p=0.11) no fueron estadísticamente significativas a diferencia de las de pacientes con reacciones exantemáticas (CD3⁺CD94⁺: aguda 13.3±2.4 y resolución 9.5±1.7, p=0.01; CD3⁺KIRs⁺ aguda 6.8±2 y resolución 3.2±0.7, p=0.04).

Estos datos en conjunto sugerían que tanto los porcentajes de células CD3⁺CD8⁺ como los de células CD3⁺NKR⁺ en pacientes con reacciones ampollasas con afectación de mucosas (EM, SJS y TEN) se mantenían elevados una vez resuelto el cuadro clínico durante al menos dos meses después de la reacción alérgica (tiempo medio de recogida de las muestras basales).

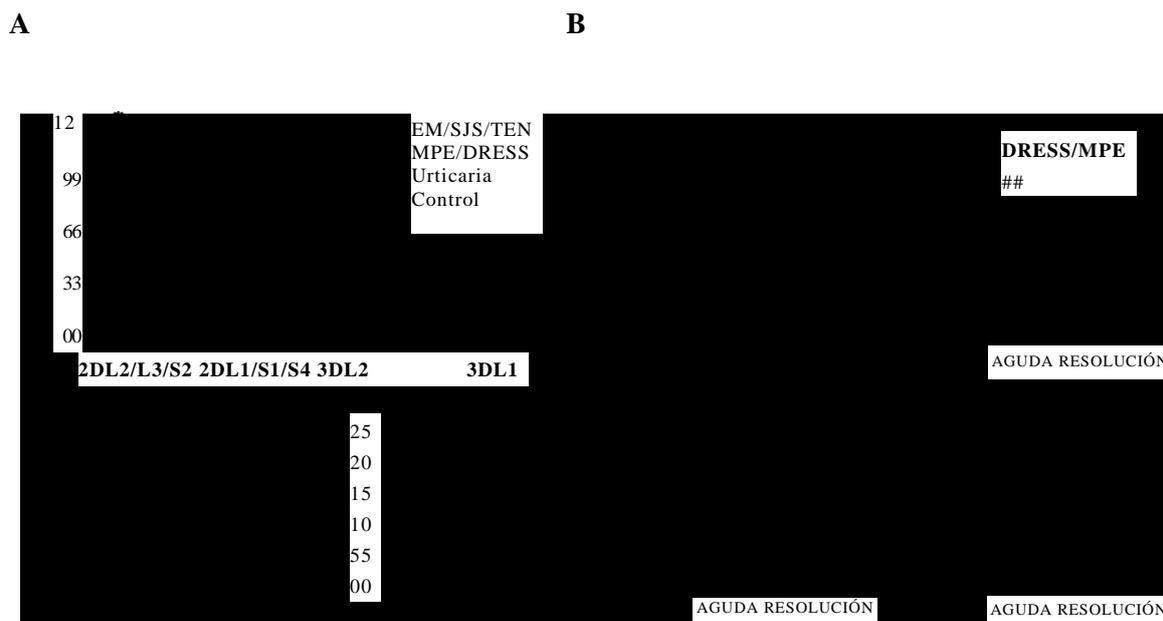


Fig 8. Porcentajes de células KIR⁺, ILT2/CD85j⁺ y CD94⁺ en PBLs CD3⁺ de pacientes y controles. Análisis mediante citometría de flujo del porcentaje de células NKR⁺ en PBMCs de controles y pacientes con anticuerpos específicos anti-KIR2DL2/L3/S2, anti-KIR2DL1/S1/S4, anti-KIR3DL2, anti-KIR3DL1, anti-ILT2, anti-CD94 y anti-CD3-PerCP. **(A)** Porcentajes de células KIR⁺, ILT2/CD85j⁺ y CD94⁺ en el total de PBLs CD3⁺ de pacientes en fase aguda y controles. Las barras representan la media y el error estándar de varios pacientes y controles. TEN/SJS/EM: KIR2DL2/L3/S2⁺ (n=18); KIR2DL1/S1/S4⁺ (n=17); KIR3DL2⁺ (n=19); KIR3DL1⁺ (n=18); CD94⁺ (n=14) e ILT2⁺ (n=17). MPE/DRESS: KIR2DL2/L3/S2⁺ (n=40); KIR2DL1/S1/S4⁺ (n=32); KIR3DL2⁺ (n=33); KIR3DL1⁺ (n=31); CD94⁺ (n=41) e ILT2⁺ (n=38). Urticaria: KIR2DL2/L3/S2⁺ (n=9); KIR2DL1/S1/S4⁺ (n=11); KIR3DL2⁺ (n=11); KIR3DL1⁺ (n=11); CD94⁺ (n=15) e ILT2⁺ (n=14). Controles: KIR2DL2/L3/S2⁺ (n=43); KIR2DL1/S1/S4⁺ (n=52); KIR3DL2⁺ (n=50); KIR3DL1⁺ (n=49); CD94⁺ (n=56) e ILT2⁺ (n=49). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test *t*-Student. *; p<0.05 respecto de pacientes con urticaria no inmediata y controles. **(B)** Porcentajes de células CD94⁺ y KIR2DL2/L3/S2⁺ en el total de PBLs CD3⁺ de pacientes con TEN, SJS y EM (gráficos izquierda) o DRESS y MPE (gráficos derecha) en fase aguda y tras la resolución del cuadro clínico. TEN/SJS/EM: KIR2DL2/L3/S2⁺ (n=7); CD94⁺ (n=6). MPE/DRESS: KIR2DL2/L3/S2⁺ (n=9); CD94⁺ (n=12). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test Wilcoxon. #; p<0.05 respecto de la muestra basal (resolución).

De nuevo el análisis estadístico de las distintas entidades clínicas por separado (tabla 2) mostró resultados similares a los observados tras el agrupamiento de los pacientes. Además, se determinó que, en general, los mayores porcentajes de células CD3⁺NKR⁺, así como las diferencias estadísticas más significativas con respecto a controles, correspondían a los pacientes con TEN y SJS en fase aguda.

Control	
35±1	
56	
3.3±0.5	
43	
7±1	
49	
8±1	
56	

Tabla 2: Porcentajes de células CD8⁺ y NKR⁺ en PBLs CD3⁺ de pacientes según la entidad clínica. La tabla recoge las medias y el error estándar de los porcentajes de células CD8⁺, CD94⁺, KIR2DL2/L3/S2⁺ e ILT2/CD85⁺ en PBLs CD3⁺ de pacientes con distintas entidades clínicas en el total de muestras agudas (At), en fase aguda (A) y tras la resolución del cuadro clínico (R) así como en controles (C). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test U Mann-Whitney para datos independientes (At vs. C) y el test Wilcoxon (A vs. R), $p < 0.05$; diferencia significativa. ND; valor no determinado.

1.2. INFILTRADO DE PIEL AFECTA Y LÍQUIDO DE AMPOLLAS

El infiltrado de ampollas de pacientes con TEN está formado mayoritariamente por células $CD3^+CD8^+NKR^+$ (Le Cleach et al., 2000; Nassif et al., 2002). Encontramos que en sangre periférica de pacientes con reacciones ampollosas con afectación de mucosas (EM, SJS y TEN) y exantemáticas sin afectación de mucosas (MPE y DRESS), pero no en aquellos con urticarias no inmediatas, existía un incremento significativo del porcentaje de células $CD8^+$ y NKR^+ en el total de PBLs $CD3^+$ respecto de individuos sanos. Estos datos sugerían que podría existir una migración específica hacia la piel de células $CD3^+CD8^+NKR^+$ también en reacciones no ampollosas. Para verificarlo, se recogieron biopsias de piel afecta de estos pacientes y se determinaron mediante citometría de flujo los porcentajes de células $CD8^+$ y NKR^+ en el total de linfocitos $CD3^+$. De igual forma se analizó el porcentaje de estas subpoblaciones en BFMCs de pacientes con SJS y TEN.

A

B

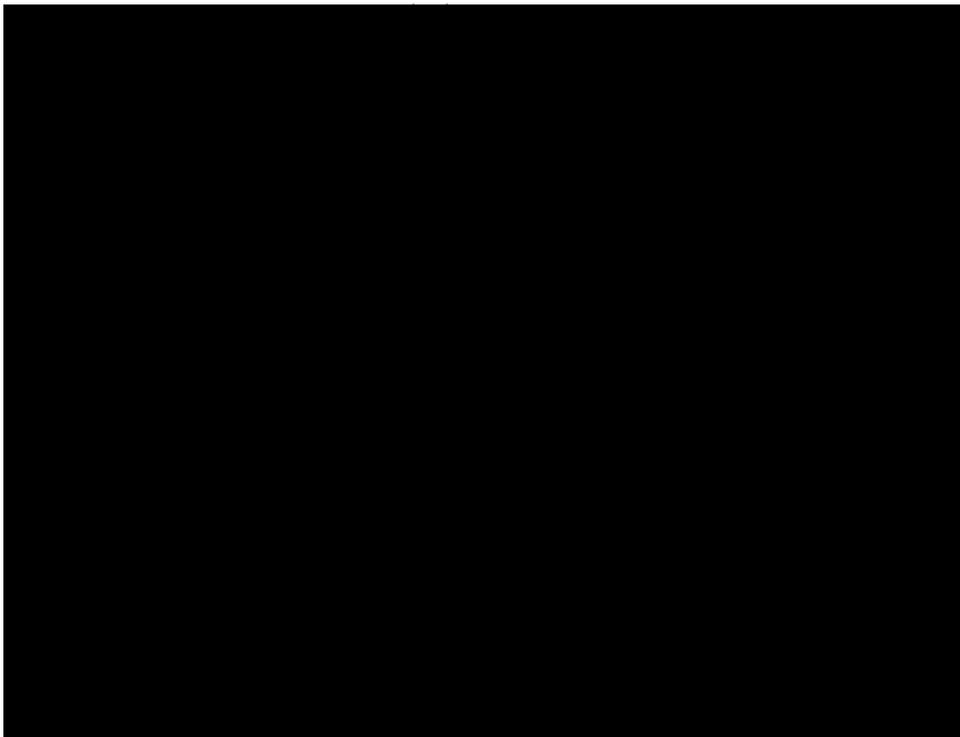


Fig 9. Porcentajes de células $CD8^+$, $CD94^+$, $CD56^+$ y KIR^+ en el total de linfocitos $CD3^+$ de sangre periférica, líquido de ampollas y piel afecta de pacientes con reacciones de hipersensibilidad a medicamentos. Análisis mediante citometría de flujo del porcentaje de células $CD8^+$, $CD94^+$, $CD56^+$ y $KIR2DL2/L3/S2^+$ en el total de linfocitos $CD3^+$ con anticuerpos específicos anti- $CD8$ -FITC, anti- $KIR2DL2/L3/S2$, anti- $CD94$, anti- $CD56$ y anti- $CD3$ -PerCP (A) en PBMCs de fase aguda y tras la resolución del cuadro clínico así como del infiltrado ampollosos de un paciente con una reacción ampollosa (SJS1) y (B) en PBMCs de fase aguda y en el infiltrado de piel afecta de un paciente con una reacción exantemática sin afectación de mucosas (DRESS 1).

El análisis del infiltrado de biopsias de piel afecta demostró que, mientras que la mayor parte de células que migran a la piel en fase aguda de pacientes con DRESS son $CD3^+CD8^+$ y muchas expresan NKR (figura 9B), en pacientes con MPE la mayoría son $CD3^+CD4^+$ y NKR (datos no mostrados). Sin embargo, los porcentajes de células $CD3^+CD8^+NKR^+$ tan elevados como los determinados en ampollas de pacientes con SJS y TEN (figura 9A) nunca se detectaron en piel afecta de pacientes con DRESS.

Todos estos datos sugerían que en fase aguda de pacientes con reacciones ampollosas (EM, SJS y TEN) y exantemáticas no ampollosas (MPE y DRESS) ocurría una expansión de células $CD3^+CD8^+NKR^+$ y una migración de las mismas hacia la piel. Esta subpoblación podría desempeñar un papel importante en el establecimiento y desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos, exceptuando urticarias no inmediatas, pudiendo ser especialmente relevante su función en SJS y TEN.

2. DISMINUCIÓN DEL UMBRAL DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES QUE EXPRESAN NKR_s TRAS LA HAPTENIZACIÓN DE MOLÉCULAS HLA-I EN CÉLULAS DIANA

2.1. COMPORTAMIENTO DE LA AMOXICILINA COMO HAPTENO SOBRE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

2.1.1. Unión de la amoxicilina a la región extracelular de proteínas de membrana

Con el objetivo de analizar el efecto que la haptениzación de moléculas HLA-I por fármacos pueda tener en las interacciones entre NKR_s y sus ligandos (moléculas HLA) se decidió estudiar, en primera instancia, si la amoxicilina (AX) podía unirse de forma espontánea a las proteínas de membrana en condiciones normales de cultivo celular. Para ello, se cultivó la línea celular 721.221 deficiente en moléculas HLA-I y sus transfectantes estables para HLA-B*2705, HLA-G1 y HLA-E (221 .B*2705, 221 .G1 y 221 .AEH respectivamente) en ausencia o presencia de AX. Como muestra la figura 10, el análisis mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos anti-AX demostró que la AX era capaz de unirse a la región extracelular de las proteínas de membrana de las líneas celulares usadas en las condiciones de cultivo utilizadas.

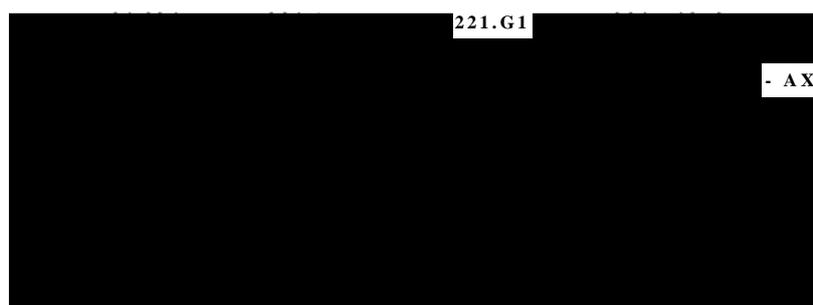


Figura 10. La amoxicilina se une covalentemente a las proteínas de membrana. La línea celular 721.221 y sus transfectantes 221 .AEH, 221 .B*2705 y 221 .G1 se cultivaron 1 8h en presencia (paneles inferiores) o ausencia (paneles superiores) de 1 mg/ml de AX. La detección del fármaco en proteínas de membrana se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta con una mezcla de anticuerpos específicos anti-AX y análisis por citometría de flujo. Los histogramas blancos muestran la tinción específica con anticuerpos anti-AX y los histogramas grises la tinción inespecífica con anticuerpos IgG control.

2.1.2. Unión covalente de la amoxicilina a moléculas HLA-I

Una vez demostrado que la AX era capaz de unirse a proteínas de superficie celular, se quiso determinar si ésta era capaz de unirse a las moléculas HLA-I. Para ello, se usaron los transfectantes 221.B*2705 y 221.G1 que expresan HLA-B*2705 y HLA-G1 respectivamente con una intensidad alta y, como control negativo, la línea parental 721.221. Tras 1 8h de incubación en presencia de AX se recogieron las células, se lisaron y se inmunoprecipitaron los lisados celulares con un anticuerpo específico anti-HLA-I (HP-1F7). Los inmunoprecipitados se resolvieron en SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF que se incubó con una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos anti-AX. El análisis por inmunoblot reveló la existencia de bandas específicas de 45 kDa en los carriles correspondientes a los inmunoprecipitados de los transfectantes preincubados con el fármaco (Figura 11, carril 4 panel izquierdo, carril 2 panel derecho). Se demostró, por tanto, que la AX era capaz de unirse covalentemente a las cadenas pesadas de HLA-B*2705 y HLA-G1.

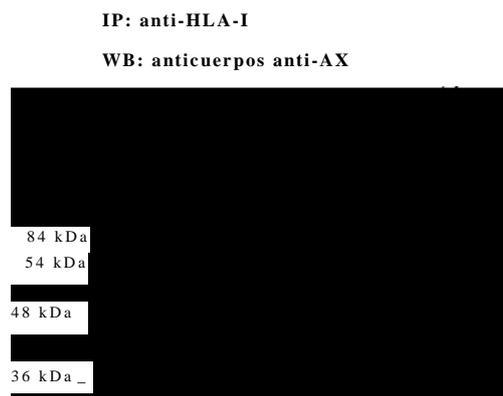


Figura 11. La AX se une a moléculas HLA-I. La línea celular 721.221 y los trasfectantes 221.B*2705 y 221 .G1 se cultivaron en presencia o ausencia de 1 mg/ml de AX durante 1 8h. Transcurrido el periodo de incubación se recogieron las células, se lisaron, y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo específico anti-HLA-I (HP-1F7). Los inmunoprecipitados se resolvieron en SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF que se incubó con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-AX. Las flechas indican las moléculas HLA -I (45 kDa) haptenizadas.

2.2. EFECTOS DE LA HAPTENIZACIÓN DE DIANAS NK SOBRE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CÉLULAS EFECTORAS

2.2.1. Incremento de la actividad citotóxica de la línea NKL frente a la diana 221.B*2705 haptenizada

La inhibición de la citotoxicidad a través del reconocimiento de moléculas HLA-I específicas de iNKR se ha estudiado ampliamente (Lopez-Botet et al., 2000). Así, se ha descrito que ILT2/CD85j inhibe la lisis de células dianas que expresan moléculas HLA-I tanto clásicas como no clásicas (Colonna et al., 1997). Para determinar si la unión covalente de la AX a HLA-I podía interferir en las interacciones iNKR-ligando y modular así la señal inhibidora, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad en los que se enfrentó la línea NK humana NKL que expresa con alta intensidad ILT2/CD85j a las dianas 721.221 y 221 .B*2705 preincubadas con AX. Como muestra la figura 12, la haptenización celular aumentó la actividad citotóxica de la línea NKL frente al transfectante 221 .B*2705.



Figura 12. La preincubación de dianas NK con AX incrementa la citotoxicidad mediada por la línea NKL frente a células 221.B*2705. Ensayo de liberación de ^{51}Cr de la línea NKL frente a las dianas 721.221 y 221 .B*2705 preincubadas (línea discontinua) o no (línea continua) con AX. Los porcentajes de lisis del transfectante preincubado con AX en las proporciones de 10:1, 25:1 y 50:1 (efectora:diana) son estadísticamente significativos ($p < 0.05$ según el test de U de Mann-Whitney).

2.2.2. Menor reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 al iNKR ILT2/CD85j tras la interacción con moléculas HLA-I haptenizadas

Se ha demostrado que el reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 a las tirosinas fosforiladas de los motivos ITIM del tallo citoplasmático de ILT2/CD85j es responsable de la transmisión de la señal inhibidora tras el reconocimiento de la molécula HLA-I específica (Bellon et al., 2002; Colonna et al., 1997; Dietrich et al., 2001). Por otra parte se ha descrito que las interacciones entre ILT2/CD85j y HLA-E son suficientes para inducir la fosforilación de las tirosinas de los

motivos ITIM del tallo citoplasmático del iNKR y el posterior reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 (Bellon et al., 2002). Para determinar si la haptización por fármacos de las moléculas HLA-I podía afectar a nivel molecular e inhibir las señales de activación de ILT2/CD85j, se realizaron ensayos con el transfectante estable de ILT2 en una línea de basófilos de rata (RBL.ILT2) y el transfectante 221 .AEH (que expresa HLA-E) preincubado con AX. Como control positivo de la fosforilación de las tirosinas y del reclutamiento de SHP-1 se trató con pervanadato la línea RBL.ILT2. Tras la estimulación se lisaron las células y se inmunoprecipitaron los lisados celulares con anticuerpos específicos anti-ILT2 (HP-F 1). Los inmunocomplejos se analizaron mediante inmunoblot revelando de forma secuencial la membrana de PVDF con anticuerpos específicos anti-SHP-1, anti-PY y anti-ILT2.

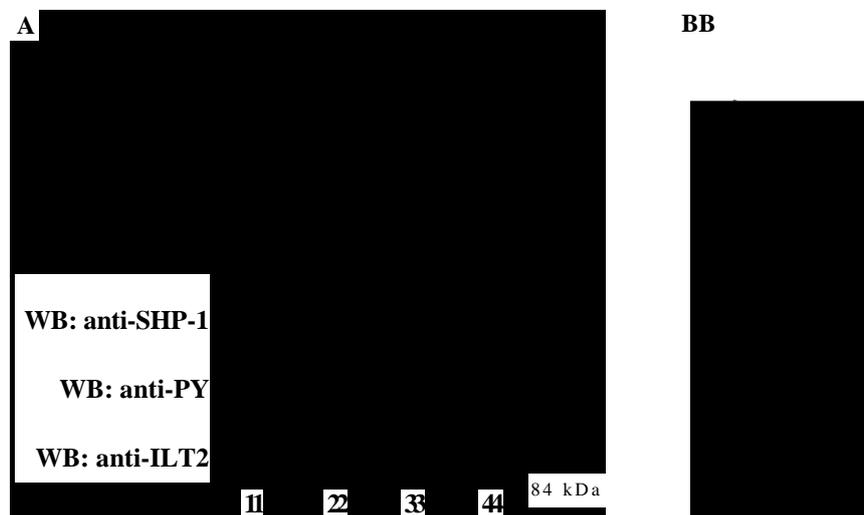


Figura 13. La preincubación de dianas NK con AX reduce la fosforilación de tirosinas del iNKR ILT2/CD85j y el posterior reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 tras la interacción con HLA-I. Los lisados celulares de la línea RBL.ILT2 tratada con pervanadato o cultivada con la diana 221.AEH preincubada o no con AX se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos anti-ILT2, se resolvieron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF que se incubó secuencialmente con los anticuerpos específicos anti-SHP-1, anti-PY y anti-ILT2. (A) Gel representativo de dos experimentos independientes. (B) Análisis de la asociación de SHP-1 con ILT2/CD85j y de la fosforilación de las tirosinas de ILT2/CD85j del experimento mostrado en A (expresado en unidades arbitrarias) determinado como la relación densitométrica de PY/ILT2 total (gráfico superior) y SHP-1/ILT2 total (gráfico inferior) en células RBL.ILT2 enfrentadas a la línea 221 .AEH haptizada (+AX) o no (-AX) con AX.

Como muestra la figura 13A, tras la conjugación de la línea RBL.ILT2 con el transfectante 221 .AEH se indujo la fosforilación (carril 1, panel medio) y el reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 (carril 1, panel superior). Sin embargo, cuando los conjugados se realizaron con la diana 221.AEH preincubada con AX se observó una menor fosforilación de las tirosinas de los motivos ITIM (carril 2, panel medio) y un menor reclutamiento de la fosfatasa SHP- 1 (carril 2,

panel superior). A partir de un análisis densitométrico de las bandas específicas se determinó una reducción del 50% de fosforilación de las tirosinas (gráfico superior) y del 75% del reclutamiento de SHP-1 (gráfico inferior) relativa a la cantidad de ILT2/CD85j total coimmunoprecipitado cuando el transfectante se preincubó con AX (figura 13B).

En conjunto estos datos sugerían que la haptización de las moléculas HLA-I por fármacos podría dificultar el reconocimiento por iNKRs y disminuir así el umbral de activación celular.

3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DEL INFILTRADO DE AMPOLLAS EN REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS NO INMEDIATAS

3.1. EXPRESIÓN EN SUPERFICIE Y LIBERACIÓN DE HLA-E

Como se ha comentado anteriormente se ha descrito que el infiltrado de las ampollas de pacientes con TEN está formado mayoritariamente por CTLs que expresan NKRs y que poseen actividad NK (Le Cleach et al., 2000; Nassif et al., 2002). Se ha identificado una población de CTLs denominada NK-CTLs ($CD3^+CD8^+CD45RO^+iNKR^+$) que presentan un TCR específico de HLA-E (Moretta et al., 2003). Por otra parte, recientemente se ha descrito una ruta de activación alternativa en LT $CD8^+$ mediada por el receptor activador $CD94/NKG2C$ (Guma et al., 2005; Meresse et al., 2006). Estas células T $CD8^+$ generalmente expresan $iNKRs$ y poseen actividad citotóxica mediante el reconocimiento de HLA-E a través del receptor $CD94/NKG2C$. Dadas las características fenotípicas y funcionales de la población mayoritaria en el infiltrado ampolloso, es presumible pensar que estas células puedan pertenecer a alguna de estas dos subpoblaciones de LT $CD8^+$ descritas y que utilicen, por tanto, alguno de los dos posibles mecanismos para lisar queratinocitos a través del reconocimiento de HLA-E.

3.1.1. Expresión de HLA-E en queratinocitos de piel afecta

Aunque la transcripción de HLA-E se ha detectado en muchos tipos celulares (Ulbrecht et al., 1992) el patrón de expresión de estas moléculas no clásicas es bastante restringido (Carosella et al., 2000). Si las células del infiltrado ampolloso lisan a los queratinocitos mediante el reconocimiento de HLA-E a través del TCR y/o del receptor activador $CD94/NKG2C$, es fundamental que los queratinocitos humanos puedan expresar esta molécula no clásica en superficie. Se ha descrito que el IFN- es capaz de aumentar la expresión en membrana tanto de HLA-I como de HLA-II y que esto también ocurre en queratinocitos humanos (Basham et al., 1985; Nassif et al., 2004a). Además, recientemente se ha demostrado que tanto melanocitos como queratinocitos de biopsias de piel afecta de pacientes con melanomas expresan HLA-E en superficie y que el tratamiento con IFN- induce la expresión de esta molécula en líneas de melanomas (Derre et al., 2006). Sin embargo, no existen datos acerca de si los queratinocitos pueden expresar HLA-E en condiciones basales y si su expresión puede aumentar en presencia de IFN-. Para ello, se trató la línea de queratinocitos humanos HaCaT y queratinocitos de

cultivo primario con IFN- y se analizó la expresión de HLA con anticuerpos específicos anti-HLA-I, anti-HLA-DR y anti-HLA-E. Como muestra la figura 14, el análisis mediante citometría de flujo demostró que el tratamiento con IFN- incrementó la expresión de HLA-I, HLA-DR y HLA-E tanto en la línea de queratinocitos humanos HaCaT como en queratinocitos de cultivo primario. Es importante resaltar que ni la línea HaCaT ni los queratinocitos de cultivo primario expresaban cantidades detectables de HLA-E en condiciones basales.

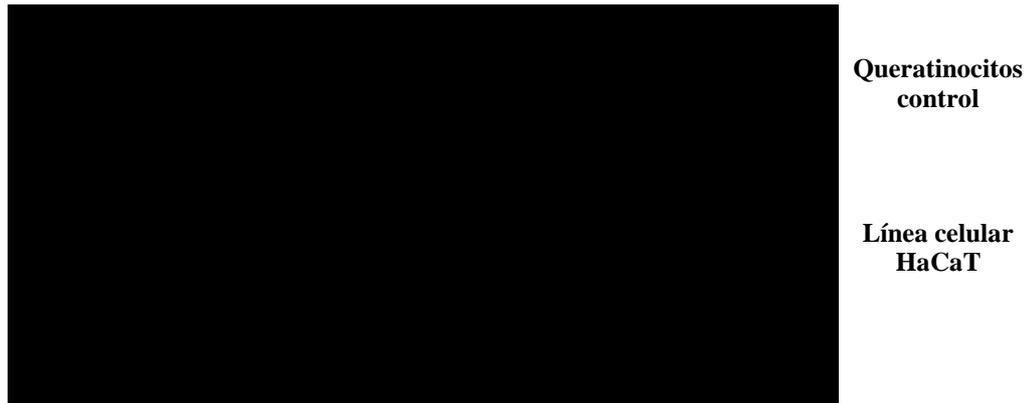


Fig 14. HLA-E se expresa en queratinocitos humanos tratados con IFN-. Queratinocitos primarios (paneles superiores) y la línea de queratinocitos HaCaT (paneles inferiores) fueron tratados durante 48 horas con 10 ng/ml (paneles superiores) o 2.5 ng/ml (paneles inferiores) de IFN-. Se estudió la expresión de HLA-DR, HLA-I y HLA-E mediante inmunofluorescencia directa (HLA-DR) o indirecta (HLA-I y HLA-E) incubando las células con anticuerpos específicos anti-HLA-DR-PE, anti-HLA-E (3D 12) y anti-HLA-I (HP-1F7) y análisis por citometría de flujo. La figura muestra la tinción con anticuerpos control IgG1 (histogramas grises) y anticuerpos específicos (histogramas blancos) en queratinocitos pretratados (línea continua) o no (línea discontinua) con IFN-.

Se ha descrito que los linfocitos del infiltrado ampolloso de pacientes con reacciones graves producen IFN-. Así, se han detectado concentraciones muy elevadas de esta citoquina en el líquido de ampollas de pacientes con TEN y SJS (Nassif et al., 2004b y datos nuestros no publicados). Ya que el tratamiento con IFN- aumentó la expresión de HLA-E en la línea HaCaT y en queratinocitos primarios, se estudió la expresión de HLA-E en queratinocitos de biopsias de piel afecta. Para ello se realizaron digestiones enzimáticas de biopsias de piel sana de controles y de piel afecta de pacientes y la suspensión celular se incubó con anticuerpos específicos anti-HLA-I y anti-HLA-E. La expresión de estas moléculas se determinó en células vivas (no marcadas con yoduro de propidio) CD45. Como muestra la figura 15, los queratinocitos de pacientes, a diferencia de los de individuos control, expresaban HLA-E en superficie. Además, se demostró que los queratinocitos de piel afecta expresaban HLA-I con mayor intensidad que los de individuos sanos (figura 15).

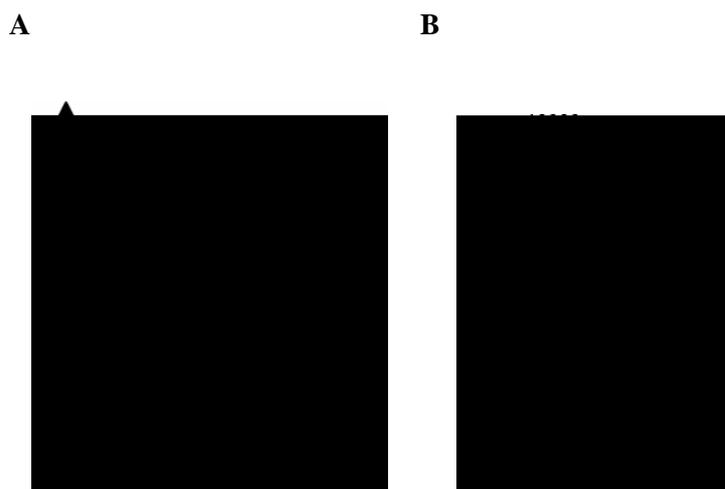


Fig 15. Expresión de HLA-E en queratinocitos de piel afecta. Se estudió la expresión de HLA-I y HLA-E mediante inmunofluorescencia indirecta en queratinocitos de pacientes y de individuos control con anticuerpos específicos anti-HLA-I (HP-1F7) y anti-HLA-E (3D12) y análisis por citometría de flujo. Las células muertas se excluyeron del análisis mediante tinción con yoduro de propidio. **(A)** Expresión de HLA-I (línea continua), HLA-E (línea discontinua) o tinción inespecífica con anticuerpos control IgG1 (histogramas grises) en queratinocitos de piel afecta de un paciente representativo (DRESS1) (panel superior) y de un individuo sano (panel inferior). **(B)** Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de HLA-I (gráfico superior) y HLA-E (gráfico inferior) en queratinocitos de pacientes (P) (n=8) y controles (C) (n=6). La IMF de la tinción no específica con anticuerpos control IgG1 se restó de la IMF determinada tras la incubación con anticuerpos específicos. Las líneas horizontales corresponden a los valores medios de IMF.

3.1.2. Liberación de HLA-E soluble al líquido de las ampollas

Recientemente se ha demostrado que tras la activación de células endoteliales (Coupel et al., 2007) y en cultivos de líneas de melanoma humano y de melanocitos primarios (Derre et al., 2006) se produce HLA-Es. La sobreexpresión de HLA-E en queratinocitos de piel afecta de pacientes con SJS o TEN sugería la posibilidad de encontrar la forma soluble de esta molécula en el líquido de ampollas. Para comprobarlo, se realizaron análisis de inmunoblot en líquidos de ampollas usando anticuerpos específicos anti-HLA-E (MEM-E/02). En paralelo se analizó la presencia de HLA-Es en sueros de pacientes en fase aguda y tras la resolución del cuadro clínico. Como muestra la figura 16, se observó una banda de 37 kDa correspondiente al peso molecular específico de la cadena pesada de HLA-E en los carriles correspondientes a muestras de líquidos de ampollas. Esta banda era específica ya que se encontraba también en el carril de sobrenadante de cultivo del transfectante de HLA-E (221 .AEH) y no en el de la línea parental (721.221). No se detectó HLA-Es en sueros de estos mismos pacientes ni en fase aguda ni tras la resolución del cuadro clínico. Como era de esperar, tampoco se detectó HLA-Es en sueros de individuos control (C1 y C2).

SJS2 TEN1 TEN2

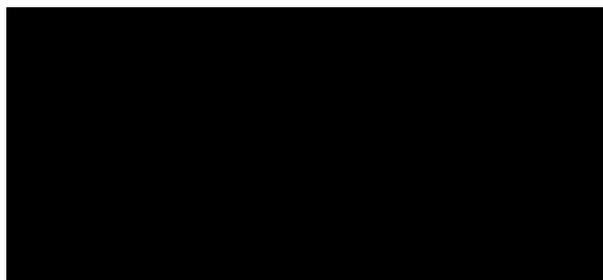


Fig 16. Liberación de HLA-E en el líquido de ampollas. Se determinó la presencia de HLA-Es mediante inmunoblot en muestras de suero de individuos sanos (C1 y C2) y pacientes en fase aguda (SJS2 y TEN1) y tras la resolución del cuadro clínico (SJS2) así como de líquido de ampollas (SJS2, TEN1 y TEN2). Como control negativo y positivo se usó sobrenadante de cultivo de las líneas 72 1.22 1 y 22 1.AEH respectivamente.

3.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DEL LÍQUIDO DE AMPOLLAS

3.2.1. Citotoxicidad de clones T CD8⁺CD56⁺ frente a queratinocitos

Una vez determinado que los queratinocitos de piel afecta de pacientes con reacciones de hipersensibilidad expresaban en superficie e incluso liberaban en forma soluble HLA-E, y tras haberse demostrado que el tratamiento con IFN- incrementaba la expresión de esta molécula tanto en la línea HaCaT como en queratinocitos primarios, se estudió si clones T citotóxicos similares a los descritos en líquidos de ampollas de pacientes con TEN (Le Cleach et al; 2000) eran capaces de lisar queratinocitos a través del reconocimiento de HLA-E. Para ello se generaron clones T CD8⁺CD56⁺ y se seleccionaron, mediante ensayos de citotoxicidad frente a las dianas 721.221 y 221.AEH, aquellos con mayor actividad citotóxica frente al transfectante de HLA-E (figura 17).

A continuación se investigó si aquellos clones “restringidos” por HLA-E podrían lisar queratinocitos que expresaban HLA-E. Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad en los que se usó como diana la línea HaCaT preincubada con IFN-. Como muestra la figura 1 8A, los clones T CD8⁺CD56⁺ “restringidos” por HLA-E eran capaces de lisar a la línea HaCaT y lo hacían de manera más eficiente cuando ésta había sido tratada con IFN-. Para comprobar que la lisis era específica de HLA-E se repitieron los ensayos de citotoxicidad en presencia de

anticuerpos bloqueantes específicos anti-HLA-I y anti-HLA-E o anticuerpos control. La preincubación de los queratinocitos con anticuerpos específicos disminuyó la citotoxicidad de los dos clones analizados frente a la línea HaCaT tratada con IFN- (figura 1 8B). Estos datos sugerían que clones con el fenotipo descrito para la subpoblación mayoritaria de las ampollas de pacientes con SJS y TEN podrían lisar queratinocitos a través del reconocimiento de HLA-E.

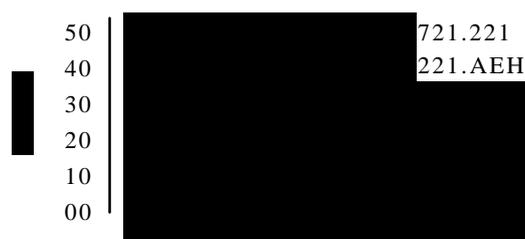


Fig 17. Clones T CD8⁺CD56⁺ específicos de HLA-E. La citotoxicidad mediada por clones T CD8⁺CD56⁺ se midió en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr durante 4 horas frente a las dianas 721.221 y 221.AEH.

AA

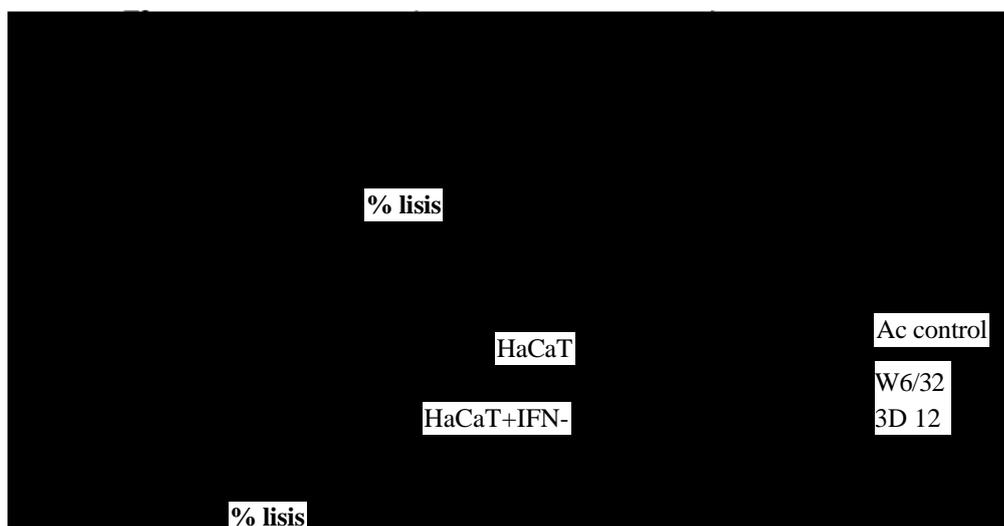


Fig 18. Los clones T CD8⁺CD56⁺ específicos de HLA-E lisan a la línea de queratinocitos HaCaT preincubada con IFN-. La citotoxicidad mediada por clones T CD8⁺CD56⁺ específicos de HLA-E se midió en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr durante 4 horas frente a la línea HaCaT tratada o no con IFN-(2.5 ng/ml). Como control positivo y negativo se midió la actividad citotóxica frente a las dianas 721.221 y 221 .AEH respectivamente. Los gráficos muestran los porcentajes de lisis en ausencia (A) o presencia (B) de anticuerpos bloqueantes anti-HLA-E y anti-HLA-I en tres clones representativos.

3.2.2. Citotoxicidad de PBMCs y BFMCs

Como se ha descrito anteriormente, se observó un incremento en los porcentajes de células CD8⁺ y NKR⁺ en el total de LT en fase aguda de pacientes con reacciones con y sin afectación de mucosas (excepto urticarias no inmediatas) respecto de individuos sanos (figuras 7A y 8A y tabla 2). Esta subpoblación de LT que expresan CD8 y NKRs era la mayoritaria en el líquido de ampollas (figura 9A) y muy representativa en piel afecta de pacientes con DRESS (figura 9B) por lo que debía representar a la población de células efectoras. En un primer intento por determinar la funcionalidad de esta subpoblación se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad en los que PBMCs de pacientes en fase aguda y de individuos control se enfrentaron a las dianas 721.221 y 221 .AEH. Cuando se usaron como efectoras PBMCs de individuos sanos se observó una disminución de los porcentajes de lisis frente a la diana 221.AEH (16±6.6) respecto de la línea parental (28.6±9) (figura 19A, panel izquierda). En aquellos ensayos en los que se usaron como efectoras PBMCs de pacientes se observaron dos patrones de comportamiento distintos de acuerdo con la entidad clínica; las PBMCs de pacientes con MPE se comportaron igual que las de los controles y lisaron más a la línea parental (18.2±4.6) que al transfectante (10±2.3), mientras que las PBMCs de pacientes con TEN o SJS lisaron por igual a la diana 221 .AEH (19.6±4.1) que a la 721.221 (18.4±3.6).

A continuación se quiso determinar si las células mononucleares de líquido de ampollas (BFMCs) de pacientes con reacciones más graves seguían este mismo patrón de comportamiento y para ello se enfrentaron en ensayos de citotoxicidad con ⁵¹Cr a las dianas NK. Como muestra la figura 19B, a diferencia de lo observado con PBMCs de pacientes con TEN y SJS, las BFMCs lisaron más al transfectante 221 .AEH (12.6±4.7) que a la línea parental 721.221 (8.2±3.2).

Para determinar si las BFMCs podían lisar queratinocitos y, en su caso, si lo hacían más eficientemente cuando estos habían sido tratados con IFN-, se realizaron ensayos de citotoxicidad frente a queratinocitos alogénicos tratados con la citoquina. Como muestra la figura 1 9C, se observó que tanto las BFMCs de un test cutáneo que desarrolló una ampolla en un paciente que había sufrido un MPE como las de una ampolla de un paciente con TEN eran capaces de lisar queratinocitos alogénicos y que la actividad citotóxica se incrementaba hasta 4 veces cuando los queratinocitos habían sido tratados con IFN-. En conjunto estos datos apoyaban la hipótesis de que una subpoblación del infiltrado ampoloso podría lisar queratinocitos mediante el reconocimiento de HLA-E.



Fig 19. Linfocitos citotóxicos específicos de HLA-E en sangre periférica y en ampollas de pacientes con SJS y TEN. Se midió la actividad citotóxica de PBMCs de controles y pacientes con distintas entidades clínicas en fase aguda así como de BFMCs de pacientes con SJS y TEN frente a las dianas 721.221 y 221 .AEH o a queratinocitos alogénicos en ensayos de liberación de ^{51}Cr de 4 horas. **(A)** Porcentajes de lisis de PBMCs de controles y pacientes con MPE o TEN y SJS frente a las dianas 721.221 y 221 .AEH en una proporción de 50:1 (efectora:diana). Las barras representan los valores medios y el error estándar de los porcentajes de lisis en experimentos independientes con PBMCs de diferentes controles ($n=4$) y pacientes con MPE ($n=9$) o TEN y SJS ($n=5$). **(B)** Porcentajes de lisis de BFMCs frente a las dianas 721.221 y 221 .AEH. Las barras representan los valores medios y el error estándar de los porcentajes de lisis en experimentos independientes con BFMCs de distintos pacientes ($n=5$) en una proporción de 20:1 (efectora:diana). **(C)** Porcentajes de lisis de BFMCs del paciente MPE8 (gráfico izquierda) y TEN2 frente a queratinocitos primarios tratados o no con IFN- (10 ng/ml).

3.2.3. Expresión y funcionalidad del receptor activador CD94/NKG2C en PBLs y en linfocitos del líquido de ampollas de pacientes con reacciones con afectación mucocutánea

Como se ha comentado anteriormente PBMCs de pacientes con TEN y SJS en fase aguda, a diferencia de las de pacientes con MPE e individuos sanos, lisaron por igual a la diana 721.221 (18.4 ± 3.6) y al transfectante 221.AEH (19.6 ± 4.1) (figura 19A). Este hecho podría deberse a la existencia en sangre periférica de LT CD8^+ con TCRs específicos de HLA-E (Moretta et al., 2003) y/o con actividad citotóxica mediada por el receptor activador CD94/NKG2C (Guma et al., 2005; Meresse et al., 2006). La reciente disponibilidad de un anticuerpo monoclonal específico anti-NKG2C (MAB 1381) nos permitió determinar la posible existencia de linfocitos CD94/NKG2C^+ en sangre periférica de fase aguda de pacientes con reacciones ampollosas. Como

Resultados

muestra la figura 20A, el análisis mediante citometría de flujo en PBMCs de estos pacientes reveló la presencia, en algunos casos, de una población muy minoritaria de LT CD4⁺CD94/NKG2C⁺ que había sido descrita anteriormente (Guma et al., 2005). No obstante, en

todos los pacientes se observó una población muy representativa de linfocitos citotóxicos ($CD3^+CD8^+$ y/o células NK ($CD3$)) que expresaban el receptor activador (figura 20A). Estudios previos (Guma et al., 2005) habían demostrado que existe una alta variabilidad en el porcentaje de linfocitos $CD94/NKG2C^+$ en sangre periférica de individuos sanos (<0.1% a 22.1%). En concreto, estos mismos autores determinaron que los porcentajes de células $CD3CD94/NKG2C^+$ variaban entre el 0.1% y el 45% y que los de células $CD3^+CD94/NKG2C^+$, en su mayoría (>95%) $CD8^+$, variaban entre el 0.1% y el 5%. Como muestra la figura 20A, el análisis de la expresión de $CD94/NKG2C$ en células $CD3^+CD8^+$ de algunos pacientes con reacciones más severas reveló valores muy por encima de los descritos en individuos sanos. Además, se observó que el porcentaje de expresión de $CD94/NKG2C$ en células $CD3^+CD8^+$, y también en células $CD3$, disminuía una vez se había resuelto el cuadro clínico (figura 20A, gráficos inferiores), lo que sugería que tanto los LT $CD8^+CD94/NKG2C^+$ como las células NK $CD94/NKG2C^+$ podrían jugar un papel importante en las reacciones más graves.

Para determinar si la ausencia de inhibición frente al transfectante 221 .AEH por parte de las PBMCs de pacientes con reacciones ampollasas en fase aguda (figura 1 9A, gráfico derecha) se debía a la presencia de linfocitos citotóxicos $CD94/NKG2C^+$, se repitieron los ensayos de citotoxicidad con PBMCs de pacientes en presencia de anticuerpos bloqueantes específicos anti-NKG2C. Como muestra la figura 20B, en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C se observó una disminución de los porcentajes de lisis frente a la diana 221.AEH (4.7 ± 3.8) respecto a los observados con anticuerpos control (15.4 ± 5.6). Es interesante mencionar que en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C se observó una ligera disminución de la actividad citotóxica frente a la línea 721.221 (12.4 ± 5.2) respecto de la determinada con anticuerpos control (14.6 ± 5.1). Esta pequeña diferencia podría ser consecuencia de la baja expresión en superficie de HLA-E descrita en la línea parental 721.221 (Braud et al., 1997; Wainwright et al., 2000).

Los resultados del análisis mediante citometría de flujo y de los ensayos de citotoxicidad en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C demostraron la expresión y funcionalidad del receptor $CD94/NKG2C$ en linfocitos citotóxicos de sangre periférica de pacientes con reacciones ampollasas con afectación de mucosas (EM, SJS y TEN). Para determinar si los responsables de la ausencia de inhibición frente al transfectante 221 .AEH eran los LT $CD8^+$ y/o las células NK que expresaban $CD94/NKG2C$, se realizaron ensayos de movilización de CD 1 07a en los que se enfrentaron PBMCs de estos pacientes en fase aguda a las dianas NK. Tras 4 horas de incubación, se marcaron las células con anticuerpos específicos anti-NKG2C y anti- $CD3$ -PerCP y se determinó el porcentaje de células $CD107a^+$ en las poblaciones de PBLs

CD3⁺ y CD3 y en las subpoblaciones CD94/NKG2C⁺ y CD94/NKG2C. Como muestra la figura 20C, se observó que el mayor porcentaje de células CD107a⁺, tanto en la población de PBLs CD3⁺ como en la CD3, correspondía a la subpoblación de células que expresaban el receptor CD94/NKG2C y que habían sido enfrentadas al transfectante 221 .AEH. De acuerdo con los datos obtenidos en los ensayos de citotoxicidad (figura 19A, gráfico derecha y figura 20B, barras negras) los porcentajes de expresión de CD107a en PBLs CD3⁺ y CD3 sin tener en cuenta la expresión de CD94/NKG2C fueron los mismos cuando las PBMCs se enfrentaron a la línea parental 721.221 y al transfectante 221 .AEH.



Fig 20. Linfocitos T y células NK de sangre periférica de pacientes con reacciones con afectación de mucosas reconocen HLA-E a través de CD94/NKG2C. (A) Inmunofluorescencia en PBMCs de pacientes con EM, SJS y TEN con anticuerpos específicos anti-NKG2C, anti-CD3-PerCP y anti-CD8-PE y análisis por citometría de flujo. La figura muestra los porcentajes de expresión de CD94/NKG2C en PBLs CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD8 y CD3 de tres pacientes representativos en fase aguda (EM2, SJS2 y TEN3a) (gráficos superiores) y tras la resolución del cuadro clínico (TEN3r) (gráfico inferior). (B) Ensayo de liberación de ⁵¹Cr durante 4 horas en los que se enfrentaron PBMCs de pacientes con reacciones ampollosas con afectación de mucosas a las dianas 721.221 y 221 .AEH en una proporción de 50:1 (efectora:diana) en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C (10 g/ml) o anticuerpos irrelevantes. Las barras muestran el valor medio y el error estándar de los porcentajes de lisis de tres experimentos independientes realizados con distintos pacientes (SJS2, SJS5 y EM2). (C) Ensayo de movilización de CD107a en PBMCs de pacientes con reacciones ampollosas con afectación de mucosas en fase aguda cultivadas con las dianas 721.221 y 221 .AEH en una proporción de 2:1 (efectora:diana). La figura muestra los porcentajes de células CD107a⁺ tras los cultivos en las poblaciones de PBLs CD3⁺ (gráfico superior) y CD3 (gráfico inferior) y en las subpoblaciones positivas o negativas para el receptor CD94/NKG2C en un experimento representativo con PBMCs del paciente EM2 en fase aguda.

Todos estos resultados apoyaban la hipótesis de que los LT CD8⁺CD94/NKG2C⁺, y muy probablemente las células NK CD94/NKG2C⁺, migraban a la piel en la fase aguda de pacientes con reacciones ampollosas y favorecían la lisis de los queratinocitos tras el reconocimiento de HLA-E. Para confirmarla, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de linfocitos citotóxicos CD94/NKG2C⁺ en el infiltrado de ampollas de pacientes con SJS y TEN. Como muestra la figura 21A, se observó un elevado porcentaje de células CD94/NKG2C⁺ en linfocitos de líquido de ampolla CD3⁺CD8⁺ y CD3. Además, el análisis de la expresión del receptor activador en blastos CD3⁺CD8⁺ reveló una frecuencia mayor de células CD94/NKG2C⁺ en esta subpoblación del infiltrado ampoloso.

AA

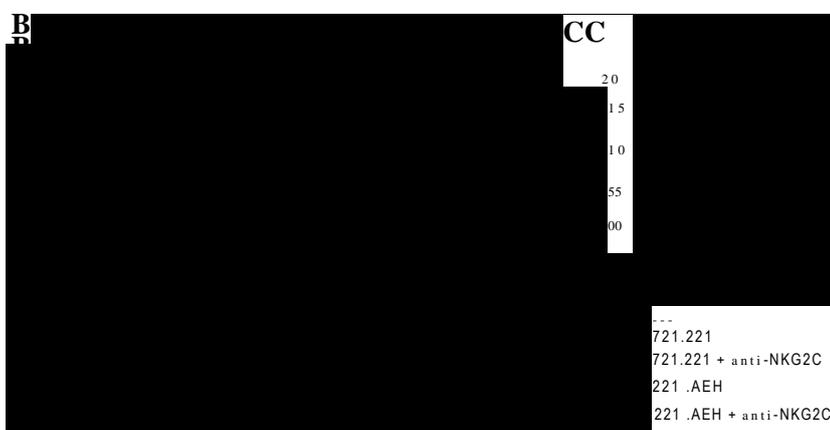
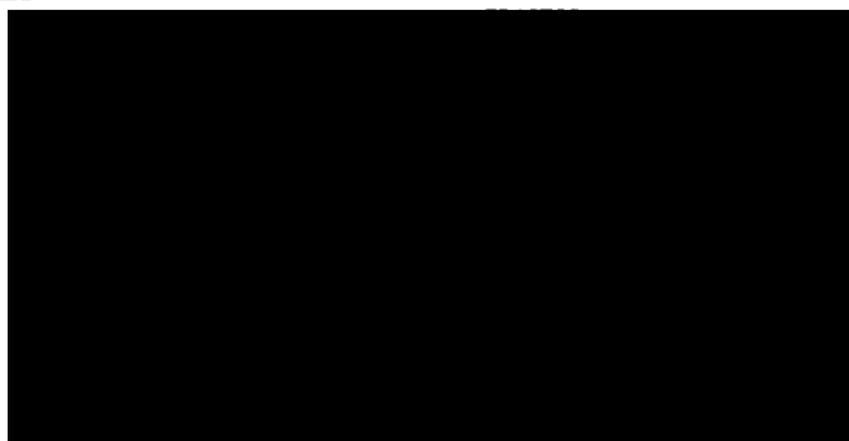


Fig 21. Los linfocitos T y NK del infiltrado de ampollas reconocen HLA-E a través de CD94/NKG2C. (A) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de NKG2C en BFMCs de pacientes con SJS. Los paneles muestran los porcentajes de expresión de CD94/NKG2C en las poblaciones de linfocitos CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD8 y CD3 y en blastos CD3⁺CD8⁺ de tres pacientes representativos (SJS4, SJS5 y SJS2). (B-C) Ensayo de movilización de CD107a en BFMCs enfrentadas a las dianas 721.221 y 221 .AEH en una proporción de 2:1 (efectora:diana) en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C (10 g/ml). Como control negativo se cultivaron las BFMCs solas. Las células se marcaron con anticuerpos específicos anti-CD8-FITC y/o anti-CD3-PerCP. (B) Porcentaje de células CD107a⁺ en la población de linfocitos CD3⁺CD8⁺ enfrentada o no a las dianas en un experimento representativo con BFMCs del paciente SJS4. (C) Porcentaje de células CD107a⁺ en la población de linfocitos CD3 enfrentada o no a las dianas en un experimento representativo con BFMCs del paciente SJS6.

Para demostrar la funcionalidad de CD94/NKG2C en BFMCs de pacientes con reacciones ampollosas se llevaron a cabo ensayos de movilización de CD 107a frente a las dianas 721.221 y 221 .AEH en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C. En ausencia de anticuerpos bloqueantes, de acuerdo con los resultados obtenidos en ensayos de citotoxicidad (figura 19B), se determinó un incremento del porcentaje de células CD107a⁺ en la población de linfocitos de líquido de ampollas CD3⁺CD8⁺ (figura 21B) y CD3 (figura 21C) enfrentada a la diana 221 .AEH. Este incremento resultó ser específico del reconocimiento de HLA-E por parte de CD94/NKG2C ya que en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C el porcentaje de células CD 107a⁺ en ambas poblaciones de linfocitos (CD3⁺CD8⁺ y CD3) enfrentadas a las diferentes dianas NK se igualó (figura 21B-C).

En conjunto estos resultados apoyan la hipótesis de que tanto los LT CD8⁺CD94/NKG2C⁺ como las células NK CD94/NKG2C⁺ podrían lisar queratinocitos mediante el reconocimiento de HLA-E a través de CD94/NKG2C y jugar un papel importante en el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad a medicamentos más graves como SJS y TEN.

4. PAPEL REGULADOR DE ILT2/CD85j SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IFN- Y LA CITOTOXICIDAD INDUCIDAS POR DISTINTOS ESTÍMULOS EN CÉLULAS NK

4.1. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- INDUCIDA TRAS EL ENCUENTRO DE CÉLULAS NK CON DIANAS

4.1.1. Caracterización funcional ILT2/CD85j en la línea NK-92

Diversos estudios (Colonna et al., 1997; Navarro et al., 1999; Vitale et al., 1999) han demostrado el papel regulador que tiene el iNKR ILT2/CD85j sobre la citotoxicidad de células NK. Sin embargo, poco se ha estudiado acerca del papel que este receptor pudiera tener sobre la producción de citoquinas y, en concreto, sobre la producción de IFN-. En un primer intento por determinar la posible función reguladora de ILT2/CD85j se usó la línea NK-92, ya que ha sido utilizada en diversos estudios sobre la regulación de la producción de IFN-. Como muestra la figura 22, se verificó que la línea NK-92 expresaba con una alta intensidad los receptores CD56 e ILT2/CD85j, con una intensidad intermedia CD94/NKG2A y que era negativa para los receptores de la familia de los KIRs y CD 16.



FL- 1

Figura 22. Fenotipo de la línea NK-92. Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos anti-CD56, anti-CD16, anti-ILT2/CD85j, anti-CD94 y una mezcla de anticuerpos anti-KIR2DL2/L3/S2, anti-KIR2DL1/S1/S4, anti-KIR3DL1 y anti-KIR3DL2 y análisis mediante citometría de flujo. La figura muestra la tinción con el anticuerpo IgG control (histogramas grises) y con los anticuerpos específicos (histogramas blancos).

Se ha descrito que ILT2/CD85j puede inhibir la citotoxicidad de células NK y de líneas NK humanas tras el reconocimiento de sus moléculas HLA-I específicas (Colonna et al., 1997; Navarro et al., 1999; Vitale et al., 1999). Para poder determinar el posible papel regulador que pudiera tener ILT2/CD85j sobre la producción de IFN- en la línea NK-92 lo primero que se comprobó fue la funcionalidad del mismo. Así, se realizaron ensayos de citotoxicidad en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes usando como células efectoras la línea NK-92 y como dianas células 721.221, 221.Cw07, 221.B*2705 y 221.G1m. Además de la línea parental 721.221 se usó como control negativo el transfectante 221 .Cw07 ya que se ha descrito que HLA-Cw07 no es ligando de ILT2/CD85j (Draghi et al., 2005; Fanger et al., 1998). Se eligieron los transfectantes 221 .B*2705 y 221 .G1m por expresar ligandos específicos de ILT2/CD85j (HLA-B*2705 y HLA-G1 respectivamente) y porque se ha descrito que la transfección en la línea 721.221 de HLA-B*2705 y HLA-G1 conduce a la inhibición de la citotoxicidad por parte de células NK KIR (Colonna et al., 1997).

Como muestra la figura 23, se observó una menor actividad citotóxica de la línea NK-92 frente a los transfectantes 221 .B*2705 y 221 .G1m. Esta inhibición era específica del reconocimiento de HLA-B*2705 y HLA-G1m por parte de ILT2/CD85j ya que se revertía al realizar los ensayos en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-ILT2 y anti-HLA-I pero no de anticuerpos anti-CD94. De acuerdo con lo descrito, la expresión de HLA-Cw07 en el transfectante 221 .Cw07 no afectó a la actividad citotóxica de la línea NK-92 y los porcentajes de lisis no variaron cuando los ensayos se realizaron en presencia de anticuerpos bloqueantes.

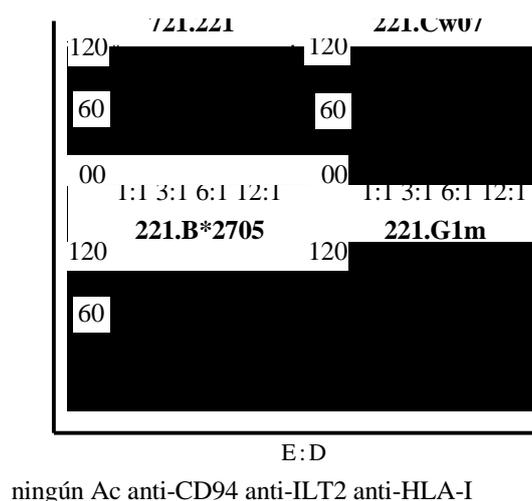


Figura 23. Citotoxicidad de la línea NK-92 frente a distintas dianas NK. La citotoxicidad mediada por células NK-92 se midió en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas frente a las líneas 721.221 y sus transfectantes 221 .Cw7, 221 .B*2705 y 221 .G1m en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-CD94, anti-ILT2 y anti-HLA-I. Los ensayos se realizaron por triplicado en diferentes proporciones efectora:diana.

Debido a sus características fenotípicas y funcionales se determinó que la línea NK-92 podría ser un buen modelo para el estudio del posible efecto modulador del iNKR ILT2/CD85j sobre la síntesis de IFN-.

4.1.2. Inhibición de la síntesis de IFN-y TNF-en la línea NK-92

Se ha descrito que el encuentro de NKs con dianas conduce a la producción de IFN- (Kurago et al., 1998). Así, para determinar el posible papel regulador que ILT2/CD85j pudiera tener sobre la producción de IFN- se realizaron cocultivos de células NK-92 con las dianas 721.221 y sus trasfectantes estables.

No obstante, antes de llevarse a cabo los cocultivos, se descartó que las dianas fueran capaces de producir IFN-. Así, se trató la línea 721.221 y sus trasfectantes estables con PMA/Io y se determinó la producción de IFN- mediante citometría intracelular con anticuerpos específicos anti-IFN--PE. Como control positivo de la producción de la citoquina se trató de igual forma la línea NK-92. Para comprobar la activación celular tras el tratamiento con PMA/Io se marcaron las células extracelularmente con anticuerpos específicos anti-CD69-PE. Como muestra la figura 24, se detectaron niveles de IFN- basales en células NK-92 que incrementaron tras el tratamiento con PMA/Io. Sin embargo no se detectó expresión de la citoquina en la línea 721.221 ni siquiera tras el tratamiento con PMA/Io (que sí indujo un aumento de expresión de CD69 en superficie).

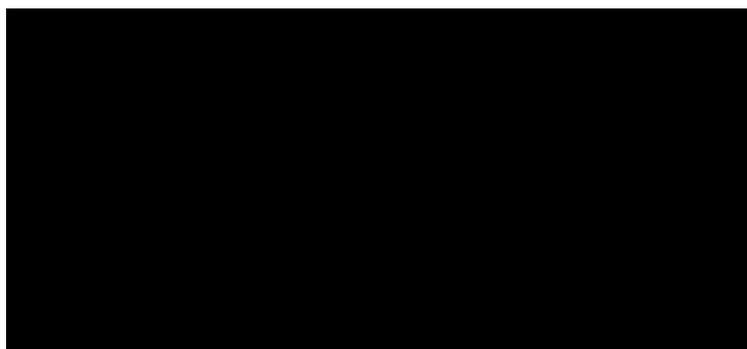


Figura 24. Expresión de CD69 y producción de IFN-tras la activación con PMA/Io en las líneas NK-92 y 721.221. Inmunofluorescencia extracelular con anticuerpos específicos anti-CD69-PE (gráficos izquierda) e intracelular con anticuerpos específicos anti-IFN--PE (gráficos derecha) y análisis mediante citometría de flujo en las líneas NK-92 (gráficos superiores) y 721.221 (gráficos inferiores) tratadas (histograma blanco, línea continua) o no (histograma blanco, línea discontinua) con PMA (10 ng/ml) e Io (500 ng/ml) durante 3 horas a 37°C. Los histogramas grises muestran la tinción con el anticuerpo IgG control.

Una vez se había demostrado que las dianas NK eran incapaces de producir IFN γ , se cultivó la línea NK-92 con las líneas 721.221, 221.Cw07, 221.B*2705 y 221.G1m durante 6 horas en presencia de brefeldina A. Transcurrido el periodo de incubación se recogieron las células, se marcaron extracelularmente con anticuerpos específicos anti-CD56-FITC, se fijaron y permeabilizaron y se tiñeron intracelularmente con anticuerpos específicos anti-IFN γ -PE.

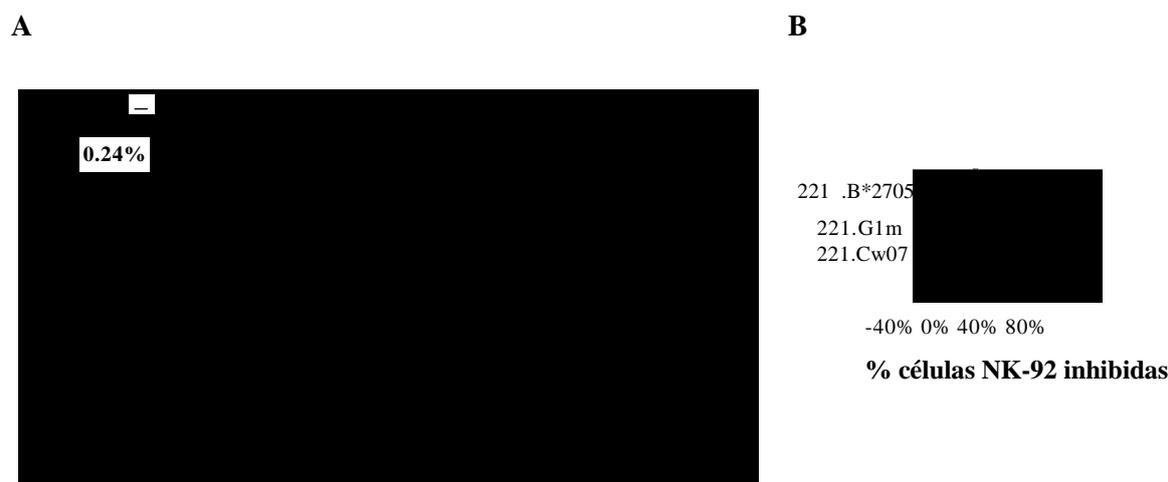


Figura 25. Inhibición de la producción de IFN- γ a través de ILT2/CD85j en la línea NK-92. Inmunofluorescencia en la línea NK-92 cocultivada con las dianas 721.221, 221.Cw07, 221.B*2705 y 221.G1m en una proporción de 2:1 (efectora:diana) con anticuerpos específicos anti-CD56-FITC y anti-IFN γ -PE y análisis mediante citometría de flujo. Como control positivo y negativo se incubó la línea efectora con o sin PMA/Io respectivamente. La producción de IFN γ se determinó en las células CD56 $^{+}$. (A) Experimento representativo (panel izquierdo) y media y error estándar de los porcentajes de células CD56 $^{+}$ IFN γ $^{-}$ de al menos 4 experimentos independientes (gráfico derecha). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test U Mann-Whitney. *, $p < 0.05$; n.s., diferencia no significativa. (B) Porcentaje de células NK-92 inhibidas tras los cultivos con los transfectantes relativo a la estimulación de la producción de IFN γ tras el cultivo con la línea parental. Las barras muestran los valores medios y las desviaciones estándar de al menos 4 experimentos independientes. El porcentaje de inhibición se calculó como $1 - (\% \text{ células NK-92 IFN}^{-} \text{ tras la incubación con los transfectantes} / \% \text{ células NK-92 IFN}^{-} \text{ tras la incubación con la línea parental}) \times 100$.

Como muestra la figura 25A, en ausencia de dianas NK no se detectaban células CD56 $^{+}$ IFN γ $^{-}$. Sin embargo, la presencia tanto de la línea 721.221 como de los transfectantes estimuló, a distintos niveles, la producción de IFN γ por parte de la línea NK-92. Así, cuando los cultivos se realizaron en presencia de ligandos específicos para ILT2/CD85j (HLA-B*2705 y HLA-G1m) disminuyó significativamente el porcentaje de células CD56 $^{+}$ IFN γ $^{-}$ (figura 25A, gráfico derecha). Los porcentajes de células NK-92 inhibidas se calcularon en relación a la estimulación de la producción de IFN γ tras los cocultivos con la línea parental. Como muestra la figura 25B, se observó una inhibición de la producción de IFN γ superior al 50% en la mayor parte de los

experimentos cuando la línea NK-92 se enfrentó a los transfectantes 221 .B*2705 y 221 .G1m. De acuerdo con la ausencia de expresión en la línea NK-92 de iNKRs específicos de HLACw07, no se observó inhibición de la producción de IFN- cuando la línea se enfrentó al transfectante 221 .Cw07.

Una vez se había demostrado el papel regulador de ILT2/CD85j sobre la producción de IFN-en células NK-92 tras el reconocimiento de moléculas HLA-I específicas, se estudió si este iNKR podía modular la producción de otras citoquinas, en concreto TNF-, en este mismo sistema. De nuevo, antes de realizar los cocultivos se comprobó si las dianas producían TNF-y se encontró que éstas producían la citoquina de forma basal (datos no mostrados). El análisis mediante citometría de flujo intracelular de los cocultivos de la línea NK-92 con las dianas reveló, en todos los casos, una menor producción de TNF- que de IFN- por parte de las células CD56⁺ (NK-92). Sin embargo se observó que, al igual que ocurría con la producción de IFN-, la presencia de dianas NK estimuló la producción de TNF- en la línea efectora y la presencia de ligandos específicos de ILT2/CD85j disminuyó los niveles de producción de esta citoquina (figura 26).

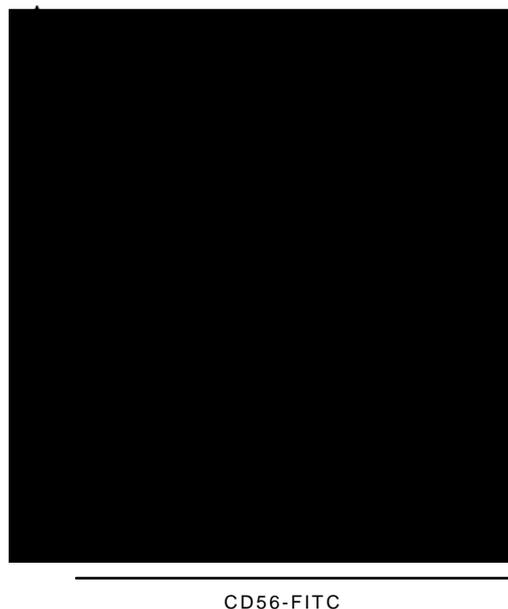


Figura 26. Inhibición de la producción de TNF- a través de ILT2/CD85j en la línea NK-92. Inmunofluorescencia en la línea NK-92 cultivada con las dianas 721.221, 221 .Cw07, 221 .B*2705 y 221.G1m en una proporción de 2:1 (efectora:diana) con anticuerpos específicos anti-CD56-FITC y anti-TNF--PE y análisis mediante citometría de flujo. Como control positivo y negativo se incubó la línea efectora con o sin PMA/Io respectivamente. La producción de TNF- se determinó en las células CD56⁺. La figura muestra un experimento representativo.

Para determinar si las diferencias en cuanto a la cantidad de citoquina detectada mediante citometría intracelular eran o no relevantes en relación a la cantidad de proteína secretada, se realizaron cultivos en las mismas condiciones descritas anteriormente en ausencia de brefeldina A y se cuantificó la cantidad de IFN- liberado al medio tras 20 horas de estimulación. Como muestra la figura 27, se observó un aumento en los niveles de IFN- secretado al medio cuando los cultivos se realizaron en presencia de dianas. Sin embargo, estos niveles fueron menores cuando la línea efectora se enfrentó a los transfectantes 221.B*2705 y 221.G1m que expresan moléculas HLA-I específicas de ILT2/CD85j. La cantidad de citoquina cuantificada en los sobrenadantes de cultivo se atribuyó únicamente a la citoquina secretada por la línea efectora, ya que como se había demostrado anteriormente las dianas NK no producían IFN- ni siquiera tras la estimulación con PMA/Io. La producción basal de TNF- por parte de las dianas imposibilitó cuantificar los niveles de secreción de esta citoquina por parte de la línea efectora.

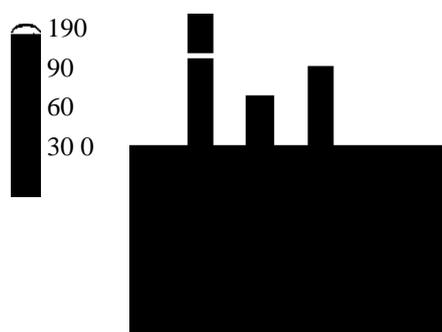


Figura 27. Inhibición de la cantidad de IFN-liberado al medio en la línea NK-92. Células NK-92 se cultivaron en presencia de las dianas 721.221, 221 .Cw07, 221 .B*2705 y 221 .G1m en una proporción de 2:1 (efectora:diana) durante 20 horas. Tras el periodo de estimulación se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la cantidad de IFN- liberado al medio mediante citometría de flujo (CBA). El gráfico muestra los nanogramos por mililitro de IFN- por cada 10⁵ células NK-92. Como control positivo y negativo se trató o no la línea NK-92 con PMA/Io respectivamente. Las barras representan la media de triplicados de un experimento representativo.

Con el fin de confirmar el papel inhibitorio de ILT2/CD85j sobre la producción de IFN- en células NK-92, se realizaron cocultivos como se ha descrito para la figura 25A en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-ILT2 o anti-HLA-I. Como muestra la figura 28A, se observó un aumento del porcentaje de células CD56⁺IFN-⁺ tras los cocultivos con las dianas. Sin embargo, este porcentaje fue bastante menor en presencia del ligando específico de ILT2/CD85j HLA-B*2705 e incrementó en presencia de anticuerpos bloqueantes tanto anti-HLA-I como anti-ILT2. En presencia de anticuerpos irrelevantes se observó una inhibición del 80% de la producción de IFN- por parte del ligando HLA-B*2705 y esta inhibición fue sólo

del 18% y del 45% en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-HLA-I o anti-ILT2 respectivamente (figura 28, panel derecha).

Estos datos en conjunto sugerían que ILT2/CD85j podría modular la producción de IFN- en la línea NK-92 tras el reconocimiento de sus moléculas HLA-I específicas.

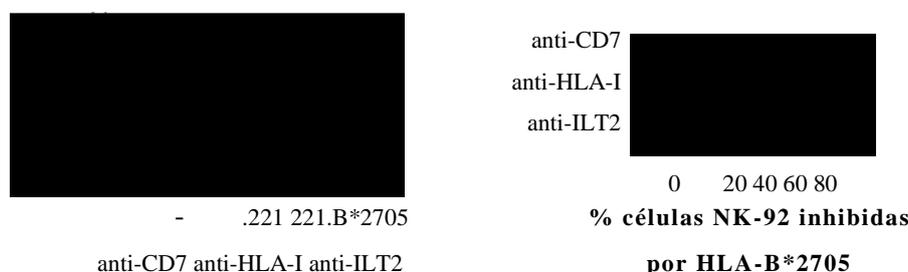


Figura 28. La inhibición de la producción de IFN- se revierte en presencia de anticuerpos bloqueantes específicos anti-ILT2 y anti-HLA-I. Las células NK-92 se cultivaron con las líneas 721.221 y 221 .B*2705 en una proporción de 2:1 (efectora:diana) en presencia de anticuerpos bloqueantes específicos anti-ILT2 y anti-HLA-I o anticuerpos control (CD7). Tras 6 horas se trataron las células como se describe en la figura 25 y se determinó el porcentaje de células CD56⁺IFN-⁺ (gráfico izquierda) y de células NK-92 inhibidas por HLA-B*2705 (gráfico derecha) en presencia de anticuerpos bloqueantes relativo a la estimulación por la línea parental 721.221. Las barras representan los valores medios de triplicados de un experimento representativo. El porcentaje de inhibición se calculó como $1 - (\% \text{ células NK-92 IFN-}^+ \text{ tras la incubación con el transfectante } 221.B^*2705 / \% \text{ células NK-92 IFN-}^+ \text{ tras la incubación con la línea parental}) \times 100$.

4.1.3. Inhibición de la expresión del mRNA de IFN- en la línea NK-92

Existen estudios que demuestran que no siempre expresión y síntesis de proteínas están relacionadas (Anegón et al., 1988; Kalina et al., 2000). Para determinar si la modulación de la producción de IFN- se debía a la inhibición de la expresión del mRNA de la citoquina se realizaron cocultivos de la línea efectora con las dianas y se midieron los niveles de expresión génica de IFN-. Aunque se había demostrado que las dianas no producían IFN-, se cuantificó la expresión génica de esta citoquina en la línea 721.221 tratada o no con PMA/Io y se observó que la cantidad de mRNA era insignificante en relación a la de la línea NK-92 (datos no mostrados). Tras enfrentar durante 3 horas la línea NK-92 a las dianas NK, se aisló el RNA total, se midieron los niveles de expresión génica de IFN- por RT-PCR cuantitativa y se normalizaron de acuerdo a los niveles de expresión génica del receptor CD94 (sólo expresado en las células NK-92). Previamente, para comprobar que se podía normalizar la expresión génica de IFN- a partir de la expresión de CD94, se realizaron estudios en los que se demostró

que los niveles de CD94 permanecían constantes tras tratar la línea efectora durante 3 horas con PMA/Io (datos no mostrados).

Tras cultivar la línea NK-92 con las dianas se observó un incremento en los niveles de expresión de IFN- (figura 29, gráfico izquierda) que se inhibió en presencia de los ligandos específicos de ILT2/CD85j HLA-B*2705 y HLA-G1 (figura 29, gráfico derecha). De nuevo, la expresión de HLA-Cw07 en el transfectante 221 .Cw07 no afectó a la expresión de IFN- en la línea NK-92.

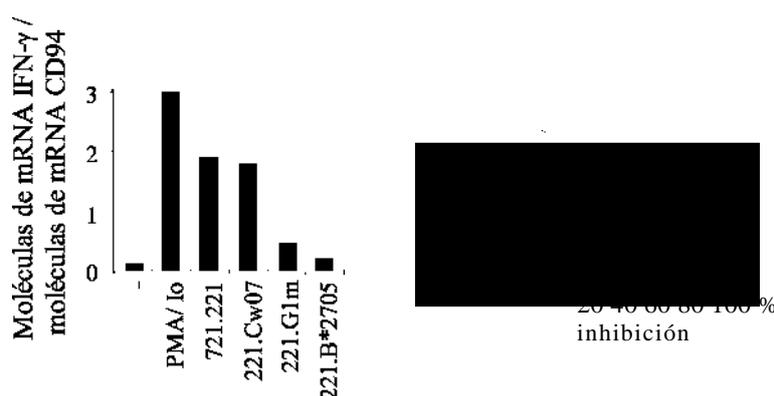


Figura 29. La inducción de la expresión de IFN-en la línea NK-92 se inhibe en presencia de ligandos específicos de ILT2/CD85j en las dianas. Células NK-92 se cultivaron con las líneas 721.221, 221.B*2705, 221.G1m y 221.Cw07 en una proporción de 2:1 (efectora:diana). Tras 3 horas se aisló el RNA total y se cuantificaron los niveles de expresión de IFN- mediante RT-PCR cuantitativa. Como control positivo y negativo se trató la línea NK-92 con o sin PMA/Io respectivamente. La figura muestra el cociente entre las moléculas de mRNA de IFN- y de CD94 (gráfico izquierda) y el porcentaje de inhibición de la expresión del mRNA de IFN- en la línea NK-92 tras los cultivos con los transfectantes relativo a la expresión inducida por la diana 721.221 (gráfico derecha) de un experimento representativo de 3 que se realizaron con resultados similares. El porcentaje de inhibición se calculó como $1 - (\text{mRNA relativo de IFN- tras la incubación de la línea NK-92 con los transfectantes} / \text{mRNA relativo de IFN- tras la incubación de la línea NK-92 con la parental}) \times 100$.

4.1.4. Modulación de la síntesis de IFN-en NKs y LT

Todos los resultados parecían indicar que las células NK eran capaces de regular la producción de IFN- a través de ILT2/CD85j tras el encuentro con ligandos específicos. Sin embargo, estos experimentos se habían realizado en una línea celular (NK-92) que para su crecimiento y funcionalidad requiere de elevadas concentraciones de IL-2. Una de las características principales de las células NK es su capacidad de intervenir rápidamente en respuestas inmunes, por lo que parecía importante determinar si ILT2/CD85j podía modular la producción de IFN- en células NK de sangre periférica. Se ha descrito que las células NK recién aisladas tienen baja

actividad citotóxica frente a la diana 721.221 (Anfossi et al., 2006; Draghi et al., 2005) y que la expresión de ILT2/CD85j en estas células, al igual que en LT, es muy variable entre individuos (Vitale et al., 1999; Young et al., 2001 y datos de nuestro grupo no publicados). Así, se aislaron PBMCs de donantes seleccionados de acuerdo a su elevada expresión de ILT2/CD85j en la subpoblación de células CD3CD56⁺ (NKs) y se mantuvieron de 1 a 3 días en presencia de IL-2 (50 U/ml) para estimular la producción de citoquinas frente a la línea 721.221. Posteriormente, se cocultivaron durante 6 horas con la diana 721.221 o sus distintos transfectantes en presencia de brefeldina A y se determinó el porcentaje de células IFN-⁺ mediante citometría de flujo intracelular.

Como muestra la figura 30, la presencia de dianas NK estimuló la producción de IFN- en PBLs y de nuevo la expresión de HLA-B*2705 y HLA-G1 en las dianas inhibió parte de la síntesis de IFN-. A diferencia de lo observado en la línea NK-92, la expresión de HLA-Cw07 en el transfectante 221 .Cw07 disminuyó el porcentaje de PBLs IFN-⁺ respecto del observado tras la estimulación con la línea parental, aunque esta inhibición siempre fue menor a la observada con células 221 .B*2705 y 221 .G1m. La figura 30 muestra un experimento representativo en el que los niveles de inducción de IFN- se correspondieron con los porcentajes de células positivas para los diferentes NKR. El 24% de los PBLs del donante seleccionado eran ILT2/CD85j⁺, un 8% KIR2DL2/3⁺ (iNKRs que reconocen HLA-Cw07) y sólo un 2% KIR3DL1⁺ (iNKR que reconoce HLA-B*2705).

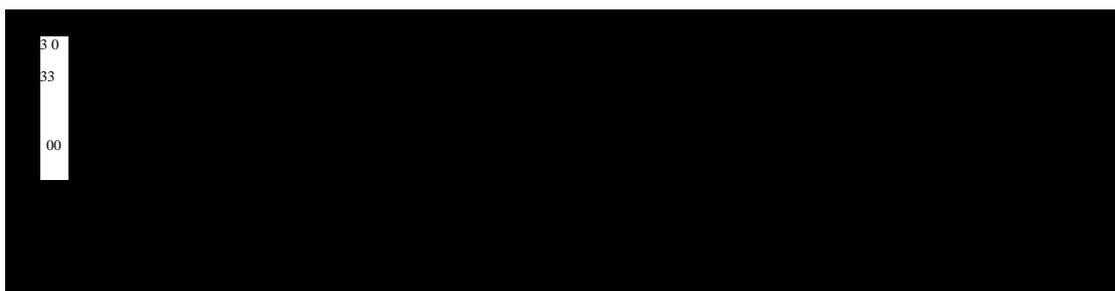


Figura 30. Los iNKRs modulan la producción de IFN-. PBMCs de donantes sanos se estimularon durante 1-3 días con IL-2 (25-50 U/ml) y se cultivaron solos o con las líneas 721.221, 221.B*2705, 221 .G1m y 221 .Cw07 en una proporción de 1:1 (efectora:diana) en presencia de brefeldina A. Tras 6 horas de cocultivo se recogieron las células y se realizó una inmunofluorescencia extracelular e intracelular con anticuerpos específicos anti-CD3-PerCP, anti-CD56-FITC o anti-ILT2-FITC y anti-IFN--PE y posterior análisis mediante citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones. La figura muestra los porcentajes de PBLs (seleccionados de acuerdo al tamaño y la complejidad) IFN-⁺, CD3CD56⁺IFN-⁺ y CD3ILT2⁺IFN-⁺ tras los cultivos en las diferentes condiciones descritas en un experimento representativo.

A continuación se determinó que en la subpoblación de PBLs CD3, sólo aquellas que expresaban el receptor CD56 eran capaces de estimularse en presencia de las dianas (datos no mostrados). El análisis de esta subpoblación (en la que el 40% eran células ILT2/CD85j⁺, el 25% KIR2DL2/L3/S2⁺ y el 10% KIR3DL1⁺) reveló que sólo el 15% se estimulaban para producir IFN- tras enfrentarse a células 721.221 (figura 30, gráfico centro) y que aproximadamente el 76% y el 50% de esta producción se inhibía tras el reconocimiento de HLA-B*2705 y HLA-G1 respectivamente. De acuerdo con el menor porcentaje de células CD3CD56⁺KIR2DL2/3⁺, sólo se observó un 20% de inhibición de la síntesis de IFN- en los cocultivos con la diana 221 .Cw07 respecto de la inducida por la línea parental. La diferencia que se observó en los niveles de inhibición tras el reconocimiento de HLA-B*2705 (76%) y HLA-G1 (50%) se podría atribuir a la inhibición adicional generada por el 10% de células CD3CD56⁺KIR3DL1⁺.

Finalmente se analizaron los porcentajes de PBLs IFN-⁺ en la subpoblación CD3ILT2/CD85j⁺. Aunque los linfocitos B son células CD3ILT2/CD85j⁺ el análisis de la producción de IFN- en células CD3CD56 tras la estimulación con dianas NK, o incluso con PMA/Io, reveló que esta subpoblación era incapaz de producir la citoquina (datos no mostrados). La expresión de CD56 en la subpoblación de células CD3 ILT2/CD85j⁺ reveló que el 60% eran NKs, sin embargo sólo el 12% se estimularon para producir IFN- tras el encuentro con la diana 721.221 (figura 30, gráfico derecha). El análisis de las células CD3ILT2/CD85j⁺ reveló que sólo un 5% expresaba el iNKR KIR3DL1, consistente con el hecho de que los porcentajes de inhibición determinados tras los cocultivos con los transfectantes 221.B*2705 y 221 .G1m fueran más similares (72% y 67% respectivamente) que los observados en la subpoblación CD3CD56⁺.

Ya que una proporción variable de las células NK ILT2/CD85j⁺ eran KIR3DL1⁺, se realizó el mismo tipo de ensayos para determinar, mediante citometría de flujo con cuatro colores, la posible contribución que KIR3DL1 pudiera tener sobre la inhibición observada en los cocultivos con el transfectante 221 .B*2705. La figura 3 1A muestra los porcentajes de células CD3ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 IFN-⁺ de un donante representativo en las distintas condiciones. La figura 3 1B recoge los datos del porcentaje de células CD3ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 inhibidas en diferentes experimentos con PBMCs de varios donantes sanos. En la mayor parte de los casos se observó un mayor porcentaje de inhibición cuando las PBMCs se cultivaron con el transfectante 221 .B*2705 que con la diana 221 .G1m. En algunos casos se observó inhibición tras la estimulación con células 221.Cw07; el estudio de la expresión de KIR2DL2/3 demostró que, en estos casos, la inhibición frente a la diana 221 .Cw07 concordaba con la expresión de el/los receptores KIR2DL2 y/o KIR2DL3 (datos no mostrados).

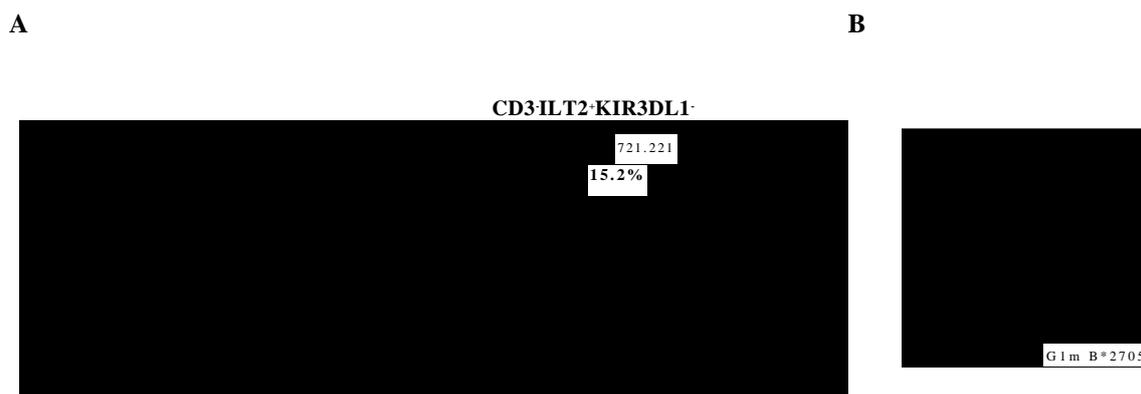


Figura 31. ILT2/CD85j inhibe la producción de IFN-en NKs. PBMCs de donantes sanos estimulados durante 3 días con IL-2 (25-50U/ml) se enfrentaron en una proporción de 1:1 (efectora:diana) a las líneas 721.221, 221.B*2705, 221.G1m y 221.Cw07 en presencia de brefeldina A. Tras 6 horas se recogieron las células y se procedió al marcaje extracelular con anticuerpos específicos anti-KIR3DL1, anti-CD85j-FITC y anti-CD3-PerCP e intracelular con anticuerpos específicos anti-IFN--PE. Como control positivo y negativo se cultivaron las PBMCs en presencia o ausencia de PMA/Io respectivamente. **(A)** Porcentajes de células CD3ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 IFN⁻ tras las distintas condiciones de cultivo en un experimento representativo. **(B)** Porcentajes de células CD3ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 inhibidas tras el encuentro con los distintos ligandos en n=7 (HLA-B*2705), n=4 (HLA-G1) y n=4 (HLA-Cw07) experimentos independientes. Los porcentajes de inhibición se calcularon como 1 - (% células CD3ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 IFN⁻ tras la estimulación con los transfectantes / % células CD3ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 IFN⁻ tras la estimulación con la línea 721.221) x 100.

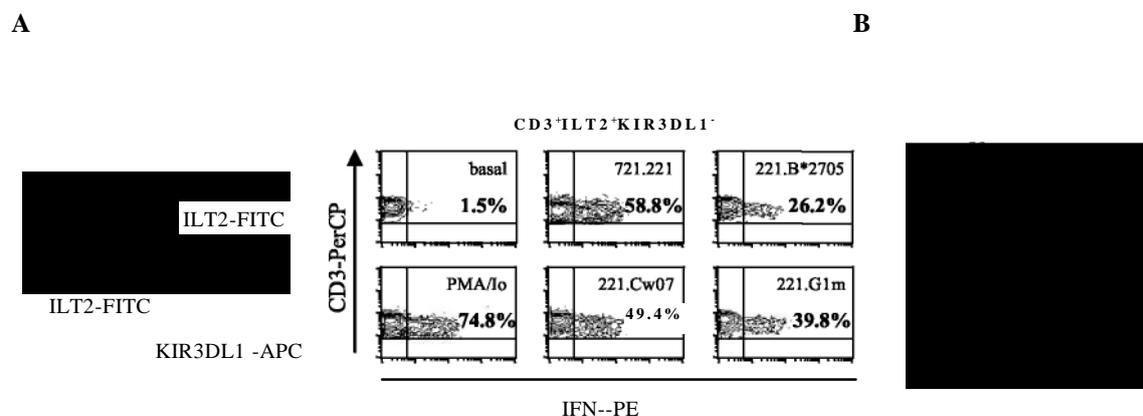


Figura 32. ILT2/CD85j inhibe la producción de IFN-en LT. PBMCs de donantes sanos estimulados durante 3 días con IL-2 (25-50 U/ml) se cultivaron con las dianas 721.221, 221.B*2705, 221.G1m y 221.Cw07 preincubadas durante 30 minutos con SEB (10 ng/ml) en una proporción de 1:1 (efectora:diana) en presencia de brefeldina A. Tras 6 horas se recogieron las células y se procedió al marcaje extracelular con anticuerpos específicos anti-KIR3DL1, anti-CD85j-FITC y anti-CD3-PerCP e intracelular con anticuerpos específicos anti-IFN--PE. Como control positivo y negativo se cultivaron las PBMCs en presencia o ausencia de PMA/Io respectivamente. **(A)** Porcentajes de células CD3⁺ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 IFN⁻ en las diferentes condiciones de cultivo en un experimento representativo. **(B)** Porcentajes de células CD3⁺ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 inhibidas tras el encuentro con los distintos ligandos en n=8 (HLA-B*2705), n=6 (HLA-G1) y n=6 (HLA-Cw07) experimentos independientes. Los porcentajes de inhibición se calcularon como 1 - (% células CD3⁺ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 IFN⁻ tras la estimulación con los transfectantes / % células CD3⁺ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 IFN⁻ tras la estimulación con la línea 721.221) x 100.

Varios estudios se han centrado en analizar el papel regulador de ILT2/CD85j sobre la producción de IFN- en células T (CD3⁺) (Ince et al., 2004; Merlo et al., 2001; Saverino et al., 2002), sin embargo la contribución que sobre esta regulación tienen las moléculas HLA-I aún no ha sido elucidada. Con este propósito, se aislaron PBMCs de donantes seleccionados de acuerdo con la elevada expresión de ILT2/CD85j en LT y se determinó la producción de IFN-

en células CD3⁺ILT2/CD85j⁺. Para la estimulación de la producción de IFN- en LT se preincubaron las dianas NK con SEB y se usaron como células presentadoras (D'Andrea et al., 1996). La figura 32 muestra el elevado porcentaje de células CD3⁺ que se inhibieron en todos los experimentos realizados tras el reconocimiento de HLA-B*2705. Sin embargo, a diferencia de lo observado en NKs, no siempre se inhibieron los LT cuando los cultivos se realizaron en presencia de HLA-G1, sino que en la mitad de los casos se estimularon y se incrementó la producción de IFN- (figura 32, panel B).

Todos estos datos apoyaban el hecho de que ILT2/CD85j podría ejercer un papel sobre la regulación de la producción de IFN- en NKs. No obstante, este nivel de regulación parecía ser distinto dependiendo del tipo celular (célula NK o LT).

4.2. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- Y LA CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS NK INDUCIDA POR PRODUCTOS VIRALES

Recientemente se ha publicado que las células NK no sólo participan en la respuesta contra infecciones virales de forma indirecta lisando células infectadas, sino que también pueden reconocer productos virales de forma directa a través de TLRs, los. Así, las NKs pueden detectar RNA de doble cadena mediante el receptor TLR3 expresado en su membrana (Schmidt et al., 2004; Sivori et al., 2004), y se ha demostrado que dosis subóptimas de IL-12 sinergizan con el análogo de RNA de doble cadena, poly (I:C), para inducir la secreción de IFN- en células NK (Pisegna et al., 2004; Sivori et al., 2004).

4.2.1. Regulación de la síntesis de IFN-

Se determinó si ILT2/CD85j podía modular la producción de IFN- estimulada en NKs por ligandos de TLR3 a partir cultivos de células NK-92 tratadas o no con poly (I:C) e IL-12 en placas recubiertas con anticuerpos específicos anti-ILT2 inmovilizados. Como muestra la figura 33, ILT2/CD85j no fue capaz de disminuir la producción de IFN- estimulada por poly (I:C) e IL-12 a pesar de expresarse con una intensidad muy elevada en la línea NK-92.

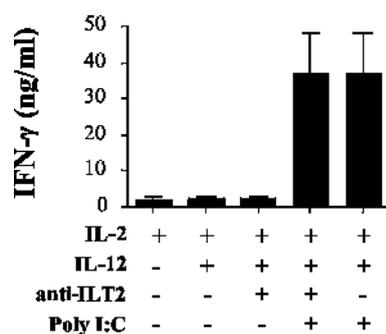


Figura 33. ILT2/CD85j no inhibe la producción de IFN-inducida tras la estimulación con dosis subóptimas de IL-12 y poly (I:C) en la línea NK-92. Se cultivó la línea NK-92 en placas de 96 pocillos con fondo plano recubiertas o no con anticuerpos anti-ILT2 en presencia o ausencia de IL-12 (1 U/ml) y

de poly (I:C) (100 g/ml). Tras 20 horas de estimulación, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la cantidad de IFN- liberado al medio (CBA). El gráfico muestra los nanogramos por mililitro de IFN- por cada 10^5 células NK-92. Las barras representan la media y el error estándar de triplicados de tres experimentos independientes.

Para determinar si ILT2/CD85j era capaz de regular la producción de IFN- inducida por poly (I:C) en NKs de sangre periférica, se repitieron los mismos experimentos usando NKs aisladas de donantes seleccionados en los que al menos el 25% de las células NK eran ILT2/CD85j⁺. Para inducir la producción de IFN- se estimularon las células NK durante 1 h con IL-2 (100 U/ml). Como muestra la figura 34, la cantidad de IFN- liberado al medio tras la estimulación con IL-12 y poly (I:C) fue muy variable entre individuos. Sin embargo, la coestimulación del receptor ILT2/CD85j disminuyó la producción de la citoquina en 5 de 6 experimentos realizados (media de la inhibición \pm desviación estándar, $41.9\pm 17.5\%$). Es interesante mencionar que en algunos casos se observó un incremento en la producción de IFN- tras la estimulación con dosis subóptimas de IL- 12 e IL-2 que se inhibió tras la activación con anticuerpos específicos anti-ILT2.

A continuación se quiso determinar si otros iNKR, en concreto CD94/NKG2A y KIR3DL1, podían modular la producción de IFN- inducida por ligandos de TLR3 en NKs. Así, se realizó el mismo tipo de experimentos con NKs purificadas de donantes seleccionados de acuerdo a la elevada expresión de dichos iNKR en células NK. Como muestra la figura 35, ambos receptores fueron capaces de regular la producción de IFN- estimulada por IL-12 y poly (I:C) ya que la estimulación mediante anticuerpos específicos anti-NKG2A y anti-KIR3DL1 disminuyó en todos los casos la producción de la citoquina (media de la inhibición \pm desviación estándar de CD94/NKG2A $44.3\pm 10.7\%$ y de KIR3DL1 $52\pm 29.4\%$).

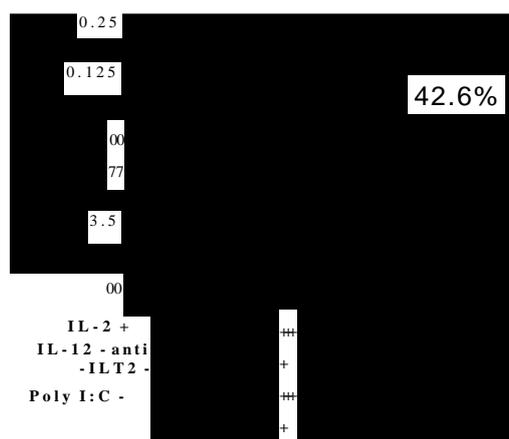


Figura 34. ILT2/CD85j modula la producción de IFN-inducida tras la estimulación con dosis subóptimas de IL-12 y poly (I:C) en NKs de sangre periférica. NKs tratadas durante 18h con IL-2 (100 U/ml) se estimularon con anticuerpos anti-ILT2 inmobilizados como se describe en materiales y métodos en presencia o ausencia de IL-12 (1 U/ml) y poly (I:C) (100 g/ml). Tras 20 horas de estimulación, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la cantidad de IFN- liberado al medio de cultivo mediante citometría de flujo (CBA). Los gráficos muestran los nanogramos por mililitro de IFN- por cada 10⁵ NKs. Las barras representan los valores medios de triplicados en dos experimentos representativos. Los histogramas muestran la expresión de ILT2/CD85j en las NKs usadas en los respectivos experimentos.

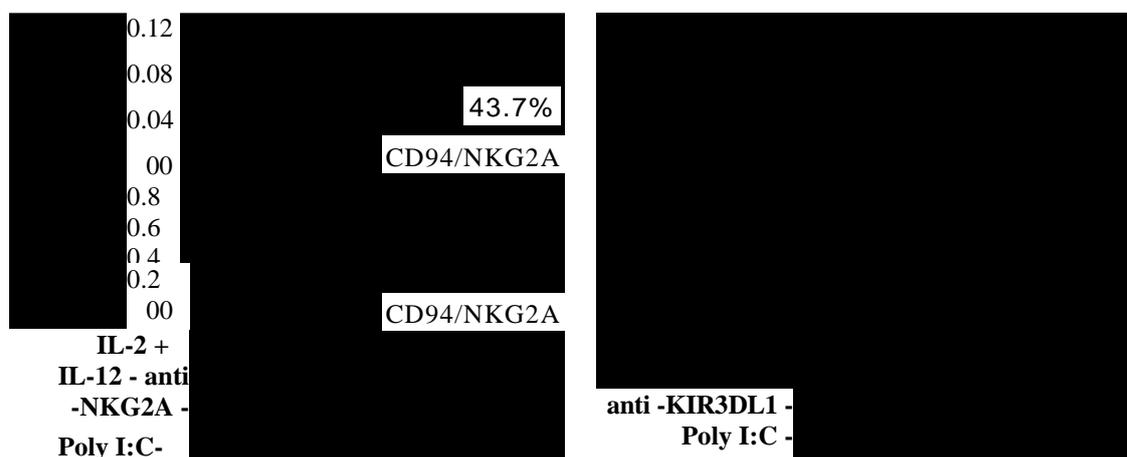


Figura 35. CD94/NKG2A y KIR3DL1 modulan la producción de IFN-inducida tras la estimulación con dosis subóptimas de IL-12 y poly (I:C) en NKs de sangre periférica. NKs tratadas durante 18h con IL-2 (100 U/ml) se estimularon con anticuerpos anti-NKG2A o anti-KIR3DL1 inmobilizados como se describe en materiales y métodos y se trataron como se describe en la figura 34. Los gráficos muestran los nanogramos por mililitro de IFN- por cada 10⁵ NKs. Las barras representan los valores medios de triplicados en dos experimentos representativos para cada iNKR. Los histogramas muestran la expresión de CD94/NKG2A o KIR3DL1 en las células NK usadas en los respectivos experimentos.

4.2.2. Regulación de la citotoxicidad

Se ha demostrado que la estimulación por ligandos de TLR3 aumenta la actividad citotóxica de células NK (Pisegna et al., 2004) por lo que nos propusimos estudiar si los iNKR's podían modular esta activación. A diferencia de lo que ocurría con la producción de IFN-, cuando se estimularon células NK de sangre periférica con poly (I:C) no siempre se observó un incremento en la actividad citotóxica frente a la diana 721.221 (datos no mostrados). Al analizar los ensayos en los que el tratamiento con poly (I:C) incrementó la citotoxicidad de las células NK se observó que la adición de anticuerpos bloqueantes anti-ILT2, como ha sido descrito anteriormente, no afectó a la lisis de las dianas 721.221 y 221 .AEH y sí incrementó los niveles de actividad citotóxica de las NKs tratadas o no con poly (I:C) frente al transfectante 221 .B*2705 (figura 36, panel izquierda). Así mismo, la adición de anticuerpos bloqueantes anti-CD94/NKG2A incrementó la citotoxicidad de las células NK tratadas o no con poly (I:C) frente al transfectante 221 .AEH (figura 36, panel derecha).

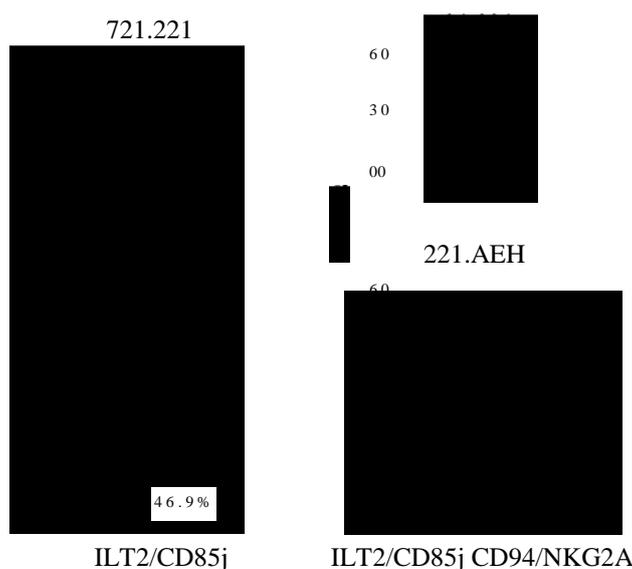


Figura 36. Los iNKR's modulan la citotoxicidad inducida en NKs tras la estimulación con poly (I:C). La citotoxicidad mediada por NKs de sangre periférica estimuladas durante 24 h con IL-2 (100 U/ml) en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de poly (I:C) (100 g/ml) se midió en un ensayo de liberación de ^{51}Cr frente a las dianas 721.221, 221 .B*2705 y 221 .AEH en ausencia () o presencia de anticuerpos específicos bloqueantes anti-ILT2 () o anti-NKG2A (). Los ensayos se realizaron por triplicado en distintas proporciones efectora:diana. La figura muestra dos experimentos representativos y la expresión de ILT2/CD85j y CD94/NKG2A en las células NK usadas en cada ensayo.

Estos datos sugerían que tanto ILT2/CD85j como otros iNKR's podían regular las señales activadoras transmitidas por TLRs en células NK.

4.3. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- Y DE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA TRAS EL ENCUENTRO DE NKs CON iDCs

La interacción entre una NK y una iDC es un proceso bidireccional y complejo que puede resultar no sólo en la activación de células NK, sino también en la maduración o lisis de las iDCs (Nishioka et al., 2001; Piccioli et al., 2002; Vitale et al., 2005). Existen trabajos que involucran al receptor de citotoxicidad natural NKp30 expresado en células NK como un elemento clave en todos estos procesos (Ferlazzo et al., 2002; Vitale et al., 2005) y recientemente se ha descrito que la principal población NK responsable de promover la lisis de iDCs es aquella que expresa CD94/NKG2A y que es negativa para los iNKRs de la familia de los KIRs (Della Chiesa et al., 2003). Las iDCs, a diferencia de las DCs maduras (mDCs), expresan con muy baja intensidad HLA-E (Della Chiesa et al., 2003). Esta baja expresión es precisamente lo que capacita a las NKs CD94/NKG2A⁺KIR a lisar iDCs, ya que la señal inhibidora transmitida a través de CD94/NKG2A es insuficiente para bloquear la activación mediada por NKp30.

Hasta el momento no existen datos acerca de si ILT2/CD85j se expresa en la subpoblación NK que lisa iDCs. Si fuera así, posiblemente este iNKR podría ejercer un papel regulador sobre la lisis de las iDCs a través del reconocimiento de moléculas HLA-I que sí se expresan con alta intensidad en estas células.

4.3.1. Modulación a través de ILT2/CD85j de la producción de IFN-y la citotoxicidad inducidas por NKp30

4.3.1.a. En líneas celulares NK

Tras el encuentro de NKs con iDCs se secretan citoquinas, como IFN- y TNF-, que conducirán a la maduración o a la lisis de las iDCs, procesos en los que NKp30 está muy implicado (Ferlazzo et al., 2002; Vitale et al., 2005). Recientemente se ha descrito que los iNKRs pueden tener un papel modulador sobre la lisis de iDCs (Della Chiesa et al., 2003; Ferlazzo et al., 2002). Sin embargo, no existen datos acerca de la implicación de ILT2/CD85j. Se ha descrito que NKp30 se asocia a la molécula adaptadora CD3 para transmitir las señales activadoras y que el reconocimiento de moléculas HLA-I específicas por parte de ILT2/CD85j puede modular la citotoxicidad mediada por la activación del receptor CD 16 (Colonna et al., 1997). Este receptor también se asocia a CD3, por lo que ILT2/CD85j podría modular también la activación de NKp30 de igual forma que lo hace para CD 16. Para comprobarlo, se realizaron ensayos de lisis redirigida frente a la línea P815 preincubada con anticuerpos específicos anti-

NKp30 y anti-CD 16 en combinación o no con anticuerpos específicos anti-ILT2. Debido a que la línea NK-92 no expresa el receptor CD16, se incluyó en los estudios a la línea NK3.3 (CD 16⁺ILT2/CD85j⁺) y se comparó la posible regulación de la activación de NKp30 a través de ILT2/CD85j con la descrita para CD 16. Como muestra la figura 37A, la citotoxicidad de la línea NK3.3 mediada por activación de CD 16 se inhibió en presencia de anticuerpos específicos anti-ILT2. Además, aunque en la línea NK3.3 la activación de NKp30 indujo una menor actividad citotóxica que la del receptor CD 16, tanto en células NK-92 como en células NK3.3 se observó una disminución de los niveles de citotoxicidad cuando se estimuló simultáneamente el receptor ILT2/CD85j.

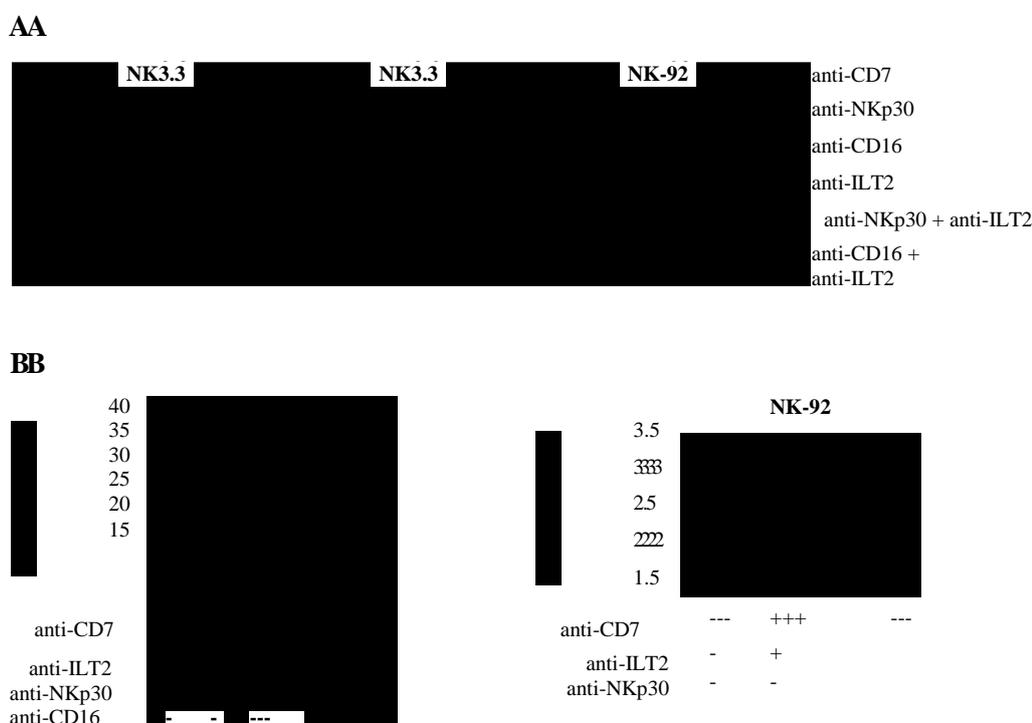


Figura 37. ILT2/CD85j modula la citotoxicidad y la producción de IFN-inducida por NKp30 en células NK3.3 y N-92. (A) Ensayo de lisis redirigida con células NK3.3 (gráficos izquierda) y NK-92 (gráfico derecha). Los ensayos se realizaron por triplicado en diferentes proporciones efectora:diana. Los gráficos muestran los porcentajes de lisis en las distintas condiciones descritas. (B) Las líneas NK3.3 (panel izquierda) y NK-92 (panel derecha) se estimularon durante 20 horas con anticuerpos inmobilizados específicos anti-NKp30, anti-CD16, anti-CD7 y anti-ILT2 como se describe en material y métodos. Tras el periodo de estimulación se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la cantidad de IFN- mediante citometría de flujo (CBA). El gráfico muestra los nanogramos por mililitro de IFN- por cada 10⁵ células NK3.3 o NK-92. Las barras representan los valores medios de triplicados de dos experimentos representativos.

Para determinar si ILT2/CD85j podía modular la producción de IFN- estimulada a través de NKp30, se cultivaron las líneas celulares NK en placas recubiertas con anticuerpos específicos

anti-NKp30 y anti-CD16 en combinación o no con anticuerpos específicos anti-ILT2 y se cuantificó el IFN- liberado a los sobrenadantes tras 20 horas de cultivo. La activación de NKp30 en la línea NK3.3 indujo una mayor liberación de IFN- que la activación de CD16. No obstante, en ambos casos la coestimulación con anticuerpos específicos anti-ILT2 disminuyó los niveles de citoquina secretada por células NK3.3 (figura 37B, gráfico izquierda). La secreción de IFN- inducida por la activación de NKp30 disminuyó tras la coestimulación con anticuerpos anti-ILT2 (media de inhibición±desviación estándar, 73±34%) en tres experimentos realizados de manera independiente con la línea NK-92. La figura 37B (gráfico derecha) muestra un experimento representativo.

4.3.1.b. En células NK de sangre periférica

Para determinar si ILT2/CD85j podía modular la citotoxicidad y la producción de IFN-estimulada por la activación de NKp30 en NKs recién aisladas, se realizó el mismo tipo de ensayos usando como células efectoras NKs purificadas de donantes seleccionados de acuerdo a la elevada expresión de ILT2/CD85j.

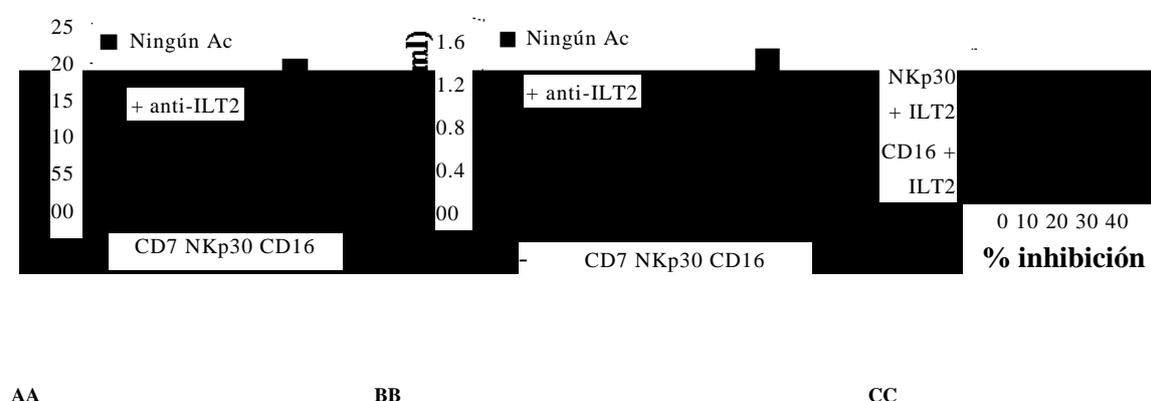


Figura 38. ILT2/CD85j modula la citotoxicidad y la producción de IFN-inducida por NKp30 en NKs de sangre periférica. (A) Ensayo de lisis redirigida con NKs purificadas de donantes seleccionados. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestra un experimento representativo en una proporción de 40:1 (efectora:diana) en el cual el 80% de las células NK expresaban ILT2/CD85j. (B-C) Las NKs purificadas de donantes seleccionados se estimularon durante 20 horas con anticuerpos inmobilizados específicos anti-NKp30, anti-CD16, anti-CD7 y anti-ILT2 como se describe en material y métodos. Transcurrido el periodo de estimulación se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la cantidad de IFN- mediante citometría de flujo (CBA). (B) Nanogramos por mililitro de IFN- por cada 10⁵ células NK. Las barras representan los valores medios de triplicados de un experimento representativo. (C) Porcentajes de inhibición de la producción de IFN- por parte de ILT2/CD85j relativos a la producción mediada por la estimulación de los receptores NKp30 y CD16. Las barras representan los valores medios y las desviaciones estándar de los triplicados de 3 experimentos independientes. Los porcentajes de inhibición se calcularon como 1 - (ng/ml de IFN- tras la activación de NKp30 o CD16 junto con la activación de ILT2/CD85j /

Resultados

ng/ml de IFN- tras la activación de NKp30 o CD16 sólo) x 100. En todos los casos el porcentaje de células NK ILT2/CD85j⁺ en los donantes era superior al 50%.

Como muestra la figura 38, se observaron niveles de inhibición de la citotoxicidad y de la producción de IFN- mediada por NKp30 muy discretos incluso cuando se usaron poblaciones NK con más de un 80% de células ILT2/CD85j⁺. Sin embargo, aunque la inhibición de la producción de IFN- fue discreta (nunca excedió del 30%), fue reproducible y comparable a la observada tras la activación de CD16 (figura 38B, gráfico derecha).

Los datos obtenidos sugerían que ILT2/CD85j podría ejercer un papel sobre la regulación de la citotoxicidad y la producción de IFN- mediada por NKp30 en líneas NK y, aunque débil, de forma consistente en NKs de sangre periférica recién aisladas.

4.3.2. Cooperación de CD94/NKG2A e ILT2/CD85j sobre la regulación de la producción de IFN-y la citotoxicidad en NKs estimuladas por iDCs

Para estudiar la contribución de ILT2/CD85j y CD94/NKG2A sobre la modulación de la producción de IFN- tras el encuentro de NKs con iDCs, se realizaron cocultivos de estas poblaciones en presencia de anticuerpos bloqueantes F(ab')₂ anti-ILT2 y/o anti-CD94/NKG2A. Como células efectoras se usaron la línea NK-92 y NKs purificadas de donantes sanos seleccionados. La presencia de iDCs alogénicas indujo la producción de IFN- por parte tanto de la línea NK-92 como de NKs de sangre periférica (figura 39A). Sin embargo, mientras que en los cultivos con la línea NK-92 sólo el bloqueo de ambos iNKR incrementó de forma sustancial los niveles de IFN- liberado al medio, en los cultivos con NKs purificadas ILT2/CD85j⁺ se observaron dos patrones de comportamiento diferentes; uno idéntico al descrito en la línea NK-92, que apoyaba un papel complementario de ambos receptores en el reconocimiento de iDCs, y otro en el que el bloqueo de CD94/NKG2A fue capaz por sí sólo de incrementar de forma sustancial los niveles de citoquina liberada. No obstante, en ambos casos se observó que el bloqueo simultáneo de ambos iNKR siempre indujo una mayor secreción de IFN- (figura 39). Cuando los cocultivos se realizaron con poblaciones NK con muy baja expresión de ILT2/CD85j se observó que el bloqueo simultáneo de ambos receptores nunca superó la producción de IFN- inducida tras el bloqueo único de CD94/NKG2A (figura 39A, gráficos derecha).

Finalmente, se quiso determinar la posible contribución de ILT2/CD85j sobre la regulación de la lisis de iDCs. Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad con ⁵¹Cr en los que células NK-92 y NK purificadas preincubadas con las combinaciones de anticuerpos F(ab')₂ descritas anteriormente se enfrentaron a iDCs alógenas. Como muestra la figura 40, cuando se bloqueó el receptor ILT2/CD85j se observó un incremento débil de la citotoxicidad de la línea NK-92 y de NKs purificadas ILT2/CD85j⁺ frente a iDCs. Sin embargo, el bloqueo de CD94/NKG2A

incrementó en gran medida la lisis de las iDCs y este incremento no se superó tras el bloqueo simultáneo de ambos iNKRrs.

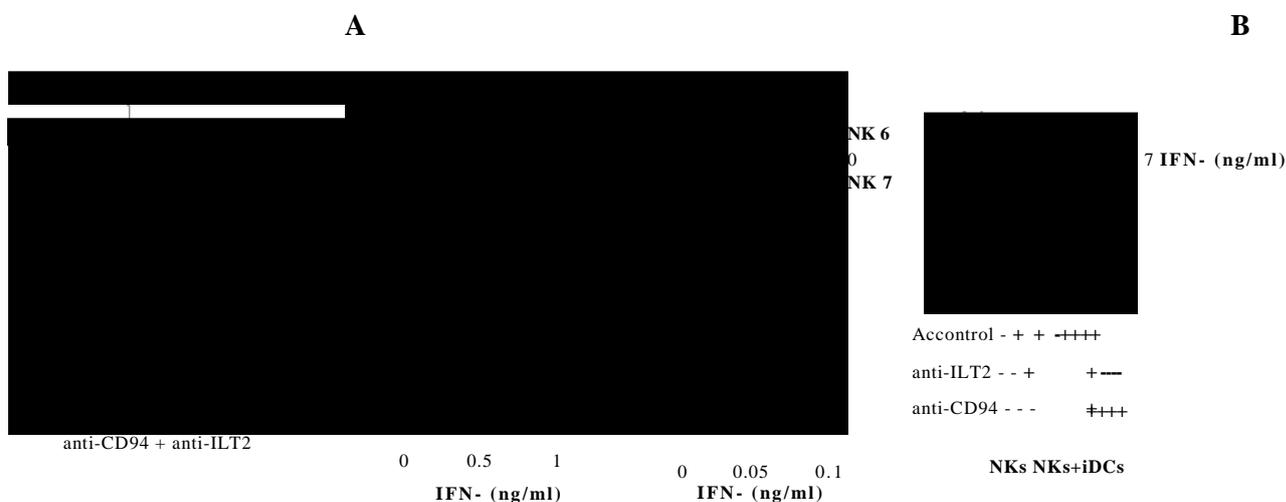


Figura 39. ILT2/CD85j coopera con CD94/NKG2A para modular la producción de IFN-inducida por iDCs alogénicas en NKs. (A) Células NK-92 y NK purificadas activadas durante 18h con IL-2 (100 U/ml) se preincubaron con combinaciones de anticuerpos F(ab')₂ anti-ILT2, anti-CD94/NKG2A y anticuerpos control y se enfrentaron a iDCs alogénicas en una proporción de 2:1 (efectora:diana). Transcurridas 20 horas se midió la concentración de IFN- liberado al medio mediante citometría de flujo (CBA). Los gráficos muestran los nanogramos por mililitro de IFN- por cada 10⁵ células NK-92 o NK purificadas ILT2/CD85j⁺. Las barras representan los valores medios de triplicados de varios experimentos representativos. Al menos el 50% y el 45% de las NKs de los donantes 6 y 7 eran ILT2/CD85j⁺ y CD94/NKG2A⁺ respectivamente, mientras no más del 4% de las NKs de los donantes 8 y 9 eran ILT2/CD85j⁺ y al menos un 25% CD94/NKG2A⁺. (B) NKs de donantes sanos que expresaban al menos un 40% de ILT2/CD85j se trataron de igual forma que en el apartado A. El gráfico muestra los nanogramos de IFN- por mililitro de sobrenadante de cultivo por cada 10⁵ células NK. Las barras representan los valores medios y las desviaciones estándar de 5 experimentos representativos.



Figura 40. CD94/NKG2A modula la lisis de iDCs tras el encuentro con NKs. Ensayos de liberación de ⁵¹Cr en los que células NK-92 y NK purificadas (ILT2/CD85j⁺ o ILT2/CD85j) preincubadas con las combinaciones de anticuerpos F(ab')₂ anti-ILT2, anti-CD94/NKG2A y anticuerpos control se enfrentaron a iDCs alogénicas en diferentes proporciones efectora:diana. En todos los casos las NKs purificadas fueron estimuladas con IL-2 (100 U/ml) durante 6 días. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La figura muestra tres experimentos representativos de 5 que se hicieron con células NK-92, 3 con NKs ILT2/CD85j⁺ y 3 con NKs ILT2/CD85j que mostraron resultados similares.

De acuerdo con lo publicado (Della Chiesa et al., 2003) nuestros resultados indicaban que, aunque ILT2/CD85j podría contribuir en la regulación de la lisis de las iDCs, este proceso parecía ser principalmente controlado mediante el reconocimiento de HLA-E a través de CD94/NKG2A. Las interacciones entre moléculas HLA-I e ILT2/CD85j parecían ser más relevantes en la regulación de la producción de IFN- tras el encuentro de NKs con iDCs

DISCUSIÓN

Los fármacos pueden producir reacciones adversas ligadas a las propiedades farmacológicas del medicamento (efectos colaterales, secundarios y sobredosis) o reacciones impredecibles ligadas a la respuesta que el paciente desarrolla y basadas generalmente en mecanismos de naturaleza inmunológica que pueden ser inmediatas o retardadas. Las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos no inmediatas comprenden una amplia gama de manifestaciones clínicas entre las cuales se incluyen desde la urticaria y los exantemas hasta las reacciones más graves como SJS y TEN. Todas ellas tienen en común la piel como órgano diana. Dentro de este grupo el MPE es la entidad clínica más frecuente y se ha descrito que cada vez presenta mayor incidencia en la población. SJS y TEN se caracterizan por la formación de ampollas y el posterior desprendimiento de la epidermis y aunque son reacciones raras pueden llegar a comprometer la vida de los pacientes.

Los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de estas reacciones son complejos, aunque existen evidencias de que los linfocitos T y las células citotóxicas que expresan NKRs tienen un papel relevante en estas patologías. Así, se ha determinado que el infiltrado ampolloso de pacientes con TEN está formado mayoritariamente por CTLs que expresan NKRs y tienen actividad NK (Le Cleach et al., 2000; Nassif et al., 2002). Con el objetivo de determinar si la población mayoritaria descrita en el infiltrado ampolloso se encontraba incrementada en sangre periférica, se analizó la expresión del receptor CD8 y de los NKRs CD94, ILT2/CD85j así como receptores de la familia de los KIRs en la subpoblación de PBLs CD3⁺ de pacientes con reacciones de hipersensibilidad retardada a medicamentos en fase aguda y se comparó con individuos sanos. Nuestros resultados mostraron un incremento significativo del porcentaje de células CD8⁺, CD94⁺, ILT2/CD85j⁺ y KIR2DL2⁺ y/o 2DL3⁺ y/o 2DS2⁺, pero no de otros receptores de la familia de los KIRs, en PBLs CD3⁺ de fase aguda de pacientes con reacciones ampollosas con afectación de mucosas (TEN, SJS y EM) y reacciones exantemáticas sin afectación de mucosas (DRESS y MPE) respecto de aquellos con urticarias no inmediatas e individuos sanos.

A continuación se compararon muestras agudas con muestras basales de pacientes con reacciones ampollosas (EM, SJS y TEN) y exantemáticas (MPE y DRESS). Los resultados mostraron que el porcentaje de células CD8⁺ en linfocitos T (CD3⁺) de pacientes que habían sufrido MPE o DRESS disminuía significativamente una vez resuelta la reacción de hipersensibilidad. Sin embargo, en aquellos que desarrollaron reacciones ampollosas el porcentaje de células CD8⁺ en LT se mantenía constante durante al menos dos meses después de la fase aguda (tiempo medio de recogida de la muestra basal). Con respecto a los porcentajes de células NKR en el total de linfocitos CD3⁺ se observó un descenso de los mismos una vez superado el cuadro clínico tanto en pacientes que habían sufrido reacciones ampollosas como en

aquellos que sufrieron reacciones exantemáticas sin afectación de mucosas. No obstante, probablemente en parte debido al limitado número de muestras agudas y basales de pacientes con EM, SJS y TEN, el descenso sólo fue estadísticamente significativo en aquellos que habían sufrido MPE y DRESS. Diversos estudios correlacionan la expresión de NKR con la función efectora citolítica de células $CD3^+CD8^+$ (Arlettaz et al., 2004a; Arlettaz et al., 2004b; Baars et al., 2000; Mingari et al., 1997; Pittet et al., 2000; Young et al., 2001). En este sentido, se ha demostrado que en PBMCs de pacientes con reacciones de hipersensibilidad en fase aguda existe un aumento en la expresión de granzima B, perforina e IFN- respecto de individuos sanos y de muestras de estos mismos pacientes recogidas una vez resuelto el cuadro clínico (Posadas et al., 2002). Además, estos mismos autores determinaron que existe una correlación positiva entre el grado de expresión de estos marcadores de citotoxicidad y la gravedad de la patología. En base a estos datos nuestros resultados sugieren que, independientemente del descenso en la expresión de granzima B, perforina e IFN- en PBMCs de muestras basales, los pacientes que han padecido reacciones ampollasas (EM, SJS y TEN) mantienen los porcentajes de células $CD8^+$, y probablemente de células NKR^+ , en la población total de PBLs $CD3^+$ elevados durante algunas semanas tras la resolución del cuadro clínico.

Los pacientes con SIDA presentan mayor susceptibilidad a desarrollar SJS o TEN (Saiag et al., 1992). Por otra parte, modelos de TEN con animales sugieren que las células T $CD4^+$ reguladoras previenen el desarrollo de esta reacción inducida por LT $CD8^+$ (Azukizawa et al., 2003; Azukizawa et al., 2005). En este sentido se ha descrito que en pacientes con SIDA, con bajos niveles de LT $CD4^+$ totales en periferia, el elevado porcentaje de LT $CD8^+$ es uno de los factores que determinan la susceptibilidad a desarrollar respuestas de hipersensibilidad a fármacos (Eliaszewicz et al., 2002). Sería interesante, por tanto, hacer un seguimiento de aquellos pacientes que han sufrido reacciones ampollasas y determinar si los porcentajes de células $CD8^+$ en el total de LT de muestras de sangre periférica recogidas durante varios meses después de la fase aguda se mantienen elevados en el tiempo como ocurre en individuos con SIDA. Si fuera así, ésta podría ser una de las razones que determinaran la susceptibilidad a sufrir reacciones de hipersensibilidad a medicamentos en individuos sanos como se ha descrito en pacientes con SIDA. Además, al igual que se observó en fase aguda de pacientes con reacciones de hipersensibilidad retardada a medicamentos (excepto urticarias), en sangre periférica de individuos con SIDA existe un enriquecimiento de células $CD3^+CD8^+NKR^+$ (De Maria and Moretta, 2000; Galiani et al., 1999).

El análisis estadístico de las entidades clínicas por separado (ver Tabla 2) mostró resultados similares y permitió determinar diferencias entre los distintos tipos de patologías que concordaban con la gravedad de la reacción. En este sentido, se encontraron los mayores porcentajes de células $CD8^+$ en LT de sangre periférica de pacientes con TEN, SJS, EM y

DRESS en fase aguda, mientras que la mayor diferencia estadística con respecto a las muestras de individuos sanos correspondió a las muestras agudas de pacientes con TEN (5.1 ± 4 , $p=0.0001$). Además, en general el mayor porcentaje de células NKR^+ en PBLs CD3^+ , así como las diferencias estadísticamente más significativas con respecto a individuos sanos, correspondieron a muestras de sangre periférica de pacientes con TEN y SJS en fase aguda. No obstante, al contrario de lo que ocurrió al comparar en conjunto pacientes con reacciones ampollas (EM, SJS y TEN) e individuos sanos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los porcentajes de células CD94^+ en linfocitos T de muestras agudas de estos pacientes por separado con muestras de controles. Una explicación a esta discordancia podría ser que el número de muestras en las que se estudió la expresión de CD94 ($n(\text{EM})=4$, $n(\text{SJS})=7$ y $n(\text{TEN})=3$) es muy reducido respecto al tamaño muestral de individuos sanos ($n=56$), al analizar la expresión de CD94 en el conjunto de pacientes con reacciones ampollas se comparan 14 muestras frente a las 56 de controles. Es interesante destacar también que los porcentajes de células CD8^+ y NKR^+ en PBLs CD3^+ de pacientes con DRESS en fase aguda, reacciones que muchas veces son graves y a las que se asocian con frecuencia afectaciones sistémicas (hígado, pulmón o riñón), se acercaban más a los determinados en muestras de pacientes con reacciones ampollas (EM, SJS y TEN) que a los de pacientes con MPE. Por último, el análisis de estos marcadores en PBLs CD3^+ de muestras agudas y basales de pacientes con urticarias no inmediatas demostró que los porcentajes de células CD8^+ y NKR^+ eran los mismos que en individuos sanos. Estos datos sugieren que, al contrario que en reacciones ampollas y exantemáticas, los LT $\text{CD8}^+\text{NKR}^+$ parecen no estar implicados en este tipo de patologías más leves.

El hecho de que en PBLs CD3^+ de fase aguda tanto de pacientes con reacciones ampollas como de aquellos con reacciones exantemáticas exista un incremento del porcentaje de células CD8^+ y NKR^+ , sugiere la posibilidad de que en reacciones no ampollas ocurra también una migración específica hacia la piel de poblaciones celulares $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{NKR}^+$. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que el infiltrado de biopsias de piel afecta de pacientes con MPE está compuesto principalmente por células CD3^+ (40-70%) (Yawalkar et al., 2000). Estos mismos autores determinaron que mientras que en la dermis predominan las células $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, en la epidermis existe el mismo número de células $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ que $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$. El análisis mediante citometría de flujo del fenotipo del infiltrado de biopsias de piel afecta de pacientes con reacciones exantemáticas no ampollas (MPE y DRESS) reveló que el porcentaje de células CD8^+ en el total de linfocitos CD3^+ era menor que en el líquido de ampollas de pacientes con reacciones ampollas (SJS y TEN). No obstante, se encontraron diferencias entre los infiltrados de biopsias de pacientes con MPE y DRESS; mientras que en el infiltrado de pacientes con MPE el número de células $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ solía superar al de células

CD3⁺CD8⁺, en el de pacientes con DRESS el número de ambas subpoblaciones resultó ser bastante similar (datos no mostrados) y en algunos casos superior el de células CD3⁺CD8⁺ (ver figura 9B). Así mismo, el análisis del porcentaje de células NKR⁺ en linfocitos T de biopsias de pacientes con MPE mostró la presencia de una subpoblación de células CD3⁺NKR⁺ mucho más minoritaria que en biopsias de pacientes con DRESS (datos no mostrados). Ya que la expresión de NKRs en LT está limitada casi exclusivamente a la subpoblación CD8⁺ (Arlettaz et al., 2004a; Arlettaz et al., 2004b; Baars et al., 2000; Mingari et al., 1997; Pittet et al., 2000; Young et al., 2001), es lógico que exista un menor porcentaje de células NKR⁺ en el infiltrado de pacientes con MPE que con DRESS y, que en ambos casos, estos porcentajes nunca superen los observados en líquidos de ampollas donde el número de células CD3⁺CD8⁺ siempre sobrepasa con creces el de células CD3⁺CD4⁺. Los datos del análisis del infiltrado de biopsias sugieren, por tanto, que en reacciones exantemáticas sin afectación de mucosas, especialmente en DRESS, también podría existir una migración específica hacia la piel de células CD3⁺CD8⁺NKR⁺.

Existen multitud de estudios que demuestran que las funciones de LT pueden estar moduladas, o incluso inhibidas, a través de la activación de iNKRs (Mingari et al., 1996; Saverino et al., 2000). Así, se ha propuesto que los iNKRs aumentan el umbral de activación de las células T y que la expresión de éstos en LT CD8⁺ efectores puede representar un mecanismo de regulación frente a lo propio. Nuestros resultados demuestran que existe un enriquecimiento en sangre periférica y piel afecta de células CD3⁺CD8⁺ y CD3⁺NKR⁺ (CD3⁺ILT2/CD85j⁺, CD3⁺CD94⁺ y CD3⁺KIR2DL2⁺ y/o 2DL3⁺ y/o 2DS2⁺). Sin embargo, debido al uso de un anticuerpo monoclonal (CH-L) que reconoce las tres formas KIRs (KIR2DL2/2DL3/2DS2) y al hecho de que CD94 puede heterodimerizar con NKG2A o NKG2C para dar lugar a un receptor inhibidor (CD94/NKG2A) o activador (CD94/NKG2C), excepto en el caso de ILT2/CD85j no se podía discernir si el aumento del porcentaje de células CD94⁺ y KIR⁺ en la población de células CD3⁺ se debía a las formas activadores y/o inhibidoras.

Un incremento en el número de células KIR2DS2⁺ y/o CD94/NKG2C⁺ en la población de linfocitos T que migran a la piel podría contribuir a la lisis de los queratinocitos. Así, se ha descrito una ruta de activación alternativa en LT CD8⁺ mediada por el receptor activador CD94/NKG2C (Guma et al., 2005; Meresse et al., 2006) y existen trabajos que implican a receptores activadores de la familia de los KIRs, entre ellos a KIR2DS2, en la inducción de la citotoxicidad y la liberación de citoquinas por parte de células citotóxicas (Della Chiesa et al., 2008; Moretta et al., 1995; Vitale et al., 2004). Además, estudios preliminares de nuestro grupo sugieren un incremento en la expresión del gen KIR2DS2 en PBMCs de pacientes respecto de individuos sanos. Este incremento podría estar relacionado con la respuesta inmunitaria en

reacciones de hipersensibilidad, ya que otro KIR activador ha sido relacionado con psoriasis (Luszczek et al., 2004). Sin embargo, parece que en LT CD8⁺ KIR2DS2 suele coexpresarse con las formas inhibitoras KIR2DL2 y/o KIR2DL3 (Arlettaz et al., 2004a).

Según nuestros resultados el porcentaje de células ILT2/CD85j⁺ en PBLs CD3⁺ de pacientes con reacciones ampollas (EM, SJS y TEN) y exantemáticas (MPE y DRESS) en fase aguda es mayor que el de células KIR2DL2/2DL3/2DS2⁺. Estos datos concuerdan con lo descrito en sangre periférica de individuos sanos, donde ILT2/CD85j se expresa en un mayor número de LT CD8⁺ que los receptores KIRs (Young et al., 2001). Sin embargo, los porcentajes de células ILT2/CD85j⁺ y KIR2DL2/2DL3/2DS2⁺ determinados en linfocitos T de piel afecta y líquido de ampollas fueron muy similares (datos no mostrados). En este sentido se ha descrito que la expresión en superficie de ILT2/CD85j, al contrario de lo que ocurre con la de receptores KIRs, disminuye con las divisiones celulares (Anfossi et al., 2004 y datos de nuestro grupo no publicados). Además, se ha sugerido que la expresión de ILT2/CD85j en linfocitos T precede a la de KIRs (Young et al., 2001). Estos datos apoyan la hipótesis de que células CD3⁺ILT2/CD85j⁺ podrían migrar a la piel (el órgano diana común en este tipo de reacciones) e ir disminuyendo la expresión de ILT2/CD85j al tiempo que adquieren la de otros NKRs (KIRs y heterodímeros de la familia CD94/NKG2). No obstante, en el infiltrado ampolloso y de piel afecta existe un elevado número de células CD3⁺ILT2/CD85j⁺ cuya actividad citotóxica podría estar modulada por el reconocimiento de moléculas HLA-I expresadas en los queratinocitos. Sin embargo, se ha sugerido que pacientes con lupus eritematoso (que al igual que individuos con SIDA son más susceptibles a desarrollar SJS y TEN) expresan formas del iNKR ILT2/CD85j con una menor capacidad inhibitora que las de individuos sanos (Monsivais-Urenda et al., 2007). En este sentido, sería interesante estudiar la funcionalidad de ILT2/CD85j, y quizás también de otros iNKRs que posiblemente se expresen en las subpoblaciones celulares que infiltran la piel, y compararla con la de individuos sanos.

Los fármacos, al igual que otros compuestos químicos de bajo peso molecular, se comportan como haptenos o prohaptenos y necesitan unirse a proteínas celulares o del suero para ser presentados a los LT en el contexto de moléculas HLA. Los antibióticos -lactámicos son los más usados en el tratamiento de infecciones bacterianas y en humanos constituyen la causa más frecuente de respuestas de hipersensibilidad no inmediatas (Weltzien and Padovan, 1998). Se ha descrito que estos antibióticos se unen de forma espontánea a residuos de aminoácidos mediante el ataque nucleofílico de su anillo -lactámico por los grupos amino libres de las proteínas (Batchelor et al., 1965). La unión covalente a proteínas les confiere capacidad inmunogénica de forma que pueden dar lugar a reacciones de hipersensibilidad. Por esta razón, multitud de

estudios se han centrado en el análisis de la naturaleza de los determinantes antigénicos implicados en su inmunogenicidad y alergenicidad así como en el reconocimiento por parte del TCR e IgE (Blanca et al., 2005; Britschgi et al., 2003; Cavani and De Pita, 2006). Sin embargo, existen pocos trabajos acerca de la interacción de fármacos con otros componentes del sistema inmune y se han descrito pocas proteínas a las que se puedan unir antibióticos -lactámicos. Aunque en un principio estos compuestos pueden unirse a residuos de lisina e histidina, se ha demostrado que la unión, que puede tener consecuencias funcionales en las proteínas haptenizadas, es preferente en unas proteínas y no en otras. En este sentido, se ha determinado que la bencilpenicilina es capaz de unirse a varias citoquinas y afecta a la actividad del IFN- γ (Brooks et al., 2001; Brooks et al., 2003).

Las células que infiltran la piel en reacciones de hipersensibilidad expresan NKRs. La presencia del fármaco (hapteno) en moléculas HLA-I podría afectar al reconocimiento entre los NKRs y sus ligandos. En nuestro estudio se demuestra que las células que infiltran la piel expresan al menos un iNKR, ILT2/CD85j, que a diferencia de los heterodímeros de la familias CD94/NKG2 y de los receptores de la familia de los KIRs, reconoce un elevado número de moléculas HLA-I (Colonna et al., 1997; Lepin et al., 2000) y tiene una distribución más amplia (además de expresarse en NKs y LT se expresa en linfocitos B, monocitos y DCs) (Colonna et al., 1997). Ya que los iNKRs incrementan el umbral de activación celular a través de la transmisión de señales inhibitoras tras la interacción con sus ligandos específicos (Ravetch and Lanier, 2000), es posible que varios linajes celulares hayan adoptado el reconocimiento de HLA-I como una estrategia común para controlar la activación celular durante una respuesta inmune y que los iNKRs contribuyan a la tolerancia de lo propio (Colonna et al., 1997; Lopez-Botet et al., 2000; Mingari et al., 2005). En este sentido se ha demostrado que ILT2/CD85j modula las funciones de células mieloides, la señal activadora transmitida por el TCR en LT y la citotoxicidad de células NK (Colonna et al., 1997; Fanger et al., 1998; Merlo et al., 2005; Saverino et al., 2000; Tenca et al., 2005). Si los LT CD8⁺ efectores que lisan a los queratinocitos son ILT2/CD85j⁺, y quizás positivos también para otros iNKRs, la presencia del fármaco en HLA-I podría interrumpir el reconocimiento de estos iNKRs con sus ligandos. En este sentido, el umbral de activación de las células citotóxicas que han migrado a la piel disminuiría y podrían provocar respuestas exacerbadas.

En nuestro estudio se analizó si la haptениzación en moléculas HLA-I por parte de la amoxicilina (AX) (antibiótico que se engloba dentro del grupo de -lactámicos) podría interrumpir el reconocimiento de ILT2/CD85j con sus ligandos específicos. Nuestros resultados mostraron que la AX podía unirse de forma covalente a proteínas de la membrana celular en condiciones normales de cultivo celular. Además, mediante ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos anti-HLA-I e inmunoblot con anticuerpos específicos anti-AX se

demonstró que este fármaco podía unirse a las cadenas pesadas de varias moléculas HLA-I clásicas y no clásicas (HLA-B*2705 y HLA-G1).

Se había determinado que la línea NKL (ILT2/CD85j⁺) inhibe su actividad citotóxica frente a dianas que expresan HLA-B*2705 a través de la activación del receptor ILT2/CD85j (Colonna et al., 1997). De esta forma, se estudió el reconocimiento a través de este iNKR de la molécula HLA-B*2705 haptenizada con AX mediante ensayos de citotoxicidad. Nuestros resultados mostraron que la haptenización de HLA-B*2705 en el transfectante 221 .B*2705 incrementaba de forma parcial la actividad citotóxica de la línea NKL, lo que sugería que la presencia de AX en moléculas HLA-I podría disminuir la señal inhibidora transmitida por ILT2/CD85j en células citotóxicas. La activación de ILT2/CD85j induce la fosforilación de tirosinas de los motivos ITIM y el reclutamiento de la fosfatasa SHP- 1 responsable de transmitir la señal inhibidora (Colonna et al., 1997). Así, para analizar los efectos a nivel molecular que la presencia de AX podría tener sobre el reconocimiento de iNKRs con sus ligandos, se estudió el grado de fosforilación de las tirosinas y el reclutamiento de SHP-1 tras enfrentar la línea RBL.ILT2 (ILT2/CD85j⁺) al transfectante 221.AEH (HLA-E⁺). Nuestros resultados mostraron que la presencia de la AX en HLA-I conllevaba a una menor fosforilación de las tirosinas de los motivos ITIM del receptor ILT2/CD85j y a un menor reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 al mismo. Al menos en el caso del iNKR ILT2/CD85j y de antibióticos -lactámicos parece que la presencia del fármaco en HLA-I podría interferir en el reconocimiento entre este iNKR y sus ligandos específicos y disminuir así el umbral de activación de los LT CD8⁺ efectores que han migrado a la piel.

En lo que respecta al incremento del porcentaje de células CD94⁺ en linfocitos T de sangre periférica y en el infiltrado de ampollas o piel afecta de pacientes en fase aguda, existían varios argumentos que sugerían la posibilidad de que ocurriera una migración específica de células CD3⁺CD8⁺CD94/NKG2C⁺ hacia la piel. Un primer argumento era el hecho de que la expresión de CD94/NKG2C, a diferencia de la de CD94/NKG2A, está restringida a células efectoras CD3⁺CD8⁺ (Arlettaz et al., 2004b). Los LT CD8⁺ efectores son células CCR7 CD28CD27 que expresan de forma constitutiva granzima B, perforina e IFN-. En el infiltrado de ampollas de pacientes con TEN y SJS existe un aumento de expresión de estos mediadores de citotoxicidad (Posadas et al., 2002; Yawalkar et al., 2000) y se han detectado concentraciones muy elevadas de IFN- en líquidos de ampollas (Nassif et al., 2004b y datos de nuestro grupo no publicados). Además, se ha demostrado que las células CD3⁺CD8⁺NKR⁺ del infiltrado ampollosos son CD28 (Le Cleach et al., 2000 y datos de nuestro grupo no publicados) que lisan a los queratinocitos mediante la liberación de granzima B y perforina (Nassif et al., 2004a). Un segundo argumento

a favor de una migración específica de células $CD3^+CD8^+CD94/NKG2C^+$ hacia la piel era la descripción de una ruta de activación alternativa de citotoxicidad mediada por CD94/NKG2C en LT $CD8^+$ de individuos sanos (Guma et al., 2005) y en CTLs intraepiteliales de intestino de pacientes celíacos (Meresse et al., 2006). Se ha demostrado que existe una expansión tanto de LT como de células NK que expresan CD94/NKG2C, ILT2/CD85j y KIR2DL2/2DS2 en sangre periférica de individuos infectados por el CMV humano respecto de aquellos con serología negativa para este herpesvirus (Guma et al., 2004). En este sentido, se ha descrito que el curso de algunas reacciones de hipersensibilidad retardadas a medicamentos se asocia con episodios de reactivación viral (Aihara et al., 2001; Descamps et al., 2003; Suzuki et al., 1998). Sin embargo, recientemente se ha identificado una población de LT $CD8^+CD28^iNKR^+$ denominada NK-CTLs que esta restringida por HLA-E y tiene actividad NK (Moretta et al., 2003). Dadas las características fenotípicas (LT $CD8^+$) y funcionales (con actividad NK) descritas en células del infiltrado de ampollas de pacientes con TEN (Le Cleach et al., 2000; Nassif et al., 2002) era presumible pensar que pertenecieran a alguna de estas dos subpoblaciones celulares y que lisaran a los queratinocitos autólogos a través del TCR y/o de CD94/NKG2C mediante el reconocimiento de HLA-E.

Aunque la transcripción de HLA-E se ha detectado en muchos tipos celulares (Ulbrecht et al., 1992), la expresión de la proteína en superficie requiere de la disponibilidad de una serie de péptidos derivados de la secuencia señal de varias moléculas HLA-I que incluyen HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-G (Braud et al., 1997; Lee et al., 1998a). Este hecho sugiere que la expresión de HLA-E puede estar limitada a algunos tipos celulares y/o a procesos de activación celular. En este sentido, se ha descrito recientemente que tanto melanocitos como queratinocitos de biopsias de piel afecta de pacientes con melanomas así como enterocitos de intestino de pacientes celíacos en fase aguda expresan HLA-E (Derre et al., 2006; Meresse et al., 2006). El IFN- es capaz de aumentar la expresión de HLA-I y HLA-II en queratinocitos humanos (Basham et al., 1985; Nassif et al., 2004a), sin embargo no existían datos acerca de si los queratinocitos expresan en condiciones basales HLA-E y de si su expresión podría aumentar en presencia de IFN-. Nuestro estudio demostró que tras el tratamiento con IFN- se inducen niveles detectables de expresión de HLA-E en la superficie de queratinocitos de la línea HaCaT e individuos sanos, mientras que aquellos provenientes de biopsias de piel afecta de pacientes con reacciones de hipersensibilidad expresan HLA-E. Estos datos sugieren que la liberación de IFN- al líquido de ampollas por parte del infiltrado puede generar un incremento de la expresión de HLA-E, aunque se ha descrito que el tratamiento de células endoteliales con IFN- y TNF-, presente también en el líquido de ampollas (Nassif et al., 2004b), incrementa aún más

los niveles de expresión de esta molécula no clásica (Coupel et al., 2007). Recientemente se ha demostrado que tras la activación de células endoteliales (Coupel et al., 2007) y en cultivos de líneas de melanoma humano y melanocitos primarios (Derre et al., 2006) se libera HLA-E de forma soluble. Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de HLA-E en queratinocitos de piel afecta de pacientes con SJS o TEN podría conllevar a la liberación en el líquido de ampollas de HLA-Es. Existen varios estudios que sugieren un papel inmunoregulador para las formas solubles de HLA. Así, se ha descrito que la forma soluble HLA-G inhibe la actividad citotóxica de NKs (Park et al., 2004) y la proliferación de LT aloreactivos (Bahri et al., 2006). Por otra parte, MIC-A soluble bloquea el reconocimiento de NKG2D con sus ligandos de membrana y disminuye los niveles de expresión del receptor en superficie (Groh et al., 2002) y se ha propuesto que HLA-Es puede actuar como agonista y proteger de la lisis mediada por células NK CD94/NKG2A⁺ (Coupel et al., 2007). En este sentido, si las células del infiltrado ampoloso lisan a los queratinocitos mediante el reconocimiento de HLA-E a través de CD94/NKG2C y/o del TCR (NK-CTLs), la presencia de HLA-Es podría aumentar la respuesta citotóxica de las células efectoras.

A continuación se estudió si clones T con el fenotipo observado en el infiltrado de ampollas (CD8⁺CD56⁺) y “restringidos” por HLA-E (cuya actividad citolítica frente al transfectante 221 .AEH era superior a la actividad frente a la línea parental 721.221) eran capaces de lisar queratinocitos. Nuestros resultados demostraron que algunos de estos clones podían lisar queratinocitos a través del reconocimiento de HLA-E, siendo mayor el porcentaje lisis cuando los queratinocitos habían sido pretratados con IFN-.

Para determinar si existía un enriquecimiento de estas poblaciones “restringidas” por HLA-E en sangre periférica de fase aguda de pacientes con reacciones de hipersensibilidad retardada a medicamentos, se realizaron ensayos de liberación de ⁵¹Cr en los que se enfrentaron PBMCs de pacientes con MPE, SJS y TEN a las dianas 721.221 y 221.AEH y se compararon con ensayos en los que se usaron PBMCs de individuos sanos como efectoras. Nuestro estudio demostró que PBMCs de pacientes con MPE, al igual que las de controles, se inhibieron en presencia de HLA-E, mientras que las de pacientes con SJS y TEN lisaron por igual a la línea parental 721.221 y al transfectante 221 .AEH. Estos datos sugieren que en sangre periférica de pacientes con reacciones ampollosas existen células citotóxicas “restringidas” por HLA-E que enmascaran la inhibición mediada por el receptor CD94/NKG2A expresado en otras subpoblaciones de PBMCs. En sangre periférica de pacientes con MPE podrían existir también LT CD8⁺CD94/NKG2C⁺ y/o NK-CTLs pero en un porcentaje mucho menor que en pacientes con SJS y TEN, lo que coincide con el fenotipo observado en biopsias de piel afecta de estos pacientes (datos no mostrados) y con la gravedad de este tipo de reacción.

A continuación se estudió mediante ensayos de liberación de ^{51}Cr la actividad citotóxica de las células mononucleares de líquido de ampollas (BFMCs). Nuestro estudio demostró que existía un enriquecimiento en el infiltrado ampolloso de células citotóxicas que pueden lisar a los queratinocitos mediante el reconocimiento de HLA-E, ya que lisaron más eficientemente al transfectante 221.AEH que a la línea 721.221 y a queratinocitos alogénicos tratados con IFN-, y que por tanto expresaban HLA-E, que a los que no se habían tratado con la citoquina. Estos datos contradicen los publicados por el grupo del Dr. Roujeau, que sugieren que las BFMCs lisan a queratinocitos autólogos tratados con IFN- únicamente en presencia del fármaco causante de la reacción (Nassif et al., 2004a).

La reciente disponibilidad de un anticuerpo monoclonal específico anti-NKG2C nos permitió analizar la expresión de este receptor en muestras de sangre periférica e infiltrado de ampollas de pacientes con SJS y TEN en fase aguda. Nuestros datos mostraron que tanto en sangre periférica como en ampollas existía un enriquecimiento de linfocitos citotóxicos (T y NK) que expresaban CD94/NKG2C. Además, el análisis de la expresión de este receptor en blastos $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ de líquido de ampollas demostró que los niveles de expresión eran muy superiores a los observados en PBLs $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$. Precisamente los blastos son las células más activadas y, por tanto, las que probablemente estén más implicadas en la lisis de los queratinocitos. En este sentido, nuestros resultados mostraron que la expresión de CD94/NKG2C en células $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ y NK de sangre periférica de pacientes que han sufrido SJS y TEN disminuía una vez resuelto el cuadro clínico (ver figura 20A). Además, mediante ensayos de citotoxicidad en los que se enfrentaron PBMCs de pacientes con SJS y TEN en fase aguda a las dianas NK en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKG2C se demostró que la ausencia de inhibición de las PBMCs de pacientes con reacciones ampollas frente a la diana 221 .AEH se debía al reconocimiento de HLA-E a través del receptor CD94/NKG2C.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que en sangre periférica de pacientes con SJS y TEN en fase aguda existe un enriquecimiento de células citotóxicas (T y NK) CD94/NKG2C^+ que migran a la piel y participan en la lisis de los queratinocitos, sin embargo no proporcionan información acerca de si son las NKs y/o los LT los responsables de la ausencia de inhibición frente al transfectante 221 .AEH. Para determinar si ambas poblaciones ($\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD94/NKG2C}^+$ y/o $\text{CD3}^+\text{CD94/NKG2C}^+$) pueden lisar a través del reconocimiento de HLA-E se realizaron ensayos de movilización de CD 107a enfrentando PBMCs y BFMCs de pacientes con SJS y TEN a las dianas 721.221 y 221.AEH. Nuestros resultados sugieren que ambas poblaciones podrían lisar a los queratinocitos a través de CD94/NKG2C mediante el reconocimiento de HLA-E ya que mostraron que el mayor porcentaje de células CD107a^+ tanto

en la población de LT (CD3⁺) como en la población CD3 de sangre periférica e infiltrado ampolloso correspondía a la subpoblación de células que expresaban el receptor CD94/NKG2C y que se habían enfrentado al transfectante 221 .AEH. En este sentido, se ha demostrado que la disminución del porcentaje de células NK CD94/NKG2A⁺ en sangre periférica de individuos con SIDA, que tienen mayor susceptibilidad a sufrir SJS y TEN, se correlaciona con una expansión de células NK CD94/NKG2C⁺ (Mela et al., 2005).

El hecho de que las células T que migran a la piel en reacciones de hipersensibilidad retardada a medicamentos tengan características fenotípicas y funcionales muy similares a las de los CTLs intraepiteliales de intestino de pacientes celíacos (Meresse et al., 2006) y a la subpoblación de CTLs detectada en sangre periférica de individuos infectados por el CMV humano (Guma et al., 2004) sugiere que esta transformación de CTLs a células con características típicas de NKs podría ser un proceso común en la inmunopatología de varias infecciones crónicas y enfermedades inflamatorias.

Los datos publicados (Nassif et al., 2004b; Posadas et al., 2002) así como los obtenidos en nuestro estudio sugieren que el IFN- juega un papel importante en el desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad más graves, y recientemente se ha descrito que la secreción de esta citoquina por parte de células NK puede determinar respuestas inmunes adaptativas. Así, aunque las NKs siempre se han descrito como componentes del sistema inmune innato que participan en respuestas tempranas contra patógenos o células transformadas a través de su actividad citotóxica y de la liberación de citoquinas y quimioquinas (Trinchieri, 1989), recientemente se ha atribuido a esta población un papel regulador en diferentes procesos inmunes y no inmunes (Hanna and Mandelboim, 2007). Entre las citoquinas producidas por células NK se ha demostrado que el IFN- conlleva a la maduración de DCs y a la polarización de respuestas inmunes (Martin-Fontecha et al., 2004; Vitale et al., 2005). Aunque se ha asumido de forma general que la subpoblación de células NK CD56⁺⁺⁺CD 16 es la principal responsable de la producción de citoquinas (Cooper et al., 2001b), recientemente se ha demostrado que la dicotomía entre células “NK citotóxicas” y “NKs productoras de citoquinas” no se aplica cuando se enfrentan NKs frescas a células tumorales (Anfossi et al., 2006). Estos autores demostraron que la mayor parte de las células NK que son citotóxicas y/o producen IFN- tras la estimulación con la línea K562 o la línea P815 preincubada con anticuerpos específicos pertenecen a la subpoblación de células NK CD56⁺CD 16⁺⁺, mientras que aquellas que responden a citoquinas tales como IL-12 o IL-15 pertenecen a la subpoblación CD56⁺⁺⁺CD16. De esta forma, estos autores proponen definir a las

subpoblaciones NK CD56⁺⁺⁺ y CD56⁺ como aquellas subpoblaciones “que responden a células diana” y “que responden a citoquinas” respectivamente.

La variabilidad de iNKRs para moléculas de HLA-I confiere especificidad a las células NK. Además, las NKs expresan una gran variedad de receptores activadores y la manera en la que los iNKRs interfieren con las rutas de activación de éstos no ha sido del todo elucidada (Bryceson et al., 2006).

Se asume que los iNKRs regulan las funciones efectoras de las células NK. Mientras que la regulación de la citotoxicidad por parte de iNKRs ha sido ampliamente estudiada, existen muy pocos trabajos acerca del papel que pueden desempeñar estos receptores sobre la producción de citoquinas. Se ha demostrado que en LT y NKs KIR3DL1 y KIR2DL2/3 pueden modular la producción de IFN- tras la unión con sus ligandos específicos (D'Andrea et al., 1996; Draghi et al., 2005; Kurago et al., 1998; Mingari et al., 1995) mientras que CD94/NKG2A puede regular la producción tanto de IFN- y TNF- (Jinushi et al., 2004; Mingari et al., 1995; Terrazzano et al., 2002; Watzl et al., 2000). Existen algunos trabajos que sugieren un posible papel regulador de ILT2/CD85j sobre la actividad citotóxica de células y clones NK (Colonna et al., 1997; Navarro et al., 1999; Vitale et al., 1999). Además, parece que la producción de IFN- y la citotoxicidad mediada por LT también puede ser modulada por este iNKR (Colonna et al., 1997; Ince et al., 2004; Merlo et al., 2001; Saverino et al., 2002). Sin embargo, no existían datos acerca de la función reguladora de ILT2/CD85j en LT tras la interacción con ligandos específicos ni sobre la regulación de la producción de IFN- en células NK.

En nuestro estudio se analizó la posible función reguladora que pudiera tener ILT2/CD85j sobre la secreción de IFN- por parte de células NK en tres situaciones fisiológicas en las que se ha descrito que las NKs producen esta citoquina: tras la interacción con células diana, en respuesta a productos virales y durante el encuentro con iDCs.

Nuestros datos demostraron que la interacción de la línea NK-92 con dianas incrementaba los niveles de expresión de mRNA de IFN- en las NKs y que este incremento se bloqueaba mediante el reconocimiento de moléculas de HLA-I específicas de ILT2/CD85j expresadas en las dianas. Además de disminuir los niveles de expresión de mRNA de IFN-, la expresión de moléculas de HLA-I que son ligandos específicos del iNKR ILT2/CD85j en células diana disminuyó tanto la síntesis como la secreción de la citoquina en células NK-92 y NKs de sangre periférica. Por otra parte, también se demostró que la expresión de ligandos específicos de este receptor en APCs disminuyó la producción de IFN- inducida por superantígenos en células T.

En estos experimentos se usaron los transfectantes de la línea celular 721.221 para HLA-Cw07 (221 .Cw07) que se ha descrito que no es ligando de ILT2/CD85j (Draghi et al., 2005; Fanger et

al., 1998) y para HLA-B*2705 (221.B*2705) y HLA-G1 (221.G1m) que son ligandos específicos de ILT2/CD85j (Colonna et al., 1997). Estudios basados en cristalografía han determinado que HLA-G1 se une con mayor afinidad al receptor ILT2/CD85j que moléculas HLA-B (Shiroishi et al., 2003). Sin embargo, nuestros experimentos con NKs de de sangre periférica mostraron una mayor inhibición frente a HLA-B*2705 que frente a HLA-G1. Así, mientras que la presencia de HLA-B*2705 siempre inhibió la producción de IFN- en células T y NK, en cultivos de PBMCs de algunos donantes con el transfectante 221 .G1m se observó inhibición de la síntesis de IFN- en células NK y aumento de la producción de esta citoquina en células T (ver figuras 31 y 32). Estas diferencias no pueden deberse al reconocimiento de HLA-E a través de receptores CD94/NKG2A y/o CD94/NKG2C expresados en las células efectoras, ya que se usaron transfectantes de la línea 721.221 de tres moléculas de HLA-I que no estabilizan la expresión en membrana de HLA-E (Draghi et al., 2005; Lee et al., 1998a; Navarro et al., 1999). KIR2DL4 es el único receptor de la familia de los KIRs que reconoce moléculas de HLA-G, y se ha descrito que KIR2DL4 puede inhibir la citotoxicidad (Rajagopalan et al., 1999) e inducir la producción de IFN- (Rajagopalan et al., 2006) en NKs a través del reconocimiento de esta molécula. Debido a que HLA-B*2705 expresado en el transfectante 221 .B*2705 es ligando específico de KIR3DL1 (y de ningún otro KIR inhibidor) y a que se desconocen KIRs que inhiban la síntesis de IFN- mediante el reconocimiento de HLA-G, se realizaron citometrías de cuatro colores para analizar la producción de IFN- en células ILT2/CD85j⁺KIR3DL1 . KIR2DL4 se transcribe en todas las células NK que expresan KIRs (Rajagopalan et al., 1999). En este sentido, es posible que el reconocimiento de HLA-G1 por parte de KIR2DL4 (u otro receptor activador aún desconocido) interrumpa la señal inhibidora transmitida por ILT2/CD85j en células T de aquellos donantes en los que la presencia de HLAG incrementó la producción de IFN-. Además, la mayor parte de los LT ILT2/CD85j⁺ son KIR pero expresan KIR2DL4 (Young et al., 2001). Se ha descrito que existen individuos homocigotos con genotipo KIR2DL4.2/9A que no expresan el receptor KIR2DL4 en la superficie de las células NK (Goodridge et al., 2003; Kikuchi-Maki et al., 2003). Sin embargo, nuestro estudio demostró que uno de los donantes en los que los LT incrementaban la síntesis de IFN- tras el encuentro con células 221.G1m era homocigoto para KIR2DL4.2 (datos no mostrados), por lo que o bien existen mecanismos adicionales que controlan la expresión de este receptor en LT o bien existen receptores activadores aún desconocidos que inducen la síntesis de IFN- a través del reconocimiento de HLA-G.

Los resultados obtenidos tras la estimulación de LT con células 221 .B*2705 preincubadas con SEB sugieren que las moléculas HLA-I clásicas modulan la síntesis de citoquinas tras la unión al receptor ILT2/CD85j. Sin embargo, los datos obtenidos tras la estimulación con células 221 .G1m preincubadas con SEB sugieren que otros receptores específicos de HLA-G podrían

bloquear las señales inhibitorias transmitidas por ILT2/CD85j tras el reconocimiento de moléculas de HLA-I clásicas en células T. No obstante, las interacciones ILT2/CD85j-HLA-G podrían ser relevantes en algunas condiciones patológicas y fisiológicas. HLA-G tiene un patrón de expresión limitado restringido a células trofoblásticas, que no transcriben moléculas HLA-A ni HLA-B. En este sentido, se ha propuesto que HLA-G juega un papel crucial en la tolerancia materno-fetal a través de la unión con ILT2/CD85j expresado en células del sistema inmune uterinas (Shiroishi et al., 2003), de las cuales durante las primeras semanas de embarazo el 85% son NKs (Hanna and Mandelboim, 2007). Sin embargo, también se ha descrito que la expresión de HLA-G en células trofoblásticas conduce a la producción de IFN- por parte de NKs deciduales (van der Meer et al., 2004). Estos datos sugieren que la interacción de HLA-G con ILT2/CD85j podría modular la secreción de IFN- y mantener unos niveles de la citoquina óptimos y esenciales para una placentación normal (Hanna and Mandelboim, 2007). Además de en células trofoblásticas, se ha propuesto que la expresión de HLA-G podría inducirse como respuesta a procesos de inflamación, transformación e infección en otros tipos celulares (LeMaoult et al., 2003). En este sentido, se ha descrito que las células infectadas por CMV humano incrementan los niveles de expresión de HLA-G y, como se ha comentado anteriormente, existe un elevado porcentaje de células T y NK ILT2/CD85j⁺ en sangre periférica de individuos infectados con CMV (Guma et al., 2004).

Recientemente se ha descrito que las células NK pueden estimularse de forma directa a través de productos virales y sintetizar IFN- (Pisegna et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Sivori et al., 2004). En nuestro estudio se determinó si ILT2/CD85j podía modular la producción de IFN- tras la activación de TLR3. Nuestros resultados mostraron que, aunque no se observó inhibición en células NK-92, la producción de IFN- disminuyó cuando se estimuló ILT2/CD85j en NKs de sangre periférica activadas con poly (I:C). Para determinar si esta capacidad inhibitoria podía atribuirse a otros iNKRs se repitieron los ensayos con NKs purificadas de donantes seleccionados de acuerdo a la elevada expresión de KIR3DL1 o CD94/NKG2A. Los resultados demostraron que, al igual que ocurría con ILT2/CD85j, cuando se estimulaban estos iNKRs también se inhibía la secreción de IFN- mediada por poly (I:C). Para determinar si la falta de inhibición al estimular ILT2/CD85j en células NK-92 tratadas con poly (I:C) era exclusiva de este iNKR, se realizaron los mismos experimentos estimulando CD94/NKG2A. Nuestros resultados revelaron que CD94/NKG2A tampoco era capaz de modular la síntesis de IFN- mediada por poly (I:C) en la línea NK-92 (datos no mostrados). Existen varias explicaciones posibles a este hecho. Una primera explicación podría ser que no se observe inhibición debido a la elevada cantidad de IFN- secretado, sin embargo ésta parece ser improbable ya que los

niveles de citoquina producidos tras la estimulación de la línea NK-92 con células 721.221 fueron mayores y en ese caso se observó que la expresión en las dianas de ligandos específicos de ILT2/CD85j inhibía la síntesis de IFN- (ver figura 27). No obstante, podría ser que el efecto de los anticuerpos inmovilizados en placas no mimetice exactamente la interacción del iNKR con sus ligandos específicos. Una segunda explicación podría ser que ya que la maquinaria inicial de transducción de señales que sigue a la activación de TLR3 (Pisegna et al., 2004) es distinta a la que acontece tras sinapsis con células diana, el paso donde los iNKRs bloquean las señales activadoras transmitidas por TLR3 podría estar alterado en células NK-92 o bien en todas las NKs que se han mantenido durante un largo periodo de tiempo en cultivo. En este sentido, se ha descrito lo contrario en cuanto a la secreción de IFN- inducida por KIR2DL4. Así, la secreción de esta citoquina se inhibe a través de la activación de CD94/NKG2A en NKs activadas pero no en NKs recién aisladas (Rajagopalan et al., 2001).

Los ensayos de citotoxicidad con NKs aisladas de sangre periférica tratadas con poly (I:C) frente a la línea 721.221 o transfectantes estables de esta línea que expresan ligandos específicos de ILT2/CD85j y/o CD94/NKG2A demostraron que las moléculas de HLA-I específicas de estos iNKRs modulaban la actividad citotóxica estimulada por poly (I:C) en NKs. Estos datos, en conjunto con los anteriores, refuerzan la hipótesis de que los iNKRs pueden regular señales activadoras inducidas por productos virales.

Tras la interacción con iDCs las células NK se estimulan y secretan IFN-. Se ha descrito que el receptor NKp30 ejerce un importante papel en este proceso. En este sentido se ha demostrado que tras enfrentar NKs activadas con iDCs se produce la liberación de grandes cantidades de IFN- (del orden de las detectadas tras el encuentro con dianas) que disminuyen en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-NKp30 (Ferlazzo et al., 2002). Además se ha demostrado que la maduración de DCs a partir de NKs depende de la liberación de IFN- y TNF- estimulada en células NK mediante la activación de NKp30 (Vitale et al., 2005). Estos mismos autores no observaron diferencias en la cantidad de IFN- producido cuando las NKs se enfrentaron a iDCs autólogas y alogénicas, y aunque parecía que la estimulación de KIRs disminuía la capacidad de las células NK de inducir la maduración de las DCs, no existían datos acerca de si ILT2/CD85j podía ejercer alguna función reguladora en estos procesos. En nuestro estudio se demostró que tanto la actividad citotóxica como la secreción de citoquinas mediada por la activación de NKp30 en dos líneas celulares NK diferentes podrían estar moduladas por la activación de ILT2/CD85j. En concreto, nuestros resultados mostraron que la producción de IFN- se inhibía un 80% en células NK-92 pero sólo un 20% en NKs recién aisladas (aunque se hubieran seleccionado poblaciones NK con un alto porcentaje de expresión de ILT2/CD85j) (ver figuras

37 y 38B y C). La explicación a estas diferencias de nuevo podría ser que los anticuerpos inmovilizados en placa no mimeticen los efectos de la interacción con moléculas HLA, aunque otra explicación posible sería que en poblaciones de NKs policlonales la producción de IFN- por parte de células CD16⁺ILT2/CD85j o NKp30⁺ILT2/CD85j podría enmascarar la inhibición de la producción de esta citoquina en las subpoblaciones CD16⁺ILT2/CD85j⁺ o NKp30⁺ILT2/CD85j⁺. En este sentido, se ha descrito que las células NK ILT2/CD85j⁺ expresan con menor intensidad el receptor NKp30 (Guma et al., 2004).

A continuación se estudió la contribución de ILT2/CD85j y CD94/NKG2A sobre la modulación de la producción de IFN- tras el encuentro de NKs con iDCs. Para ello se realizaron cocultivos de la línea NK-92 o NKs purificadas preincubadas con anticuerpos bloqueantes F(ab')₂ anti-ILT2 y/o anti-CD94/NKG2A con iDCs alogénicas. Las DCs expresan ILT2/CD85j, por lo que la presencia de anticuerpos bloqueantes F(ab')₂ anti-ILT2 durante el cocultivo podría disminuir el umbral de activación de las iDCs y aumentar la secreción de IL-12, citoquina que parece esencial en la estimulación de la síntesis de IFN- por parte de NKs, aunque se ha descrito que las células NK pueden sintetizar IFN- en ausencia de IL-12 (Gerosa et al., 2002). En nuestro modelo experimental no se observó ningún incremento en la concentración de IL-12 producida por las iDCs en comparación con la cantidad de citoquina sintetizada por iDCs cultivadas en ausencia de NKs (datos no mostrados). En lo que respecta a la cantidad de IFN- secretado tras estimular células NK-92 con iDCs alogénicas, los resultados mostraron que sólo en presencia de ambos anticuerpos bloqueantes (anti-ILT2 y anti-CD94) aumentó de forma sustancial la cantidad de citoquina liberada al medio. Sin embargo, cuando se usaron como efectoras NKs policlonales los resultados revelaron dos patrones distintos de comportamiento; uno similar al de la línea NK-92, y otro en el que sólo el bloqueo del receptor CD94/NKG2A incrementó de forma sustancial la síntesis de IFN-. No obstante, es importante mencionar que en este caso el bloqueo simultáneo de ambos iNKRs indujo una secreción aún mayor de la citoquina. Este efecto complementario de ambos anticuerpos bloqueantes siempre se observó cuando se midió la concentración de IFN- en sobrenadantes de cocultivos en los que se enfrentaron células NK ILT2/CD85j⁺ con iDCs pero no en aquellos en los que las células NK eran ILT2/CD85j.

Por el contrario, los resultados del análisis de la posible contribución de ILT2/CD85j sobre la regulación de la lisis de iDCs demostraron que el bloqueo de ILT2/CD85j incrementó de forma débil la actividad citotóxica de células NK-92 y NK purificadas ILT2/CD85j⁺ frente a iDCs, y que sólo el bloqueo de CD94/NKG2A fue capaz de incrementar la citotoxicidad hasta niveles que no se superaron en presencia de ambos anticuerpos bloqueantes. En este sentido, se ha demostrado que en LT CD8⁺ el bloqueo del receptor ILT2/CD85j afecta poco a la actividad citotóxica de esta población pero sí incrementa en gran medida la producción de IFN- (Ince et

al., 2004). Además, la unión de KIR2DL2 a su ligando específico en LT CD4⁺KIR2DL2⁺ no inhibe la degranulación pero sí la síntesis de IFN- (Henel et al., 2006).

De acuerdo con lo publicado (Della Chiesa et al., 2003) nuestros resultados indican que, aunque ILT2/CD85j podría contribuir en la regulación de la lisis de las iDCs, este proceso parece ser controlado principalmente por el reconocimiento de HLA-E a través de CD94/NKG2A. Según nuestros datos, las interacciones entre moléculas HLA-I e ILT2/CD85j tras el encuentro de NKs con iDCs parecen ser más relevantes en la regulación de la producción de IFN-.

En conjunto, nuestros datos demuestran que ILT2/CD85j regula la producción de IFN- tras la interacción con moléculas HLA-I específicas tanto en células NK como en LT. Por otra parte, sugieren que ILT2/CD85j además de incrementar el umbral de activación de células inmunoefectoras podría participar en mecanismos de regulación manteniendo niveles óptimos de citoquinas o finalizando respuestas inmunes. Por último, nuestro estudio sugiere por primera vez un papel regulador de iNKRs sobre las funciones estimuladas a través de TLRs en NKs.

CONCLUSIONES

1. Las subpoblaciones CD8, CD94, ILT2/CD85j y KIR2DL2/L3/S2 aumentan en PBLs CD3⁺ de pacientes con reacciones ampollosas (EM, SJS y TEN) y exantemáticas (DRESS y MPE) en fase aguda respecto de aquellos con urticarias no inmediatas e individuos sanos.
2. La frecuencia de LT que expresan CD8 y NKRs (CD3⁺CD8⁺NKR⁺) en piel afecta de pacientes con reacciones de hipersensibilidad retardada a medicamentos aumenta de forma proporcional a la gravedad de la patología.
3. La haptenización por fármacos de moléculas HLA-I podría dificultar el reconocimiento por iNKRs disminuyendo el umbral de activación de células efectoras.
4. Los queratinocitos de piel afecta de pacientes con reacciones de hipersensibilidad retardada a medicamentos, a diferencia de los de individuos sanos o la línea de queratinocitos humanos HaCaT, expresan HLA-E en la superficie celular.
5. Existe un incremento del porcentaje de LT CD8⁺ y células NK que expresan CD94/NKG2C en sangre periférica de fase aguda y líquido de ampollas de pacientes con reacciones ampollosas. Estas subpoblaciones linfoides podrían participar en la lisis de los queratinocitos mediante el reconocimiento de HLA-E.
6. ILT2/CD85j regula la producción de IFN- en células NK tras la interacción con dianas que expresan ligandos específicos de este receptor.
7. ILT2/CD85j y otros iNKRs modulan las señales activadoras transmitidas por TLRs en células NK de sangre periférica.
8. ILT2/CD85j y CD94/NKG2A cooperan en la regulación de la síntesis de IFN-estimulada en células NK tras el encuentro con iDCs, mientras que la actividad citotóxica es controlada principalmente por el reconocimiento de HLA-E a través de CD94/NKG2A.

BIBLIOGRAFÍA

- Aihara, M., Sugita, Y., Takahashi, S., Nagatani, T., Arata, S., Takeuchi, K. and Ikezawa, Z.** (2001). Anticonvulsant hypersensitivity syndrome associated with reactivation of cytomegalovirus. *Br J Dermatol* **144**, 1231-4.
- Anegon, I., Cuturi, M. C., Trinchieri, G. and Perussia, B.** (1988). Interaction of Fc receptor (CD 16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med* **167**, 452-72.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D. et al.** (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* **25**, 331-42.
- Anfossi, N., Doisne, J. M., Peyrat, M. A., Ugolini, S., Bonnaud, O., Bossy, D., Pitard, V., Merville, P., Moreau, J. F., Delfraissy, J. F. et al.** (2004). Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8+ T cells. *J Immunol* **173**, 7223-9.
- Arlettaz, L., Degermann, S., De Rham, C., Roosnek, E. and Huard, B.** (2004a). Expression of inhibitory KIR is confined to CD8+ effector T cells and limits their proliferative capacity. *Eur J Immunol* **34**, 34 13-22.
- Arlettaz, L., Villard, J., de Rham, C., Degermann, S., Chapuis, B., Huard, B. and Roosnek, E.** (2004b). Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alphabeta lymphocytes. *Eur J Immunol* **34**, 3456-64.
- Arnon, T. I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A. and Mandelboim, O.** (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* **31**, 2680-9.
- Azukizawa, H., Kosaka, H., Sano, S., Heath, W. R., Takahashi, I., Gao, X. H., Sumikawa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, K. and Itami, S.** (2003). Induction of T-cell-mediated skin disease specific for antigen transgenically expressed in keratinocytes. *Eur J Immunol* **33**, 1879-88.
- Azukizawa, H., Sano, S., Kosaka, H., Sumikawa, Y. and Itami, S.** (2005). Prevention of toxic epidermal necrolysis by regulatory T cells. *Eur J Immunol* **35**, 1722-30.

B

- Baars, P. A., Ribeiro Do Couto, L. M., Leusen, J. H., Hooibrink, B., Kuijpers, T. W., Lens, S. M. and van Lier, R. A.** (2000). Cytolytic mechanisms and expression of activation-regulating receptors on effector-type CD8+CD45RA+CD27- human T cells. *J Immunol* **165**, 1910-7.
- Bahri, R., Hirsch, F., Josse, A., Rouas-Freiss, N., Bidere, N., Vasquez, A., Carosella, E. D., Charpentier, B. and Durrbach, A.** (2006). Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol* **176**, 1331-9.
- Basham, T. Y., Nickoloff, B. J., Merigan, T. C. and Morhenn, V. B.** (1985). Recombinant gamma interferon differentially regulates class II antigen expression and biosynthesis on cultured normal human keratinocytes. *J Interferon Res* **5**, 23-3 2.

- Batchelor, F. R., Dewdney, J. M. and Gazzard, D.** (1965). Penicillin allergy: the formation of the penicilloyl determinant. *Nature* **206**, 362-4.
- Bellon, T., Kitzig, F., Sayos, J. and Lopez-Botet, M.** (2002). Mutational analysis of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs of the Ig-like transcript 2 (CD85j) leukocyte receptor. *J Immunol* **168**, 3351-9.
- Blanca, M., Cornejo-Garcia, J. A., Torres, M. J. and Mayorga, C.** (2005). Specificities of B cell reactions to drugs. The penicillin model. *Toxicology* **209**, 181-4.
- Blery, M., Olcese, L. and Vivier, E.** (2000). Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Hum Immunol* **61**, 51-64.
- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D. K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R. and Coligan, J. E.** (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* **38**, 637-60.
- Brander, C., Mauri-Hellweg, D., Bettens, F., Rolli, H., Goldman, M. and Pichler, W. J.** (1995). Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-structures are observed in penicillin-allergic individuals. *J Immunol* **155**, 2670-8.
- Braud, V., Jones, E. Y. and McMichael, A.** (1997). The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* **27**, 1164-9.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H. et al.** (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**, 795-9.
- Britschgi, M., Steiner, U. C., Schmid, S., Depta, J. P., Senti, G., Bircher, A., Burkhart, C., Yawalkar, N. and Pichler, W. J.** (2001). T-cell involvement in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis. *J Clin Invest* **107**, 1433-41.
- Britschgi, M., von Greyerz, S., Burkhart, C. and Pichler, W. J.** (2003). Molecular aspects of drug recognition by specific T cells. *Curr Drug Targets* **4**, 1-11.
- Brooks, B. M., Flanagan, B. F., Thomas, A. L. and Coleman, J. W.** (2001). Penicillin conjugates to interferon-gamma and reduces its activity: a novel drug-cytokine interaction. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 1175-81.
- Brooks, B. M., Thomas, A. L. and Coleman, J. W.** (2003). Benzylpenicillin differentially conjugates to IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta, IL-4 and IL-13 but selectively reduces IFN-gamma activity. *Clin Exp Immunol* **131**, 268-74.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. and Long, E. O.** (2006). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* **214**, 73-91.
- Byrd, A., Hoffmann, S. C., Jarahian, M., Momburg, F. and Watzl, C.** (2007). Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44. *PLoS ONE* **2**, e1339.

- Carosella, E. D., Paul, P., Moreau, P. and Rouas-Freiss, N.** (2000). HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunol Today* **21**, 532-4.
- Cavani, A. and De Pita, O.** (2006). The role of T cells in drug reaction. *Curr Allergy Asthma Rep* **6**, 20-4.
- Cerwenka, A. and Lanier, L. L.** (2001a). Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* **181**, 158-69.
- Cerwenka, A. and Lanier, L. L.** (2001b). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* **1**, 41-9.
- Coleman, J. W. and Blanca, M.** (1998). Mechanisms of drug allergy. *Immunol Today* **19**, 196-8.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M. and Lopez-Botet, M.** (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* **186**, 1809-18.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. and Caligiuri, M. A.** (2001a). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* **22**, 633-40.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E. and Caligiuri, M. A.** (2001b). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* **97**, 3146-51.
- Correia, O., Delgado, L., Ramos, J. P., Resende, C. and Torrinha, J. A.** (1993). Cutaneous T-cell recruitment in toxic epidermal necrolysis. Further evidence of CD8+ lymphocyte involvement. *Arch Dermatol* **129**, 466-8.
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L. and Hsu, M. L.** (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* **7**, 273-82.
- Coupel, S., Moreau, A., Hamidou, M., Horejsi, V., Souillou, J. P. and Charreau, B.** (2007). Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* **109**, 2806-14.

D

- D'Andrea, A., Chang, C., Phillips, J. H. and Lanier, L. L.** (1996). Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J Exp Med* **184**, 789-94.
- De Maria, A. and Moretta, L.** (2000). HLA-class I-specific inhibitory receptors in HIV-1 infection. *Hum Immunol* **61**, 74-81.
- Della Chiesa, M., Romeo, E., Falco, M., Balsamo, M., Augugliaro, R., Moretta, L., Bottino, C., Moretta, A. and Vitale, M.** (2008). Evidence that the KIR2DS5 gene codes for a surface receptor triggering natural killer cell function. *Eur J Immunol* **38**, 2284-9.

- Della Chiesa, M., Vitale, M., Carlomagno, S., Ferlazzo, G., Moretta, L. and Moretta, A.** (2003). The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* **33**, 1657-66.
- Derre, L., Corvaisier, M., Charreau, B., Moreau, A., Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Jotereau, F. and Gervois, N.** (2006). Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol* **177**, 3 100-7.
- Descamps, V., Mahe, E., Houhou, N., Abramowitz, L., Rozenberg, F., Ranger-Rogez, S. and Crickx, B.** (2003). Drug-induced hypersensitivity syndrome associated with Epstein-Barr virus infection. *Br J Dermatol* **148**, 1032-4.
- Dietrich, J., Cella, M. and Colonna, M.** (2001). Ig-like transcript 2 (ILT2)/leukocyte Ig-like receptor 1 (LIR1) inhibits TCR signaling and actin cytoskeleton reorganization. *J Immunol* **166**, 25 14-21.
- Draghi, M., Yawata, N., Gleimer, M., Yawata, M., Valiante, N. M. and Parham, P.** (2005). Single-cell analysis of the human NK cell response to missing self and its inhibition by HLA class I. *Blood* **105**, 2028-35.
- E**
- Eliaszewicz, M., Flahault, A., Roujeau, J. C., Fillet, A. M., Challine, D., Mansouri, S., Wolkenstein, P., Aractingi, S., Penso-Assathiany, D., Maslo, C. et al.** (2002). Prospective evaluation of risk factors of cutaneous drug reactions to sulfonamides in patients with AIDS. *J Am Acad Dermatol* **47**, 40-6.
- F**
- Fanger, N. A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S. C., Maliszewski, C. R. and Borges, L.** (1998). The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol* **28**, 3423-34.
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M. and Munz, C.** (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* **195**, 343-51.
- Flaig, R. M., Stark, S. and Watzl, C.** (2004). Cutting edge: NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* **172**, 6524-7.
- G**
- Galiani, M. D., Aguado, E., Tarazona, R., Romero, P., Molina, I., Santamaria, R., Solana, R. and Pena, J.** (1999). Expression of killer inhibitory receptors on cytotoxic cells from HIV-1 -infected individuals. *Clin Exp Immunol* **115**, 472-476.
- Geraghty, D. E., Stockschleider, M., Ishitani, A. and Hansen, J. A.** (1992). Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism. *Hum Immunol* **33**, 174-84.
- Gerber, B. O. and Pichler, W. J.** (2004). Cellular mechanisms of T cell mediated drug hypersensitivity. *Curr Opin Immunol* **16**, 732-7.

- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G. and Trinchieri, G.** (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* **195**, 327-33.
- Gonzalez, F. J., Leyva, L., Posadas, S., Luque, I., Blanca, M., Santamaria, L. and Juarez, C.** (1998). Participation of T lymphocytes in cutaneous allergic reactions to drugs. *Clin Exp Allergy* **28 Suppl 4**, 3-6.
- Goodridge, J. P., Witt, C. S., Christiansen, F. T. and Warren, H. S.** (2003). KIR2DL4 (CD 158d) genotype influences expression and function in NK cells. *J Immunol* **171**, 1768-74.
- Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E. and Walzer, T.** (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* **220**, 169-82.
- Griem, P., Wulferink, M., Sachs, B., Gonzalez, J. B. and Gleichmann, E.** (1998). Allergic and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise? *Immunol Today* **19**, 133-41.
- Grimsley, C. and Ober, C.** (1997). Population genetic studies of HLA-E: evidence for selection. *Hum Immunol* **52**, 33-40.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C. and Spies, T.** (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**, 734-8.
- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N. and Lopez-Botet, M.** (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* **104**, 3664-71.
- Guma, M., Busch, L. K., Salazar-Fontana, L. I., Bellosillo, B., Morte, C., Garcia, P. and Lopez-Botet, M.** (2005). The CD94/NKG2C killer lectin-like receptor constitutes an alternative activation pathway for a subset of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* **35**, 2071-80.
- H**
- Hanna, J. and Mandelboim, O.** (2007). When killers become helpers. *Trends Immunol* **28**, 201-6.
- Henel, G., Singh, K., Cui, D., Pryshchep, S., Lee, W. W., Weyand, C. M. and Goronzy, J. J.** (2006). Uncoupling of T-cell effector functions by inhibitory killer immunoglobulinlike receptors. *Blood* **107**, 4449-57.
- Hertl, M., Bohlen, H., Jugert, F., Boecker, C., Knaup, R. and Merk, H. F.** (1993). Predominance of epidermal CD8+ T lymphocytes in bullous cutaneous reactions caused by beta-lactam antibiotics. *J Invest Dermatol* **101**, 794-9.
- Hertl, M. and Merk, H. F.** (1995). Lymphocyte activation in cutaneous drug reactions. *J Invest Dermatol* **105**, 95S-98S.

Ince, M. N., Harnisch, B., Xu, Z., Lee, S. K., Lange, C., Moretta, L., Lederman, M. and Lieberman, J. (2004). Increased expression of the natural killer cell inhibitory receptor CD85j/ILT2 on antigen-specific effector CD8 T cells and its impact on CD8 T-cell function. *Immunology* **112**, 531-42.

Ingelman-Sundberg, M. (2001). Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res* **482**, 11-9.

J

Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Kanazawa, Y., Hiramatsu, N. and Hayashi, N. (2004). Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* **173**, 6072-81.

K

Kahle, P., Wernet, P., Rehbein, A., Kumbier, I. and Pawelec, G. (1981). Cloning of functional human T lymphocytes by limiting dilution: impact of filler cells and interleukin 2 sources on cloning efficiencies. *Scand J Immunol* **14**, 493-502.

Kalina, U., Kauschat, D., Koyama, N., Nuernberger, H., Ballas, K., Koschmieder, S., Bug, G., Hofmann, W. K., Hoelzer, D. and Ottmann, O. G. (2000). IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. *J Immunol* **165**, 1307-13.

Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H - 2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**, 675-8.

Kikuchi-Maki, A., Yusa, S., Catina, T. L. and Campbell, K. S. (2003). KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J Immunol* **171**, 3415-25.

Komatsu, T., Moriya, N. and Shiohara, T. (1996). T cell receptor (TCR) repertoire and function of human epidermal T cells: restricted TCR V alpha-V beta genes are utilized by T cells residing in the lesional epidermis in fixed drug eruption. *Clin Exp Immunol* **104**, 343-50.

Kuechler, P. C., Britschgi, M., Schmid, S., Hari, Y., Grabscheid, B. and Pichler, W. J. (2004). Cytotoxic mechanisms in different forms of T-cell-mediated drug allergies. *Allergy* **59**, 6 13-22.

Kurago, Z. B., Lutz, C. T., Smith, K. D. and Colonna, M. (1998). NK cell natural cytotoxicity and IFN-gamma production are not always coordinately regulated: engagement of DX9 KIR+ NK cells by HLA-B7 variants and target cells. *J Immunol* **160**, 1573-80.

Kuttruff, S., Koch, S., Kelp, A., Pawelec, G., Rammensee, H. G. and Steinle, A. (2008). NKp80 defines and stimulates a reactive subset of CD8 T cells. *Blood*.

- Lanier, L. L.** (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* **16**, 359-93.
- Lanier, L. L. and Bakker, A. B.** (2000). The ITAM-bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function. *Immunol Today* **21**, 611-4.
- Le Cleach, L., Delaire, S., Boumsell, L., Bagot, M., Bourgault-Villada, I., Bensussan, A. and Roujeau, J. C.** (2000). Blister fluid T lymphocytes during toxic epidermal necrolysis are functional cytotoxic cells which express human natural killer (NK) inhibitory receptors. *Clin Exp Immunol* **119**, 225-30.
- Lee, N., Goodlett, D. R., Ishitani, A., Marquardt, H. and Geraghty, D. E.** (1998a). HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* **160**, 495 1-60.
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M. and Geraghty, D. E.** (1998b). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5199-204.
- LeMaoult, J., Le Discorde, M., Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C., McCluskey, J. and Carosella, E. D.** (2003). Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens* **62**, 273-84.
- Lepin, E. J., Bastin, J. M., Allan, D. S., Roncador, G., Braud, V. M., Mason, D. Y., van der Merwe, P. A., McMichael, A. J., Bell, J. I., Powis, S. H. et al.** (2000). Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur J Immunol* **30**, 3552-61.
- Lerch, M. and Pichler, W. J.** (2004). The immunological and clinical spectrum of delayed drug-induced exanthems. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **4**, 411-9.
- Leyva, L., Torres, M. J., Posadas, S., Blanca, M., Besso, G., O'Valle, F., del Moral, R. G., Santamaria, L. F. and Juarez, C.** (2000). Anticonvulsant-induced toxic epidermal necrolysis: monitoring the immunologic response. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 157-65.
- Llano, M., Lee, N., Navarro, F., Garcia, P., Albar, J. P., Geraghty, D. E. and Lopez-Botet, M.** (1998). HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* **28**, 2854-63.
- Long, E. O., Burshtyn, D. N., Clark, W. P., Peruzzi, M., Rajagopalan, S., Rojo, S., Wagtmann, N. and Winter, C. C.** (1997). Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev* **155**, 135-44.
- Long, E. O. and Rajagopalan, S.** (2002). Stress signals activate natural killer cells. *J Exp Med* **196**, 1399-402.
- Lopez-Botet, M. and Bellon, T.** (1999). Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* **11**, 301-7.
- Lopez-Botet, M., Bellon, T., Llano, M., Navarro, F., Garcia, P. and de Miguel, M.** (2000). Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum Immunol* **61**, 7-17.

- Luque, I., Leyva, L., Jose Torres, M., Rosal, M., Mayorga, C., Segura, J. M., Blanca, M. and Juarez, C.** (2001). In vitro T-cell responses to beta-lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy* **56**, 611-8.
- Luszczek, W., Manczak, M., Cislo, M., Nockowski, P., Wisniewski, A., Jasek, M. and Kusnierczyk, P.** (2004). Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS 1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol* **65**, 758-66. **M**
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W. and Porgador, A.** (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* **409**, 1055-60.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F.** (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H) 1 priming. *Nat Immunol* **5**, 1260-5.
- Mauri-Hellweg, D., Bettens, F., Mauri, D., Brander, C., Hunziker, T. and Pichler, W. J.** (1995). Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. *J Immunol* **155**, 462-72.
- Mayorga, C., Obispo, T., Jimeno, L., Blanca, M., Moscoso del Prado, J., Carreira, J., Garcia, J. J. and Juarez, C.** (1995). Epitope mapping of beta-lactam antibiotics with the use of monoclonal antibodies. *Toxicology* **97**, 225-34.
- Mela, C. M., Burton, C. T., Imami, N., Nelson, M., Steel, A., Gazzard, B. G., Gotch, F. M. and Goodier, M. R.** (2005). Switch from inhibitory to activating NKG2 receptor expression in HIV- 1 infection: lack of reversion with highly active antiretroviral therapy. *Aids* **19**, 1761-9.
- Meresse, B., Curran, S. A., Ciszewski, C., Orbelyan, G., Setty, M., Bhagat, G., Lee, L., Tretiakova, M., Semrad, C., Kistner, E. et al.** (2006). Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med* **203**, 1343-55.
- Merlo, A., Saverino, D., Tenca, C., Grossi, C. E., Bruno, S. and Ciccone, E.** (2001). CD85/LIR-1/ILT2 and CD152 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) inhibitory molecules down-regulate the cytolytic activity of human CD4+ T-cell clones specific for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **69**, 6022-9.
- Merlo, A., Tenca, C., Fais, F., Battini, L., Ciccone, E., Grossi, C. E. and Saverino, D.** (2005). Inhibitory receptors CD85j, LAIR- 1, and CD 152 down-regulate immunoglobulin and cytokine production by human B lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**, 705-12.
- Mingari, M. C., Pietra, G. and Moretta, L.** (2005). Human cytolytic T lymphocytes expressing HLA class-I-specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* **17**, 312-9.
- Mingari, M. C., Ponte, M., Cantoni, C., Vitale, C., Schiavetti, F., Bertone, S., Bellomo, R., Cappai, A. T. and Biassoni, R.** (1997). HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells. *Int Immunol* **9**, 485-91.

- Mingari, M. C., Schiavetti, F., Ponte, M., Vitale, C., Maggi, E., Romagnani, S., Demarest, J., Pantaleo, G., Fauci, A. S. and Moretta, L.** (1996). Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12433-8.
- Mingari, M. C., Vitale, C., Cambiaggi, A., Schiavetti, F., Melioli, G., Ferrini, S. and Poggi, A.** (1995). Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *Int Immunol* **7**, 697-703.
- Monsivais-Urenda, A., Nino-Moreno, P., Abud-Mendoza, C., Baranda, L., Layseca-Espinosa, E., Lopez-Botet, M. and Gonzalez-Amaro, R.** (2007). Analysis of expression and function of the inhibitory receptor ILT2 (CD85j/LILRB 1/LIR- 1) in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun* **29**, 97-105.
- Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G. and Moretta, L.** (2008). NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* **15**, 226-33.
- Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C. and Moretta, L.** (1995). Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* **182**, 875-84.
- Moretta, L., Ciccone, E., Mingari, M. C., Biassoni, R. and Moretta, A.** (1994). Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv Immunol* **55**, 34 1-80.
- Moretta, L., Romagnani, C., Pietra, G., Moretta, A. and Mingari, M. C.** (2003). NK-CTLs, a novel HLA-E-restricted T-cell subset. *Trends Immunol* **24**, 136-43.
- Morris, M. A. and Ley, K.** (2004). Trafficking of natural killer cells. *Curr Mol Med* **4**, 431-8. N
- Nakajima, H. and Colonna, M.** (2000). 2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum Immunol* **61**, 39-43.
- Nassif, A., Bensussan, A., Bousmell, L., Deniaud, A., Moslehi, H., Wolkenstein, P., Bagot, M. and Roujeau, J. C.** (2004a). Toxic epidermal necrolysis: effector cells are drugspecific cytotoxic T cells. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 1209-15.
- Nassif, A., Bensussan, A., Dorothee, G., Mami-Chouaib, F., Bachot, N., Bagot, M., Bousmell, L. and Roujeau, J. C.** (2002). Drug specific cytotoxic T-cells in the skin lesions of a patient with toxic epidermal necrolysis. *J Invest Dermatol* **118**, 728-33.
- Nassif, A., Moslehi, H., Le Gouvello, S., Bagot, M., Lyonnet, L., Michel, L., Bousmell, L., Bensussan, A. and Roujeau, J. C.** (2004b). Evaluation of the potential role of cytokines in toxic epidermal necrolysis. *J Invest Dermatol* **123**, 850-5.
- Navarro, F., Llano, M., Bellon, T., Colonna, M., Geraghty, D. E. and Lopez-Botet, M.** (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* **29**, 277-83.

Nickoloff, B. J., Bonish, B., Huang, B. B. and Porcelli, S. A. (2000). Characterization of a T cell line bearing natural killer receptors and capable of creating psoriasis in a SCID mouse model system. *J Dermatol Sci* **24**, 2 12-25.

Nishioka, Y., Nishimura, N., Suzuki, Y. and Sone, S. (2001). Human monocyte-derived and CD83(+) blood dendritic cells enhance NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* **31**, 2633-41.

O

O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L. and von Andrian, U. H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* **7**, 507-16.

P

Papazahariadou, M., Athanasiadis, G. I., Papadopoulos, E., Symeonidou, I., Hatzistilianou, M., Castellani, M. L., Bhattacharya, K., Shanmugham, L. N., Conti, P. and Frydas, S. (2007). Involvement of NK cells against tumors and parasites. *Int J Biol Markers* **22**, 144-53.

Park, G. M., Lee, S., Park, B., Kim, E., Shin, J., Cho, K. and Ahn, K. (2004). Soluble HLAG generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 606-11.

Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Dondero, A., Lazzari, E., Lasagni, L., Martini, S., Rivera, P. et al. (2006). Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD 112) and poliovirus receptor (CD 155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* **107**, 2030-6.

Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E. and Valiante, N. M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* **195**, 335-41.

Pirmohamed, M., Breckenridge, A. M., Kitteringham, N. R. and Park, B. K. (1998). Adverse drug reactions. *Bmj* **316**, 1295-8.

Pisegna, S., Pirozzi, G., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. and Palmieri, G. (2004). p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood* **104**, 4157-64.

Pittet, M. J., Speiser, D. E., Valmori, D., Cerottini, J. C. and Romero, P. (2000). Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J Immunol* **164**, 1148-52.

Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P. et al. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the Nkp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* **27**, 965-74.

Posadas, S. J., Padial, A., Torres, M. J., Mayorga, C., Leyva, L., Sanchez, E., Alvarez, J., Romano, A., Juarez, C. and Blanca, M. (2002). Delayed reactions to drugs show levels of perforin, granzyme B, and Fas-L to be related to disease severity. *J Allergy Clin Immunol* **109**, 155-61.

Bibliografia

Y

Posadas, S. J. and Pichler, W. J. (2007). Delayed drug hypersensitivity reactions - new concepts. *Clin Exp Allergy* **37**, 9 89-99.

R

Rajagopalan, S., Bryceson, Y. T., Kuppusamy, S. P., Geraghty, D. E., van der Meer, A., Joosten, I. and Long, E. O. (2006). Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol* **4**, e9.

Rajagopalan, S., Fu, J. and Long, E. O. (2001). Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD 158d) in resting NK cells. *J Immunol* **167**, 1877-81.

Rajagopalan, S., Rajagopalan, S. and Long, E. O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* **189**, 1093-100.

Ravetch, J. V. and Lanier, L. L. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84-9.

Roujeau, J. C. (2005). Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. *Toxicology* **209**, 123-9.

S

Saiag, P., Caumes, E., Chosidow, O., Revuz, J. and Roujeau, J. C. (1992). Drug-induced toxic epidermal necrolysis (Lyell syndrome) in patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Am Acad Dermatol* **26**, 5 67-74.

Saverino, D., Fabbi, M., Ghiotto, F., Merlo, A., Bruno, S., Zarccone, D., Tenca, C., Tiso, M., Santoro, G., Anastasi, G. et al. (2000). The CD85/LIR-1/ILT2 inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions. *J Immunol* **165**, 3742-55.

Saverino, D., Merlo, A., Bruno, S., Pistoia, V., Grossi, C. E. and Ciccone, E. (2002). Dual effect of CD85/leukocyte Ig-like receptor-1/Ig-like transcript 2 and CD 152 (CTLA-4) on cytokine production by antigen-stimulated human T cells. *J Immunol* **168**, 207-15.

Schmidt, K. N., Leung, B., Kwong, M., Zarembek, K. A., Satyal, S., Navas, T. A., Wang, F. and Godowski, P. J. (2004). APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol* **172**, 138-43.

Schnyder, B., Burkhart, C., Schnyder-Frutig, K., von Greyerz, S., Naisbitt, D. J., Pirmohamed, M., Park, B. K. and Pichler, W. J. (2000). Recognition of sulfamethoxazole and its reactive metabolites by drug-specific CD4+ T cells from allergic individuals. *J Immunol* **164**, 6647-54.

Seo, N., Tokura, Y., Ishihara, S., Takeoka, Y., Tagawa, S. and Takigawa, M. (2000). Disordered expression of inhibitory receptors on the NK1-type natural killer (NK) leukaemic cells from patients with hypersensitivity to mosquito bites. *Clin Exp Immunol* **120**, 413-9.

Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V. M., Allan, D. S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B. et al. (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 885 6-61.

Bibliografia

Y

Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L. and Moretta, A. (2004). CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Tolllike receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10116-21.

Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L. and Moretta, A. (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* **29**, 1656-66.

Spits, H., Lanier, L. L. and Phillips, J. H. (1995). Development of human T and natural killer cells. *Blood* **85**, 2654-70.

Suto, Y., Ishikawa, Y., Kasahara, M., Kasai, F., Yabe, T., Akaza, T. and Juji, T. (1998). Gene arrangement of the killer cell inhibitory receptor family on human chromosome 19q13.4 detected by fiber-FISH. *Immunogenetics* **48**, 235-41.

Suzuki, Y., Inagi, R., Aono, T., Yamanishi, K. and Shiohara, T. (1998). Human herpesvirus 6 infection as a risk factor for the development of severe drug-induced hypersensitivity syndrome. *Arch Dermatol* **134**, 1108-12.

T

Tenca, C., Merlo, A., Merck, E., Bates, E. E., Saverino, D., Simone, R., Zarccone, D., Trinchieri, G., Grossi, C. E. and Ciccone, E. (2005). CD85j (leukocyte Ig-like receptor-1/Ig-like transcript 2) inhibits human osteoclast-associated receptor-mediated activation of human dendritic cells. *J Immunol* **174**, 6757-63.

Terrazzano, G., Zanzi, D., Palomba, C., Carbone, E., Grimaldi, S., Pisanti, S., Fontana, S., Zappacosta, S. and Ruggiero, G. (2002). Differential involvement of CD40, CD80, and major histocompatibility complex class I molecules in cytotoxicity induction and interferon-gamma production by human natural killer effectors. *J Leukoc Biol* **72**, 305-11.

Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* **47**, 187-376.

U

Ugolini, S. and Vivier, E. (2000). Regulation of T cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* **12**, 295-300.

Ulbrecht, M., Honka, T., Person, S., Johnson, J. P. and Weiss, E. H. (1992). The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. *J Immunol* **149**, 2945-53.

V

Vales-Gomez, M., Reyburn, H. T., Erskine, R. A., Lopez-Botet, M. and Strominger, J. L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo J* **18**, 4250-60.

Bibliografia

Y

- van der Meer, A., Lukassen, H. G., van Lierop, M. J., Wijnands, F., Mosselman, S., Braat, D. D. and Joosten, I.** (2004). Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod* **10**, 189-95.
- Vitale, M., Carlomagno, S., Falco, M., Pende, D., Romeo, E., Rivera, P., Della Chiesa, M., Mavilio, D. and Moretta, A.** (2004). Isolation of a novel KIR2DL3-specific mAb: comparative analysis of the surface distribution and function of KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2. *Int Immunol* **16**, 1459-66.
- Vitale, M., Castriconi, R., Parolini, S., Pende, D., Hsu, M. L., Moretta, L., Cosman, D. and Moretta, A.** (1999). The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1 + NK cell clones. *Int Immunol* **11**, 29-35.
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Arico, M., Moretta, L. and Moretta, A.** (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* **106**, 566-71.
- von Greyerz, S., Zanni, M., Schnyder, B. and Pichler, W. J.** (1998). Presentation of non-peptide antigens, in particular drugs, to specific T cells. *Clin Exp Allergy* **28 Suppl 4**, 7-11.
- von Greyerz, S., Zanni, M. P., Frutig, K., Schnyder, B., Burkhart, C. and Pichler, W. J.** (1999). Interaction of sulfonamide derivatives with the TCR of sulfamethoxazole-specific human alpha beta+ T cell clones. *J Immunol* **162**, 595-602.

W

- Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K.** (2004). The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol* **34**, 81-90.
- Wainwright, S. D., Biro, P. A. and Holmes, C. H.** (2000). HLA-F is a predominantly empty, intracellular, TAP-associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern. *J Immunol* **164**, 3 19-28.
- Watzl, C., Stebbins, C. C. and Long, E. O.** (2000). NK cell inhibitory receptors prevent tyrosine phosphorylation of the activation receptor 2B4 (CD244). *J Immunol* **165**, 3545-8.
- Weltzien, H. U. and Padovan, E.** (1998). Molecular features of penicillin allergy. *J Invest Dermatol* **110**, 203-6.
- Wilson, M. J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S. and Trowsdale, J.** (2000). Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4778-83.

Bibliografía

Y

Yabe, T., McSherry, C., Bach, F. H., Fisch, P., Schall, R. P., Sondel, P. M. and Houchins, J. P. (1993). A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics* **37**, 455-60.

Yawalkar, N., Egli, F., Hari, Y., Nievergelt, H., Braathen, L. R. and Pichler, W. J. (2000). Infiltration of cytotoxic T cells in drug-induced cutaneous eruptions. *Clin Exp Allergy* **30**, 847-55.

Young, N. T., Uhrberg, M., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Parham, P. (2001). Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. *J Immunol* **166**, 3933-41.

Z

Zanni, M. P., Mauri-Hellweg, D., Brander, C., Wendland, T., Schnyder, B., Frei, E., von Greyerz, S., Bircher, A. and Pichler, W. J. (1997). Characterization of lidocainespecific T cells. *J Immunol* **158**, 1139-48.

Zanni, M. P., von Greyerz, S., Schnyder, B., Wendland, T. and Pichler, W. J. (1998). Allele-unrestricted presentation of lidocaine by HLA-DR molecules to specific alphabeta+ T cell clones. *Int Immunol* **10**, 507-15.

ANEXO
