

11261
Ej
16.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LAS
CELULAS DE LANGERHANS EPIDERMICAS
EN LAS AVES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(AREA MORFOLOGIA)
P R E S E N T A :
ARMANDO PEREZ TORRES



México, D. F.

1989

BALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

ASPECTOS HISTORICOS-----	1
TEORIAS ACERCA DEL ORIGEN DE LAS CELULAS DE LANGERHANS	
Teoría Neural-----	3
Teoría Melanocítica-----	5
Teoría Mesodérmica-----	7
HISTOQUIMICA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS	
Impregnaciones Aúricas-----	12
Impregnaciones Argénticas-----	13
Tinciones Supravitales-----	13
Métodos de ioduro de osmio y zinc-iodo-osmio-----	14
Histofluorescencia para L-dopa, dopamina y noradrenalina-----	15
Histoquímica Enzimática	
Adenosintrifosfatasa-----	17
Esterasa no específica-----	21
Fosfatasa Alcalina-----	23
Aminopeptidasa-----	25
α -D-Manosidasa-----	25
β -Glucuronidasa-----	26
Lisozima, α -1-Antitripsina, α -1-Antiquimotripsina-----	27
Colinesterasa-----	28
Peroxidasa Endógena-----	29
Lipasas-----	31
Fosfatasa Acida-----	31
Otras enzimas-----	31
Histoquímica de la captación de haptenos-----	32
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS-----	34
MORFOLOGIA, FORMACION Y FUNCION DEL GRANULO DE LAS CELULAS DE LANGERHANS-----	43
Formación del Gránulo de las Células de Langerhans-----	52
EL SISTEMA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS	
Células de Langerhans, Células Veladas y Células Interdigitantes-----	62

Células de Langerhans y Células Dendríticas de Steiman y Cohn-----	73
Células de Langerhans y Células Dendríticas Foliculares-----	84
Células de Langerhans Intraepiteliales-----	91
CELULAS DE LANGERHANS EN LOS VERTEBRADOS NO MAMIFEROS-----	95
SISTEMA TEGUMENTARIO DE LAS AVES DOMESTICAS	
Estructura General-----	99
Ultraestructura-----	102
Anexos epidérmicos de las aves-----	105
Pigmentación de las aves-----	107
Funciones de la piel-----	110
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	113
HIPOTESIS-----	114
OBJETIVOS-----	115
DISEÑO EXPERIMENTAL-----	116
MATERIAL Y METODOS-----	119
RESULTADOS-----	126
DISCUSION-----	132
CONCLUSIONES-----	144
REFERENCIAS-----	145

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS
EPIDERMICAS EN LAS AVES

ASPECTOS HISTORICOS.

Paul Langerhans nació en 1847 y vivió durante una época en la que el interés por la biología y la medicina era muy importante. Su padre era doctor y su madre era prima del embriólogo e histólogo Franz Keibel. Es posible que estos antecedentes hayan influido en él para dedicarse a la medicina y en particular a las ciencias morfológicas. Antes de llegar a Berlín, Langerhans estudió en Jena teniendo como maestro a Ernst Haeckel cuyas ideas determinaron el interés de Paul por la zoología.

En 1868, a la edad de 21 años, mientras estudiaba el sistema nervioso de la piel bajo la guía de Rudolf Virchow y Julius Cohnheim, Langerhans evidenció las células que hoy llevan su nombre, describiéndolas como "cuerpos negros, los cuales son muy distintos de las células epiteliales". A pesar de los recursos limitados de la época, identificó la localización suprabasal de estas células y sus dendritas, cada una con una dilatación en forma de botón en su extremo; observó que algunas dendritas alcanzaban la capa córnea, mientras que otras se extendían a través de las capas inferiores de la epidermis.

Únicamente dos características que Langerhans atribuyó a estas células no han sido aceptadas: que forman parte del sistema nervioso y que sus dendritas alcanzan la dermis para conectarse con el sistema nervioso.

En 1869, Langerhans informó de la presencia de un tipo celular que forma cúmulos en el páncreas del conejo, los islotes de Langerhans, hallazgo por el cual es ampliamente conocido dentro de las ciencias médicas.

En 1874, por razones de salud, Paul Langerhans se trasladó a la isla portuguesa de Madeira, donde falleció en 1888 a los 41 años de edad. Durante ese período publicó varios artículos acerca de la fauna marina de Madeira que constituyen una importante contribución a la zoología. Por ello, no debe sorprendernos el gran número de especies que llevan el nombre de Langerhans, el mismo de las células dendríticas y de los islotes pancreáticos.¹⁻³

TEORIAS ACERCA DEL ORIGEN DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

Desde su primera descripción, el origen y función de las células de Langerhans (CL) han sido motivos de controversia. Inicialmente fueron consideradas como células nerviosas y luego como un melanocito desgastado o inactivo; se pensó que eran artefactos de tinción, ya que las técnicas empleadas para su visualización eran caprichosas y de resultados inciertos. A esto se agregó que las técnicas de tinción de rutina, como la hematoxilina y eosina, no las teñían y por eso muchos investigadores dudaron que las CL realmente existieran. Seguramente todo esto explicaría el porqué se haya escrito tan poco sobre las CL durante más de medio siglo después de su descubrimiento. Hasta 1968 dos corrientes teóricas pretendían explicar el origen y función de las CL: la teoría neural y la teoría melanocítica.

TEORIA NEURAL. Además de hacer la descripción morfológica de las células epidérmicas que llevan su nombre, Langerhans especuló acerca de su origen o naturaleza. Pensó que se trataba de células nerviosas, seguramente influido por su morfología dendrítica y por su afinidad a una impregnación a base de cloruro de oro diseñada por J. F. Cohnheim para evidenciar elementos del tejido nervioso. En 1928* esta idea se enriqueció al ser consideradas las CL como receptores al tacto y al dolor, como precursores de las

células de Merkel, como células ganglionares autonómicas ó como células de Schwann. Posteriormente, otros investigadores europeos siguieron sosteniendo que las CL eran elementos neurosensoriales intraepidérmicos o células con funciones neurovegetativas y neurohormonales.^{5,6} En 1962, se informó que las células dendríticas de la epidermis de origen neural (CL y melanocitos) mostraban actividad de ATPasa, al igual que algunas extensiones intraepidérmicas de nervios localizados en la dermis, con las que establecían contactos o conexiones.⁷ En este estudio se especuló sobre el posible significado funcional de la ATPasa en las células epidérmicas sugiriéndose que, como en otros sitios, la enzima favorecía la conducción de impulsos nerviosos al actuar como bomba de iones y para el almacenamiento y liberación de catecolaminas, posiblemente por los melanocitos. Sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado satisfactoriamente una relación morfológica entre las CL y terminaciones o fibras nerviosas.

Recientemente ha sido identificado, por inmunofluorescencia indirecta, un neuropéptido parecido a la somatostatina en células dendríticas OKT6 positivas en la dermis y epidermis de piel normal y de pacientes con urticaria pigmentosa.⁸ Esto llama poderosamente la atención ya que sugiere que las CL tienen alguna relación, más que ontogénica, funcional, con el sistema nervioso.

En conclusión, no hay evidencias críticas que prueben

que las CL derivan o son elementos del sistema nervioso. Por ahora, su posible papel neurohormonal no está suficientemente fundamentado ni descartado, siendo muy atractivo para futuras investigaciones.

TEORIA MELANOCITICA. La observación de cortes de piel procesados para ver CL y melanocitos da la impresión de que hay una correspondencia uno a uno entre los melanocitos basales y las CL suprabasales. Debido a ésto se pensó que ambos tipos celulares pertenecían a la misma genealogía. Se postulaba que las CL eran melanocitos desgastados,^{7,10} melanocitos inmaduros o postdivisionales.^{11,12} Aunque se identificaron ultraestructuralmente características comunes entre los melanocitos y las CL, cada tipo celular presenta un organelo único, el melanosoma y el gránulo de las CL o gránulo de Birbeck, respectivamente.¹³ La descripción de células epidérmicas con ambos organelos hizo suponer que entre las CL y los melanocitos había células intermedias que indicaban la relación entre los dos tipos celulares.¹¹ Poco después surgieron evidencias que demostraban que la densidad de la población de melanocitos tenía variaciones considerables mientras que la de las CL era muy constante en casi todas las regiones de la piel.¹⁴ En este sentido, la supuesta relación numérica entre melanocitos y CL no podía ser considerada como una evidencia contundente para sostener la teoría del melanocito desgastado.

De particular importancia para aclarar la hipótesis del origen de las CL a partir de melanocitos resultarían los experimentos de Mary Rawles,¹⁵ quién demostró concluyentemente el origen de los melanocitos a partir de las crestas neurales. Simultáneamente, Masson¹⁶ postuló que las CL eran melanocitos desgastados viajando a través de los estratos epidérmicos en vías de descamación; al parecer, Merkel (citado por Billingham¹⁰) ya había sugerido algo semejante. Durante muchos años esta teoría predominó en la mente de varios investigadores. Una década después de que Masson la propusiera, las evidencias circunstanciales que la apoyaban recibirían un desafío verdaderamente crítico. Silvers¹⁴ aplicó las experiencias de Rawles¹⁵ y encontró células dendríticas aureofílicas en la piel de ratones experimentalmente privados de crestas neurales y concluyó que las CL no se originaban de éstas ni tenían relación con los melanocitos. Posteriormente, estos resultados fueron reproducidos en experimentos similares, empleándose la microscopía electrónica de transmisión para identificar a las CL en la piel de los primordios de la extremidades de ratón deprivada de sus componentes originados en las crestas neurales; las conclusiones de Silvers fueron confirmadas rotundamente.¹⁷

Los estudios enzimológicos o de histoquímica enzimática (ver capítulo correspondiente) también son evidencias en contra de la teoría del melanocito desgastado, ya que

demuestran que la CL tiene una intensa actividad hidrolítica, que está viva y que no es una célula degenerada o desgastada; por otro lado, emparenta a las CL con otras células con las que comparte estas actividades enzimáticas. La incorporación de timidina tritiada por las CL es indicativo de que sintetizan DNA, que tienen capacidad de autorreplicarse y por ello es poco probable que corresponda a un melanocito "desgastado".^{18,19} Casi simultáneamente a los experimentos anteriores, se descubrió que las células proliferantes en la histiocitosis X presentaban un organelo citoplásmico característico,²⁰ semejante al gránulo de las CL.²¹ Esto resultaba sorprendente porque era una evidencia de la existencia de CL en sitios extraepidérmicos donde no existían melanocitos, y porque sugería una relación entre las CL y los histiocitos.

Así pues, transcurrieron cien años para que las CL adquirieran una identidad propia y para que el contenido de las investigaciones sobre esta célula tuviera un giro radical.

TEORIA MESODERMICA. Entre 1965 y 1975 se fueron acumulando un número considerable de evidencias acerca del posible origen mesodérmico de las CL. Fueron consideradas como células inmunocompetentes o como células que podían capturar materiales antigénicos.²² Ultraestructuralmente se identificaron células similares a las de Langerhans en

tejido normal y patológico. Así, las CL se evidenciaron en el timo,²³ en linfonodos²⁴ y en células de la histiocitosis X.^{20,21,25}

Poco después del inicio de la década de los 70, se observó que en las reacciones de hipersensibilidad retardada a alérgenos aplicados epicutáneamente, algunas células parecidas a linfocitos establecían contactos estrechos con las CL, además de que el número de estas aumentaban significativamente en los vasos linfáticos y en los linfonodos regionales.²⁶⁻²⁸ En 1976, Shelley y Juhlin²⁹ demostraron "in vitro" la afinidad de las CL por ciertas sustancias potencialmente alérgicas como algunos metales, aminas y aldehídos. Lo anterior hizo suponer que si las CL estaban involucradas en reacciones inmunológicas deberían poseer algunos marcadores característicos de las células con funciones inmunológicas conocidas. Entre 1977 y 1979, se demostró que las CL en humanos, cobayos y ratones, expresaban en su superficie receptores para el fragmento cristalizante (Fc) de la IgG y para el componente C3 del complemento, y también antígenos H-2 (HLA-A, B, C en humanos, región B en cobayos) e Ia (antígenos asociados a la respuesta inmune) codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).³⁰⁻³⁷ En conjunto, estos hallazgos indicaron que las CL tenían marcadores de superficie característicos, los cuales eran similares a los de las células de la serie monocito-macrófago, sugiriendo el origen

mesodérmico de aquellas.

Un año importante en la historia de las CL fue 1979, cuando Katz, Tamaki y Sachs demostraron definitivamente que estas células derivaban y eran continuamente sustituidas por células precursoras móviles provenientes de la médula ósea. En sus experimentos se trasplantó piel de un ratón A/J a ratones híbridos F1 (A/J x BALB/c) y, después de períodos variables, se determinó la especificidad de los antígenos Ia y H-2 de las células trasplantadas con el objeto de definir si los queratinocitos y las CL tenían especificidad del donador o del receptor. Para esto se empleó una técnica de inmunofluorescencia indirecta y simultáneamente se hicieron pruebas de formación de rosetas para el Fc de la IgG. A los 11 días del injerto, se observó un incremento gradual en el porcentaje de CL con características del receptor (el antisuero empleado reaccionaba sólo contra el antígeno Ia.8 de las CL de ratones BALB/c y de los híbridos F1, pero no con el antígeno de las CL del donador A/J), mientras que los queratinocitos continuaron siendo del donador. El porcentaje de células formadoras de rosetas (Fc-IgG positivas, Ia.8 positivas) también se incrementó de un 61% a los 11 días hasta un 100% a los 49 días después del injerto. Esto sugería que las CL Ia.8 positivas y Fc IgG positivas, presentes en la piel trasplantadas, se originaban de células móviles del receptor. Sin embargo, no se excluía la posibilidad de que

las CL de la piel trasplantada se hubieran originado a partir de las CL de la epidermis que rodeaba al injerto.²² Para aclarar esta duda se estudió la especificidad de los antígenos Ia y H-2 en las células epidermicas de ratones irradiados a los que posteriormente se les injertó médula ósea. A ratones C57B1/6 irradiados con 750 R se les transfundieron células de la médula ósea de un ratón BALB/c (sistema alogénico) y a los 62 días después de la quimerización se encontró que más del 45% de las CL tenían especificidad del donador (BALB/c). En un segundo experimento, ratones B10.A irradiados con 900 R recibieron intravenosamente células de la médula ósea de un ratón F1 (B10 x B10.A) (sistema semialogénico) y se determinó que a los 85 días de la quimerización, el 80% de las CL eran del donador de médula ósea. Ultraestructuralmente se observó que las células formadoras de rosetas tenían todas las características de las CL. En ambos sistemas experimentales, los queratinocitos de los animales quiméricos tuvieron especificidad del receptor. La conclusión obvia fue que las CL epidérmicas derivaban y eran continuamente repobladas por precursores móviles presentes en la médula ósea trasplantada.²³ La naturaleza de dichos precursores no fue determinada, especulándose que la célula más probable fuera el promonocito, ya que las CL expresan marcadores de superficie similares o idénticos a los de las células de la serie monocito-macrófago.²⁴

En 1984, Volc-Platzer y colaboradores obtuvieron evidencias del origen de las CL humanas a partir de células presentes en la médula ósea. Una mujer de 19 años de edad con anemia aplástica, secundaria a tratamiento con cloramfenicol, recibió un aloinjerto de médula ósea de su hermano. A los 150 días del procedimiento, la paciente desarrolló un síndrome parecido al liquen plano que progresó hasta una forma esclerodermoide, afectando únicamente la piel. A los 614 días se tomaron biopsias de piel y se procesaron para estudios inmunohistológicos con OKT6 y empleando un anticuerpo marcado con rojo-Texas. Los cortes de piel también fueron expuestos a mostaza de quinacrina para verlos al microscopio de fluorescencia. Se observó que varias células OKT6 positivas, del receptor femenino, presentaban cuerpos Y en sus núcleos. El cuerpo Y es un segmento distal del cromosoma Y que fluoresce brillantemente y es visible después de la tinción de núcleos en interfase y metafase con mostaza de quinacrina. De esta manera pudieron concluir que las CL de la paciente se habían originado de células presentes en la médula ósea que recibió de su hermano, con lo que se confirmaban los primeros estudios en ratones quiméricos sobre el origen de las CL.^{37,40}

HISTOQUIMICA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

IMPREGNACIONES AURICAS. Las CL fueron evidenciadas por primera vez con una técnica a base de cloruro de oro diseñada por Cohnheim para estudiar elementos nerviosos. Desde un principio se notó que el procedimiento daba resultados variables, siendo más exitoso cuando se empleaba piel de cadáver de 2 días. Esto motivó que las CL fueran consideradas como artefactos técnicos, provocados por los procesos autolíticos de la piel estudiada.²⁹

Quienes han empleado la técnica de Cohnheim opinan que, aunque no produce maceración ni distorsión celulares, no revela con fineza los procesos dendríticos de las CL en comparación a la variante de la técnica introducida por Gairns.^{10,41} Ambas técnicas comparten la variabilidad de sus resultados, para lo cual no hay explicación, ya que los cortes de piel tratados de la misma manera pueden mostrar marcadas diferencias locales en el grado de impregnación de las CL.^{42,43}

En 1968, Zelickson y Mottaz⁴⁴ demostraron ultraestructuralmente, en la piel humana, que las células fuertemente impregnadas con oro eran idénticas a las CL y claramente diferenciables de los queratinocitos y melanocitos. El depósito de las partículas de oro se localizó alrededor de la cubierta nuclear y finamente en el citoplasma, sin tener una ubicación específica en alguno de

los organelos. La introducción del tiosulfato de oro para estudiar las CL en láminas epidérmicas de cobayo parece ofrecer resultados más consistentes y reproducibles, comparables a otras técnicas de mayor difusión como la demostración histoquímica de adenosintrifosfatasa.⁴⁵

La afinidad de las CL por tinciones a base de metales, en este caso por el oro, no parece ser una casualidad. El cloruro de oro es un sensibilizador moderadamente potente que puede inducir hipersensibilidad de contacto, situación en que las CL tienen una destacada participación como células presentadoras de antígenos.

IMPREGNACION ARGENTICA. La utilización de la plata para estudiar a las CL ha tenido poca difusión porque impregna a otros elementos cutáneos como melanocitos y terminaciones nerviosas. Sin embargo, se ha informado que entre el estrato basal y el estrato granuloso de la piel del cobayo, existe una población de células dendríticas, visibles con el método de impregnación con plata de Holmes, que morfológicamente corresponden a las CL.¹⁰

TINCIONES SUPRAVITALES. Las CL tienen afinidad por algunos colorantes quinona-íminas como el azul de metileno y el azul brillante de cresilo. Cuando se procesa epidermis separada de la dermis con una solución diluida y débilmente alcalina de estos colorantes, pueden observarse células

dendríticas altamente ramificadas en los estratos superficiales de la epidermis, morfológicamente semejantes a las CL impregnadas con cloruro de oro. Estas técnicas no han sido muy empleadas porque tienen melanocitos y terminaciones nerviosas.⁴⁶

MÉTODOS DEL IODURO DE OSMIO Y DEL ZINC-IODO-OSMIO (ZIO). Las propiedades tintoriales de una mezcla de ácido ósmico y ioduro de potasio fueron estudiadas primeramente por Champy en 1913,⁴⁴ utilizándose para el estudio de fibras nerviosas. En 1958, Niebauer y Weidmann emplearon la técnica y demostraron CL.⁴⁷ Un año después, en 1959, Maillet modificó la técnica de Champy, proponiendo el uso de la mezcla formada por tetróxido de osmio-ioduro de zinc,⁴⁸ siendo empleada nuevamente por Niebauer y colaboradores en 1969, para demostrar que las CL de la piel humana normal y de pacientes con histiocitosis, presentan sitios reactivos al ZIO en la cubierta nuclear, en el complejo de Golgi y, particularmente, en el gránulo de las CL; con microscopía fotónica también demostraron el depósito selectivo de la mezcla ZIO en células dendríticas epidérmicas, las CL, fácilmente distinguibles de los queratinocitos.⁴⁹

En 1978, Rodríguez y Caorsi, realizan cuatro modificaciones a la técnica convencional del ZIO y lograron la tinción selectiva de las CL en humanos, demostrando la afinidad por estos metales de algunos organelos,

especialmente del gránulo de las CL del que proporcionaron una detallada descripción ultraestructural.²⁰

La mezcla Z10 ha sido aplicada a láminas epiteliales del exocérnix humano, obteniéndose una tinción excelente de las CL cuyas características ultraestructurales son idénticas a las CL epidérmicas.²¹

HISTOFLUORESCENCIA PARA L-DOPA, DOPAMINA Y NORADRENALINA. Las CL de humanos y cobayos albinos tienen la capacidad de acumular y retener aminoácidos como la L-hidroxitifenilalanina (L-dopa)²² y algunas catecolaminas como la dopamina y la noradrenalina²³ reveladas por el método de Falck, Hillarp, Thieme y Torp.²⁴ Las CL aparecen en una posición suprabasal, con sus procesos dendríticos dirigidos hacia la superficie terminando en una pequeña dilatación en forma de botón. Algunas células dendríticas de la dermis, indistinguibles de las CL, también se ponen en evidencia con esta técnica.

Los melanocitos pueden mostrar fluorescencia debido a su contenido natural de cisteinildopa; sin embargo, pierden la fluorescencia al lavarse con el amortiguador bicarbonato Ringer-Krebs después de la incubación en L-dopa. Además, el fluoróforo de cisteinildopa, inducido por el formaldehído, tiene su máximo de excitación/emisión de 430/490 nm, lo que permite distinguirlo del fluoróforo de L-dopa que es de 410/480, por lo que el método puede considerarse sensible y

selectivo para la visualización de las CL.²²

El método de L-dopa ha sido empleado en el estudio de la piel de pacientes con dermatitis de contacto alérgica, revelándose microlesiones formadas por acúmulos de células dendríticas fluorescentes en la epidermis y en la parte superior de la dermis que rodean a otras células redondas, con menor fluorescencia, parecidas a células mononucleares probablemente linfocitos.²³

La captación de aminas biogénicas, dopamina y noradrenalina, parece tener ciertas particularidades. Mientras que la fluorescencia de L-dopa se observa a través de toda la CL, hasta la más fina dendrita, la fluorescencia de las aminas está confinada a pequeños gránulos en el citoplasma, particularmente en la región perinuclear. Cuando se incuban cortes de piel en un medio que contiene L-dopa y las aminas, las CL muestran ambos patrones de fluorescencia, característicos para cada sustancia, lo que hace suponer que los mecanismos de captación operan independientemente y no interfieren uno con el otro.²⁴

El melanocito también capta dopamina, pero no el derivado β -hidroxilado de ésta, la noradrenalina, así que la noradrenalina sería la amina de elección para la visualización de las CL. Sin embargo, con tiempos de incubación menores de 30 minutos se evita que el melanocito capte la dopamina lo que debe considerarse cuando se utilice ésta para producir histofluorescencia de las CL.²⁵

El mecanismo de la captación de L-dopa y de las aminas aún no está completamente aclarado. Se sabe que las CL acumulan y retienen L-dopa, aún a concentraciones muy bajas del aminoácido en el medio de incubación, por medio de un transporte estereoespecífico, ya que las CL no captan otros aminoácidos de estructura parecida como D-dopa, dihidroxifenilserina, α -metildopa, metatirosina y 5-hidroxitriptofano. El transporte puede ser bloqueado o inhibido por otros aminoácidos como metionina, alanina, serina y norvalina. Algunas proteasas como papaína y tripsina deterioran la captación de L-dopa, quizás porque dañan a la proteína acarreadora de ésta, unida a la membrana de las CL. La inhibición de sulfhidrilos por N-etilmalimida y p-cloromercurifenilsulfonato también afecta la captación de L-dopa.²³

HISTOQUIMICA ENZIMATICA

ADENOSINTRIFOSFATASA. En 1962, Mustakallio²⁴ informó que los nervios papilares, sus extensiones intraepidérmicas, las CL y probablemente los melanocitos, podían evidenciarse, en la piel humana, empleando una reacción histoquímica para adenosintrifosfatasa (ATPasa), con el medio de Padykula y Hermann²⁵ o con el de Wachstein y Meisel.²⁷ Ese mismo año, en un trabajo semejante, Jarret y Riley²² informaron que las

células dendríticas de la piel humana eran ATPasa positivas y esterasa inespecífica negativas. En 1963, Bradshaw y colaboradores,¹⁰ al estudiar la actividad de ATPasa mitocondrial y no mitocondrial en cortes de piel humana, concluyeron, entre otras cosas, que las células dendríticas, "melanocitos activos y melanocitos desgastados o CL", presentaban actividad de ATPasa no mitocondrial resistente a periodos prolongados de fijación en formalina. En 1964, Wolff¹¹ demostró que en la epidermis del cobayo existen células dendríticas con actividad de nucleósido trifosfatasa y de aminopeptidasa, considerándolas como CL.

Hasta este momento no se había determinado el sitio celular de actividad de ATPasa ni si ésta era exclusiva de las CL o si los melanocitos u otras células epidérmicas también la exhibían. Para mediados de la década de los 60 ya se conocían los criterios ultraestructurales para identificar a las CL (ver capítulo correspondiente). Tomando en cuenta lo anterior, Wolff y Winkelmann, en 1967,¹² combinaron la histoquímica enzimática y la microscopía electrónica de transmisión y demostraron que la actividad de ATPasa epidérmica se localiza exclusivamente en la membrana plasmática de las CL. A partir de entonces, la histoquímica para ATPasa es considerada altamente específica para identificar a las CL epidérmicas, comparable a las técnicas inmunohistoquímicas para T6⁴⁰ y para Ia.⁴¹

La obtención de láminas epidérmicas fue empleada por

Billingham y Medawar¹⁰ para estudiar las diferentes células dendríticas de la epidermis, aunque nunca realizaron histoquímica para ATPasa. Para este fin, las láminas epidérmicas se obtuvieron con una solución de bromuro de sodio en piel de cobayo normal y tratado con radiación ultravioleta¹²⁻¹⁴ así como de paciente con vitiligo.¹⁵ El método de separación parecía alterar la actividad enzimática, dañaba a la epidermis y requería tiempos de incubación de hasta 1.5 horas.

En 1975, Mackenzie y Squier¹² introdujeron como medio de separación de láminas epidérmicas una solución balanceada de EDTA, ideada originalmente por Scaletta y MacCallum.¹⁷ Esto fue una contribución importante a la técnica para ATPasa ya que las láminas epidérmicas de ratones Balb/C se obtenían más rápido y requerían menos tiempo de incubación en el sustrato que las obtenidas con bromuro de sodio, lo que permitía preservar la morfología epidérmica y obtener una localización más precisa del producto de la reacción histoquímica. Algunas de las láminas sometidas a la técnica fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión observándose que el producto de la reacción histoquímica estaba localizado en el espacio extracelular que rodeaba a células dendríticas con características ultraestructurales de CL. Los resultados de este trabajo son, además, otra evidencia de la especificidad de la técnica para ATPasa en el estudio de las CL.

En 1977, Shelley y Juhlin²⁹ y Juhlin y Shelley³⁰ demostraron que la morfología y la afinidad "tintorial" de las CL puede ser modificadas por el método de separación de láminas epidérmicas. Esto debe tomarse en cuenta porque puede ser un factor de error muy importante en la interpretación de resultados al emplear láminas epidérmicas para estudiar a las CL.

Al inicio de la década de los 80, el método de ATPasa estaba plenamente difundido y aceptado. Sin embargo, se seguían haciendo modificaciones como las de Robin y Brandon³¹ quienes utilizaron el formol-cacodilato como fijador y aumentaron la concentración del sustrato en el medio de incubación. Compararon sus resultados con los de otros métodos^{32,33,34} y concluyeron que con sus modificaciones se lograba una excelente definición del cuerpo celular y de los procesos dendríticos de las CL epidérmicas de cobayo.

Recientemente se ha informado que las CL epidérmicas de roedores pueden ser demostradas con mayor especificidad y mejor definición al utilizar como sustrato el adenosindifosfato (ADP) en lugar del adenosin trifosfato (ATP).^{49,70} En realidad, algo semejante había sido observado, aunque no intencionalmente, por Farquhar y Palade⁷¹ en 1966, al estudiar la actividad de ATPasa en células epidérmicas de anfibios.

En la actualidad se acepta que la histoquímica

enzimática para ATPasa evidencia específicamente a las CL epidérmicas. La enzima es resistente a la fijación con formaldehído, está unida a la membrana celular de las CL y cataliza la hidrólisis de ATP y ADP (adenosinpolifosfatasa) en presencia de iones de plomo y magnesio para formar fosfato de plomo, el cual es visualizado al tratar las preparaciones con sulfuro de amonio para producir sulfato de plomo, de color negro, sobre la superficie de las CL. El método es particularmente útil cuando se aplica a láminas epidérmicas porque éstas permiten observar la distribución numérica y espacial de las CL.

ESTERASA NO ESPECÍFICA. La primera demostración histoquímica de la actividad de esterasa no específica en las CL corresponde a Jarret y Riley,⁷² quienes emplearon una modificación a la técnica con pararosanilina hexazotizada, introducida por Davis y Ornstein en 1959.⁷³ En la piel de la cola de ratones, demostraron células dendríticas epidérmicas y dérmicas esterasa inespecífica positivas, pero ATPasa negativas. En la piel humana sólo encontraron una banda de actividad de esterasa a nivel del estrato granuloso.

En 1966, Riley⁷⁴ estudió las propiedades histoquímicas de la esterasa inespecífica de las células dendríticas epidérmicas de la cola del ratón, demostrando que la enzima es una acetilesterasa dependiente de sulfhidrilo, que hidroliza únicamente naitil ésteres y que es inhibida por

fluoruros y organofosfatos. Ese mismo año, Campo-Aasen y Pearce⁷² realizaron una amplia investigación en torno a la actividad enzimática de las CL en cortes de piel y láminas epidérmicas de ratones albinos. No lograron demostrar actividad de las enzimas fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, aril sulfatasa, ubiquinonas y esterasa específica. Únicamente revelaron actividad de ATPasa y de esterasa inespecífica; para esta última, los mejores resultados fueron obtenidos con el método de Davis y Ornstein,⁷³ usando la pararosanilina como agente acoplador y el naftol AS nonoato como sustrato. Otros sustratos que dieron buenos resultados fueron el α -naftil acetato y el α -naftil butirato. Por la actividad enzimática demostrada, los autores consideraron que las CL eran macrófagos epidérmicos.

En 1979, Sterry y Steigleder⁷⁴ demostraron actividad de α -naftil acetato esterasa ácida en los macrófagos dérmicos y en las CL epidérmicas de la piel de pacientes afectados de micosis fungoides, empleando la técnica de Müller y colaboradores.⁷⁵ Consideraron que sus hallazgos eran evidencias citoquímicas de la relación entre las CL y el sistema monocito-macrófago.

En los ratones C57BL se demostró ultraestructuralmente que la actividad de esterasa no específica se localizaba en la membrana plasmática de las CL,⁷⁶ como ocurre en los macrófagos pulmonares humanos⁷⁷ y en las células de histiocitosis X, cuyos gránulos X, similares a los gránulos

de las CL, exhiben actividad esterasica idéntica a la de la membrana plasmática.²⁰

Llama la atención que hasta ahora no se haya informado si las CL epidérmicas humanas normales presentan actividad de esterasa inespecífica.

FOSFATASA ALCALINA. En la piel de tres primates menores del Africa continental de la especie Lorisidae: Perodicticus potto, Galago senegalensis y Galago crassicaudatus, se han identificado células dendríticas que contienen fosfatasa alcalina²¹⁻²³ que por sus características morfológicas corresponden a las CL.²³ La impregnación con ioduro de zinc demuestra células dendríticas situadas entre la unión dermoepidérmica y el estrato granuloso de la piel de Perodicticus potto, cuya estructura y distribución son similares a las células fosfatasa alcalina positivas del mismo animal.²⁴

En 1965, Kechijian²⁵ demostró que las CL epidérmicas de Perodicticus potto, especialmente reactivas a la fosfatasa alcalina, disminuyeron de 450 células/mm², en condiciones normales, a 273 células/mm² después de 5 exposiciones a radiación ultravioleta, recuperándose el número luego de 28 exposiciones.

A principio de la década de los 70 se pensaba que la actividad de fosfatasa alcalina estaba restringida a las CL epidérmicas de los primates prosimios africanos. Sin

embargo, en 1973, Schleger y Bean²⁴ informaron que en la epidermis del ganado vacuno existen células dendríticas fosfatasa alcalina positivas, aunque ATPasa negativas, que identificaron como CL. Con el fin de determinar si la actividad de fosfatasa alcalina era una característica confiable para ser empleada en la identificación de las CL de la piel de bovinos, Khalil, Nitiuthai y Allen²⁵ cuantificaron estas células en cortes de piel y láminas epidérmicas obtenidas con EDTA e incubadas en un medio de Gomori y Takamatsu.²⁶ Además, incubaron en el medio de Hugen y Borgers²⁷ para la demostración ultraestructural de esta actividad enzimática. Encontraron que las células positivas a la fosfatasa alcalina, en número de 1600 mm², eran de aspecto dendrítico, de situación basal y suprabasal, alcanzado sus dendritas la parte superior del estrato espinoso. Ultraestructuralmente, el producto de la actividad enzimática se localizó en la membrana plasmática de células dendríticas con citoplasma claro y núcleo lobulado, sin desmosomas, libres de tonofilamentos, de melanosomas y premelanosomas y, de manera sobresaliente, con una inclusión citoplásmica estructuralmente similar al gránulo de las CL, el cual también mostró el producto de la reacción histoquímica. Los melanocitos y los queratinocitos no tuvieron actividad enzimática.

El significado funcional de la fosfatasa alcalina en las CL es desconocido. Esta enzima se encuentra en

granulocitos^{10, 11} y junto con la ATPasa y la esterasa inespecífica, relaciona a las CL con las células del sistema fagocítico-mononuclear.¹²

AMINOPEPTIDASA. En la piel del cobayo albino normal y tratada con dinitrociorobenceno y "stripping", se ha demostrado la actividad de leucinaminopeptidasa en las CL epidérmicas.¹³ El número, distribución y morfología de las CL evidenciadas con esta técnica corresponden a las demostradas con ATPasa.¹² Sin embargo, no es un procedimiento comunmente empleado para el estudio de las CL. Tiene la ventaja de que el producto de la reacción es de color rojo brillante y no negro como el de la ATPasa. Esto ha sido aprovechado cuando se hacen marcajes autorradiográficos ya que permite la visualización simultánea de los gránulos de plata sobre las CL reveladas con la histoquímica de leucinaminopeptidasa.¹³

α -D-MANOSIDASA. En la piel de pacientes con alguna de las siguientes enfermedades: Hurler, Hunter, Niemann-Pick tipo C y alopecia mucinosa, pueden demostrarse células epidérmicas con actividad de α -D-manosidasa, enzima capaz de actuar sobre 1-naftil- α -D-manopiranosido. Por su distribución en las capas medias de los estratos espinosos y en la vaina epitelial externa de los folículos pilosos, semejante a lo demostrado con ATPasa, representan a las

CL. El aspecto de las células manosidasas positivas llama la atención porque no muestran el patrón dendrítico de las CL. Hasta el momento no se sabe si esto es una consecuencia de la técnica o es una característica de las CL de los tejidos patológicos estudiados. Por ello, se requiere estudiar la piel normal para comparar los resultados.

El significado funcional o biológico de la elevada actividad de α -D-manosidasa de las CL en las enfermedades referidas no se ha aclarado; probablemente refleje el alto nivel de recambio de compuestos que contienen manosa, como es el caso de las glucoproteínas.

β -GLUCURONIDASA. Con un método modificado de Hayashi, Nakajima y Fishman²⁰, Mackenzie, Dickenback y Rittman²¹ demostraron una población de células dendríticas reactivas a la β -glucuronidasa, cuya distribución espacial y numérica corresponde a la de las CL evidenciadas con ATPasa y con inmunofluorescencia para el antígeno Ia. Las células positivas mostraron un área de reacción intensa perinuclear, especulándose que la localización de la enzima estaría en el complejo de Golgi o en los lisosomas, mientras que en el resto del cuerpo celular y las dendritas podría estar asociada al retículo endoplásmico. De las especies estudiadas: ratones BALB/c, C3H, híbridos de C3H y BALB/c, ratas Sprague Dawley, cobayos Hartly, conejos blancos, monos rhesus y humanos, sólo las dos últimas no tuvieron el patrón

celular antes mencionado ya que toda la epidermis fue positiva a la enzima, siendo difícil distinguir algunas células más reactivas. Esta falta de reactividad específica de las CL a β -glucuronidasa en humanos ya había sido observada en condiciones patológicas.⁷⁴

Además de la epidermis, el epitelio del paladar y de las papilas filiformes de la lengua del ratón también contienen CL β -glucuronidasa positivas.⁷⁷

El significado biológico de la actividad de β -glucuronidasa en las CL es incierto. Puede estar relacionada al procesamiento de glucoproteínas de membrana, análogo a lo que se especula para la actividad de α -D-manosidasa.⁷⁴

LISOZIMA, α -1-ANTITRIPSINA, α -1-ANTIQUIMOTRIPSINA. En la epidermis de pacientes con micosis fungoides se ha descrito un incremento en el número de células positivas a lisozima, α -1-antitripsina y α -1-antiquimotripsina⁷⁸ que podrían ser CL.^{79, 100} Sin embargo, en la piel humana normal no se han identificado estas enzimas intracelulares, aún con el empleo de técnicas inmunohistoquímicas.¹⁰¹ La interpretación de este hecho es que las células observadas en la micosis fungoides no son CL o que éstas han adquirido características histiocíticas.¹⁰¹ Por otro lado, la ausencia de las tres enzimas puede reflejar la falta de funciones fagocíticas en las CL epidérmicas normales.¹⁰¹

COLINESTERASA. En 1962, Bourlond, Wolff y Winkelmann¹⁰² informaron de la presencia de colinesterasa específica en el "sistema melanocito-Langerhans" del murciélago. Algunas muestras de piel, de mucosas oral y nasal fueron incubadas en acetiltiocolina, observándose el producto de la reacción en diversos elementos nerviosos de la dermis y en glándulas sebáceas. Sin embargo, la reacción más pronunciada la manifestaron células dendríticas localizadas en todos los niveles de la epidermis, en la vaina externa del folículo piloso, en la capa germinal y conducto de las glándulas sebáceas y en la porción distal del conducto de las glándulas sudoríparas. En el epitelio de las mucosas estudiadas también se identificaron células dendríticas positivas a colinesterasa. Esta actividad enzimática era inhibida si los tejidos se preincubaban en fisostigmina y diisopropilfluorofosfato. Por otro lado, el empleo de butiriltiocolina como sustrato no evidenciaba las células lo que sugirió la especificidad de la colinesterasa de las células dendríticas.¹⁰²

Ya que muchas de las células colinesterasa positivas mostraban una fuerte reacción a DOPA y contenían melanina, se pensó que eran melanocitos, a diferencia de las células encontradas en las mucosas y en las glándulas sudoríparas que no presentaban esas características y que por ello fueron identificadas como CL.¹⁰²

La presencia de acetilcolinesterasa específica también

ha sido demostrada en células dendríticas epidérmicas de ovejas. Al igual que en el murciélago, el empleo de butiriltiocolina como sustrato no permite revelar dichas células que, además, tampoco son evidenciadas con las técnicas de ioduro de zinc, cloruro de oro, DOPA y fosfatasa alcalina.¹⁰² Es interesante señalar que no en todas las especies de ovejas estudiadas, así como en conejos, ratas y bueyes, ha sido posible identificar células positivas a la colinesterasa. Esta variabilidad histoquímica intraespecie también ha sido observada para la fosfatasa alcalina en ciertos primates africanos.¹¹⁻¹³

A pesar de no tener todas las características histoquímicas que se han identificado en las CL de otras especies, la morfología y distribución de las células dendríticas acetilcolinesterasa específicas positivas de la epidermis de ovejas, en piel con y sin melanocitos, permitió concluir que eran equivalentes a las CL.¹⁰³

En los ratones albinos no ha sido posible demostrar la presencia de acetilcolinesterasa en las CL epidérmicas, quizás por haberse empleado como sustrato el ácido tiolacético⁷⁸ y no la acetiltiocolina como en los estudios en murciélagos^{102, 103} y en ovejas.¹⁰³

PEROXIDASA ENDOGENA. Algunas poblaciones celulares consideradas dentro del sistema fagocítico-mononuclear presentan actividad de peroxidasa endógena en la cubierta

nuclear y en el retículo endoplásmico, como es el caso de las células de Küpffer en el hígado de la rata normal¹⁰⁴ y de los macrófagos peritoneales de algunos murinos.¹⁰⁵

Los primeros intentos para demostrar actividad de peroxidasa endógena en las CL de cobayos y de humanos fueron infructuosos, quizás por emplear tiempos de fijación muy prolongados o por utilizar el fijador no apropiado para la enzima.^{106, 107} Maruyama, Uda y Yokoyama, en 1980, informaron que algunas células epidérmicas del ratón con gránulos de Birbeck presentaban el producto de la reacción histoquímica para peroxidasa endógena en la cubierta nuclear y en el retículo endoplásmico, concluyendo que se trataba de CL. A la microscopía fotónica la reacción fué muy débil y sólo se pudo observar en los cortes semifinos. Los autores emplearon láminas epidérmicas separadas con EDTA, prefijadas en glutaraldehído e incubadas en 3-3 tetrahidrocloruro de diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.⁷⁰

Posteriormente, en 1981 y 1982, Dubertret, Breton-Gorius, Fosse y Touraine observaron actividad peroxidásica en la cubierta nuclear y en el retículo endoplásmico de las CL humanas normales, determinándose que la enzima era inhibida por el fijador de Karnovsky, por la mezcla aldehído-ácido tánico y por 3-amino-1,2,4, triazol.^{108, 109}

La actividad peroxidásica de las CL humanas y de murinos se debe probablemente a una enzima similar a la de monocitos adherentes y de macrófagos humanos^{110, 111} ya que

la localización intracelular es idéntica y la enzima es inhibida por las mismas sustancias.

Estos resultados han sido considerados como evidencias adicionales del linaje monocítico de las CL.¹⁰⁰

LIPASAS. Cuando se incuban láminas epidérmicas y cortes de piel de ratón en una solución de tween 60, siguiendo el método de Gomori,¹¹² se observan células dendríticas castañas en la epidermis y en la dermis, identificadas como CL.⁷⁸ Riley, en 1966, no logró demostrar CL en la cola de ratón siguiendo una técnica semejante.⁷⁴

FOSFATASA ACIDA. Esta enzima no ha podido ser demostrada en estudios de microscopía fotónica de las CL de murinos, empleándose como sustratos β -glicerofosfato de sodio o naftol-AS-B1-fosfato.⁷⁸ Sin embargo, con citoquímica ultraestructural se han encontrado pequeñas cantidades de la enzima en las CL.¹¹³

OTRAS ENZIMAS. En las CL de ratón albino se ha buscado infructuosamente la actividad de arilsulfatasas, ubiquinonas y esterasa específica.⁷⁸

HISTOQUIMICA DE LA CAPTACION DE HAPTENOS.

Con el fin de investigar algunos aspectos de la posible función inmunológica de las CL, como sugirieron los trabajos sobre dermatitis de contacto, Shelley y Juhlin, en 1976, expusieron láminas epidérmicas de cobayos y de humanos, separadas con EDTA y bromuro de sodio, a soluciones de algunos metales (cloruro de mercurio, cloruro de níquel, cloruro de cobalto y cloruro de cromo), aminas (etilendiamina y parafenilendiamina) y aldehídos (formaldehído y glutaraldehído), todos ellos conocidos porque pueden actuar como sensibilizadores de contacto. Siguiendo procedimientos histoquímicos, se demostró que estos antígenos fueron captados selectivamente por células de aspecto dendrítico, morfológicamente equivalentes a las CL. Con base en lo anterior, los autores propusieron que las CL captadoras de haptenos forman un retículo protector que llamaron "sistema reticuloepitelial" para indicar su estrecha relación con el sistema reticuloendotelial.¹¹⁴

Al año siguiente, Shelley y Juhlin investigaron la captación de dos haptenos más: la toluendiamina y el cloruro de oro además de probar siete diferentes métodos de separación epidérmica,¹¹⁵ obteniendo resultados similares a los de su primer trabajo. Ese mismo año, Juhlin y Shelley publicaron una modificación a la técnica para ATPasa e introdujeron el tiomalato sódico de oro en las técnicas de

impregnación úrica, comparando los resultados con los de sus trabajos previos y recomendando el empleo de sus nuevas técnicas histoquímicas en el estudio de las CL normales y patológicas del cobayo y de humanos.¹¹⁵

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

Para el inicio de la década de los 60, la teoría melanocítica del origen de las CL seguía ejerciendo una influencia importante en el estudio de estas células. Por otro lado, la ultraestructura de las células epidérmicas, en particular la del melanocito, ya había empezado a ser conocida.

Las características ultraestructurales del melanocito fueron establecidas por Odland,¹¹⁴ Clark y Hibbs¹¹⁷ y por Charles e Ingram.¹¹⁸ Esta célula presenta un citoplasma claro debido a la ausencia de queratina, con gránulos de melanina en diferentes estados de maduración, una región de Golgi bien desarrollada y mitocondrias escasas y pequeñas; el núcleo y la cubierta nuclear tienen un perfil liso exhibiendo ocasionalmente algunas muescas. La membrana plasmática carece de especializaciones que unan al melanocito con las células vecinas.

Dentro de este marco de conocimientos se originó la primera descripción ultraestructural de las CL epidérmicas humanas realizada por Michael S. Birbeck, Aodan S. Breathnach y John D. Everall en 1961.¹¹⁹ Estos autores sabían que en lesiones cutáneas de vitiligo absoluto era imposible identificar histoquímicamente células con actividad de dopa o tirosinasa que correspondieran a melanocitos. Sin embargo, con tinciones supravitales con colorantes quinona-imidas,

como el azul de metileno, se demostraba la presencia de células dendríticas en la capa basal de la epidermis, suponiendo que se trataba de "melanocitos inactivos". Así, emprendieron su investigación para observar con el microscopio electrónico a estos melanocitos inactivos y compararlos con los melanocitos basales normales.

Birbeck, Breathnach y Everall encontraron células con todas las características de los melanocitos en las capas basales de las muestras de piel normal de pacientes con vitiligo y en la piel de sujetos sanos pero no en la piel con vitiligo. Aquí, un hallazgo interesante fué la identificación de células fácilmente distinguibles de los queratinocitos, localizadas sobre la membrana basal, en una posición similar a la que ocupan los melanocitos en la piel normal, por lo que fueron consideradas el equivalente de los "melanocitos inactivos" observados con microscopía de luz. Algo más significativo a lo anterior fue que su ultraestructura era similar en todos los aspectos a la de las células claras suprabasales (las CL) de la epidermis normal y vitiliginosa:

-La cubierta nuclear era marcadamente anfractuosa debido a la presencia de surcos profundos que corrían sobre ella, llegando a dividir al núcleo celular en lóbulos. El resto de las estructuras nucleares eran similares a las de los queratinocitos y melanocitos basales.

-La región del Golgi estaba bien desarrollada, formando

racimos de vesículas y membranas a un lado del núcleo, donde también se observaban estructuras centriolares.

-Las mitocondrias eran cortas, pequeñas y poco numerosas.

-El citoplasma era claro en comparación con los queratinocitos vecinos, aunque a veces era posible observar algunos haces de un material fibrilar adyacente a numerosas vesículas pequeñas.

-La membrana plasmática no se unía ni se insertaba en las células vecinas porque carecía de desmosomas. Por el contrario, se encontraba separada de éstas por un espacio o hendidura, como ocurría con los melanocitos normales.

-No contenían gránulos de melanina o premelanina, pero se distinguía otro tipo de gránulo que no se encontraba en los queratinocitos ni en los melanocitos normales. Estos gránulos aparecían como estructuras lineales con extremos redondeados y atravesados a todo lo largo y por el centro, por una línea estriada. De acuerdo a las imágenes observadas, más que parecidos a bastones, los gránulos semejabán estructuras laminadas o discoides de $0.3 \mu\text{m}$ de diámetro, con un arreglo bidimensional de partículas responsable de la estriación de la línea central. El espaciamiento de las estriaciones en ambas direcciones era de 90 \AA , aproximadamente. Estos gránulos característicos de las CL no se observaban en todos los cortes, posiblemente debido al plano de sección de una célula en particular.

En el mismo estudio no se demostraron melanocitos dopa positivos en las muestras de piel con vitiligo. Únicamente se encontraron células dendríticas aureofilicas y teñidas supravitalmente con azul de metileno, cuyo número y distribución intraepidérmica no parecía ser diferente al de la piel normal.

A pesar de haber establecido los criterios ultraestructurales para identificar a ciertas células como de Langerhans, independientemente de su localización, Birbeck y colaboradores no consideraron a las CL como una población celular epidérmica independiente, sino como un melanocito desgastado que sintetizaba un gránulo citoplásmico característico, llamado gránulo de Birbeck o de las CL (BCL), en lugar de los gránulos de melanina característicos de los melanocitos activos. La forma anfractuosa o indentada del núcleo de las CL la explicaron como el reflejo de una función desordenada, expresión de la vejez celular como en el caso de los leucocitos seniles.

Basados en lo anterior, fueron los primeros en proponer la existencia de células que tenían características intermedias entre los melanocitos y las CL. Dos años después, en 1963, decidieron aclarar esta incógnita al incrementar experimentalmente el recambio o tasa de eliminación de los melanocitos aplicando una solución de torio X en la piel de voluntarios sanos, siguiendo un procedimiento ideado por Staricco en 1957.^{11*} Al séptimo día

de iniciado el experimento, observaron un incremento en la actividad de los melanocitos basales evidenciada por la presencia de células dendríticas suprabasales positivas a dopa y a la impregnación con plata. Sin embargo, la impregnación con oro rara vez puso de manifiesto alguna CL típica. Esto constituía una discrepancia con la idea de que las CL eran melanocitos desgastados o inactivos ya que en estas condiciones experimentales su número debería estar incrementado. ¿ Por qué no se observaban las CL si la impregnación aurica en los controles demostraba un número y una impregnación adecuados ? Se pensó que el torio X tenía un efecto letal específico sobre las CL o que las células intermedias, posiblemente incrementadas en número por el experimento, no se impregnaban con oro ni eran dopa positivas. Sin embargo, con microscopía electrónica no encontraron un tipo celular que pudiera ser identificado como un estado intermedio o transicional entre los melanocitos y las CL.¹²⁰

En 1964, Breathnach retomó la cuestión de la ultraestructura de las CL al describir otros organelos citoplásmicos y otras características del GCL, además de estudiar las variaciones en las CL a diferentes niveles de la epidermis.¹²¹ Un hallazgo constante fue la presencia de numerosas vesículas en todo el citoplasma, particularmente en las cercanías de la región del Golgi, cuya membrana de 150 Å de grosor se evagina hasta una eventual transformación

discoide por el colapso de sus paredes, produciéndose así la forma de bastón del GCL observada en los cortes. Ocasionalmente se observó una continuidad entre las membranas del GCL y la plasmática, estableciéndose una comunicación entre el espacio extracelular y el interior del gránulo. Esto fue interpretado como una forma alternativa de formación del GCL a partir de una invaginación de la membrana celular.

En el mismo estudio, Breathnach determinó que las CL raras vez se encuentran en las capas basales de la epidermis, en cuyo caso se caracterizan por la escasez de GCL. Las CL de las capas profundas o intermedias del estrato espinoso son las que reúnen todas las características descritas mientras que en las capas superficiales las células muestran muy pocos organelos citoplásmicos. Además, los estratos granuloso y córneo no contienen CL, las cuales nunca presentan signos de queratinización o de exfoliación.

Este trabajo confirmó que la característica más conspicua de las CL es la presencia de cuerpos en forma de bastón que representan la imagen al corte de organelos en forma de disco originados, posiblemente, de dos sitios: la membrana plasmática y las vesículas del complejo de Golgi. Aunque esto pudo haber sugerido alguna función particular de las CL, Breathnach siguió pensando que estas células eran un derivado del melanocito que nunca se compromete en la melanogénesis.¹²¹

Zelickson, en 1965, luego de un estudio que le llevó 4 años, agregó que las CL no sólo se encontraban en la epidermis sino también en la dermis e incluso podían observarse atravesando la membrana basal. Las CL descritas por Zelickson poseían numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico muy desarrollado, centriolos en la región del Golgi y una cubierta nuclear con poros. Las CL localizadas en las capas superficiales de la epidermis se caracterizaban por la abundancia de lisosomas y por numerosas gotas de lípidos. Los GCL fueron descritos como organelos en forma de raqueta de tenis cuyo mango tenía una porción media lineal estriada con una periodicidad de 50 Å situada entre dos membranas limitantes. La porción dilatada del gránulo estaba limitada por una membrana que rodeaba una zona central clara, ocasionalmente también con estriaciones. Estos organelos eran particularmente numerosos en la región del Golgi, en la periferia de las células y en las dendritas. Algunas CL presentaban, concomitantemente, GCL, melanosomas típicos y/o gránulos de melanina, sugiriendo que se trataba de células transicionales o intermedias entre CL y melanocitos, como habían propuesto Birbeck y colaboradores.^{11,122}

A diferencia del enfoque melanocítico en los estudios ultraestructurales de las CL, otras evidencias histoquímicas y de microscopía electrónica acumuladas desde 1965 enfatizaban la similitud entre las CL y los

histiocitos,^{20, 22, 24} proponiéndose la hipótesis de que las CL epidérmicas eran macrófagos intraepidérmicos.⁷ En este sentido, Hashimoto y Tarnowski²⁵ aportaron elementos que sustentaban la hipótesis de que las CL formaban un "sistema fagocítico intraepitelial" que se autopropagaba y renovaba por mitosis o a partir de histiocitos que se agregaban a la epidermis provenientes de la dermis, atravesando la membrana basal.²⁵ Para apoyar esta idea se estudiaron muestras obtenidas de varios tumores de piel: siringoma, cilindroma, siringocistadenoma papilífero, epiteloma superficial de células basales, pitiriasis rosada, enfermedad de Letterer-Siwe, un caso de sarcoma de células del retículo, dos casos de leucoplaquia oral y, como testigo, piel humana normal. En todas las condiciones se encontró un número variable de histiocitos dérmicos con GCL. En la enfermedad de Letterer-Siwe y en la piel normal el gránulo parecía formarse por invaginación de la membrana plasmática, endocitando material extracelular o glucálix del propio histiocito, el cual se condensaba entre las dos membranas limitantes para formar una línea central estriada análoga a la descrita en ciertos tipos de unión intercelular pero con una periodicidad de 90 Å. Comúnmente, en uno o ambos extremos del organelo se formaba una dilatación, dando al gránulo la forma de una campana. En la enfermedad de Letterer-Siwe, los histiocitos con GCL eran los que atravesaban la membrana basal con mayor frecuencia en los

sitios donde ésta parecía ausente debido a la migración celular masiva. Un hallazgo muy interesante era que en esta enfermedad y en el epiteloma superficial de células basales, las CL frecuentemente se acompañaban de linfocitos. Así pues, éste parece ser el primer informe de la asociación entre estos dos tipos celulares, observada también en hipersensibilidad cutánea y con menor frecuencia en la epidermis normal.^{12*} Finalmente, en todos los especímenes, las CL contenían centriolos y en un corte de epiteloma de células basales fue posible observar una mitosis de una CL basal.

Quince años después de que Breathnach participara en la descripción original de la ultraestructura de las CL, reconsideró algunos aspectos de las características de estas células. Para entonces, 1977, ya se aceptaba que las CL eran una población celular epidérmica independiente, sin relación ontogénica con células del sistema nervioso ni con melanocitos. Breathnach mismo había reproducido los trabajos de Silvers¹⁴ comprobando que las CL no se originaban de las crestas neurales.¹⁷ Por otro lado, ya se tenían evidencias acerca de la posible participación de las CL en algunas reacciones inmunológicas de la piel. Con estos antecedentes, Breathnach dió a conocer nuevos aspectos ultraestructurales de las CL que pudieran ser importantes en las nuevas funciones atribuidas a estas células dendríticas.^{12*} Así, informó que existían dos tipos

celulares epidérmicos que presentaban el GCL. El llamado tipo I era una célula típicamente dendrítica, con citoplasma moderadamente electrólúcido, con numerosos GCL y un número regular de mitocondrias y lisosomas. Tales células se localizaban preferentemente por debajo del estrato granuloso y, significativamente, podían estar en aposición a células mononucleares pequeñas. El tipo II era menos dendrítica, con citoplasma más electrodensó y muy pocos GCL pero con numerosas mitocondrias, muchas de las cuales aparecían edematizadas y sin crestas. Su localización más frecuente era en la capa basal de la epidermis y eran muy semejantes a histiocitos que atraviesan la membrana basal de la piel humana normal, así como a las CL de la dermis y de los vasos linfáticos de cobayos sensibilizados pasivamente a un antígeno.¹²⁴

MORFOLOGIA, FORMACION Y FUNCION DEL GRANULO DE LAS CELULAS DE LANGERHANS.

El interés por conocer la morfología, formación y función del GCL comenzó desde el momento en que fue descrito y reconocido como el organelo distintivo de las CL. La metodología de estudio de este organelo ha sido muy diversa e incluye microscopía electrónica de rutina y con cortes seriados, impregnación metálica ultraestructural,

criofractura, microdensitometría, difracción óptica de micrografías electrónicas, microanálisis con rayos X e inmunohistoquímica ultraestructural. A pesar de todo aún queda mucho por resolver. Se conoce muy bien su morfología, pero su modo de formación, su función y sus características bioquímicas apenas han empezado a ser conocidas.

En 1967, Klaus Wolff¹²⁷ informó que el GCL tenía una membrana limitante de 55-60 Å de grosor, cuya cara interna estaba tachonada por pequeñas partículas espaciadas a intervalos de 50-60 Å. Entre las membranas limitantes se ubicaba una lámina central formada por partículas electrondensas separadas por espacios de 50-60 Å y ordenadas en dos láminas paralelas. Este patrón regular de partículas confería al GCL un aspecto de estriaciones transversales. La cara interna de la porción vesicular estaba revestida por un material finamente granular que permitía diferenciarla de las vesículas del Golgi, de paredes lisas. Al corte tangencial (face on), la porción en forma de bastón del GCL aparecía como cuerpos discoides o redondeados con una red cuadrículada bidimensional de partículas pequeñas; la porción vesicular parecía empotrarse a la estructura discoide. El análisis de los cortes permitió suponer que la porción discoide era plana o curva, con un grosor de 50 nm y 1 µm de diámetro, formada por un enrejado tridimensional de partículas agrupadas en cuatro láminas bidimensionales separadas. La porción vesicular sería tridimensionalmente

una ampolla hemisférica o globosa.

Wolff también consideró que el GCL se originaba de las cisternas del Golgi, basándose en la estrecha relación topográfica observada entre ambas estructuras.^{11,12} El movimiento posterior del gránulo hacia la membrana celular, para abrirse al espacio extracelular, sugería cierta actividad secretoria de las CL.

Un año después, en 1968, Sagebiel y Reed²⁰ reconstruyeron tridimensionalmente los GCL en plastilina, apoyándose en cortes seriados de gránulos individuales y demostrando que el GCL es una red paracristalina limitada externamente por una membrana, que asume una gran variedad de formas que van desde la discoide, la más frecuente, hasta la caliciforme o combinación de ambas. Invariablemente la estructura paracristalina estaba presente y su membrana limitante frecuentemente formaba una porción vesicular en uno de los extremos. En los cortes tangenciales, las partículas de la lámina paracristalina aparecían como una red ortogonal, separadas unas de otras por espacios de 90 Å. Dicha periodicidad coincidía con la observada en los cortes transversales de la lámina paracristalina. En su trabajo, Sagebiel y Reed no discutieron acerca del origen y función del GCL. Propusieron que la diversidad de formas del organelo podía ser el resultado de fuerzas citoplásmicas que actuaban sobre el gránulo, sin descartarse los posibles artefactos creados por el procesamiento del tejido, sobre

todo para los GCL en forma de copa.

En ese mismo año, Cancilla^{12*} llevó a cabo un estudio ultraestructural de tejido obtenido de un granuloma eosinofílico solitario, posfijando el material con una mezcla de tetróxido de osmio-colidina-lantano con la intención de que éste último, un trazador del espacio extracelular, penetrara y evidenciara a los GCL cercanos a la membrana celular. El lantano estuvo presente en las partes superficiales de los gránulos y únicamente fue localizado en este organelo. Aunque Cancilla no opinó acerca de la formación y función del GCL, sus resultados pueden ser considerados como evidencia en favor de la teoría endocítica de la formación del gránulo (vide infra).

En 1969, Niebauer y colaboradores^{4*} confirmaron muchos de los aspectos ultraestructurales del GCL, aunque hicieron notar que las membranas limitantes tenían un aspecto trilaminar y un grosor de 120 Å aproximadamente. Para su estudio utilizaron como fijador una mezcla de ZIO, observando que los GCL eran mejor y más frecuentemente visualizados en comparación a los de la piel fijada rutinariamente. Al confrontar los hallazgos en epidermis normal y con enfermedad de Letterer-Siwe, notaron que las CL patológicas presentaban una mayor cantidad de gránulos en la periferia celular, fusionados a la membrana plasmática y carentes de impregnación metálica. Por el contrario, los GCL normales se impregnaban fuertemente y se localizaban en la

región del Golgi. En ambas situaciones la ultraestructura del gránulo era idéntica, aunque en la enfermedad la variedad de formas y tamaños era mayor.

Además del gránulo, la impregnación metálica también se localizó en la cubierta nuclear, lisosomas y, llamativamente, en el complejo de Golgi. En los GCL el depósito más intenso se observó en la lámina estriada ubicada centralmente, quedando sin impregnar el resto del organelo.

Dos hechos fueron significativos para la interpretación de los resultados del trabajo de Niebauer y colaboradores. En primer lugar, los GCL normales y patológicos situados en la periferia celular o fusionados a la membrana plasmática no mostraron impregnación metálica; en segundo lugar, se evidenció una estrecha relación entre las impregnaciones de los GCL y del complejo de Golgi. Los autores propusieron que esto sería una evidencia más de que el GCL se originaba a partir del complejo de Golgi y que las diferencias en la impregnación podían ser el resultado de cambios metabólicos y/o estructurales de los gránulos.

En 1976, Caputo, Peluchetti y Monti⁴³⁰ hicieron un estudio comparativo de réplicas de criofracturas y cortes finos del GCL con el objeto de aportar conocimientos sobre la organización interna del gránulo y probar la validez de los modelos morfológicos propuestos hasta entonces. Por otro lado, al comparar las caras de fractura de la membrana

plasmática, del complejo de Golgi y del GCL, pretendían buscar el origen de este organelo. El trabajo fue apoyado con el análisis de difracción óptica de micrografías electrónicas obtenidas de piel normal y de lesiones de un caso típico de enfermedad de Letterer-Siwe. Los resultados comprobaron que las réplicas de criofractura del GCL eran idénticas a las imágenes observadas en los cortes finos y que los modelos tridimensionales propuestos eran exactos. La distribución periódica de partículas en el centro de la porción discoide fue semejante con los tres métodos de análisis. La red de partículas presentó una separación de las subunidades de 156 Å en un mismo plano y de 78 Å en un mismo eje. Esta organización de partículas con una disposición paracristalina sugirió que la sustancia contenida entre las membranas limitantes de la porción discoide del GCL era una proteína. Por otro lado, el aspecto particulado de las caras de fractura de la membrana plasmática, del complejo de Golgi y de los GCL mostraron un patrón muy similar lo que no ayudó a esclarecer el origen del gránulo.

En 1978, Rodríguez y Caorsi²⁰ realizaron un trabajo detallado de la ultraestructura del GCL empleando cuatro esquemas de fijación a base de ZIO, ampliando lo aportado por Niebauer y colaboradores 10 años atrás.¹⁹ Con microscopía electrónica convencional encontraron que la membrana limitante del segmento discoide del GCL, además de

continuarse ocasionalmente con la membrana plasmática, también se unía a la membrana de estructuras tubulares que muy probablemente pertenecían al retículo endoplásmico liso. Todos los esquemas de fijación-impregnación "tifieron" selectivamente al GCL, aunque con afinidad diferente, a las distintas porciones del gránulo y a otros organelos. Así, el ZIO preparado en ácido cítrico impregnó intensamente la cara citoplásmica de las membranas limitantes del componente en forma de bastón del GCL. La fijación con la mezcla de Karnovsky, seguida de impregnación con ZIO-ácido cítrico, evidenció selectivamente al gránulo y algunas vesículas del complejo de Golgi. El componente vesicular del gránulo presentó un anillo periférico muy impregnado, rodeando una zona central de baja densidad electrónica. Dependiendo del corte, la porción en bastón se observó como algo semejante a un disco, que en los cortes transversales mostraba tres regiones diferentes de impregnación. La primera fue la cara interna de la unidad de membrana trilaminar. La segunda fue una zona central formada por partículas de 4 a 5 nm de diámetro con una periodicidad de 4 nm. La tercera localización de la impregnación fue una zona de 8 nm de grosor, subyacente a la hoja interna de la unidad de membrana. La visión frontal de la porción discoide permitió ver una malla de partículas ordenadas en ángulos rectos. Cada partícula tenía un diámetro de 7 nm, separadas una de otra por un espacio de 7 nm. Entre las partículas se

extendían filamentos de 3 nm de grosor. Esta disposición formaba cuadrículas, con las partículas en los ángulos y los filamentos formando los lados de los cuadros, en cuyo centro, además, se localizaba otra partícula de 4 nm de diámetro. Dependiendo del plano de visión, la sumación de imágenes de las partículas y filamentos confería al gránulo una apariencia estriada.

Con el ZIO preparado en amortiguador de veronal, la porción vesicular se impregnó totalmente, al igual que todas las vesículas del Golgi, cuerpos densos y estructuras tubulares. La cubierta nuclear y las cisternas del Golgi sólo fueron reveladas cuando se empleó ZIO-veronal en tejidos fijados con la mezcla de Karnovsky.²⁰

En su estudio, Rodríguez y Caorsi también realizaron un análisis microdensitométrico y encontraron que la membrana limitante del GCL era una estructura trilaminar de 9 nm de grosor, siendo 17% más gruesa que la membrana plasmática y 30% más gruesa que las membranas del Golgi. La unidad trilaminar era claramente asimétrica, con diferencias histoquímicas entre las capas interna y externa. Por los resultados obtenidos con las mezclas ácidas y alcalinas del ZIO, pareció evidente que en la porción vesicular del GCL existían por lo menos dos tipos de sustancias: una en la membrana y otra que llenaba la luz. En conclusión, los resultados sugirieron que el GCL parecía originarse de estructuras tubulares parecidas al retículo endoplásmico

liso y/o de vesículas del aparato de Golgi.

En 1981, Runge, Younger y Zelickson,¹³¹ en un estudio que investigó la porción no vesicular o discoide del GCL por medio de difracción óptica en tres planos de micrografías electrónicas, informaron que no encontraron una membrana limitante homogénea y lineal ni un arreglo cristalino o paracristalino de partículas como había sido sugerido por Caputo, Peluchetti y Monti, en su estudio del GCL con criofractura.¹³⁰ En lugar de esto, la "membrana limitante" exhibió una discontinuidad lineal con una periodicidad aproximada de 11 nm. El grosor promedio de la porción en forma de bastón era de 55.7 nm, cuya porción lineal central, de 13.2 nm, se formaba por el contacto ortogonal de dos láminas de partículas superpuestas. A ambos lados de éstas se identificó un espacio de 2.7 nm limitado externamente por una lámina simple de partículas ordenadas de manera lineal o con un perfil "como haciendo eses" por la superposición de medias partículas. De acuerdo con los autores, las diferencias morfológicas de los modelos del GCL podían deberse a la metodología empleada y al proceso de preparación del tejido en estudio.¹³¹ En este sentido, lo más razonable sería integrar todos los modelos en un sólo concepto ante la posibilidad de que el gránulo presente cambios metabólicos o de maduración estructural asociados al estado morfofuncional de las CL.

FORMACION DEL GRANULO DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

En 1964, Breathnach¹²¹ habia propuesto que el GCL se formaba a partir de vesículas originadas en el complejo de Golgi y/o por plegamientos de la membrana plasmática de las CL. Con el tiempo esta opinión derivaría en dos teorías para explicar el origen y función del GCL. Una de ellas, llamada teoría secretoria, establece que el gránulo se origina en el complejo de Golgi como vesículas que madurarán y eventualmente se fusionarán con la membrana plasmática para abrirse al espacio extracelular y vertir algún producto de secreción. Esta idea, apoyada principalmente por Zelickson,¹¹ Wolff¹²⁷ y Niebauer,⁴⁹ está sustentada en evidencias que tienen mucho de circunstancial, tomadas de las imágenes estáticas de las micrografías electrónicas convencionales:

-La mayor cantidad de GCL se encuentra en la parte central del citoplasma, particularmente en la region del complejo de Golgi.

-Algunas imágenes sugieren una relación íntima entre la porción vesicular del GCL y las vesículas del Golgi.

-La estructura altamente organizada del interior del gránulo es indicativa de una actividad sintética especializada.

En oposición a lo anterior, la segunda teoría, conocida como endocítica, postula que el GCL se forma a partir de

plegamientos de la membrana celular. Las primeras evidencias que sugirieron la naturaleza endocítica fueron obtenidas por Hashimoto y Tarnowsky¹²² en 1967, siendo apoyada por Cancilla al año siguiente¹²⁹ y por otras publicaciones de aquéllos.^{107, 128, 132} Estas incluyen lo siguiente:

-En histiocitosis X, la mayor cantidad de GCL se encuentran en la periferia celular, observándose una continuidad entre la membrana del gránulo y la membrana plasmática.

-La incubación prolongada en nitrato de lantano o en peroxidasa evidencia con mayor frecuencia a los GCL, cuyo aspecto interior es semejante a la superficie externa de la membrana plasmática.

Hasta la fecha no se han emitido conclusiones definitivas en relación al tema que nos ocupa. Sin embargo, la teoría endocítica de Hashimoto corresponde satisfactoriamente con las funciones de las CL reconocidas en la actualidad. Las evidencias recientes que la apoyan han surgido de trabajos más críticos, cuya interpretación parece no dejar duda de que el GCL es un organelo endocítico adsortivo.

En 1983, Takahashi y Hashimoto¹³³ emplearon una técnica de inmunohistoquímica ultraestructural en CL en cultivo, con el anticuerpo monoclonal OKT6 dirigido contra la glucoproteína T6 presente en la membrana plasmática de las CL y de los timocitos. Encontraron que muchas vesículas

cubiertas mostraban reactividad, es decir, contenían a la glucoproteína T6 y eventualmente formaban al GCL, apoyando fuertemente que este organelo se origina a partir de invaginaciones de la membrana celular. Al año siguiente, en 1984, Ishii y colaboradores¹³⁴ tomaron biopsias del borde eritematoso de lesiones cutáneas con vitiligo para estudiar las CL con microscopía electrónica convencional. Observaron que en la proximidad de la membrana plasmática de las CL existían vesículas cubiertas que frecuentemente se unían a las numerosas invaginaciones tubulares con el típico patrón estriado o de bandas del GCL. La secuencia de eventos sugerida en el proceso de formación del gránulo fue la siguiente:

- 1) Presencia de vesículas cubiertas cercanas a la membrana celular.
- 2) Invaginación de la membrana celular para formar un plegamiento tubular al cual se une la vesícula cubierta.
- 3) Elongación de la invaginación y formación del patrón de bandas característico de los GCL, antes de separarse de la membrana celular.
- 4) Alteración o separación de la vesícula cubierta del gránulo. Esto hace difícil explicar el origen de la porción vesiculosa del GCL.

Además de apoyar la teoría del origen endocítico del GCL, estos resultados asociaron la formación de este

organelo con el fenómeno de endocitosis adsortiva llevado a cabo por vesículas cubiertas desde la membrana celular.¹³⁵

Siguiendo la idea anterior, Takigawa y colaboradores¹³⁶ obtuvieron células epidérmicas por tripsinización de la piel del cobayo y las incubaron en ferritina conjugada con concanavalina A (ConA) o en ferritina conjugada con un suero anticélulas epidérmicas, seguido de otra incubación en ferritina con un anticuerpo anti IgG. Esto se llevó a cabo a diferentes tiempos, hasta 30 minutos, para posteriormente centrifugar las suspensiones celulares y los "botones" celulares resultantes procesarlos para microscopía electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

-5 minutos de incubación: se observaron numerosas partículas de ferritina en el interior de hoyos o fosos cubiertos ubicados en la base de proyecciones citoplásmicas de las CL.

-15 minutos de incubación: algunos organelos sugestivos de GCL inmaduros presentaron una porción en forma de bastón con una lámina central formada incompletamente y una extensión bulbosa con partículas de ferritina en su interior y un material vellosa o "peluda" sobre su superficie citoplásmica.

-15 a 30 minutos de incubación: las partículas de ferritina se observaron en vacuolas cuyas características sugirieron que se trataban de lisosomas y/o prelisosomas a

las cuales se fusionaba ocasionalmente la porción en forma de bastón.

Los resultados anteriores demostraron que la presencia de ferritina en la porción vesicular del GCL es dependiente del tiempo de incubación, alcanzándose el máximo porcentaje, 41 a 57% de gránulos con ferritina, a los 30 minutos. Por otro lado, con tiempos de incubación breves los gránulos observados estaban en la vecindad de la membrana plasmática mientras que a los 30 minutos su posición fue yuxtannuclear. De manera significativa, los GCL o la membrana de las CL no presentaron partículas cuando las incubaciones se hicieron con ferritina nativa en presencia o ausencia de ConA no conjugada o con suero normal de conejo. Esto sugería que el conjugado de ferritina era incorporado selectivamente en el GCL, posiblemente por medio de un mecanismo de endocitosis mediado por lectinas ya que la internalización del complejo ferritina-ConA era inhibido por α -metil-D-manosidasa, mientras que N-acetil-D-glucosamina careció de ese efecto.

Los hallazgos fueron interpretados, una vez más, como indicativos de que el GCL era un organelo endocítico adsorptivo, formado en respuesta a la unión de un ligando a un receptor de membrana de las CL. Una vez internalizado el material adsorbido, y ya presente en un GCL maduro, sería conducido a organelos semejantes a lisosomas. Esta vía podría tener importancia para la función presentadora de antígenos de las CL, la cual requiere que la molécula

endocitada sea procesada intracelularmente en un compartimento ácido para adquirir inmunogenicidad.¹³⁷ Posteriormente sería reciclada hacia la superficie celular para asociarse a determinantes Ia¹³⁸ y ser reconocida por los linfocitos.

Hasta la fecha, no hemos encontrado opiniones en contra de la teoría endocítica. Por el contrario, en 1981, Elofsson y colaboradores¹³⁹ además de aportar evidencias de ésta, refutaron directamente los postulados de la teoría secretoria o exocítica. Estos autores estudiaron piel humana normal y con dermatitis de contacto alérgica, experimentando con diferentes osmolaridades del fijador primario. En resumen, sus resultados fueron los siguientes:

-En dermatitis de contacto alérgica hay un incremento en el número de GCL, particularmente en la vecindad de áreas discretas de la membrana plasmática con numerosas arrugas o microvellosidades.

-La porción vesicular de GCL es observada casi exclusivamente cuando la osmolaridad del vehículo del fijador primario es de 200 mOsm/l o menos. Lo anterior sugiere que la porción vesicular del gránulo es un artefacto y no una vesícula producida en el complejo de Golgi, que se colapsa para formar la porción discoide del GCL que aparece en forma de bastón al ser cortada transversalmente.

-El interior del gránulo no está tan organizado como se ha pensado. La opinión clásica es que dos de las cuatro

láminas de partículas densas de la línea central del gránulo están en contigüidad con la cara interna de las membranas limitantes no trilaminares. Cuando la osmolaridad del vehículo del fijador fue de 300 mOsm/l, la porción en forma de bastón del gránulo presentó una membrana limitante trilaminar, similar a la membrana plasmática, con un grosor de 30-35 nm. En estas condiciones no fue posible observar la porción vesicular y, por lo tanto, tampoco la forma de raqueta de tenis descrita para el GCL. La organización interna del gránulo apareció como un patrón de puntos con centro menos electrondenso, regularmente distribuidos en el plano medio del disco y separados de la membrana limitante por un espacio lúcido. A veces, el aspecto interno del gránulo semejaba una escalera cuyos peldaños llegaban a alcanzar las membranas limitantes. La apariencia del GCL era más homogénea cuando las preparaciones eran inclinadas en el plano del disco. La interpretación tentativa de estas observaciones fue que entre los planos del disco se localizan estructuras tubulares espaciadas regularmente. Las láminas externas de partículas unidas a las membranas limitantes, observadas en los GCL de muestras procesadas con un fijador con osmolaridad de 100 mOsm/l, representan los fragmentos de una unidad de membrana o de la capa interna de ésta.

Recientemente se ha descrito otra relación directa entre el GCL y la membrana plasmática de las CL. En un

estudio *in vitro*, se observó que la exposición de células epidérmicas a digitonina dispersaba las membranas de todas las células, excepto la de las CL, que se organizaba en láminas o discos de doble membrana (Sandwiching effect) con la misma estructura de un GCL ordinario.¹⁴⁴ Esta capacidad inherente de la membrana plasmática de las CL de superponerse sobre si misma deja poca duda de que el gránulo en las células normales deriva de la citomembrana.

Algunos organelos parecidos a los GCL han sido descritos en las CL de ciertas especies de ratones. Kobayashi y Hoshino^{141,142} encontraron que las CL de la dermis y linfonodos de ratones presentaban una estructura tubular única, semejante a un bastón con una línea central interna observada en los cortes longitudinales, que recordaba a la imagen típica de un GCL cortado longitudinalmente. Sin embargo, difería en que los túbulos tenían un diámetro de 30 nm, mientras que la porción discoide del GCL tiene 43 nm de grosor. Frecuentemente los túbulos se anastomosaban o se ramificaban, formando una red que a veces rodeaba a cuerpos electrondensos, llamados tentativamente cuerpos esferoideos, de 300 nm de diámetro, y que podrían corresponder a lisosomas o microcuerpos (peroxisomas). La red de túbulos ocupaba una gran superficie del citoplasma y frecuentemente se conectaban con estructuras semejantes a vesículas de retículo endoplásmico rugoso.

Aunque este sistema de tubulos era similar al GCL, sobre todo en las imágenes obtenidas al corte, ambas estructuras se localizaban separadamente en el citoplasma sin establecer alguna relación estructural.^{141,142}

Finalmente, no quisieramos dejar de mencionar un punto de vista totalmente distinto acerca de la naturaleza del GCL. Hoefsmit, en 1982, mencionó en su artículo sobre las relaciones entre las CL y otras células accesorias del sistema inmune¹⁴³ que el Dr. Kamperdijk ha demostrado que la presencia del GCL en las CL no tiene importancia inmunológica, siendo solamente una "marca" del microambiente donde estas células han estado presentes. Los GCL representarían desmosomas que han sido endocitados, sugiriendo que su presencia dependería del grado de queratinización del epitelio plano estratificado donde se encuentran las CL y no de la función presentadora de antígenos de estas células.

EL SISTEMA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

El tropismo positivo que presentan las CL por los epitelios planos estratificados, sobre todo por los que poseen capacidad de queratinización, puede orillarnos a pensar que su localización o identificación en otros sitios sería poco probable o inusitada. Sin embargo, existen algunas poblaciones celulares situadas en tejidos extraepidérmicos o extraepiteliales que poseen características morfológicas, inmunohistoquímicas y funcionales análogas a las CL. En conjunto, estos elementos celulares forman el sistema de las CL (SCL), distinguiéndose de las células del sistema fagocítico-mononuclear, fundamentalmente de los macrófagos comunes (MØ), porque su capacidad de adherencia y de fagocitosis son poco importantes y por la particularidad de expresar la glucoproteína de superficie T6 y la proteína citoplásmica S-100. Al final del presente capítulo aparecen las tablas I y II que resumen el concepto del SCL.

CELULAS DE LANGERHANS, CELULAS VELADAS Y CELULAS INTERDIGITANTES.

En 1969, Kondo^{2*} observó, en un grupo de linfonodos axilares de conejo, un tipo celular con características similares a las CL epidérmicas, que denominó MØ tipo A; estas células mostraban un núcleo pálido profundamente indentado y numerosas proyecciones citoplásmicas y se encontraban dispersas en el parénquima y en el seno subcapsular de los linfonodos. Con microscopía electrónica los MØ tipo A presentaban una membrana celular plegada y sin desmosomas, con vacuolas pinocíticas y un complejo de Golgi bien desarrollado al igual que el retículo endoplásmico rugoso y liso. Las mitocondrias estaban en grupos y se observaban numerosos filamentos finos organizados en haces.

De particular interés fue el hallazgo de GCL en algunos de los MØ tipo A. Este no era el primer informe de la presencia de los gránulos en células extraepidérmicas, sin embargo, Kondo abrió la posibilidad de relacionar a las CL con otras células ubicadas más allá de la dermis.

Ese mismo año, Jimbow, Sato y Kukita,^{1**} obtuvieron resultados similares a los de Kondo, pero en los linfonodos femorales de pacientes con dermatitis eccematosa generalizada, aunque la distribución de las células con GCL fue diferente ya que algunas se encontraron en la región

perifolicular del linfonodo.

Según Silberberg-Sinakin y colaboradores¹⁴⁵ y Hoefsmit¹⁴⁶ fue Veldman, en 1970, quien describió las células interdigitantes (CID), dándoles ese nombre por el entrelazamiento de su citoplasma con la membrana celular y las proyecciones en forma de dedos de los linfocitos que la rodean y que a su vez son atrapados entre las extensiones citoplásmicas de aquellas.¹⁴⁷ Hasta ese momento no parecía existir una relación entre las células con GCL de los linfonodos de conejo, de pacientes con linfadenopatía dermatopática, de pacientes con panencefalitis esclerosante subaguda, descritas en estos últimos en 1973, por Verman y colaboradores,¹⁴⁸ y las CID descritas por Veldman. Sin embargo, los trabajos de hipersensibilidad de contacto no sólo dieron a las CL una identidad funcional sino también ayudaron a entender las relaciones con las CID.

En 1974, Silberberg, Baer y Rosenthal²⁴ aportaron la primera evidencia de la presencia de CL en el interior de los vasos linfáticos dérmicos subyacentes al sitio de desafío con dinitroclorobenceno, en cobayos sensibilizados pasivamente a la misma sustancia. El origen de estas CL linfáticas permaneció en duda, incluso en un trabajo posterior de los mismos autores.²⁷ A pesar de ello, se empezó a especular acerca de la función de las CL en la alergia de contacto y en otras reacciones alérgicas, particularmente en las mediadas por células, que involucran

a la piel. La sola presencia de las CL en los vasos linfáticos y en los linfonodos podría tener un gran significado inmunológico. Incluso, los mismo autores identificaron CL en los linfonodos que drenan la linfa de los sitios cutáneos con reacción alérgica de contacto positiva.²⁷

Estos hallazgos permitieron al grupo de Silberberg-Sinakin postular que las CL captan antígenos en la piel y los llevan en su membrana para estimular una respuesta por linfocitos inmunológicamente competentes, ya sea periféricamente en la piel o centralmente en los linfonodos. Para demostrar su hipótesis, estudiaron biopsias de piel retada con una solución de ferritina aplicada intradérmicamente, así como a los linfonodos que recibían el correspondiente drenaje linfático, en este caso, los linfonodos poplíteos de cobayos normales y de cobayos que habían sido sensibilizados pasivamente a ferritina o peroxidasa por transferencia de células linfoides obtenidas de linfonodos de cobayos sensibilizados previamente a las mismas sustancias. Tres horas después del reto antigénico intradérmico con ferritina, se observaron algunas CL en el interior de los vasos linfáticos locales y a las cuatro horas, algunas CL que habían captado el antígeno se encontraron en el seno marginal y la corteza de linfonodos que drenaban al sitio de la inyección. Estos resultados indicaron que las CL eran capaces de captar un antígeno en

la piel y circular por los linfáticos hacia los linfonodos de drenaje, desempeñando una función como la de los MØ, al exhibir posteriormente el antígeno a los linfocitos de la piel y de los linfonodos.²⁷

En 1978, otros investigadores informaron de resultados similares a los anteriores. Kelly, Balfour, Armstrong y Griffiths⁴⁴ obtuvieron la linfa de los linfáticos aferentes que drenan hacia los linfonodos poplíteos, desde la piel y tejidos superficiales de los miembros posteriores de conejos normales, la cual procesaron para observar sus células con microscopía fotónica y electrónica. La capacidad fagocítica de algunas células linfoides fue estudiada al incubarlas en una suspensión de partículas de carbón y en una solución de complejos inmunes marcados con fluoresceína. Como controles en este estudio se utilizaron MØ peritoneales. Posteriormente, las células fueron examinadas con un hemocitómetro y se hicieron preparaciones teñidas con Giemsa o azul de toluidina para observarlas con el microscopio de luz. En otros animales se tomaron muestras de linfa a diferentes intervalos después de la inyección regional de toxoide diftérico. Las células fueron marcadas con adenosina tritiada y luego regresadas a los mismos linfáticos aferentes. Algunas células marcadas fueron procesadas para realizar autorradiografía. A las 24 horas de la infusión de éstas, los conejos fueron sacrificados y los linfonodos poplíteos se procesaron para hacer cortes en

parafina y obtener las autorradiografías. Por otro lado, los cortes también permitieron hacer un estudio morfométrico y conocer la distribución de las células marcadas en los linfonodos.

Las muestras de linfa obtenidas de conejos no estimulados con el toxoide diftérico contenían alrededor de 300,000-500,000 células/ml, con una composición diferencial de 53 ± 3.8 % de células mononucleares grandes, 45 ± 4.1 % de linfocitos y 1.5 ± 0.8 % de polimorfonucleares. Las primeras fueron considerablemente más grandes que los linfocitos y cerca del 65 % se caracterizó por poseer irregularidades y proyecciones en su superficie que formaban un fleco o velo periférico. Su núcleo era grande y oval o reniforme, con uno o dos nucleolos prominentes. El citoplasma era débilmente basófilo con muy escasas vacuolas claras. Estas características fueron confirmadas ultraestructuralmente. Además, se observó que dentro de las grandes células mononucleares podían distinguirse por lo menos dos subpoblaciones. Así, cerca del 8 % de las células contenían fagolisosomas prominentes con material parcialmente digerido y un complejo de Golgi y retículo endoplásmico altamente desarrollados, lo que indicaba una actividad fagocítica activa reciente. Otra subpoblación, aproximadamente el 3 % de las células mononucleares, contenían organelos similares al GCL, dispuestos en grupos o en pilas, íntimamente asociados a haces de microfilamentos y

a vesículas o cisternas del complejo de Golgi.

En las pruebas de fagocitosis se observó que las células mononucleares no tenían actividad fagocítica, en comparación a los MØ controles, a excepción de un 8-10 % que captaron pequeñas cantidades de carbon. La captación isotópica también fue mínima en las células mononucleares, pero con estimulación antigénica, más del 95 % de éstas estuvieron marcadas.

Al primer día después de la estimulación antigénica, las células mononucleares se encontraron predominantemente en las zonas paracorticales, yuxtapuestas a células reticuloendoteliales que formaban el borde entre los cordones paracorticales y los senos intermedios. En la región subfolicular, en la corteza interfolicular y en todos los senos de los linfonodos, también se observaron células mononucleares marcadas. Entre el segundo y cuarto días, hubo un taponamiento de los senos intermedios por linfocitos desarrollándose una distensión paracortical, durante la cual pocas células mononucleares penetraron en las áreas paracorticales timodependientes del linfonodo. En contraste, la mayoría de estas células se encontraron en el seno marginal, en la corteza interfolicular y en las regiones subfoliculares. Con la reducción de la distensión paracortical, entre el cuarto y sexto días, retornó la predominancia de las células mononucleares de localización paracortical.

La retención de las células mononucleares por los linfonodos pareció ser muy efectiva, estimada en un 94 %, ya que no se observaron células semejantes en los linfáticos eferentes.

Este estudio y sus resultados nos parecen muy importantes y por ello ha sido extensa su descripción, ya que demuestra que una población de grandes células mononucleares, de las cuales cerca del 3 % contienen GCL, sin actividad fagocítica en su mayoría, emigran desde la piel y tejidos superficiales hacia los linfonodos regionales, vía los linfáticos aferentes. Este tráfico celular es incrementado por la estimulación antigénica, lo que podría tener implicaciones inmunológicas ya que las células mononucleares interaccionarían con linfocitos periféricos o de los linfonodos regionales. Además, la retención y distribución de estas células "veladas" (CV) no parecen ser azarosa, lo que es indicativo de que realizan una función específica en las regiones paracorticales de los linfonodos.

Kelly y colaboradores¹⁴⁹ son partidarios de que las CV transporten antígenos, estando de acuerdo con Silberberg-Sinakin y, sobre todo, con los trabajos de Søbberg y colaboradores, quienes detectaron pequeñas cantidades de radiactividad en algunas células de los linfáticos aferentes que drenan la piel tratada con dinitrofluorobenceno tritiado aplicado tópicamente. Estas

células fueron capaces de inducir hipersensibilidad de contacto cuando fueron transferidas a receptores normales.¹⁵⁰

Kamperdijk y Hoefsmit también describieron CL en los senos marginales y áreas paracorticales de los linfonodos, estableciendo que el GCL característico es un fenómeno transitorio que no dura más de 24 horas después de la estimulación antigénica.¹⁵¹ En el mismo trabajo, sugirieron que las CID llegan a las áreas paracorticales a través de los linfáticos aferentes regionales, ya que desaparecen de los linfonodos en un lapso de 6 semanas después de ligar estos vasos.

Resumiendo, las CL epidérmicas, en condiciones normales y después de estimulación antigénica, emigrarían hacia la dermis y los linfáticos aferentes dentro de los cuales aparecerían como CV y posteriormente como CID en las áreas paracorticales de los linfonodos regionales. Estudios inmunohistoquímicos posteriores permitirían asegurar que los tres tipos celulares mencionados pertenecen a un mismo linaje.

Simultáneamente a los resultados de Kelly y colaboradores,¹⁴⁹ otros investigadores habían descrito lo mismo, pero en la linfa obtenida de humanos. En este caso, sin embargo, las grandes células mononucleares con GCL y núcleo característico constituían el 1.5 % del total de células presentes en la linfa,¹⁵² a diferencia del 3 %

encontrado en conejos. Teniendo en mente lo anterior, Spry, Plufg, Janossy y Humphrey¹⁵³ estudiaron las muestras de linfa obtenida de pacientes con edema de miembros inferiores, para determinar si las CV expresaban antígenos Ia y receptores para el Fc de la IgG.

Ellos encontraron que las CV formaban hasta el 15 % del total de las células nucleadas presentes en la linfa. En preparaciones fijadas parecía que las CV estaban en yuxtaposición a células semejantes a linfocitos T. Característicamente no se adherían al vidrio y presentaban proyecciones citoplásmicas ondulantes. Las preparaciones celulares por citocentrífuga también evidenciaron los largos procesos citoplásmicos. Menos del 10 % de las CV formaron rosetas con los eritrocitos de buey cubiertos con IgG de conejo. Los estudios con inmunofluorescencia demostraron una reactividad muy fuerte de estas células con los antisueros anti-Ia, lo que resultaba muy alentador ya que recientemente se había demostrado que las CL expresaban Ia^{23,30} y formaban rosetas con eritrocitos cubiertos con IgG.³⁰ Además, se acababa de conocer que las CID paracorticales de linfonodos también expresaban el antígeno Ia.¹⁵⁴

En 1985, Rowden, Boudreau y Higley¹⁵⁵ y Goordyal e Isaacson¹⁵⁶ aportaron evidencias que acercaban a las CL y a las CID y que aumentaban las diferencias con las células de la serie fagocito-macrófago. Este nuevo panorama había sido iniciado por Takahashi y colaboradores en 1981,¹⁵⁷ quienes

demonstraron que las CID contenían la proteína S-100 al igual que las CL.¹⁵⁸

Rowden y colaboradores¹⁵⁸ demostraron inmunohistoquímicamente la presencia de la proteína citoplásmica S-100 en las CL epidérmicas de ratas, cobayos y humanos y en las CID localizadas en la paracorteza de los linfonodos, en la zona linfática periarterial de la pulpa blanca esplénica y en la médula tímica. Además, la piel y los linfonodos de pacientes con linfadenopatía dermatopática e histiocitosis X, enfermedades caracterizadas por la proliferación de las CL y las CID, presentaron un gran número de células S-100 positivas en los infiltrados dérmicos y en el parénquima de los linfonodos. Los experimentos con fracciones celulares obtenidas del bazo y de linfonodos de ratón y del timo de rata, demostraron que el 5-10 % de las células colectadas en la interfase eran S-100 positivas y con morfología dendrítica al día siguiente de ser cultivadas, a diferencia de otras células que carecían de procesos dendríticos y que fueron identificadas como MØ por ser S-100 negativas y lisozima positivas. Con microscopía electrónica, las células S-100 positivas tenían forma irregular por la presencia de procesos dendríticos, con núcleo multilobulado eucromático y organelos organizados en un citocentro. Las CID de la médula tímica de rata ocasionalmente presentaron GCL. En las suspensiones celulares epidérmicas, las CL S-100 positivas representaban

el 3-5 % y todas las células formadoras de rosetas mostraron reactividad para S-100.

Sin duda, la demostración del marcador citoplásmico S-100 en las CL y en las CID del timo, bazo y linfonodos, es otra evidencia de que pertenecen a un linaje celular independiente a las del sistema fagocítico-mononuclear.

A principios de 1986, Kraal, Breel, Janse y Bruin¹⁵⁹ produjeron un anticuerpo monoclonal común para las CL y las CID: el NLDC-145, que probaron en diferentes órganos linfoides periféricos de rata y ratones. El anticuerpo reaccionó con células no linfoides de aspecto dendrítico, localizadas en la paracorteza de linfonodos, en la vaina periarteriolar interna de la arteriola central del bazo y en las áreas interfoliculares de células T de las placas de Peyer. En el timo, además de las CID medulares y corticomedulares, se tiñeron algunos elementos corticales. En la médula ósea y en la sangre periférica no se demostraron células positivas. Los MØ peritoneales estimulados con tioglicolato fueron reactivos no sólo al NLDC-145, sino también a un anti-Ia. En la piel, la inmunofluorescencia doble con estos anticuerpos demostró una correlación completa entre ambos, evidenciando específicamente a las CL.

Todas las células NLDC-145 positivas fueron débilmente fosfatasa ácida positivas.

LAS CELULAS DE LANGERHANS Y LAS CELULAS DENDRITICAS DE
STEINMAN Y COHN.

En 1973, Steinman y Cohn¹⁴⁰ identificaron un tipo celular especial, diferente de los granulocitos, linfocitos y fagocitos mononucleares, durante sus estudios sobre las células del bazo del ratón que se adhieren a superficies de vidrio o de plástico. Esta cuarta variedad celular adherente presentaba un citoplasma con pseudópodos de forma, longitud, anchura y número variables, confiriendo a la célula un aspecto que iba desde el bipolar hasta el dendrítico o estrellado. El interior del citoplasma contenía gránulos circulares densos, sin evidencia de endocitosis a pesar de ser cultivadas en concentraciones elevadas de suero, condición que se sabe estimula la endocitosis en los MØ. El núcleo mostraba un perfil contorneado, con masas de cromatina adheridas a la cubierta nuclear, que era gruesa y densa. A diferencia de los MØ, la superficie celular no tenía pliegues.

La tinción vital de estas células dendríticas (CD) con verde Janus demostró un gran número de mitocondrias en el interior de los pseudópodos, mientras que el rojo neutro evidenció pocos lisosomas.¹⁴⁰

En las preparaciones de células adherentes fijadas, las CD fueron PAS negativas, tificándose débilmente con azul de

toluidina, hematoxilina y Giemsa. Histoquímicamente, las CD y los MØ fueron claramente diferenciables. Estos últimos presentaron grandes gránulos perinucleares fosfatasa ácida positivos y otros tejidos con azul de Prusia, presumiblemente gránulos de hemosiderina. La actividad de ATPasa y peroxidasa también fue demostrada únicamente en los MØ.¹⁴⁰

En los estudios microcinematográficos, con contraste de fases, se observó que los MØ eran más sedentarios que las CD, cuyo citoplasma se movía de una manera pulsátil, emitiendo y retrayendo continuamente los pseudópodos y pequeñas dendritas.¹⁴⁰

En las diferentes especies de ratones estudiadas, las CD esplénicas constituyeron del 1.0 al 1.6 % del total de células nucleadas. La separación de la pulpa blanca y la pulpa roja, evidenció que las CD estaban restringidas a la primera. En los linfonodos mesentéricos el porcentaje de CD osciló entre 0.2 a 0.5 %, en los linfonodos axilares y cervicales entre el 0.1 a 0.3 %, y en las placas de Peyer entre 0.1 a 0.2 %. El timo, el intestino, la médula ósea, el hígado y la cavidad peritoneal casi no presentaron CD.¹⁴⁰

Otros mamíferos estudiados como el ratón desnudo, la rata, el conejo y la vaca también tuvieron CD en el bazo y los linfonodos.¹⁴⁰

Steinman y Cohn pensaron inicialmente que las CD que habían descrito eran equivalentes a los MØ dendríticos que

retienen antígenos en su superficie a través de anticuerpos específicos. Estos MØ habían sido descritos en los folículos linfoides secundarios o centros germinales por Nossal y colaboradores.¹⁴¹ Sin embargo, ellos mismos, al año siguiente, aportaron pruebas sugestivas de que las CD de ratones no representaban una variante morfológica de los MØ o de los linfocitos, ya que carecían de inmunoglobulinas con cadenas ligeras kappa y lambda, expresando únicamente aloantígenos H-2. Además, no exhibían la capacidad fagocítica del MØ hacia la peroxidasa de raíz fuerte soluble, hacia partículas de poliestireno, hacia eritrocitos de oveja opsonizados y hacia agregados inmunes de peroxidasa-antiperoxidasa. Por otro lado, nunca observaron que las CD en cultivo se diferenciaron hacia MØ.¹⁴²

A diferencia de las células reticulares dendríticas, las CD no sintetizaban macromoléculas semejantes a la colágena, como se demostró cuando fueron pulsadas con prolina tritiada. Por otro lado, no formaban colonias mieloides o eritroides ya que la transferencia de suspensiones celulares esplénicas depletadas de CD por adherencia al vidrio, producía un número normal de unidades formadoras de colonias en la superficie del bazo receptor de los ratones irradiados subletalmente.¹⁴²

En una serie de trabajos posteriores, Steinman y colaboradores encontraron que las radiaciones ionizantes y los esteroides reducían importantemente la población de CD

esplénicas de ratón, siendo restituidas por la transferencia pasiva de médula ósea pero no de células tímicas de ratones singénicos.¹⁴³

Aunque la tasa de recambio de las CD era considerable, no coincidía con el índice tan bajo de marcaje con timidina tritiada. Esto sugirió que las CD derivaban de células presentes en otro compartimento proliferativo, que podría ser la médula ósea, sin embargo, el mecanismo de población y recambio no ha sido plenamente descifrado. Los órganos linfáticos de los ratones recién nacidos no contenían CD. La concentración de estas células en el bazo y linfonodos mesentéricos alcanza los niveles de adulto hasta las 3 a 4 semanas de edad, para mantenerse casi constante, tanto en la respuesta inmune primaria, como en la administración experimental de eritrocitos de oveja.¹⁴³

En 1975, Steinman, Adams y Cohn¹⁴⁴ identificaron, in situ, células esplénicas de ratón estructuralmente idénticas a las CD caracterizadas in vitro. Se localizaban únicamente en la pulpa blanca, cercanas a los vasos sanguíneos de los nódulos de ésta. Su núcleo de forma irregular con una banda periférica de heterocromatina y el citoplasma electrónlúcido fueron los criterios de identificación, ya que eran similares a los de las CD in vitro. En ratones no axénicos los hallazgos fueron muy semejantes, destacándose el mayor número y la forma irregular de las CD in situ, cuya membrana no contenían especializaciones de unión y formaba profundos

pliegues o invaginaciones hacia el cuerpo celular, interdigitándose con las prolongaciones de las células adyacentes. Steinman y colaboradores concluyeron que las CD caracterizadas *in vitro* e identificadas *in situ* en este estudio, eran similares a las CID descritas por Veldman, en 1970.¹⁴⁷

Para conocer el papel funcional de las CD, Steinman y Witmer compararon la eficacia de las diferentes poblaciones celulares contenidas en el bazo, timo y linfonodos mesentéricos, en la inducción de una respuesta proliferativa de células T alogénicas, como representación de una reacción leucocítica mixta primaria (RLM).¹⁴⁸ Los cubreobjetos con una mezcla de 100,000 CD y 100,000 MØ indujeron una respuesta proliferativa fuerte y prolongada en células esplénicas alogénicas, de 30 a 75 veces mayor a la actividad proliferativa de otras células no estimuladas.

Cuando se probó un purificado de células peritoneales adherentes, con más del 90 % de MØ y muy pocas CD, la captación de timidina tritiada que se produjo fue casi nula, lo que sugería que la estimulación de una RLM no parecía estar relacionada con el número de MØ. Por el contrario, las CD recientemente purificadas y las de 4 días de cultivo, en número de 100,000, mantuvieron la RLM observada, apenas modificada por la adición de mitomicina al sistema. Las células resultantes, marcadas con timidina tritiada, fueron identificadas como linfoblastos en fase S, mediante

autorradiografías de los frotis celulares. Además, la potencia estimuladora de las CD quedó manifestada ya que con sólo 300 a 1000 CD, se podía detectar actividad proliferativa en los co-cultivos con 5'000,000 de células esplénicas. Para obtener una respuesta similar con células esplénicas totales, se requerían de 30,000 a 300,000 de estas células. Estos resultados son particularmente significativos ya que las CD representan tan sólo el 1 % o menos de las células nucleadas de los órganos linfáticos periféricos.¹⁴²

En las fracciones celulares exentas de linfocitos T y B por pruebas citotóxicas, la RLM fue similar a las anteriores, concluyéndose que la principal capacidad de los órganos linfoides del ratón para estimular una RLM no residía en las subclases de células principales como los linfocitos T y B y los MØ, sino en un pequeño número de CD, sobre todo las esplénicas, que demostraron mayor potencia proliferativa que las CD de linfonodos, timo y médula ósea.¹⁴⁵

¿Cómo explicar esta capacidad de las CD como potentes estimuladores de la RLM? Steiman y Witmer¹⁴⁶ refieren que esta propiedad ha sido atribuida a células que expresan determinantes antigénicos Ia, codificados por la subregión I del Complejo Principal de Histocompatibilidad.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ Tal es el caso de las CD, cuya expresión del antígeno Ia persiste aún en cultivos de 4 días¹⁴⁸ y que podría explicar,

en parte, su potencia estimuladora de RLM.

En 1980, Steinman y colaboradores¹⁶⁷ hicieron una revisión muy concreta de sus trabajos y comentaron que las CD y las CL podían ser miembros de un mismo linaje celular, aunque todavía no se identificara el GCL ni se demostrara actividad de ATPasa en las primeras. Sin embargo, ambas son células que sintetizan Ia y participan en fenómenos inmunológicos semejantes, ubicándose como células accesorias del sistema inmune.

Cinco años después, en 1985, Steinman participó en un trabajo cuyos resultados sugirieron que las CL podían ser precursores o elementos inmaduros del sistema de células dendríticas.¹⁷⁰ En las suspensiones de células epidérmicas frescas, obtenidas de diferentes cepas de ratones, alrededor del 3 % de las células eran Ia positivas, (alrededor de 800 células Ia positivas / mm² de piel). A las 72 horas de cultivo, el número de estas células, no adherentes al plástico, disminuía progresivamente a un 30 % del nivel inicial. Con la microscopía electrónica, presentaban todas las características de las CL, incluyendo al GCL, observándose una notable similitud con las CD esplénicas.

La falta de marcaje con bromodeoxiuridina demostró que las CL no proliferaban in vitro.¹⁷⁰

Al cabo de 3 días de cultivo, las células Ia positivas presentaban un aspecto muy irregular por la presencia de largos procesos o velos citoplásmicos delgados, en los que

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

también se observó el inmunomarcaje con anti-Ia. La comparación de las CL y las CD esplénicas cultivadas, reveló que ambos tipos celulares compartían características similares con la microscopía electrónica, con contraste de fases y con inmunofluorescencia. En experimentos de doble marcaje, las células epidérmicas Ia positivas, exhibieron una débil pero clara reactividad con los anticuerpos F4/80 anti-MØ, M1/70 y 1.21I antiMac-1 o antirreceptor C3b y 2.4G2 antirreceptor Fc. No hubo marcaje con anticuepos anticélulas T (Lyt-1, Lyt-2) ni con anticélulas B (TIB 145 y 146) o con anti-CD esplénicas. La intensidad de la tinción anti-Ia se incrementó con el tiempo de cultivo; M1/70 permaneció constante y el resto casi o no fue detectable. Histoquímicamente, las CL y las CD en cultivo no mostraban actividad de ATPasa ni esterasa no específica, mientras que los MØ peritoneales eran fuertemente positivos. Por otro lado, ni las CL ni las CD acumulaban peroxidasa de raíz fuerte. Funcionalmente, las suspensiones frescas de células epidérmicas tenían una capacidad muy débil para inducir respuestas proliferativas de células T. Sin embargo, al cabo de tres días de cultivo, desarrollaban una progresiva actividad estimuladora. Los purificados de CL presentaban un comportamiento similar, induciendo la formación de acúmulos de células proliferativas, como lo hacían las CD. De manera significativa, la depleción de CL por citólisis con anti-Ia y complemento o por "panning" sobre cajitas

cubiertas con anti-Ia, abolía la función estimuladora. Análogas a las CD, las CL tuvieron una potencia estimuladora muy notable ya que con tan sólo 30 CL cultivadas por 3 días, se inducía una respuesta significativa en cultivos estándares de 300,000 linfocitos. Así pues, el cultivo por más de tres días hacía que las CL, que en estas condiciones perdían rápidamente el GCL, y las CD fueran marcadamente similares en ultraestructura, fenotipo y función. Sin embargo, dos diferencias eran detectables: las CL no poseían el antígeno tripsina-resistente 33D1 de las CD y la exposición a radiación ultravioleta no afectaba a las CL in vitro, mientras que las CD no sobrevivían más allá de un día después del tratamiento.¹⁷⁰

Schuller y Steinman postularon que las CL epidérmicas empiezan a madurar en la piel para luego dejarla vía la linfa y convertirse en CV de los linfáticos aferentes, que podrían ser las representantes in situ de las CL en cultivo.¹⁷⁰

Finalmente, las CD también tenían su representante in situ en las CID de los linfonodos.¹⁷¹ La relación entre CD y CID ya había sido sugerida por Steinman y colaboradores, en 1975.¹⁴⁴ La CD que Kamperdijk y colaboradores¹⁷² aislaron de los linfonodos normales y estimulados por la aplicación, en el cojinete plantar de la rata, de la vacuna paratifoidea con altas concentraciones del antígeno flagelar H, eran

células de baja densidad, resistentes a la radiación, sin receptores para Fc y no formadoras de rosetas. El citocentro tenían actividad de fosfatasa ácida mientras que la membrana celular era Ia positiva. Sus características ultraestructurales eran similares a las CL, sobre todo al día siguiente de la estimulación antigénica, observándose frecuentemente el GCL. Algunas células presentaban pseudópodos y otras eran parecidas a las CV de la linfa proveniente de la piel, descritas previamente^{149, 172} y consideradas las precursoras de las CID.¹⁷³

Las CD no sólo se han identificado en los órganos linfáticos. Su distribución abarca varios órganos como el corazón, hígado, páncreas, músculo esquelético, riñón, uréter y vejiga. Estas localizaciones pueden tener enorme trascendencia puesto que las CD son potentes estimuladores de los linfocitos T, tanto en cultivos alogénicos¹⁴⁵ como singénicos.¹⁷⁴

En 1981, Hart y Fabre¹⁷⁵ publicaron un artículo muy interesante que abrió nuevas perspectivas en la biología de las CD. Ellos demostraron la presencia de CD Ia positivas orientadas paralelamente a las fibras musculares cardíacas de la rata RT1.Ø. Emplearon técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa con el anticuerpo monoclonal F17-23-2 dirigido contra moléculas Ia. Histoquímicamente, las CD mostraron actividad de esterasa inespecífica, siendo negativas para ATPasa, β -glucuronidasa y fosfatasa ácida. En

los cortes por congelación de tiroides, hígado, páncreas y piel, también demostraron CD reactivas al anticuerpo, dispersas en el tejido conectivo intersticial. En el hígado, las CD se encontraban alrededor de la triada portal, distinguiéndose de los hepatocitos y de las células de Küpffer.¹⁷⁵

La inyección intravenosa de carbón coloidal demostró que las CD Ia positivas de los diferentes tejidos estudiados, tenían poca o nula actividad fagocítica. En el hígado, las células de Küpffer captaron el carbón pero no mostraron positividad al Ia.¹⁷⁵

Las CD Ia positivas intersticiales podían ser depletadas con radiaciones ionizantes y con ciclofosfamida. En el corazón, la disminución del número de CD ocurría al quinto día postirradiación, habiendo una recuperación al trasplantar médula ósea singénica. En los animales no trasplantados este fenómeno no se observó, lo que hizo suponer que no sólo las CD son radiosensibles, sino también sus precursores presentes en la médula ósea.¹⁷⁵

Una aplicación interesante de estos hallazgos la hicieron Faustman y colaboradores¹⁷⁴ al demostrar que el tratamiento de islotes pancreáticos (islotes de Langerhans) de ratones con un aloantisuero dirigido contra determinantes I (aloantisuero anti-CD) más complemento, previamente al trasplante de aquellos, permitía que los islotes sobrevivieran más de 200 días en un receptor

histoincompatible.

Lo anterior nos hace pensar que el conocimiento de estos eventos y su estudio abrirán nuevas posibilidades en el campo de los trasplantes.

LAS CELULAS DE LANGERHANS Y LAS CELULAS DENDRITICAS FOLICULARES.

Los centros germinales de los folículos linfoides están formados por dos tipos celulares principales: los linfoblastos o linfocitos proliferativos y los macrófagos (Tingible Body Macrophages o TBM), que son de gran tamaño. Los linfoblastos tienen características de células B, formadoras de anticuerpos,^{177, 178} que pueden desarrollarse hacia células pequeñas de memoria para las respuestas subsiguientes.¹⁷⁹

Como resultado de los estudios acerca de la distribución de antígenos dentro de los órganos linfoides, Nossal y colaboradores sugirieron, en 1965, que los centros germinales (CG) contenían otro tipo celular, diferente a las células fagocíticas típicas y cuya función sería la retener antígenos en forma de complejos inmunes sobre la superficie celular de sus abundantes prolongaciones citoplásmicas o "dendritas".^{141, 180, 181} Estas células fueron

llamadas células reticulares dendríticas¹⁴¹ y son conocidas actualmente como células dendríticas foliculares (CDF).

Con la microscopía de luz, cuando se han inducido CG por estimulación antigénica, las CDF pueden ser reconocidas por su gran núcleo lobulado, exento de heterocromatina, cuyo nucleoplasma es más denso o más basófilo que el resto de las células. El citoplasma es escaso y únicamente se distingue cuando hay grandes espacios intercelulares, dando a la célula un aspecto estrellado. Las CDF se encuentran principalmente en la región del manto y adyacentes al CG propiamente dicho. Nunca han sido observadas alrededor de la arteria central del CG.¹⁴²

Ultraestructuralmente, las CDF localizadas en la periferia de la pulpa blanca y hacia la profundidad del CG, se distinguen por la forma de su núcleo y la estructura y distribución del citoplasma. El cuerpo celular es muy pequeño, ramificándose el citoplasma en prolongaciones muy delgadas dirigidas en diferentes direcciones, aunque permaneciendo cercanas al núcleo. Así, el citoplasma está organizado en láminas más que en verdaderas dendritas. Ocasionalmente pueden observarse uniones tipo desmosomas entre dos prolongaciones, presumiblemente pertenecientes a dos CDF diferentes. Las prolongaciones intercelulares están particularmente desarrolladas en las CDF de la región del manto y de la periferia del CG. En la vaina linfática perianteriolar, las CDF no existen y las que llegan a

encontrarse sobre la arteria central del CG casi no tienen prolongaciones citoplásmicas, confundiendo con las células reticulares fibroblásticas.¹⁰²

El citoplasma de las CDF posee escasos organelos y los que tiene están pocos desarrollados. De manera característica, la superficie celular está cubierta por un material electrodensu, de grosor variable, formado por delgadas proyecciones semejantes a pelos que llenan el espacio extracelular y que pueden contener elementos particulados. Esto ha sido interpretado como un atributo por medio del cual las CDF funcionan como células retenedoras de antígenos,¹⁰² como lo sugiere la retención de carbón coloidal y de dióxido de torio coloidal. Las prolongaciones citoplásmicas llegan a captar la peroxidasa de raíz fuerte dentro de un pequeño número de vesículas. Las características ultraestructurales y funcionales, además de su nula actividad endocítica, han servido para diferenciar a las CDF de otras poblaciones celulares, sobre todo de los MØ.

El origen de las CDF no ha sido aclarado del todo. En los bazo no estimulados estas células son raras e incluso la retención de coloides no se lleva a cabo si la inyección de las partículas se realiza antes de la formación de los CG. Esto ha hecho pensar que las CDF se desarrollan después de que se ha iniciado la formación del CG, posiblemente a partir, según Chen y colaboradores,¹⁰² de la activación de

las CD ya conocidas por nosotros. Esta idea, indirectamente, propone que las CDF se originarian en la médula ósea. Dijkstra, Kamperdijk y Döpp,¹⁰³ en 1984, propusieron que el origen de éstas era a partir de células del retículo. Ellos encontraron que los folículos primarios esplénicos de ratas de 21 días de edad no mostraban, ultraestructuralmente, CDF características pero sí células reticulares fibroblásticas en estrecha relación con fibras de colágena y con numerosos pliegues de membrana incluidos en un material electrodensito que correspondía al complejo peroxidasa-antiperoxidasa inyectado 24 horas antes de ser observadas. En los folículos secundarios, ya presentes en ratas de 48 días de edad, las células cuyas membranas formaban un intrincado sistema de invaginaciones, eran las que retenían extracelularmente aquel complejo antígeno-anticuerpo. Así, las células reticulares fibroblásticas madurarían ontogénicamente hacia CDF, lo que por sí mismo sería una diferencia importante con las CD y CID.

Otros investigadores han demostrado que las CDF definitivamente no tienen una relación ontogénica con las CD esplénicas. En ratones quimerizados por radiación y transfusión de médula ósea se demostró que, por más de un año, las CDF expresaron los antígenos H-2 del receptor, a diferencia de los linfocitos y MØ esplénicos que expresaron los antígenos H-2 del donador durante 3 meses.¹⁰⁴

Los estudios histoquímicos también han aportado

evidencias que separan a las CDF del resto de las CD, incluidas las CID y las CL. En 1974, Müller-Hermelink, Heusermann y Stuttle¹²² demostraron que aquellas zonas de pulpa blanca (región de células B) del bazo humano que retenían los complejos formados por eritrocitos-anticuerpo-complemento, contenían células con un patrón histoquímico enzimático claramente diferente de las células situadas en áreas esplénicas que no retenían los complejos mencionados, es decir, las áreas de las vainas linfáticas periarteriolas. Por su localización, las células de las regiones de células B serían las CDF o células dendríticas reticulares, como las llaman Müller y colaboradores,¹²³ carentes de actividad de ATPasa y de fosfatasa alcalina pero con actividad de esterasa inespecífica, de fosfatasa ácida y, sobre todo, de 5-nucleotidasa. Por su parte, las CD de las regiones de células T se caracterizaron por su actividad de fosfatasa alcalina, de fosfatasa ácida, de esterasa inespecífica y, con menor intensidad, de ATPasa. Además de distinguirse entre sí, las CDF y las CD se diferenciaron de los MØ porque éstos mostraban una actividad más intensa de esterasa no específica y de fosfatasa ácida, siendo negativos para el resto de las enzimas.¹²⁴

Considerando en conjunto las evidencias, las células ATPasa positivas de la porción central de la pulpa blanca que no retienen complejos antígeno-anticuerpo corresponden a las CID/CD que son características de las regiones de

células T de los tejidos linfáticos, difiriendo cualitativamente de las CDF, presentes en las regiones de células B, en el resto de la actividad enzimática.

Otros hallazgos relacionados con el tema son los de Gerdes, Stein, Mason y Ziegler,¹⁴⁴ quienes encontraron que las CDF de las tonsilas palatinas humanas se pueden evidenciar in situ con inmunoperoxidasa, empleando anticuerpos dirigidos contra IgM, IgG, cadenas kappa y lambda y C3b, pero no con anti-HLA-DR. Estas dos últimas características establecen una diferencia más con las CD esplénicas, que si expresan HLA-DR pero no C3b.^{140, 142}

La identificación de inmunorreactividad de un marcador citoplásmico, la proteína S-100, ha sido de gran utilidad para conformar el sistema de las CL, distinguiéndolas de los MØ y de otras células de tipo linfoide. Lo mismo se ha conseguido con el empleo de anticuerpos monoclonales como el OKT-6 y OKT-3. En este sentido, se ha podido determinar que en cultivos de 8 a 9 días de timo humano, pueden distinguirse 4 tipos celulares: las CD, los MØ, las células epiteliales y los timocitos, que se adhieren al cuerpo o a las prolongaciones citoplásmicas de las primeras. Con inmunohistoquímica ultraestructural, estas poblaciones celulares muestran reactividad para OKIa (CD y MØ), para OKT-6 (CD y timocitos) y OKT-3 (únicamente timocitos).¹⁴⁷

En ratas se ha determinado que las CD tímicas Ia positivas derivan de la médula ósea,¹⁴⁸ de manera que las CD

tímicas positivas a OKT-6 e Ia y derivadas de médula osea pueden pertenecer al mismo linaje celular de las CL.

El sistema de las CL se caracteriza porque sus células, además de ser OKT-6 positivas, expresan inmunorreactividad a la proteína citoplásmica S-100. Las CL,¹⁵⁰ las CID y las CD^{155, 157, 170} de ratones y de humanos presentan esta proteína, además de ser DR/Ia positivas y de no reaccionar con anticuerpos monoclonales contra antígenos de las células del sistema monocito-macrófago (OKM-1, Leu M3, PAM1) ni con antiseros anti- α -1-antitripsina y anti- α -antiquimotripsina.¹⁷⁰ Además, el sistema de las CL se distingue de las CDF de ratón, de cobayo y de humano en que estas últimas son S-100 negativas. Una excepción a lo anterior son las CDF de la rata que muestran inmunorreactividad para este marcador citoplásmico.¹⁵⁰

Recientemente se ha corroborado la utilidad de la identificación de varios marcadores para reconocer a las CL extraepidérmicas. En el epitelio tonsilar humano se han encontrado células dendríticas similares a las CL, con inmunorreactividad para S-100, T6 e Ia, aunque carentes de un organelo equivalente al GCL. Significativamente, estas células parecen interactuar con linfocitos T cooperadores/inductores.¹⁷¹

Es seguro que aún no se ha dicho la última palabra acerca de las relaciones ontogénicas y funcionales de las CL, CV, CID y CD, como elementos formadores del sistema de

las células de Langerhans. En relación a las CDF, éstas no tienen características para pertenecer a este sistema, pero tampoco pueden incluirse en el sistema fagocítico-mononuclear porque no son fagocíticas ni tienen actividad de esterasa inespecífica y son negativas a Mac-1 e Ia.¹⁹²

LAS CELULAS DE LANGERHANS INTRAEPITELIALES.

Como se mencionó al principio de este capítulo, las CL tienen predilección o tropismo por los epitelios, sobre todo por aquéllos que llevan a cabo procesos de queratinización. Esta situación puede tener explicación en el hecho de que las superficies epiteliales son la primera barrera de defensa del organismo y están en constante contacto con sustancias antigénicas que demandan la participación de células que las captan, procesen y presenten a los linfocitos para dar inicio a la respuesta inmune. En este sentido, las CL representarían el componente más periférico de la rama aferente, e incluso de la eferente, del sistema inmune.³⁰

Los sitios u órganos cuyos epitelios presentan CL, identificadas con uno o más de los métodos ya mencionados, son los siguientes:

En el globo ocular, la córnea^{193, 194} y conjuntiva

humanas¹⁷⁵ y la córnea de cobayo¹⁷⁶ contienen CL.

En el sistema digestivo, las CL pueden encontrarse en la mucosa de la mayoría de los órganos que lo forman. En la cavidad oral de ratas, cobayos, monos y humanos, las CL han sido identificadas en labios, encías, lengua, mejilla, piso de la boca, paladar duro y paladar blando.¹⁷⁷⁻²⁰⁰ La mucosa esofágica de cobayos, de ratones y de humanos, además de contener CL, presenta algunas células parecidas a linfocitos.²⁰⁰⁻²⁰² En ovejas y en el ganado bovino, las CL han sido identificadas en los epitelios del rumen y del estómago anterior.^{203,204}

En el sistema genital femenino de ratones hembra y de humanos, los epitelios del cuello uterino y de la vagina presentan células con actividad histoquímica y características ultraestructurales idénticas a las de las CL epidérmicas.²⁰⁵⁻²⁰⁸

El número de epitelios con CL podría extenderse más si tomáramos en cuenta algunas condiciones patológicas en las que estas células están presentes. Creemos que ésto escapa al objetivo del presente trabajo y por ello no serán consideradas.

TABLA I

(basada en 209)

PRINCIPALES LOCALIZACIONES DEL SISTEMA DE LAS CL

<u>PIEL:</u> epidermis	<u>EPITELIOS:</u> cavidad oral
anexos de la piel	nasofaringe
linfáticos de la dermis	esófago
dermis	cérvix uterino
	vagina
	córnea
	conjuntiva
	uréter
	vejiga

TEJIDO LINFÁTICO: zona corticomedular del timo
 paracorteza timodependiente de linfonodos
 linfáticos aferentes
 vaina periarteriolar del bazo
 amígdalas
 tejido linfático asociado a intestino

TEJIDO INTERSTICIAL: de corazón
 de páncreas
 de hígado
 de riñón
 de músculo esquelético

TABLA II

(basada en 219)

COMPARACION DE LOS MACROFABOS COMUNES Y DE LAS CL

	<u>MΦ</u>	<u>CL</u>
Origen medular	+	+
Características morfológicas		
Lisomas	+	+
GCL	-	+
Núcleo indentado	-	+
Actividad fisiológica		
Adherencia al vidrio	+	+
Supervivencia in vitro	+	+
Fagocitosis Fc dependiente	+	?
Metabolismo		
Esterasa no específica	+	+
α-D-manosidasa	+	+
Fosfatasa ácida	+	-
Peroxidasa	+	+
ATPasa	+	+
α-antitripsina	+	-
α-antiquimotripsina	+	-
Lisozima	+	-
Colagenasa	+	?
Proteína S-100	-	+
Receptores de membrana		
Concanavalina A	+	+
Aglutinina de cacahuete	+	+
Fc	+	+
C ₃	+	+
Marcadores inmunológicos		
Antígeno Ia/DR	+	+
Antígeno Lag	-	+
Antígeno i	+	?
OKM1	+	-
OKT4	-	-
OKT6	-	+

LAS CELULAS DE LANGERHANS EN LOS VERTEBRADOS NO MAMIFEROS.

PECES. No existen informes de la presencia de CL en estos vertebrados.

ANFIBIOS. En 1966, Farquhar y Palade⁷¹ investigaron la actividad de ATPasa en la epidermis de Rana pipiens, Rana catesbeiana y Bufo marinus. Con microscopia de luz observaron que el producto de la reacción enzimática delineaba a todas las células epidérmicas, en particular las de los estratos germinativo, espinoso y granuloso. En los dos primeros la reacción más intensa se observó en células dendríticas al usar como sustrato ADP en vez de ATP. Ultraestructuralmente, el producto de la reacción histoquímica, a manera de un precipitado electrondenso, fue más intenso en las membranas celulares de los elementos dendríticos epidérmicos, sobre todo cuando se empleó el ADF como sustrato.

Farquhar y Palade consideraron que las células dendríticas ATPasa/ADPasa positivas de la epidermis de los anfibios estudiados eran similares a las encontradas en la epidermis de humanos. Sin embargo, no hicieron una caracterización más detallada de aquellas, ya que fueron un hallazgo fortuito al que no dieron mayor importancia.

Más recientemente, en 1984, Banerjee y Hoshino²¹⁰ estudiaron muestras de piel de Rana catesbeiana con histoquímica enzimática para demostrar ATPasa, GTPasa y

GMFasa; en algunas muestras realizaron impregnación con ZIO y otras fueron procesadas para microscopía electrónica. A pesar de este abordaje, no lograron demostrar células positivas a los diferentes sustratos ni a la impregnación metálica. Ultraestructuralmente, sólo encontraron escasas células parecidas a linfocitos, dispersas entre las células epiteliales de la epidermis. Estos resultados fueron interpretados como reflejo de la forma primitiva del sistema inmunológico de los anfibios, ya que las CL pueden ser un constituyente específico del sistema de linfonodos asociado a la piel, el cual se desarrolla filogenéticamente hasta el grupo de las aves. Alternativamente, sugirieron que la ausencia de CL podía estar relacionada a la pobre o escasa queratinización de la epidermis de las ranas.

Nosotros pensamos que la explicación a estos hallazgos es otra. Banerjee y Hoshino utilizaron cortes por congelación de piel no fijada o débilmente fijada, mientras que Farquhar y Palade obtuvieron los mejores resultados en cortes de piel fijada, realizados con un vibratomo que no requiere congelar los tejidos.⁷⁴

En nuestro laboratorio, Castell, Pérez, Rondán y Carrillo han demostrado la existencia de células dendríticas en la epidermis de diferentes especies de anfibios, que fueron positivas a la histoquímica enzimática para ATPasa, esterasa no específica y a la impregnación con ZIO. Ultraestructuralmente, el producto de la reacción

histoquímica para ATPasa se localizó exclusivamente en células de aspecto dendrítico, sin desmosomas ni tonofilamentos, con núcleo indentado. Aunque no presentaban el GCL, las características morfológicas e histoquímicas de estas células permitieron concluir que se trataba de células homólogas a las CL. La publicación de estos resultados constituiría la primera comunicación formal de la existencia de las CL en los anfibios.²¹¹

REPTILES. En 1966, Breathnach y Poyntz²¹² realizaron una investigación para conocer la estructura básica, el desarrollo y los mecanismos de transferencia de los gránulos de melanina, desde los melanocitos hasta los queratinocitos de la piel de la cola de *Lacerta vivipara*, lagartija común europea. Para ese entonces, las CL seguían siendo consideradas como el destino final de los melanocitos. En este sentido, y de acuerdo con el objetivo primordial del trabajo, las CL fueron buscadas intencionalmente.

Además de conocer la estructura de las células pigmentarias, ocasionalmente se observaron algunas células de citoplasma claro, sin desmosomas y sin tonofilamentos, con núcleo indentado, claramente distinguibles de los melanocitos y de los queratinocitos. La ausencia del GCL en aquel tipo celular hizo que Breathnach y Poyntz concluyeran que la piel de los reptiles carecía de CL típicas.²¹²

AVES. La existencia de las CL en la epidermis de las aves ha sido negada por algunos investigadores. En 1973, Reams y Tompkins²¹³ llevaron a cabo un estudio cuyo objetivo era determinar si las CL epidérmicas estaban relacionadas con las células pigmentarias. Para ello, cultivaron, en embriones de pollo, pequeños fragmentos de piel de embriones de ratón obtenidos antes de la invasión por elementos celulares derivados de las crestas neurales. Utilizaron los embriones de pollo porque este modelo ofrecía la ventaja de la ausencia de las CL, según una comunicación personal de Jimbow, y de sus propios estudios previos. Esta idea se vio reforzada porque Reams y Tompkins no encontraron artículos al respecto.

En 1981, Rowden²¹⁴ mencionó en su revisión que había observado células ATPasa positivas dispersas en la epidermis del pollo, cuyas imágenes no eran similares a las CL, además de faltarles el GCL.

Como puede observarse, es poco lo que se sabe de la existencia de células similares o equivalentes a las CL en los vertebrados no mamíferos, los cuales poseen un sistema inmunológico suficientemente desarrollado²¹⁵ que seguramente requiere de la participación de células morfofuncionalmente homólogas a las CL. Aún dentro de los mamíferos, la situación de las CL no está totalmente esclarecida. Sólo en pocas especies se ha documentado la existencia de las CL o

es incompleta la identificación de sus marcadores histoquímicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales, además de que sus características funcionales pocas veces han sido exploradas.

BISTEMA TEGUMENTARIO DE LAS AVES DOMÉSTICAS.

ESTRUCTURA GENERAL.

La piel de las aves domésticas es similar a la de muchas especies de mamíferos pero se caracteriza fundamentalmente por ser una cubierta delgada y por carecer de glándulas cutáneas. Algunas áreas no protegidas por las plumas, como el pico y la cresta, presentan una epidermis muy desarrollada y una estructura dérmica más compleja.

La piel está dividida en dos capas: una superficial o epidermis y una profunda o dermis. La primera es un epitelio plano estratificado queratinizado organizado en dos estratos: el más profundo o germinativo colinda con la dermis mientras que al más superficial, formado por células muertas, se le conoce como estrato córneo. La epidermis es avascular y se nutre por difusión de nutrientes desde la dermis. En los sitios de piel delgada la unión dermoepidérmica es muy regular con escasas papilas, a diferencia de las zonas de piel gruesa donde la unión está intensamente plegada, con abundantes asas capilares en el vértice de las papilas dérmicas.

En las partes corporales cubiertas por plumas, el

estrato germinativo consta de dos láminas celulares: una interna de células cuboidales y una externa de células poliédricas. Superficial a estas últimas, y colindando con el estrato córneo, existe una capa de células transicionales con núcleos en vías de degeneración, en las que se llevan a cabo los procesos finales de la queratinización. Finalmente, varias capas de células planas queratinizadas se organizan en hojuelas secas para formar el estrato córneo propiamente dicho.²¹⁴

En 1967, Cane y Spearman²¹⁷ propusieron que la epidermis del gallo doméstico estaba formada por cuatro capas que denominaron, de la profundidad a la superficie: capa germinal basal, capa de células espinosas, capa de células transicionales y capa o estrato córneo. Los estratos granuloso y lúcido no han sido descritos satisfactoriamente. Sin embargo, Matolsty en 1969²¹⁸ describió ultraestructuralmente la presencia de gránulos de queratohialina en las células de las segunda y tercera capas. A pesar de lo anterior, ni citoquímicamente ni con microscopía de luz convencional parece evidente un estrato granuloso. En la interfase entre el estrato germinativo y el estrato córneo se han observado algunas células aplanadas con núcleo picnótico, las células transicionales, que parecen tener gránulos de queratohialina.²¹⁴ En lo que parece no haber controversia es en la ausencia de un verdadero estrato lúcido, semejante al de la piel gruesa de

los mamíferos.

Desde el punto de vista histoquímico, la piel del gallo doméstico presenta las siguientes características:²¹⁷

-Esterasa no específica: en la piel cubierta con plumas hay una fuerte reacción en todo el "estrato granuloso". En la piel tarsal y en la de la articulación tibiotarsal, la reacción está confinada a la capa transicional de las escamas. Por debajo de esta capa, pero en la piel plantar, existen células esterasa positivas.

-ATPasa: ni la piel cubierta con plumas ni la piel tarsal presentan actividad de ATPasa. En la piel plantar se encontró una actividad débil en la capa transicional.

-Fosfatasa ácida: la capa transicional de la piel plantar y tarsal tiene una actividad enzimática intensa, mientras que en la piel cubierta con plumas la reacción es débil, aunque intensa en el estrato germinativo basal.

-Fosfatasa alcalina: el estrato germinativo basal de la piel plantar y de la articulación tibiotarsiana es muy positivo, mientras que en la piel cubierta con plumas la reacción es muy débil. En la piel tarsal también hay positividad, pero únicamente en la zona transicional de las escamas.

En relación a la dermis, también se han demostrado variaciones estructurales de acuerdo al sitio de piel de que se trate. En general, está formada de tejido conectivo fibroso, vasos sanguíneos y nervios. En la dermis están

inmersos los folículos plumosos. En la unión dermoepidérmica, la lámina basal es una capa delgada de una sustancia filamentosa fina, en la cual se insertan o se anclan numerosas fibrillas. Esta disposición de fibrillas está reforzada por un enrejado de fibras de colágena.²¹⁰

Basalmente, la dermis se confunde con el tejido conectivo laxo subcutáneo que cubre la fascia muscular del cuerpo, por encima de la cual pueden indentificarse fibras musculares lisas asociadas a los tractos de los folículos plumosos y fibras musculares estriadas que mueven la piel en respuesta a estímulos irritativos.

ULTRAESTRUCTURA.

En 1969, Matolsty²¹⁰ describió la ultraestructura de la piel delgada del dorso de pollos recién salidos del cascarón. Dividió a la epidermis en cuatro capas, de la profundidad a la superficie:

- Capa de células basales.
- Capa de células en diferenciación.
- Capa de células en transformación.
- Capa de células cornificadas.

Las células basales presentaban mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y liso y manojos de tonofilamentos asociados a desmosomas. Ocasionalmente se observaron gotas de lípidos e inclusiones parecidas a glucógeno.

Las células en diferenciación se caracterizaron por la organización del citoplasma en compartimentos y por el aplanamiento celular. La parte central de las células podía contener gotas de grasa asociadas al retículo endoplasmico liso y al complejo de Golgi. A partir de vesículas de paredes lisas se formaban cuerpos multigranulares cuyo contenido era vertido al citoplasma cuando se rompían. En una etapa posterior, los gránulos de queratohialina se acumulaban en la periferia de la célula donde ya se habían depositado filamentos finos. En conjunto, formaban una banda cortical densa. Este momento celular es lo que se ha considerado como el equivalente al estrato granuloso de la piel de los mamíferos.

Las células en transformación no formaban una capa continua, pero era posible observarlas entre el "estrato granuloso" y el estrato córneo. Se caracterizaron por contener filamentos finos, gránulos de queratohialina, gotas de grasa y algunos cuerpos multigranulares. Se podían observar algunos organelos y el núcleo pero ya en degeneración avanzada, lo que daba lugar posteriormente a una célula muy aplanada con una sustancia densa acumulada en su periferia y gotas de grasa llenando su parte central.

Las células cornificadas estaban casi completamente aplanadas y su parte central había perdido las gotas de lípidos. La sustancia periférica densa de las células en transformación parecía formar una cubierta doble y

engrosada.

Todas las células, hasta las células en transformación, presentaban uniones tipo desmosoma.²¹⁰

En resumen, y de acuerdo con la Nomenclatura Anatómica de París (Comité Internacional de la Nomenclatura Anatómica), la piel de las aves presenta las siguientes capas:

EPIDERMIS

Estrato Córneo

Estrato Germinativo

Capa transicional

Capa intermedia o estrato espinoso

Capa basal

DERMIS

Estrato Superficial de la Dermis

Estrato Profundo de la Dermis

Capa densa de tejido conectivo

Capa laxa de tejido conectivo (grasa, vasos, músculo liso y folículos plumosos)

Capa músculo-elástica (músculo y tendones apteriales y de las plumas)

Lámina Elástica de la Dermis

SUBDERMIS o SUBCUTIS o FASCIA SUPERFICIAL

Estrato Superficial del Subcutis

Estrato Profundo del Subcutis

ANEXOS EPIDERMICOS DE LAS AVES.

Las modificaciones epidérmicas en las aves son importantes para la producción de estructuras queratinizadas y duras como el pico, las garras, las escamas y, sobre todo, lo que las caracteriza exclusivamente : las plumas. En las tres primeras, la intensa actividad proliferativa del estrato germinativo origina capas de células queratinizadas empacadas estrechamente y cuya queratina es muy densa, probablemente por la presencia de uniones disulfuro y de calcio.²¹⁷

Por ser el elemento más conspicuo de las aves, describiremos, aunque brevemente, la estructura de las plumas. Esto nos permitirá abordar el tema de la pigmentación y de las células responsables de ella.

Las plumas son, en realidad, escamas reptilianas modificadas. El desarrollo de una pluma recuerda mucho al de una escama de saurios y ofidios pero la evolución exacta de aquella no se conoce del todo.

Se describen tres tipos de plumas: las filoplumas o plumas filamentosas, las plúmulas o plumas del plumón y las penas o plumas del contorno.

Las filoplumas se parecen a los pelos pero tienen un origen y estructura muy diferentes. Están formadas de un cálamo o cañón delgado en cuyo extremo distal hay unas barbas. El primero se inserta en la piel y lo rodea un

folículo plumoso. El pavo real es un ejemplo en donde las filoplumas están muy especializadas.

Las plúmulas constituyen el primer plumaje de las crías y son sustituidas posteriormente por las plumas de contorno del adulto. Su cálamo es corto y de su extremo distal emergen unas barbas provistas de bárbulas o barbillas.

A las penas se les conoce como plumas de contorno porque determinan la silueta del animal. A las áreas donde se insertan en la piel se les llama pterilios y a las áreas desprovistas de ellas apterios. Las plumas conocidas como rémiges o remeras y las plumas de dirección, rectrices o timoneras son especializaciones para el vuelo de este tipo de plumas.

Las plumas de contorno son las plumas tipo donde se describen las partes de una pluma. Una pena típica consta de un cálamo largo y una porción ensanchada y aplanada que es el vexilo o estandarte. La porción del cálamo insertada en la piel se conoce como cañón y la porción relacionada con el vexilo es el raquis. El cañón es hueco, con un ombligo inferior y otro superior donde se une al raquis, que es macizo. El vexilo está formado por barbas que se insertan en el raquis y cada una lleva bárbulas en su cara proximal y distal. Las bárbulas proximales de una barba se articulan con las bárbulas distales de otra, por medio de ganchillos o barbicelas presentes en la cara inferior de cada bárbula.

El primer indicio de la formación de un plúmula típica

foliculo plumoso. El pavo real es un ejemplo en donde las filoplumas están muy especializadas.

Las plúmulas constituyen el primer plumaje de las crías y son sustituidas posteriormente por las plumas de contorno del adulto. Su cálamo es corto y de su extremo distal emergen unas barbas provistas de bárbulas o barbillas.

A las penas se les conoce como plumas de contorno porque determinan la silueta del animal. A las áreas donde se insertan en la piel se les llama pterilios y a las áreas desprovistas de ellas apterios. Las plumas conocidas como rémiges o remeras y las plumas de dirección, rectrices o timoneras son especializaciones para el vuelo de este tipo de plumas.

Las plumas de contorno son las plumas tipo donde se describen las partes de una pluma. Una pena típica consta de un cálamo largo y una porción ensanchada y aplanada que es el vexilo o estandarte. La porción del cálamo insertada en la piel se conoce como cañón y la porción relacionada con el vexilo es el raquis. El cañón es hueco, con un ombligo inferior y otro superior donde se une al raquis, que es macizo. El vexilo está formado por barbas que se insertan en el raquis y cada una lleva bárbulas en su cara proximal y distal. Las bárbulas proximales de una barba se articulan con las bárbulas distales de otra, por medio de ganchillos o barbicelas presentes en la cara inferior de cada bárbula.

El primer indicio de la formación de un plúmula típica

es la formación de una protuberancia o papila dérmica elongada y redonda, cubierta de epidermis. La base de la papila está rodeada por un surco anular que es el primordio de un folículo plumoso. La epidermis de la papila forma una vaina llamada peridermo y la dermis subyacente se pliega para penetrar en la pulpa dérmica. Este primordio de las plumas, con aristas que formarán las barbas, crece y hace protuberancia hasta que el estrato germinativo se retrae y se rompe el vértice del peridermo. Las aristas se agrietan y las bárbulas emergen en el vértice del cálamo. Con el crecimiento de la pluma, las aristas se cornifican y se separan una de la otra.^{219.220}

PIGMENTACION DE LAS AVES.

Los patrones de coloración de las aves son los más llamativos de todos los vertebrados. Esta característica no sólo es un adorno sino una adaptación evolutiva trascendental que se combina funcionalmente con el pobre desarrollo de la olfacción de las aves y con su excelente sentido de la visión. Así, mientras que en numerosos vertebrados el sentido del olfato es importante para el reconocimiento, la estimulación sexual y la vida social, para las aves lo son la vistosa cubierta y su muy buena visión.

La pigmentación de muchos grupos de animales está dada

por la presencia de pigmentos como las melaninas, las cuales tienen un rango de color que va del negro al café y amarillo, y parcialmente por los efectos de reflexión y difracción. En la papila plumosa se encuentran las células pigmentarias, los melanocitos, que vierten sus pigmentos a las barbas y bárbulas a través de sus procesos dendríticos. Además de las melaninas, existen otros pigmentos como la xantantina, de color amarillo, y la astaxantina, de color rojo, localizadas en el plumaje de los canarios, en el pico y patas de los patos y en algunos faisanes, respectivamente. La coloración blanca usualmente está dada por la reflexión. Los colores azules se originan porque la luz incidente se refleja en una capa de queratina esponjosa con orificios de 1 a 2 μm de diámetro que absorben el rojo y reflejan el azul.²²¹

En las aves, como en el resto de los vertebrados, las células pigmentarias se originan de la cresta neural. Una vez que los melanoblastos han emigrado hacia la piel y hacia los primordios de las plumas, se multiplican entre el cuarto y séptimo día de incubación, distribuyéndose uniformemente hasta que se incorporan a los primordios plumosos recién formados, donde persisten y se multiplican, mientras van desapareciendo de la epidermis.²²² Entre el séptimo y el octavo día de incubación las células empiezan a sintetizar melalina. El núcleo celular se hace esférico y el citoplasma emite algunas prolongaciones. Estos cambios morfofuncionales

indican que el melanoblasto se ha transformado en un melanocito.

Desde el décimo día de incubación los melanocitos empiezan a agruparse en líneas paralelas al eje mayor de los dos tercios distales del gérmen plumoso, situándose en la capa intermedia, cerca del borde interno de las barbas en formación. La transferencia de pigmentos a las células vecinas parece estar mediada por dos mecanismos. En uno de ellos, el melanocito "inyecta" el pigmento; en el otro se requiere de la participación activa de las células de las bábula para "ingerir" el pigmento, sólomente cuando ya han adquirido una etapa definida de diferenciación, caracterizada por el inicio de la queratinización.²²³

La melanina no sólo se deposita en las plumas sino también en la piel y otros de los derivados. En los pollos, los melanocitos aparecen en la dermis entre los 15 y 21 días de desarrollo. Estas células son poco comunes o raras en la piel corporal de la mayoría de los pollos pigmentados. Algunas especies presentan una piel muy pigmentada debido a los numerosos melanocitos dérmicos. Así pues, tanto los melanoblastos como los melanocitos se localizan en la dermis; los primeros constituyen un reservorio para la pigmentación de las plumas en regeneración, mientras que los melanocitos dérmicos influyen en la pigmentación de la piel. Aunque los melanocitos pueden ser idénticos morfológicamente, los dérmicos sintetizan gránulos de

melanina diferentes a los de los melanocitos de las plumas.²²⁴

Algunas áreas desprovistas de plumas, como la cubierta córnea del pico o ramfoteca, presentan algunos melanocitos en la dermis, mientras que en la epidermis estas células son más abundantes pero de menor tamaño, localizadas en la capa basal del estrato germinativo. En la piel escamosa de las patas y piernas o podoteca, pueden identificarse gránulos de melanina en la epidermis a pesar de que el número de melanocitos es muy escaso o nulo. Posiblemente, los gránulos de pigmentos provienen de los melanocitos dérmicos, que son más numerosos que en la ramfoteca.²²⁵

Finalmente, las aves, como los reptiles, casi no poseen glándulas cutáneas. Es característico de las primeras la presencia de una glándula localizada sobre la base de la cloaca, de secreción oleosa que es recogida por el pico del ave y esparcida sobre el plumaje. Esta estructura es conocida como glándula uropigial, es par, del tipo acinosa ramificada y holocrina, particularmente desarrollada en las aves acuáticas. Algunas especies de aves tienen una glándula de secreción sebácea cerca del orificio auditivo.

FUNCIONES DE LA PIEL.

Como en la mayoría de los mamíferos, la piel de las aves presenta varias funciones que incluyen las de proteger

al organismo contra las pérdidas de agua por evaporación (deseccación) y contra los rozamientos, lo que realiza por medio de la capa córnea de la epidermis. Además, recibe estímulos del ambiente a través de sus terminaciones nerviosas. Por medio de sus vasos, glándulas y tejido adiposo, colabora en la termorregulación del cuerpo. Aunado a lo anterior, la pigmentación de las plumas protege contra las radiaciones ultravioleta.²¹⁹

En algunas especies de mamíferos se ha reconocido recientemente la función inmunológica de la piel. Esto no se ha hecho extensivo al resto de los vertebrados. Sin embargo, en el grupo de las aves se han descrito algunas reacciones cutáneas cuya naturaleza es inmunológica. En 1975, Maguirre, Rank y Weidanz²²⁵ produjeron, por vez primera, dermatitis de contacto alérgica específica en pollos, luego de la sensibilización y reto epicutáneo con alérgenos de bajo peso molecular como el cloruro de picrilo y la oxazolona. Esto resultaba muy interesante porque permitía estudiar los fenómenos de hipersensibilidad en las aves, que pueden ser depletadas selectivamente de células B y T, y determinar la participación de estos elementos en la inducción, expresión e inhibición de las dermatitis de contacto alérgica.

Al año siguiente, los autores antes mencionados informaron de resultados similares, agregando el dinitrofluorobenceno como agente sensibilizador. A las 24 a 48 horas después del reto antigénico, los cambios

histológicos producidos en los sitios cutáneos de desafío se caracterizaron por acantosis, acantolisis y abscesos intraepidérmicos. En la dermis se observó edema y exudados linfocítico e histiocítico, extendiéndose hasta la epidermis.²²⁴

En un trabajo posterior, Weidanz, Weber y Maguirre emplearon pollos bursectomizados químicamente con testosterona y ciclofosfamida para definir la participación de células T y B en la dermatitis alérgica de contacto. Estos animales deficientes en células B y por lo tanto agammaglobulinémicos, fueron capaces de manifestar hipersensibilidad a la oxazolona, por lo que se concluyó que esta reacción cutánea era una respuesta de células T.²²⁷

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las CL epidérmicas de los mamíferos son una población celular necesaria para dar inicio a las respuestas inmunológicas normales y anormales asociadas a la piel, ya que realizan la captación, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos. La existencia de células homólogas a las CL en la epidermis del resto de los vertebrados no ha sido demostrada. En el caso particular de las aves, la presencia de estas células es sugerida porque tienen la capacidad de manifestar fenómenos de hipersensibilidad de contacto alérgica muy similares a la de algunos mamíferos, en los que las CL participan de manera determinante. Además, las características histológicas de la piel de las aves reúnen las condiciones microambientales por las que las CL epidérmicas de los mamíferos manifiestan tropismo y en donde llevan a cabo su diferenciación morfofuncional

HIPOTESIS.

1) La epidermis de las aves contiene células morfológicamente homólogas a las CL de los mamíferos, porque es un epitelio plano estratificado donde se llevan a cabo procesos de queratinización.

2) La inducción de dermatitis de contacto a alérgenos de bajo peso molecular en los pollos, macroscópica e histológicamente semejante a la de los mamíferos, sugiere la existencia de células epidérmicas que son homólogas a las CL.

OBJETIVO GENERAL.

Demostrar la presencia de células de Langerhans o su equivalente en la epidermis de las aves.

OBJETIVO PARTICULAR.

Caracterizar morfológicamente a las células de Langerhans o su equivalente en la epidermis de las aves.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

1) Se estudiaron 20 pollos (Gallus gallus) mayores de 30 días, fueron sacrificados por decapitación y se utilizó la piel de ambas apterias pectorales para obtener fragmentos de 1 cm², destinados a los estudios de microscopía fotónica, y de 10 mm X 1mm X 1mm para microscopía electrónica.

2) Con el fin de conocer la histología general de la piel del pollo, en especial para identificar el epitelio plano estratificado de la epidermis, algunas muestras de piel fueron fijadas y procesadas para hacer cortes en parafina de 6 µm teñidos con hematoxilina-eosina.

3) Uno de los procedimientos más importantes del presente trabajo fue la separación mecánica de láminas epidérmicas. Para ello, se probaron 6 técnicas diferentes y las láminas separadas fueron procesadas para hacer cortes en parafina de 2 a 4 µm teñidos con hematoxilina y eosina. Con esto, corroboramos que se obtuvo exclusivamente epidermis.

4) La técnica o técnicas de separación que resultaron más eficientes, es decir, que permitieron la obtención de láminas sin dificultad y, sobre todo, que conservaron la estructura de la epidermis, fueron utilizadas al realizar la técnica histoquímica para ATPasa.

5) Para la demostración histoquímica de ATPasa se empleó una modificación a la técnica de Juhlin y Shelley⁴² realizada por Robins y Brandon.⁴³ Las etapas críticas fueron el tiempo de fijación en formol-cacodilato durante 20 a 60 minutos, a 4° C y el tiempo de incubación en una solución fresca de ATP durante 60 a 90 minutos, a 37° C.

Aunque los resultados fueron variables, la intensidad de la actividad enzimática localizada en algunas células y la presencia de actividad tisular inespecífica o "fondo", fueron los indicadores para hacer modificaciones en el tiempo de fijación. En general, cuando se observó mucho "fondo", se aumentó el tiempo de fijación. En relación al tiempo de incubación, las modificaciones fueron sugeridas, principalmente, por la formación de precipitados que no fueron eliminados con los lavados de las láminas epidérmicas en solución salina balanceada.

El considerar en primer lugar las anteriores variaciones a la técnica, se debe a que son los factores que más han influido en los estudios de histoquímica enzimática de las CL en las diferentes especies de mamíferos.

Otras variaciones implementadas fueron el tipo de fijador y la concentración del sustrato en el medio de incubación. Para esto, se consideró como guía lo consignado por Robins y Brandon⁴³ reproducido en la tabla III de material y métodos.

Los controles, en cualquiera de los casos, fueron las láminas epidérmicas incubadas en un medio carente de ATP.

La utilización de láminas epidérmicas para estudiar a las CL con histoquímica para ATPasa, nos permitió observar plenamente la morfología dendrítica, la distribución espacial de las células que resultaron positivas y su relación con los queratinocitos vecinos.

6) Algunas láminas epidérmicas con reacción histoquímica fueron procesadas para realizar cortes en parafina que no se contratificaron con hematoxilina y eosina. Esto nos permitió definir la ubicación intraepidérmica de las células ATPasa positivas.

7) Para la demostración de ATPasa ultraestructural se emplearon variaciones a la técnica diseñada por Farquhar y Palade para demostrar actividad de ATPasa en la epidermis de los anfibios.⁷⁴ Las modificaciones incluyeron el empleo de diferentes osmolaridades del fijador primario, preparado en distintos amortiguadores. Además, como en el caso de la ATPasa en lámina epidérmica, se probaron varios medios de incubación que difirieron en la concentración de ATP (ver tabla III de material y métodos).

Los controles fueron los fragmentos de piel incubados en el medio sin sustrato.

MATERIAL Y METODOS.OBTENCION DE LAS MUESTRAS.

Los pollos fueron sacrificados por decapitación y se tomó la piel de ambas apterías pectorales. Para los estudios de microscopía fotónica se cortaron fragmentos de 1 cm² aproximadamente y para microscopía electrónica las muestras fueron de 10 mm X 1 mm X 1 mm.

TECNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA.

Algunas muestras de piel de 1 cm² fueron fijadas en formol amortiguado al 10% durante 24 horas y procesadas para realizar cortes en parafina de 6 µm teñidos con la técnica habitual de hematoxilina-eosina.

METODOS DE SEPARACION DE LAMINAS EPIDERMICAS.

Las muestras de piel de 1 cm² fueron incubadas en las siguientes soluciones:

1. EDTA; NaCl-----3.415 g.
- KCl-----0.10 g.
- Na₂HPO₄-----0.575 g
- KH₂PO₄-----0.10 g
- EDTA-----3.8 g.
- Agua destilada-----500 ml.
- Rojo fenol al 1%-----6-8 gotas
- Ajustar pH a 7.2-7.4 con NaOH 1N ó HCl 1N.

Incubación de 20 a 90 minutos a 37° C. ⁴⁵

2. CLORURO DE CALCIO: las muestras de piel se incubaron en una solución 2M de cloruro de calcio durante 20 a 40 minutos a temperatura ambiente.74

3. TIOCIANATO DE AMONIO: en una solución 0.5M de tiocianato de amonio en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 6.8, se incubaron las muestras durante 20 minutos a 4° C.45

5. ALCALINA: incubación de las muestras de piel en un amortiguador de borato-carbonato al 1%, pH 11.0 durante 30 minutos a 37° C.45

6. CALOR: se colocó el lado dérmico de las muestras de piel sobre una platina caliente a 49.2° C durante 2 minutos.45

La obtención de las láminas epidérmicas se realizó con la ayuda de una pinza de disección fina sin dientes o con dos agujas hipodérmicas.

TECNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA EN LAMINAS EPIDERMICAS.

Una vez obtenidas las láminas epidérmicas fueron lavadas en solución salina balanceada (SSB) y fijadas en formol amortiguado al 10%. Las etapas de deshidratación, aclaramiento e infiltración en parafina, se realizaron manualmente con el objeto de no dañar y/o extraviar las

láminas durante el procedimiento automático en el Histoquinette. Posteriormente se incluyeron en parafina y se cortaron a 4-10 μm para teñirlas con hematoxilina-eosina.

TECNICA PARA DEMOSTRAR LA ACTIVIDAD DE ATPasa EN LAMINAS EPIDERMICAS.

Una vez establecido el método de separación apropiado, las láminas epidérmicas fueron procesadas de la siguiente manera:

1. Lavado en SSB durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Fijación en formol-cacodilato durante 60 minutos a 4° C.
3. Lavado en SSB, 3 veces de 5 minutos cada una a temperatura ambiente.
4. Lavado en solución tri-maleato durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Incubación en solución fresca de ATP, filtrada, durante 90 minutos a 37° C.
6. Lavado en agua destilada, 2 veces de 5 minutos cada una a temperatura ambiente.
7. Revelado en sulfuro de amonio al 1% hasta observar una coloración café tabaco de las láminas. En general, menos de un minuto.
8. Lavado en agua destilada, 2 veces de 5 minutos cada una

a temperatura ambiente.

9. Montado en gelatina glicerizada de Kaiser.

Resultado: el cuerpo y las dendritas de las CL aparecieron de color café oscuro sobre un fondo claro o ambarino.

SOLUCIONES PARA LA TECNICA DE ATPasa.

Solución Salina Balanceada.

NaCl-----	3.415 g
KCl-----	0.10 g
Na ₂ HPO ₄ -----	0.575 g
KH ₂ PO ₄ -----	0.10 g
Agua destilada-----	500 ml

Rojo fenol al 1%,--6 a 8 gotas. Se agrega como indicador de pH. Ajustar el pH si es necesario con NaOH 1N o HCl 1N.

Solución de Formol-Cacodilato.

Sucrosa-----	6.85 g
Formol al 38-40%-----	10 ml
Acido cacodílico 0.2M-----	40 ml
Agua destilada-----	50 ml

Solución Tris-Maleato (pH 7.2, 0.25M).

Tris salt buffer-----	12.10 g
Acido maleico-----	11.60 g
NaOH-----	4.0 g
Agua destilada-----	400 ml

Solución de ATP.

Solución tris-maleato----	10.00 ml
Agua destilada-----	12.50 ml
Mg ₂ SO ₄ 0.1M-----	2.5 ml
Pb(NO ₃) ₂ al 2%-----	2.75 ml
Glucosa-----	1.25 g
ATP-----	0.02 g

Todas las soluciones se prepararon y guardaron en refrigeración excepto la solución de ATP, que se preparó poco antes de utilizarla. El nitrato de plomo también se preparó hasta el momento de agregarlo a la solución del sustrato, lo cual se hizo gota a gota para evitar su precipitación.

Solución reveladora de sulfuro de amonio al 1%.

Agua destilada-----19.8 ml
 Sulfuro de amonio----- 0.2 ml

La solución se preparó dentro de una campana de extracción al momento de utilizarse.

Gelatina glicerinada de Kaiser.

Glicerina-----50 g
 Gelatina----- 7 g
 Acido fénico----- 1 g
 Agua destilada----42 ml

La gelatina se colocó en un cristizador para hidratarla perfectamente con agua destilada vertida a goteo lento con una pipeta Pasteur. Posteriormente se colocó el cristizador en baño María y se agregó el resto del agua destilada para dejar que la gelatina se disolviera por sí sola durante el tiempo necesario para ello.

El ácido fénico se disolvió en la glicerina y se agregó a la gelatina, procurando que escurriera por las paredes del cristizador para evitar la formación de burbujas. Se permitió que los componentes se mezclaran hasta que la gelatina adquirió un color homogéneo.

Se dejó enfriar a la temperatura ambiente o en refrigeración. Para usarlo, se cortó un fragmento con hoja de rasurar y se licuó en baño María.

TABLA IIIVariaciones a los esquemas de fijación y concentración de sustratos.FIJADOR

- 1.- Formol-cacodilato 0.1M, pH 6.0, a 4° C y 20° C.
- 2.- Formol al 10% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7, a 4° C y 20° C.
- 3.- Glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato 0.2M, a 4° C.

Cada uno se probó durante 5, 20 y 60 minutos.

CONCENTRACION DEL SUSTRATO

- 1.- 9.07×10^{-4} molar de ATP. Wachstein y Meisel.⁵⁷
 - 2.- 3.63×10^{-4} molar de ATP. Mackenzie y Squier.⁴⁴
 - 3.- 8.25×10^{-4} molar de ATP. Juhlin y Shelley.⁴⁵
-

En cada caso, las incubaciones se hicieron durante 5, 15, 20, 60, 90 y 120 minutos, a 37° C.

En la técnica que empleamos de inicio, la concentración de ATP fue de 1.32×10^{-3} molar (Robins y Brandon⁴⁸).

ATPasa ULTRAESTRUCTURAL.

- 1) Obtención de muestras de 10 mm X 1 mm X 1 mm, aproximadamente.
- 2) Fijación en glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.2 (483 mOsm), durante 2 horas a 4° C. Después de la primera media hora de fijación, sección de las muestras en fragmentos de 50 a 100 μ m aproximadamente, con vibratomo o manualmente.
- 3) Lavado en amortiguador de cacodilato de sodio 0.15M, pH 7.2, adicionado con sacarosa 0.025M y cloruro de calcio 0.05% para obtener osmolaridad de 521 mOsm. Hacer 3 lavados de 15 minutos cada uno a 4° C.
- 4) Incubación en el medio de Wachstein y Meisel durante 60 minutos a 37° C. La osmolaridad del medio debe ser de 88 mOsm.
- 5) Lavado de los cortes como en 3).
- 6) Posfijar en tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M, pH 7.2 y a 4° C, durante 45 minutos.
- 7) Lavado como en 3).
- 8) Deshidratación en alcoholes de graduación ascendente (2 horas aproximadamente).

- 9) Infiltración en Araldita 6005-tolueno (1:1), durante 7 días a temperatura ambiente.
- 10) Inclusión y polimerización en Araldita 6005, durante 48 horas a 60° C.
- 11) Cortes semifinos, finos y observar al microscopio electrónico.

VARIACIONES A LA TÉCNICA ULTRAESTRUCTURAL DE ATPasa.

- 1) Modificación del tipo de amortiguador del fijador primario.
- 2) Modificación de la osmolaridad de las soluciones: 290, 400 y 700 mOsm/l.
- 3) Utilización de diferentes concentraciones del sustrato (ver tabla III).

RESULTADOS

MICROSCOPIA FOTONICA

Hematoxilina-eosina: En los cortes teñidos con H-E (figura 1), se observó que la piel de las apterias pectorales contenía todos los elementos descritos en el resto de la piel del pollo, diferenciándose únicamente por ser delgada, muy plegada y por carecer de folículos plumosos.

La epidermis era un epitelio plano estratificado queratinizado, formado por 2 a 3 estratos de células nucleadas y por una capa superficial, aparentemente acelular, organizada en láminas que se descamaban como hojuelas cornificadas. Los límites intercelulares eran poco distinguibles y por ello las formas de las células eran difíciles de precisar. Sin embargo, se observó que desde el estrato basal hasta la superficie las células iban haciéndose cada vez más planas o fusiformes. Frecuentemente, las células presentaron un halo claro perinuclear, siendo más evidente en las situadas en los estratos intermedios.

La unión dermoepidérmica tuvo un perfil muy regular debido a la ausencia de clavos interpapilares y a que la dermis subyacente carecía de papilas.

La dermis superficial estuvo formada por un estrato en el que predominaron células fusiformes semejantes a

fibroblastos y haces gruesos de colágena organizados en asas, que junto con la epidermis vecina daban el aspecto plegado de la piel. En esta capa de la dermis sólo ocasionalmente se observaron vasos sanguíneos.

Hacia la profundidad dérmica se identificó una banda continua y no plegada de células musculares lisas. Por arriba de éstas había numerosos vasos sanguíneos, por debajo tejido conectivo laxo, sobre haces longitudinales y transversales de músculo estriado.

Nunca se observaron elementos glandulares.

Métodos de separación: La separación con cloruro de calcio fué la más efectiva ya que permitió la obtención fácil, rápida y exclusiva de la epidermis (figura 2). Además, la estructura epitelial estaba íntegra, mostrando un patrón histológico semejante al de la epidermis de los cortes de piel total (comparar figura 1 y figura 2).

La separación con calor también fué rápida y completa, pero frecuentemente había restos de dermis en las láminas epidérmicas.

El empleo del amortiguador alcalino y del tiocianato de amonio separó fácilmente la epidermis pero con destrucción importante del tejido. Al reducir los tiempos de incubación lo único que se logró separar fué el estrato córneo.

El proceso de separación con EDTA fué el menos exitoso. Sólo ocasionalmente, aún prolongando el tiempo de incubación por más de 24 horas, se obtenían pequeños fragmentos de

láminas epidérmicas que por su tamaño no podían ser procesadas para realizar los cortes en parafina.

HISTOQUIMICA ENZIMATICA PARA ATPasa

La técnica histoquímica para ATPasa de Robins y Brandon⁴⁶ en láminas epidérmicas separadas con cloruro de calcio, fue con la que se obtuvieron los resultados más constantes y definitivos. Las células ATPasa positivas se distinguieron fácilmente del resto de las células epidérmicas porque el producto de la reacción histoquímica, localizado únicamente en aquéllas, las evidenció como células con cuerpos largos y poligonales de cuyos ángulos emergían prolongaciones que se ramificaban e introducían entre los queratinocitos, lo que les confería un aspecto⁴⁶ estrellado o dendrítico (figura 3, figura 4).

La distribución espacial de estas células dendríticas ATPasa positivas no fué uniforme ya que frecuentemente formaban acúmulos y, por el contrario, había áreas epidérmicas que carecían de ellas (figura 3).

Aunque hubo diferencias en el patrón dendrítico de las células, el número y extensión de las prolongaciones ramificadas fueron suficientes para que cada una de las células ATPasa positivas estableciera contacto con, por lo menos, seis queratinocitos. Comúnmente, las prolongaciones citoplásmicas de una misma célula dendrítica, rodeaban a uno o más queratinocitos vecinos (figura 4).

En las preparaciones en las que se logró una excelente definición de las dendritas el número de queratinocitos relacionados a una célula ATPasa positiva fue mayor (figura 5, figura 6). Más aún, la estrecha contigüidad y los contactos entre las prolongaciones de una célula y otra dió la impresión de que estas células dendríticas formaban una red en cuyos espacios se localizan el resto de las células epidérmicas (figura 5).

En los cortes de láminas epidérmicas procesadas con la técnica de Robins y Brandon** no fue posible identificar todas las características morfológicas de las células dendríticas ATPasa positivas de la epidermis del pollo, descritas anteriormente. Sin embargo, pudo observarse que algunas células poligonales de coloración café oscura, producto de la reacción enzimática, y ubicadas basalmente, eran claramente distinguibles de los queratinocitos pálidos o claros. La no contraindicación con H-E resaltó estas diferencias (figura 7).

Los controles nunca presentaron células parecidas a las ATPasa positivas, observándose únicamente a los queratinocitos.

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

ATPasa ULTRAESTRUCTURAL. El estudio ultraestructural de la epidermis del pollo demostró claramente que ésta es un

epitelio plano estratificado queratinizado, separado de la dermis por una membrana o lámina basal (figura 8, figura 9).

La técnica histoquímica para ATPasa ultraestructural de Farquhar y Palade,⁷¹ modificando la osmolaridad del amortiguador a 450 ± 50 mOsm/l, aproximadamente, y conservando la del medio de incubación de Wachstein y Meisels⁷² a 88 mOsm/l, fue la que ofreció mejores resultados. Cuando se emplearon amortiguadores del fijador primario con osmolaridades inferiores a 300 mOsm/l o de 700 mOsm/l aproximadamente, el producto de la reacción enzimática pudo observarse en la membrana plasmática de algunas células epidérmicas cuya ultraestructura estaba poco conservada.

En las preparaciones mejor logradas, el producto de la reacción histoquímica para ATPasa se identificó como un precipitado electrodensso depositado exclusivamente en la membrana plasmática y, finamente granular, en el citoplasma de células relativamente claras, localizadas entre la capa basal y la capa intermedia del estrato germinativo. El contorno de estas células era irregular por la presencia de prolongaciones citoplásmicas, algunas de las cuales en el corte aparecían como masas de citoplasma interpuestas entre los queratinocitos y limitadas por membranas con el producto de la reacción histoquímica (figura 8, figura 9).

Las células dendríticas ATPasa positivas de la epidermis del pollo se distinguieron ultraestructuralmente de los queratinocitos por su relativa palidez citoplásmica

debida a la ausencia de tonofilamentos y por carecer de uniones celulares tipo desmosoma, que son características de aquéllas. En el citoplasma se observaron escasas mitocondrias y segmentos cortos de retículo endoplásmico y una gran cantidad de microfilamentos delgados (figura 9, figura 10). Los microfilamentos se localizaron en la periferia del cuerpo celular y de las dendritas, formando enrejados fibrilares inmediatamente por dentro de algunas regiones de la membrana plasmática (figura 10), diferentes a los haces de tonofilamentos densos observados en los queratinocitos adyacentes.

El núcleo era casi central y redondo, sin irregularidades en la cubierta nuclear a la que se adherían masas de cromatina condensada (figuras 8, 9, 10).

Por las características ultraestructurales y por presentar actividad de ATPasa, las células dendríticas encontradas en la epidermis del pollo semejaban a las CL y por ello se esperaba encontrar un organelo citoplásmico similar al GCL, sin embargo, esto no fue posible.

Nunca se observaron células parecidas a melanocitos.

En la dermis se observó un precipitado granular electrondenso, producto de la reacción histoquímica, aparentemente inespecífico y situado en el intersticio.



FIGURA 1. Corte perpendicular de la arteria pectoral del pollo. La epidermis es un epitelio plano estratificado queratinizado delgado, con pocas capas celulares y sin anexos. (Hematoxilina-eosina. 250X)

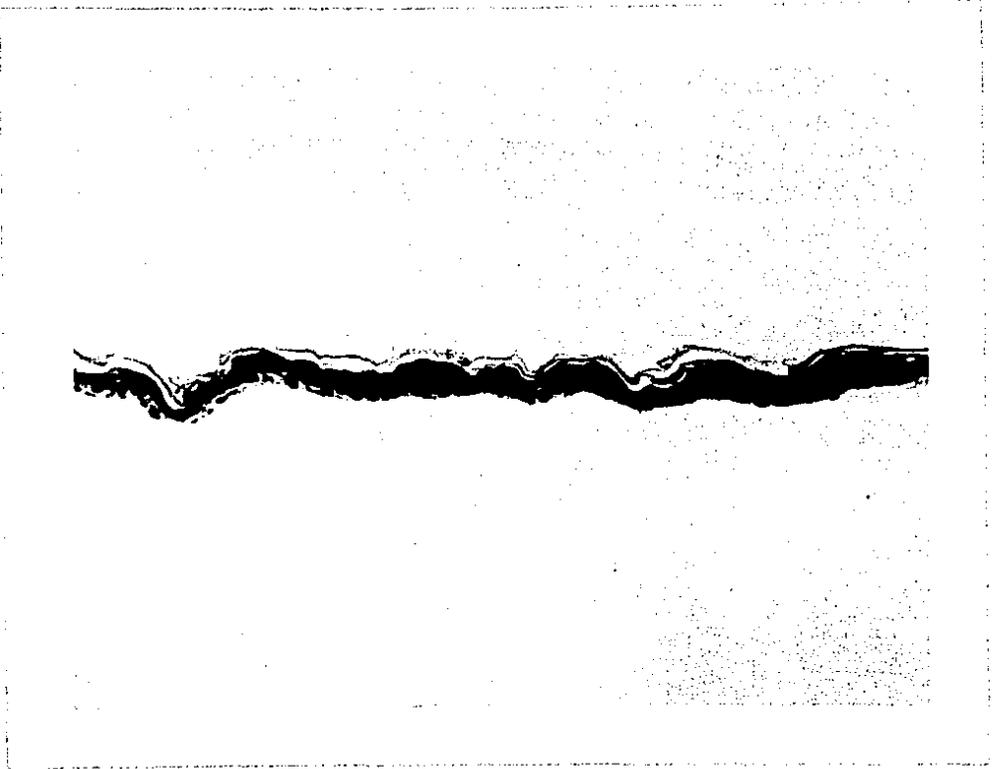


FIGURA 2. Corte perpendicular de una lámina epidérmica separada totalmente de la dermis con la técnica de cloruro de calcio. La estructura de la epidermis está bien conservada. Compárese con la figura 1. (hematoxilina-eosina. 250X)

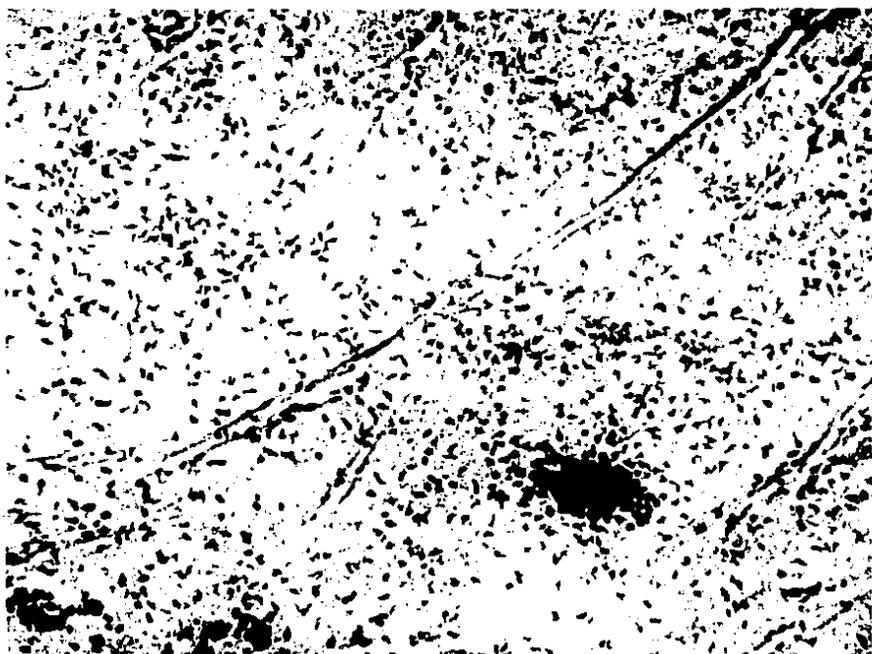


FIGURA 3. Lámina epidérmica con células dendríticas ATPasa positivas distribuidas de manera heterogénea, en ocasiones formando pequeños cúmulos. Los queratinocitos forman el fondo de la preparación y no presentan el producto de la reacción histoquímica (ATPasa. 100X)

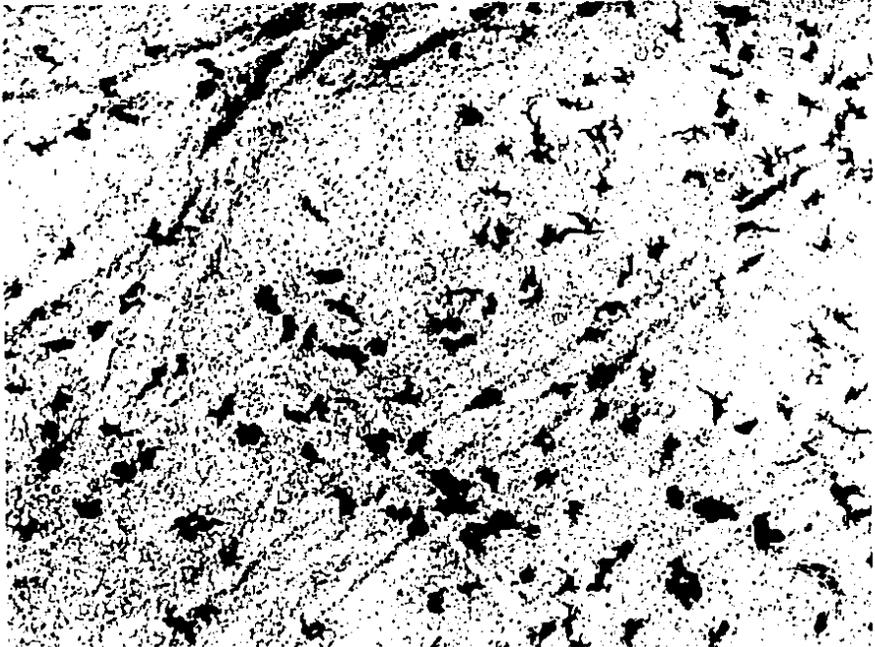


FIGURA 4. Células dendríticas ATPasa positivas cuyas prolongaciones y ramificaciones se introducen entre los queratinocitos, de acuerdo al grado de desarrollo de sus patrones dendríticos (ATPasa. 150X).

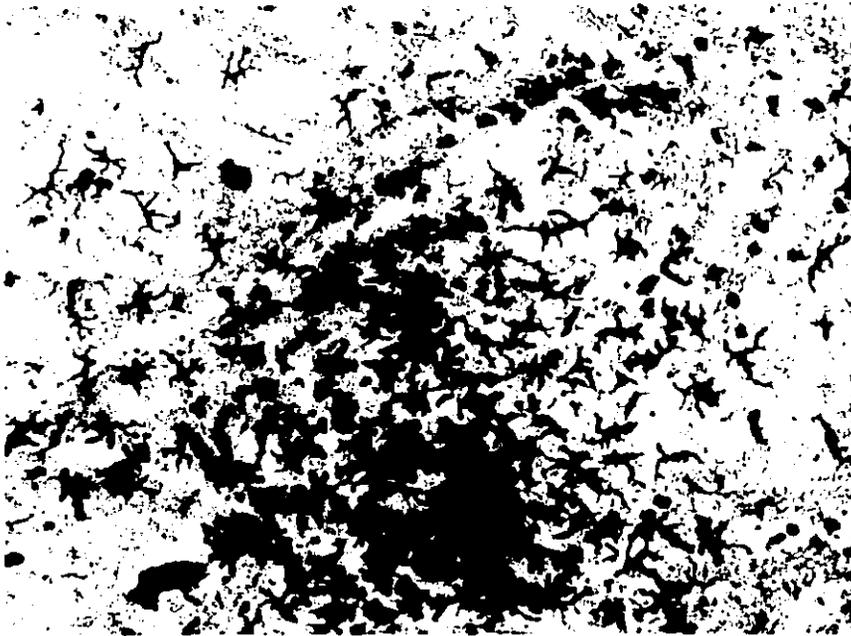


FIGURA 5. Cúmulo de células dendríticas ATPasa positivas. El patrón dendrítico está muy desarrollado, la distribución celular y los contactos entre las prolongaciones hacen que estas células semejen una red interquercinocítica (ATPasa. 250X).

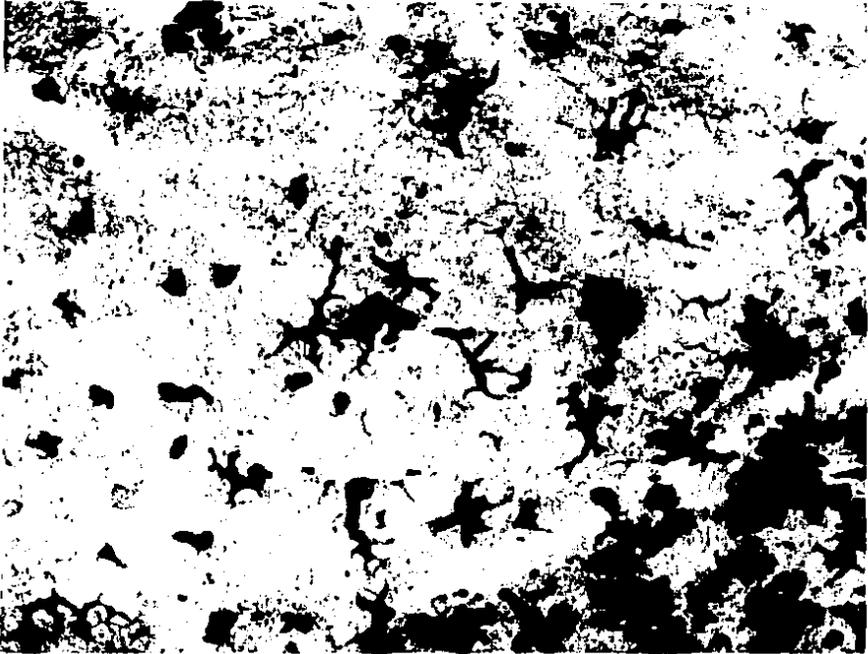


FIGURA 4. Diferencias en la densidad celular y en los patrones dendríticos en relación a la formación de cúmulos de células ATPasa positivas (ATPasa. 400X).

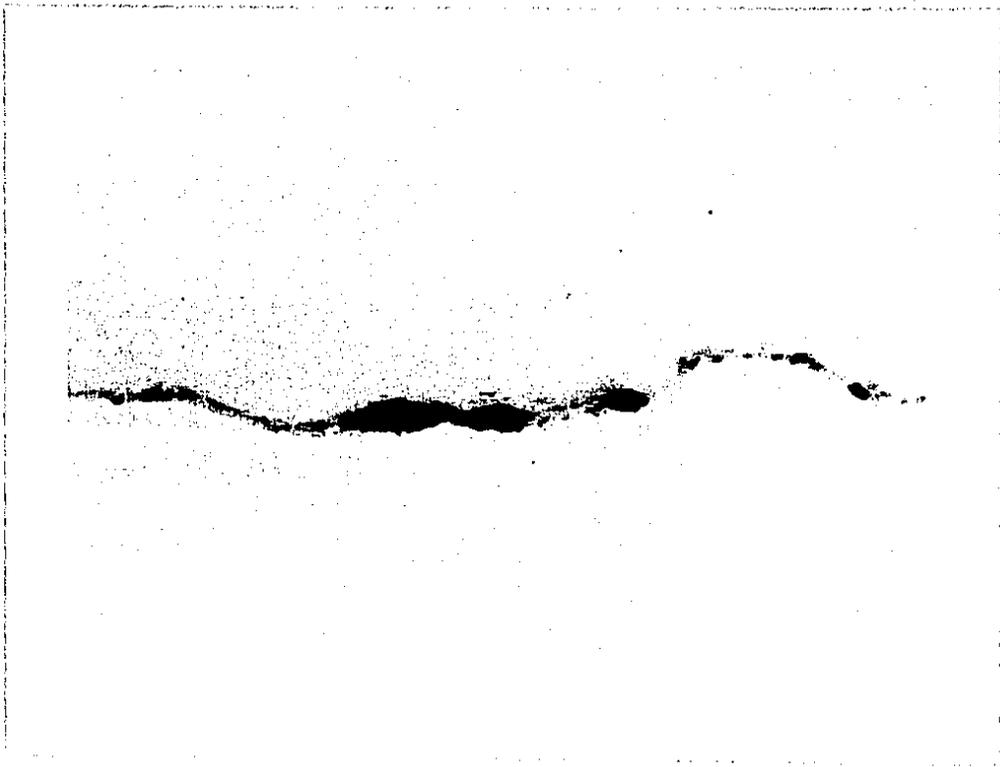


FIGURA 7. Corte perpendicular no contrateñido de una lámina epidérmica procesada con histoquímica enzimática para ATPasa. Los queratinocitos son ATPasa negativos y por ello no se observan claramente. Las áreas negras son las células ATPasa positivas. La morfología dendrítica de éstas no se observa porque la epidermis y el corte son muy delgados (ATPasa. 400X).

FIGURA 8. Micrografía electrónica donde se observa la presencia de una célula dendrítica ATPasa positiva, claramente delineada por el producto electrondenso de la reacción histoquímica, con citoplasma relativamente claro y ubicada suprabasalmente. Las masas de citoplasma que también muestran el producto de la reacción en su membrana plasmática, una de ellas con abundantes mitocondrias y microfilamentos, corresponden a dos prolongaciones de la misma célula o de otras. En la dermis se observa también en producto de la reacción histoquímica, en forma de gránulos aparentemente intersticiales (600X).



FIGURA 9. Micrografía electrónica en la que se aprecia perfectamente las células ATPasa positivas y las prolongaciones libres de tonofilamentos y desmosomas, características de los queratinocitos vecinos. En el citoplasma se observan algunas mitocondrias y microfilamentos cercanos a la membrana celular (12000X).



FIGURA 10. Micrografía electrónica en la que se observa con más detalle la organización de los microfilamentos delgados en una prolongación y en el cuerpo de células ATPasa positivas, sin tonofilamentos ni desmosomas. Los tonofilamentos que se observan pertenecen a un queratinocito vecino, unido a otro a través de desmosomas.

En el citoplasma de las células ATPasa positivas se observa también el producto de la reacción histoquímica en forma de gránulos que no parecen ser artefactuales pues están limitados exclusivamente a estas células (20000X).



DISCUSION

La técnica histoquímica para demostrar actividad de ATPasa ha sido utilizada ampliamente en el estudio de las CL epidérmicas de los mamíferos. Actualmente se acepta que las CL de estos vertebrados son las únicas células dendríticas epidérmicas que contienen dicha enzima en la membrana plasmática, lugar donde se deposita el producto de la reacción histoquímica.^{14,44} La técnica es altamente específica y confiable ya que los resultados que proporciona son cuantitativa y cualitativamente idénticos a los de las técnicas inmunohistoquímicas para demostrar otros marcadores de las CL como son los antígenos Ia⁴⁰ y T6.6¹

En el presente estudio se demuestra la existencia de células dendríticas ATPasa positivas en la epidermis del pollo, empleando una técnica histoquímica que evidencia CL en los cobayos.⁴⁰

Los melanocitos epidérmicos de los mamíferos también son células dendríticas que pueden ser confundidas con las CL ya que su coloración natural semeja al producto café oscuro de la reacción histoquímica para ATPasa. Esta eventualidad se descarta en nuestro trabajo ya que las aves, en este caso los pollos, no contienen melanocitos en la epidermis.²²¹⁻²²³ Además, en las láminas epidérmicas controles nunca fueron observadas células con pigmentación propia parecidas a las células ATPasa positivas de las

láminas experimentales.

Los resultados obtenidos con microscopía fotónica sugieren que estamos ante la presencia de células morfológicamente equivalentes a las CL y que éstas no son exclusivas de los mamíferos.

La histoquímica ultraestructural aportó otras evidencias que nos permiten aseverar lo dicho anteriormente. Con microscopía electrónica, únicamente las células epidérmicas ATPasa positivas presentaron características suficientes para considerarlas como CL.¹³ Sólo dos aspectos no fueron satisfechos o identificados: la presencia del BCL y de un núcleo lobulado o indentado. Con respecto al primero, éste ha sido juzgado como el criterio más importante para decidir si una célula dendrítica, independientemente de su localización tisular, es una CL. Contrariamente, y menos difundida e influyente, ha existido la idea de que la presencia de este organelo no es un prerequisite para identificar a las CL dentro de un epitelio.^{201.202.220} Esta controversia seguramente surgió porque no en todos los mamíferos en los que se han encontrado células epiteliales con todas las características fenotípicas y morfológicas generales de las CL, ha sido posible identificar un organelo semejante al BCL.^{201.202.214.220} Más aún, sólo un porcentaje bajo de las CV y de las CID presentan al gránulo^{24.26.27.144.147.155} o no lo tienen, como ocurre con las CD del bazo.¹⁴⁷ Para

algunos, la presencia del GCL es un fenómeno transitorio que no dura más de 24 horas^{150, 170} y que representa una "marca" microambiental, reflejo del grado o naturaleza de la queratinización del epitelio donde se encuentran estas células, en particular las CL.¹⁴³ Sin embargo, ésto no garantizaría que los GCL abundaran en una CL en condiciones normales. Al respecto, se ha estimado que en las encías de la rata hay 4.3 gránulos, en promedio, por cada CL.¹⁷⁷

Así pues, lo anteriormente dicho restringe la especificidad del GCL y hace necesario considerar más importantes otros aspectos estructurales y funcionales para identificar a una célula como CL. En este sentido, la ausencia del GCL no ha obstado para integrar el concepto del Sistema de las Células de Langerhans, es decir, del sistema de células dendríticas dispersas en el organismo que carecen de este organelo pero que comparten el resto de las características funcionales y estructurales de las CL epidérmicas.²²⁰

Un factor muy importante a considerar en relación a la "ausencia" del GCL en las células dendríticas ATPasa positivas de la epidermis del pollo es que en los estudios de microscopía electrónica, los cortes sólo permiten la observación de porciones pequeñas del citoplasma de una célula. Esto significaría que un corte de CL debe pasar por alguna región del citoplasma que contenga GCL o, en el mejor de los casos, que se requieran cortes seriados para aumentar

la probabilidad de observar estas estructuras. Aunque esto último es poco práctico y costoso, se ha demostrado lo exitoso de esta práctica para detectar a los GCL,²³⁰ sobre todo si son escasos.¹⁷⁹ Concomitantemente, los gránulos son claramente visibles si los cortes son observados con un microscopio electrónico equipado con goniómetro que permite modificar el ángulo de inclinación de las preparaciones y colocar al GCL en una posición más favorable con respecto al haz de electrones.^{140,230}

En nuestro estudio no empleamos esta metodología, lo que podría explicar, en parte, el no haber identificado un organelo semejante al GCL. No puede descartarse, sin embargo, la posibilidad de que el gránulo sea una adquisición filogenética y represente morfológicamente un estado funcional más evolucionado de las CL de los mamíferos ya que existen evidencias de que el GCL se origina de la membrana plasmática¹³³ y se asocia a fenómenos de endocitosis adsorptiva¹³⁴ o mediada por receptores.¹³⁴

Es probable que el conocimiento de los factores que determinan el epidermotropismo de las CL contribuya a esclarecer la naturaleza exacta de la "señal" que induce la formación del GCL y el significado funcional de este organelo.

Las células dendríticas ATPasa positivas de la epidermis del pollo tampoco exhibieron una configuración lobulada o indentada de su núcleo, como ocurre en las CL de

los mamíferos. El núcleo redondo puede ser una característica estructural distintiva de las primeras, como ha sido demostrado en el 19.1% de las CL de la cavidad oral de la rata¹⁷⁹ y del ratón.²³¹ Poco puede decirse al respecto debido a que no se conoce el significado funcional o biológico de la anfractuosidad nuclear de las CL. Pensamos que la forma redonda del núcleo no sería, entonces, un inconveniente insalvable para identificar a las células dendríticas ATPasa positivas descritas en este trabajo, como equivalentes a las CL.

Algunos hallazgos que pueden ser más relevantes en la identidad de las células dendríticas ATPasa positivas de la epidermis del pollo, serán discutidos a continuación.

Los precursores circulantes de las CL continuamente están llegando a la epidermis, la cual abandonan posteriormente para alcanzar los vasos linfáticos. Se ha calculado que en los humanos, considerando la superficie corporal media y el número de CL por mm², se lleva a cabo una repoblación normal diaria de casi 45 millones de CL para la piel total,²³² lo que indica que éstas deben poseer características que les permitan desplegar esa gran capacidad de movimiento.

Las células que describimos en el presente trabajo se encuentran "libres" en la epidermis por carecer de desmosomas o de algún otro tipo de especializaciones de la membrana plasmática que las unan a los queratinocitos

vecinos. El aparato motriz de estas células equivalentes a las CL puede estar representado por los haces densos de microfilamentos y quizás también por la manifiesta actividad de ATPasa, ambos asociados íntimamente a la membrana celular.

Hasta ahora no se ha dilucidado el papel que desempeña la ATPasa en las CL. Es posible que participe en los fenómenos de endocitosis. Sin embargo, aunque no sabemos de qué manera, podría ser necesaria para la motilidad de las CL, característica fundamental de estas células. El haber encontrado actividad de ATPasa en células dendríticas epidérmicas del pollo y de varias especies de anuros.²¹¹ morfológicamente equivalentes a las CL de los mamíferos, nos indica que la conservación filogenética de la enzima es una particularidad importante e imprescindible de este tipo celular epidérmico. Al mismo tiempo, nos sugiere que la presencia de ATPasa es más representativa que la observación del GCL, como criterio para identificar a una célula como CL.

La morfología dendrítica de las células ATPasa positivas de la epidermis del pollo no debe tomarse como un hallazgo nimio en la identidad de éstas. La disposición interqueratinocítica de las prolongaciones ramificadas de aquéllas favorece la formación de un retículo intraepidérmico, parecido al propuesto para las CL de los mamíferos que funcionaría como una trampa para antígenos

extraños^{114, 115} y propios como los antígenos tumorales, los antígenos de diferenciación, aloantígenos, etc. expresados por los queratinocitos vecinos o por las propias CL, con el fin de generar respuestas protectoras por parte de las células T efectoras.²³³

El hallazgo de células dendríticas equivalentes a las CL confirmó una de nuestras hipótesis que suponía la existencia de estas células en la epidermis del pollo por ser un epitelio plano estratificado donde se llevan a cabo procesos de queratinización.^{217, 218}

En la mucosa oral de humanos¹⁹⁸ y de cobayo²⁰⁰ se ha encontrado una relación inversa entre el grado de queratinización epitelial y la frecuencia de las CL. Otros han encontrado que la relación es directa en la mucosa oral de monos.¹⁹⁷ En la cola del ratón, la epidermis ortoqueratótica de las regiones interescamosas contiene numerosas CL, mientras que la epidermis paraqueratótica de las escamas carece de dichas células.^{72, 74, 234} Esta aparente relación entre las CL y la queratinización sugirió que aquéllas ejercían un control en la proliferación epidérmica o en la velocidad de queratinización y se propuso que las CL eran el centro de una unidad proliferativa de queratinocitos, habiendo una relación 1:10 entre ambos tipos celulares.²³⁵ Esta hipótesis no ha contado con muchos seguidores. Por el contrario, no ha podido demostrarse que la actividad proliferativa entre ambas regiones de la piel

de la cola del ratón sea diferentes.²³⁴

En algunas formas de ictiosis, situación en la que existe una tasa de recambio celular lenta con un alto grado de queratinización y ausencia o deficiencia del estrato granuloso,²³⁴ se ha informado de aumento de las CL epidérmicas,²³⁷ mientras que en la psoriasis, donde sobresale un estrato córneo paraqueratótico anormalmente engrosado y el estrato granuloso está ausente,²³⁴ hay una disminución de las mismas.²³⁷ En estas condiciones patológicas, la presencia o ausencia de las CL parecería estar relacionada con las características histológicas del estrato córneo. Otro estudio sugirió que la aparición de las CL estaba asociada a la formación de una capa granulosa en las regiones paraqueratóticas de las escamas de la cola del ratón, luego del tratamiento tópico con vitamina A, que convertía a estas regiones en zonas ortoqueratóticas.²³⁸

La impresión que se obtiene después de lo anterior es que las evidencias en las que se apoya la relación entre queratinización y las CL son fragmentarias, inferenciales y contradictorias.

En nuestro estudio, difícilmente pudo hacerse una correspondencia entre la estructura general de la epidermis del pollo y la de los mamíferos. La ultraestructura epidérmica de los primeros sugiere que los procesos de diferenciación y queratinización de las células de la epidermis del pollo son distintos a los de los mamíferos,

confirmándose algunos estudios previos^{217, 218} en los que se demostró que la queratinización entre estos vertebrados difiere cuantitativa y cualitativamente. Por otro lado, la existencia de un estrato granuloso en las aves ha sido pobremente documentada²¹⁹ o ha sido considerado que no existe²¹⁷ lo que está de acuerdo con nuestras observaciones.

En resumen, no podemos inclinarnos a pensar que los cambios celulares asociados a la queratinización que se lleva a cabo en la epidermis de los pollos sean los factores que determinen la presencia de células epidérmicas ATPasa positivas morfológicamente equivalentes a las CL, en estos animales. Hasta ahora, no se sabe con certeza cuáles son los factores que intervienen en la diferenciación de las CL de los epitelios, a partir de sus precursores circulantes.

Se ha postulado que la estimulación antigénica local puede influir en la presencia de las CL en los epitelios estratificados. Cuando la parte central de la córnea, usualmente carente de CL, es estimulada con suturas y por debridamiento epitelial^{194, 239} o con sensibilizadores de contacto como el dinitroclorobenceno,²⁴⁰ estas células se hacen presentes en número considerable, al cabo de 6 a 8 días después del estímulo, notándose una regresión a la mitad del número máximo luego de 21 días de retirar la sutura.²³⁹ Resultados similares se han informado en el epitelio gingival humano queratinizado, donde el número de CL es bajo,¹⁹⁰ al haber acumulación de placa dental,²⁴¹ en

la que seguramente existen sustancia antigénicas responsables del aumento de las CL.

Estos hallazgos pueden resultar trascendentes si se analizan conjuntamente con las evidencias de que los queratinocitos epidérmicos^{242,243} y gingivales²⁴⁴ y las células epiteliales corneales²⁴⁵ secretan una citoquina llamada Factor Activador de Timocitos-derivado de células epidérmicas (ETAF) que es idéntico a la interleucina-1 (IL-1) en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.^{242,243,244} Los agentes estimulantes de la producción y liberación del ETAF o IL-1 son múltiples; entre ellos están algunos constituyentes de la pared bacteriana, exotoxinas bacterianas y traumatismos²⁴⁷ ¿ No podría ser la estimulación antigénica de la que hablábamos anteriormente, en relación a la presencia de las CL en los epitelios, un liberador de IL-1 ?

El papel de la IL-1 epidérmica apenas empieza a conocerse. Se ha mencionado que la acción de la IL-1 en las CL puede ser la responsable de la expresión y modulación del antígeno T6,^{248,249} un indicador de la diferenciación de estas células, y de receptores para interleucina-2 (IL-2).²⁵⁰ Además, ETAF o IL-1 ejercen un efecto quimiotáctico para la movilización de monocitos y neutrófilos.²⁴⁷ ¿ No podría serlo también para los precursores de las CL ?

Considerando las funciones de las CL reconocidas en la actualidad, parece ser más probable que los factores

responsables de la presencia y diferenciación de éstas células en los epitelios, podrían encontrarse en las funciones sintetizadoras de citoquinas con propiedades de interleucinas de los queratinocitos e incluso de las propias CL.²⁰¹ En este contexto, la epidermis del pollo tendría dichas condiciones microambientales que explicarían la existencia de células equivalentes a las CL.

Es indudable que se requieren estudios críticos para esclarecer este aspecto de la biología de las CL, lo que contribuiría a entender los mecanismos que participan en la proliferación excesiva de las CL en algunas entidades patológicas cutáneas y extracutáneas.

La identificación en el presente estudio de CL epidérmicas en los pollos nos ha hecho pensar en la existencia de un sistema de células dendríticas en estos animales que fuera similar al sistema de las CL de los mamíferos. En la médula tímica de los pollos existen células con citoplasma claro, no fagocíticas, sin desmosomas, claramente diferenciables de los MØ tímicos²⁰² que recuerdan la morfología de las CL o CID de la zona corticomedular del timo de algunos mamíferos.¹⁵⁵ Estos resultados y los nuestros son compatibles con la existencia de un sistema de CL en las aves, cuyo estudio en estos vertebrados en particular, podría contribuir con mucho al conocimiento de la función de estas células accesorias del sistema inmune.

Finalmente, la interpretación de los fenómenos de

hipersensibilidad de contacto a alergenicos, manifestada por los pollos²²⁵⁻²²⁷ de una manera similar a los mamiferos, debe tener en cuenta la posible participación de las células epidérmicas descritas en este trabajo ya que son morfológicamente equivalentes a las CL y éstas son indispensables en la inducción de hipersensibilidad de contacto.²⁴⁻²⁶

En un trabajo posterior, trataremos de caracterizar funcionalmente a las células dendríticas ATPasa que hemos descrito en la epidermis del pollo para obtener evidencias directas de su papel en los fenómenos de hipersensibilidad de contacto y de tolerancia. Con esto, quizás podamos decir que además de ser morfológicamente equivalentes a las CL, también lo son en la función, con lo que se aseguraría la homología plena entre ambos tipos celulares.

CONCLUSIONES

1) Las células dendríticas ATPasa positivas, carentes de desmosomas y de tonofilamentos, presentes en la epidermis del pollo son morfológicamente equivalentes a las CL descritas en la epidermis de los mamíferos.

2) La histoquímica enzimática para ATPasa es una técnica específica para identificar a las CL epidérmicas y debe ser considerada como uno de los criterios más importantes para identificar a estas células.

REFERENCIAS

1. Langerhans P: Ueber die Nerven der Menschlichen Haut. Archiv Pathol Anat Physiol Klin Med. 44: 325-337, 1868.
2. Baer RL: Introductory remarks to the session on Langerhans. J Invest Dermatol 74: 307-308, 1980.
3. Ebling FJB: Homage to Paul Langerhans. J Invest Dermatol 75: 3-5, 1980.
4. Kreibich C: Die Hautnerven.A. Die Langerhans Zelle (L.Z.). Arch Derm Syph 154: 329, 1928. (ref. en 29)
5. Ferreira Márquez J: Systema sensitivum intraepidermicum. Die Langerhanschen Zellen als Rezeptoren des hellen Schmerzes: Doloriceptors. Arch Derm Syph 193: 191-250, 1951.
6. Weidmann A: Studien über das neurohormonale System der menschlichen Haut. Acta Neurovegetativa 3: 354-372, 1951.
7. Mustakallio K: Adenosine triphosphatase activity in neural elements of human epidermis. Exp Cell Res 28: 449-451, 1962.
8. Johansson O: Morphological characterization of the somatostatin-immunoreactive dendritic skin cells in Urticaria Pigmentosa patients by computerized image analysis. Scan J Immunol 21: 431-439, 1985.
9. Masson P: Pigment cells in man. In: The Biology of melanosomes. Ed. M. Gordon. Spec Publ NY Acad Sci 4: 15-51, 1948.
10. Billingham RF, Medawar FB: A study of the branched cells of the mammalian epidermis with special reference to the fate their division products. Phyl Trans Roy Soc. B. 237: 151-169, 1953.
11. Zelickson AS: The Langerhans cells. J Invest Dermatol 44: 201-212, 1965.
12. Breathnach AS: The cell of Langerhans. Int Rev Cytol. 18: 1-28, 1965.
13. Birbeck MSL, Breathnach AS, Overall JD: An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. J Invest Dermatol 37: 51-64, 1961.
14. Wolff K, Winkelmann RK: Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. J Invest Dermatol 48: 50-54, 1967.
15. Rawles ME: Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. Physiol Zool 20: 248-266, 1948.
16. Silvers WK: A histological and experimental approach to determine the relationship between gold-impregnated dendritic cells and melanocytes. Am J Anat 100: 225-240, 1957.
17. Breathnach AS, Silver WK, Smith S, Hayner S: Langerhans cells in mouse skin experimentally deprived of its neural crest component. J Invest Dermatol 50: 147-160,

- 1968.
18. Giacometti L, Montagna W: Langerhans cells: Uptake of tritiated thymidine. *Science* 157: 439-440, 1967.
 19. Mackenzie IC: Labelling of murine epidermal Langerhans cells with H_3 -thymidine. *Am J Anat* 144: 127-136, 1975.
 20. Basset F, Turiaf J: Identification par la microscopie electronique de particules de nature probablement viral dans le liaisons granulemateuses d'une histiocytose "X" pulmonaire. *CR Acad Sci* 261: 3701-3703, 1965.
 21. Carrillo J, Gutierrez G, Antuna S: Diagnosis of Langerhans cell histiocytosis in smears. *Patologia* 24: 9-16, 1984.
 22. Pruneiras M: Interactions between keratinocytes and dendritic cells. *J Invest Dermatol* 52: 1-17, 1969.
 23. Hoshino T, Kukita A, Sato S: Cells containing Birbeck granules (Langerhans granules) in the human thymus. *J Electron Microscop* 19: 271-276, 1970.
 24. Kondo Y: Macrophages containing Langerhans cell granules in normal lymph nodes of the rabbit. *Z Zellforsch* 98: 506-511, 1969.
 25. Imamura M, Sakamoto S, Hanazono H: Malignant histiocytosis: A case of generalized histiocytosis with infiltration of Langerhans granule containing histiocytes. *Cancer* 28: 467-475, 1971.
 26. Silberberg I: Ultrastructural studies of Langerhans cells in contact sensitive and primary irritant reactions to mercuric chloride. *Cil Res* 19: 715 (abst), 1971.
 27. Silberberg I: Apposition of the mononuclear cells to Langerhans cells in contact allergic reactions. An ultrastructural study. *Acta Dermatol venereol (Stockh)* 53: 1-12, 1973.
 28. Silberberg I, Baer RL, Rosenthal SA, Thorbecke GJ, Berezowsky V: Dermal and intravascular Langerhans cells at sites of passively induced allergic contact sensitivity. *Cell Immunol* 18: 435-453, 1975.
 29. Shelley WB, Juhlin L: The Langerhans cell. Its origin, nature, and function. *Acta Dermatol Venereol (Stockh)*. Suppl 79: 7-22, 1978.
 30. Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Gschnait F, Knapp W, Wolff K: Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268: 245-246, 1977.
 31. Stingl G, Katz SI, Shevach EM, Wolff-Schreiner E, Green I: Detection of Ia antigens on Langerhans cells in guinea pig skin. *J Immunol* 120: 570-578, 1978.
 32. Stingl G, Katz SI, Clement L, Green I, Shevach EM: Immunological function of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 121: 2005-2013, 1978.
 33. Rowden G, Lewis MB, Sullivan AL: Ia antigen on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268: 247-248, 1977.
 34. Rowden G, Phillis TM, Delovitch TL: Expression of Ia antigens by murine keratinizing epithelial Langerhans

- cells. *Immunogenetics* 7: 454-478, 1970.
35. Klareskog L, Malmnas-Tjernlund U, Forslum U, Peterson PA: Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268: 248-250, 1977.
 36. Berman B, Gigli I: Complement receptors on guinea pig epidermal Langerhans cells. *Clin Res* 27: 522A, 1979.
 37. Tamaki K, Stingl G, Gullino M, Sachs DH, Katz SI: Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cells. *J Immunol* 123: 784-787, 1979.
 38. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH: Epidermal Langerhans cells are derived from cell originating in the bone marrow. *Nature* 282: 324-326, 1979.
 39. Volc-Platzer B, Stingl G, Wolff K, Hintenberg W, Schneden W: Bone marrow origin of human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 82: 417 (abstracts), 1984.
 40. Volc-Platzer B, Stingl G, Wolff K, Hintenberg W, Schneden W: Cytogenetic identification of allogeneic epidermal Langerhans cell in bone marrow graft recipient. *N Engl J Med*. 310: 1123-1124, 1984.
 41. Gairns FW: A modified gold chloride method for demonstration of nerve ending. *Quart J Micr Sci* 74: 151-154, 1930.
 42. Becker SW, Fitzpatrick TB, Montgomery H: Human melanogenesis: cytology and histology of pigment cells (melanodendrocytes). *Arch Derm Syph NY* 65: 511-523, 1952.
 43. Breathnach AS: The distribution of Langerhans cells within the human hair follicle and some observations on its staining properties with gold chloride. *J Anat (London)* 97: 73-80, 1963.
 44. Zelickson AS, Mottaz JH: Localization of gold chloride and adenosine triphosphatase in human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 51: 365-372, 1968.
 45. Juhlin L, Shelley W: New staining techniques for the Langerhans cells. *Acta Dermatol Venereol (Stockh)* 57: 289-296, 1977.
 46. Champy CJ: *Anat Physiol* 4: 110, 1913. (ref. en 48).
 47. Niebauer G, Weidemann A: Zur Histochemie der neurovegetativen System der Haut. *Acta Neurovegetativa*. 10: 280-296, 1958.
 48. Maillet M: Modifications de la techniques des Champy au tétraoxyde d'osmium-iodure de potassium. Résultats de son application à l'étude des fibres nerveuses. *CR Seances Soc Biol. Paris*. 153:939-940, 1959.
 49. Niebauer G, Krawczyk WS, Kidd RL, Wilgramm GF: Osmium Zinc Iodide reactive sites in the epidermal Langerhans cell. *J Cell Biol* 43: 80-89, 1969.
 50. Rodríguez EM, Caorsi I: A second look at the ultrastructure of the Langerhans cell of the human epidermis. *J Ultrastruc Res* 65: 279-295, 1978.
 51. Figueroa CD, Caorsi I: Ultrastructural and morphometric

- study of the Langerhans cell in normal human exocervix. *J Anat* 131: 669-682, 1980.
52. Falck B, Agrup G, Jacobsson S, Rorsman H, Rosengren E, Sachner K, Ogren M: Uptake of L-dopa and functionally related aromatic amino acids into the Langerhans cells. *J Invest Dermatol*. 66: 265 (abstracts), 1976.
 53. Axelsson S, Linfsson R, Falck B, Sjöberg S: In vitro uptake of L-dopa and catecholamines into the epidermal Langerhans cells. *Acta Dermatovenereol (Stockh) Suppl* 79: 31-35, 1978.
 54. Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* 10: 348-354, 1962.
 55. Sjöberg S, Axelsson B, Falck B, Jacobsson S, Ringberg A: A new method for the visualization of the epidermal Langerhans cell and its application on normal and allergic skin. *Acta Dermatovenereol (Stockh) Suppl* 79: 23-30, 1978.
 56. Padykula HA, Herman EJ: Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. *J Histochem Cytochem* 3: 161-195, 1955.
 57. Wachstein M, Meisel E: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special references to the demonstration of bile canaliculi. *Am J Clin Pathol* 27: 13-23, 1957.
 58. Bradshaw M, Wachstein M, Spence J, Elias J: Adenosine triphosphatase activity in melanocytes and epidermal cells of human skin. *J Histochem Cytochem* 11: 465-473, 1963.
 59. Wolff K: Zur Enzymaktivität in den Langerhansschen Zellen. *Arch Klin Exp* 218: 446, 1964.
 60. Belsito D, Sánchez M, Baer R, Valentine F, Thorbecke J: Reduced Langerhans cell Ia antigen and ATPase activity in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 310: 1279-1282, 1984.
 61. Foster CA, Holbrook KA, Farr AG: Ontogeny of Langerhans cells in human embryonic and fetal skin: Expression of HLA-DR and DKT-6 determinants. *J Invest Dermatol* 86: 240-243, 1986.
 62. Wolff K, Winkelmann RK: Quantitative studies on the Langerhans cell population of guinea pig epidermis. *J Invest Dermatol* 48: 504-513, 1967.
 63. Wolff K, Winkelmann RK: The influence of ultraviolet light on the Langerhans cell population and its hydrolytic enzymes in guinea pigs. *J Invest Dermatol* 48: 531-539, 1967.
 64. Lessard RJ, Wolff K, Winkelmann RK: The disappearance and regeneration of Langerhans cells following epidermal injury. *J Invest Dermatol* 50: 171-179, 1968.
 65. Brown J, Winkelmann RK, Wolff K: Langerhans cells in vitiligo: A quantitative study. *J Invest Dermatol* 49:

- 386-390, 1967.
66. MacLennan IC, Squier CA: Cytochemical identification of ATPase-positive Langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. *Br J Dermatol* 92: 523-533, 1975.
 67. Scaletta LJ, Mac Callum DK: A fine structural study of divalent cation mediated epithelial union with connective tissue in human oral mucosa. *Am J Anat* 133: 431-439, 1972.
 68. Robins PG, Brandon DR: A modification of the adenosine triphosphatase method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Technol* 56: 87-89, 1981.
 69. Chaker MB, Thrap MD, Bergstresser PR: Rodent epidermal Langerhans cells demonstrate greater histochemical specificity for ADP than for ATP and AMP. *J Invest Dermatol* 82: 496-500, 1984.
 70. Cole S, Humm SA: A modified adenosine polyphosphatase histochemical method to demonstrate Langerhans cells in fragile epidermis. *Stain Technol* 62: 285-290, 1987.
 71. Farquhar M, Palade G: Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. *J Cell Biol* 30: 359-379, 1966.
 72. Jarret A, Riley PA: Esterase activity in dendritic cells. *Br J Dermatol* 75: 79-81, 1962.
 73. Davis BJ, Ornstein JJ: High resolution enzyme localization with a new diazo-reagent: Hexazonium Pararosanilin. *J Histochem Cytochem* 7: 297-298, 1959.
 74. Riley PA: Esterase in epidermal dendritic cells of the mouse. *Br J Dermatol* 78: 388-397, 1966.
 75. Campo-Aasen I, Pearse AGE: Enzimología de las células de Langerhans. *Medicina Cutánea* 1: 35-44, 1966.
 76. Sterry W, Steigleder GK: Acid nonspecific esterase in human Langerhans cells. *J Cutan Pathol* 6: 476-478, 1979.
 77. Mueller J, Brun Del Re G, Burerbi H, Keller HU, Hess MW, Cottier H: Nonspecific acid esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol* 5: 270-274, 1975.
 78. Maruyama T, Uda H, Yokoyama M: Localization of non-specific esterase and endogenous peroxidase in the murine epidermal Langerhans cell. *Br J Dermatol* 103: 61-66, 1980.
 79. Jaubert F, Monnet JP, Danel C, Caretien J, Nezelof C: The localization of non-specific esterase in human lung macrophages. An ultrastructural study. *Histochemistry* 59: 141-, 1978.
 80. Jaubert F, Barbey S, Nagues C, Monnet JP, Brun M, Nezelof C: Histiocyte X positivity for nonspecific esterase. *J Histochem Cytochem* 28: 45-46, 1980.
 81. Montagna W, Ellis RA: The skin of primates. I. The skin of the potto (*Perodicticus potto*). *Am J Phys Anthropol* 17: 137-162, 1959.
 82. Yasuda K, Aoki T, Montagna W: The skin of primates. IV.

- The skin of the lesser bushbaby (*Galago senegalensis*). *Am J Phys Anthropol* 19: 23-34, 1961.
83. Montagna W, Yun JS: The skin of primates. VII. The skin of the great bushbaby (*Galago crassicaudatus*). *Am J Phys Anthropol* 20: 149-166, 1962.
84. Quevedo WC Jr, Montagna W: A new System of melanocytes in the skin of the potto (*Perodicticus potto*). *Anat Rec* 144: 279-285, 1962.
85. Kechijian P: The skin of primates. XIX. The relationship between melanocytes and alkaline phosphatase-positive cells in the potto (*Perodicticus potto*). *Anat Rec* 152: 317-324, 1965.
86. Schleger AV, Bean KG: The melanocyte system of the cattle skin. The amelanotic dendritic cells of epidermis. *Aust J Biol Sci* 26:983-943, 1973.
87. Khalil HM, Nitiuthai S, Allen J: Alkaline phosphatase-positive Langerhans cells in the epidermis of cattle. *J Invest Dermatol* 79: 47-51, 1982.
88. Gomori: Histochemistry. Libro en la JJI.
89. Hugon J, Borgers M: A direct lead method for the electron microscopic visualization of alkaline phosphatase activity. *J Histochem Cytochem* 14: 429-431, 1965.
90. Wachstein M: Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. *J Lab Clin Med* 31: 1-17, 1946.
91. Baiton DF: Sequential degranulation of two types of polymorphonuclear granules during phagocytosis of microorganisms. *J Cell Biol* 58: 247-264, 1973.
92. Berman B, France DS: Histochemical analysis of Langerhans cells. *Am J Dermatopathol* 1: 215-, 1979.
93. Gschnait F, Brenner W: Kinetics of epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 73: 566-569, 1979.
94. Elleder M: Activity of alfa-D-mannosidase in human Langerhans epidermal cells. *Virchows Arch B Cell Path* 19: 93-96, 1975.
95. Hayashi M, Nakajima Y, Fishman WH: The cytologic demonstration of beta-glucuronidase employing naphthol AS-BI glucuronide and hexazonium pararosanilin: A preliminary report. *J Histochem Cytochem* 12: 293-297, 1964.
96. Mackenzie IC, Bickenbach JR, Rittman BR: Reactivity of epidermal Langerhans cells to a histochemical method for demonstration of beta-glucuronidase. *J Invest Dermatol* 78: 239-242, 1982.
97. Mackenzie IC, Bickenbach JR: Label-retaining keratinocytes and Langerhans cells in mouse epithelia. *Cell Tissue Res* 242: 551-556, 1985.
98. Kerdel FA, Morgan EW, MacDonald DM: The demonstration of histiocytes in the epidermal infiltrate of mycosis fungoides by immunohistochemical and histochemical techniques. *Br J Dermatol* 106: 651-656, 1982.

99. Holden CA, Morgan EW, MacDonald DM: The cell population in the cutaneous infiltrate of mycosis fungoides: in situ studies using monoclonal antibodies. *Br J Dermatol* 106: 385-392, 1982.
100. Mackie RM: A monoclonal antibody techniques to demonstrate and increase in Langerhans cells in cutaneous lesions of mycosis fungoides. *Clin Exp Dermatol* 7: 43-48, 1982.
101. Holden CA, Kerdel FA, MacDonald DM: Lack of lysozyme, alfa-1-antitrypsin and alfa-1-antichymotrypsin in normal Langerhans cells: Differentiation from cells of the monocyte-histiocyte-macrophage serie. *Acta Dermatol Venereol (Stockh)* 62: 513-514, 1982.
102. Bourlond A, Wolff K, Winkelmann RK: Cholinesterase in melanocytes of the bat. *Nature* 214: 816-817, 1962.
103. Lyne AG, Chase HB: Branched cells in the epidermis of the sheep. *Nature* 209: 1357-1358, 1966.
104. Wisse E: Observations on the fine structure of normal rat liver Kupffer cells. *J Ultrastruc Res* 46: 393-, 1974.
105. Daems DWTh, Koerten HK, Soranzo MR: Differences between monocytes-derived and tissue macrophages. *Adv Exp Med Biol* 73: 27-, 1976.
106. Wolff K, Schreiner E: Uptake, intercellular transport and degradation of endogenous protein by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 54: 37-47, 1970.
107. Hashimoto K: Langerhans cell granule. An endocytic organelle. *Arch Derm* 104: 148-160, 1971.
108. Dubertret L, Breton-Gorius J, Fosse M, Touraine R: Peroxidatic activity in endoplasmic reticulum of normal human Langerhans cells. *J Reticuloendothel Soc* 30: 313-316, 1981.
109. Dubertret L, Breton-Gorius J, Fosse M, Touraine R: A cytochemical marker for epidermal differentiation Langerhans cells, skin resident macrophages and mitochondria. *Br J Dermatol* 102 (suppl 23): 96-100, 1982.
110. Beelen RHJ, Van't Veer MB, Fluitsma DM, Hoesfsmi ECM: Identification of different peroxidatic activity patterns in human macrophages in vivo and in vitro. *J Reticuloendothel Soc* 24: 351-362, 1978.
111. Bodel PT, Nichols BA, Baiton DE: Appearance of peroxidase reactivity within the rough endoplasmic reticulum of blood monocytes after surface adherence. *J Exp Med* 145: 264-274, 1977.
112. Gomori G: Distribution of lipase in the tissue under normal and under pathological conditions. *Arch Pathol* 41: 121-129, 1946.
113. Rowden G: Ultrastructural studies of keratinized epithelial of the mouse. I. Combined EM and cytochemical studies of lysosomes in mouse epidermis and esophageal epithelium. *J Invest Dermatol* 49: 181-197, 1967.
114. Shelley WB, Juhlin L: Langerhans cells form a reticuloepithelial trap for external contact antigens.

- Nature 261: 46-47, 1977.
115. Shelley WB, Juhlin L: Selective uptake of contact allergens by the Langerhans cells. Arch Derm 113: 187-192, 1977.
 116. Odland CF: The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. J Biophys Biochem Cytol 4: 529-538, 1958.
 117. Clark WH Jr, Hibbs RG: Electron microscope studies of the human epidermis. The clear cell of Masson (dendritic cell or melanocytes). J Biophys Biochem Cytol 4: 679-684, 1958.
 118. Charles A, Ingram JT: Electron microscope observations of the melanocyte of the human epidermis. J Biophys Biochem Cytol 6: 41-44, 1959.
 119. Staricco RJ: Qualitative and quantitative data on melanocytes in human epidermis treated with thorium X. J Invest Dermatol 29: 185-195, 1957.
 120. Breathnach AS, Birbeck MSC, Overall JD: Observations bearing on the relationship between Langerhans cells and melanocytes. Ann NY Acad Sci 100: 223-238, 1963.
 121. Breathnach AS: Observations on cytoplasmic organelles in Langerhans cells in human epidermis. J Anat (London) 98: 265-270, 1964.
 122. Zelickson AS: Melanocyte, melanin granule, and Langerhans cell. In: Ultrastructure of normal and abnormal skin. Ed. H. Kimpton, Ltd, London, England, 1967.
 123. Hashimoto K, Tarnowski WM: Ultrastructural studies of racket-bodies in epidermal Langerhans cells and in Histiocytosis X. Fed Proc 26: 370, 1967.
 124. Tarnowski WM, Hashimoto K: Langerhans cells granules in Histiocytosis X. Arch Derm 96: 298-304, 1967.
 125. Hashimoto K, Tarnowski WM: Some new aspects of the Langerhans cell of normal human epidermis. Arch Derm 97: 450-464, 1968.
 126. Breathnach AS: Variations in ultrastructural appearance of Langerhans cells of normal human epidermis. Br J Dermatol (Suppl 97) 15: 14, 1977.
 127. Wolff K: The fine structure of the Langerhans cell granule. J Cell Biol 35: 468-473, 1967.
 128. Sagebiel RW, Reed TM: Serial reconstruction of the characteristic granules of the Langerhans cell. J Cell Biol 36: 595-602, 1968.
 129. Cancilla FA: Demonstration of the Langerhans granule by lanthanum. J Cell Biol 38: 248-252, 1968.
 130. Caputo R, Peluchetti D, Monti M: Freeze-fracture of Langerhans granules. A comparative study. J Invest Dermatol 66: 297-301, 1976.
 131. Runge W, Younger B, Zelickson AS: Optical transforms of epidermal Langerhans cell granules. J Invest Dermatol 77: 421-429, 1981.
 132. Hashimoto K: Lanthanum staining of Langerhans cell. Communication of Langerhans cell granules with

- extracellular space. Arch Derm 102: 280-290, 1970.
133. Takahashi S, Hashimoto K: Derivation of Langerhans cell granules from cytomembrane. J Invest Dermatol 80: 345A, 1984.
 134. Ishii M, Terao Y, Kitajima J, Hamada T: Sequential production of Birbeck granules through adsorptive pinocytosis. J Invest Dermatol 82: 28-29, 1984.
 135. Alberts B: The plasma membrane. In: Molecular Biology of the Cell. Cap 6, pp255-317, 1983.
 136. Takigawa M, Iwatsuki K, Yamada M, Okamoto H, Imamura S: The Langerhans cell granule is an adsorptive endocytic organelle. J Invest Dermatol 85: 12-15, 1985.
 137. Allen PM, Unanue ER: Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas. J Immunol 132: 1077-1079, 1984.
 138. Unanue ER: The regulation of lymphocyte function by the macrophage. Immunol Rev 40: 227-255, 1978.
 139. Elofsson R, Andersson A, Falck B, Sjöberg S: Evidence for endocytotic mechanism in the epidermal Langerhans cells. Acta dermatovener (Stockh) Suppl 99: 29-35, 1981.
 140. Falck B, Andersson Bartosik J: Some new ultrastructural aspects on human epidermis and its Langerhans cells. Scan J Immunol 21: 409-416, 1985.
 141. Kobayashi M, Hoshino T: J Electron Microsc 27: 199-, 1978.
 142. Kobayashi M, Hoshino T: The three-dimensional structure of cored tubules in the dermal Langerhans cells of mice. J Electron Microsc 36: 411-418, 1987.
 143. Hoefsmit ECM: Macrophages, Langerhans cells, Interdigitating and dendritic accessory cells: A summary. Adv Exp Med Biol 149: 463-468, 1982.
 144. Jimbow K, Sato S, Kukita A: Cells containing Langerhans granule in human lymph nodes of dermatopathic lymphadenopathy. J Invest Dermatol 53: 295-299, 1969.
 145. Silberberg-Sinakin I, Gigli I, Baer R, Thorbecke J: Langerhans cells: Role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages. Immunol Rev 53: 203-232, 1980.
 146. Hoefsmit ECM: Mononuclear phagocytes, reticulum cells and dendritic cells in lymphoid tissue. In: Mononuclear phagocytes In: Immunity, infection, and pathology. Ed. Ralph Van Furth, Blackwell Scientific Publications. Cap 8. pp 129-146, Great Britain, 1975.
 147. Veldman JE: Histophysiology and electron microscopy of the immune response. Ph. D. Thesis. Groningen, The Netherlands, State University, 1970.
 148. Vermon ML, Fountain L, Krebs HM, Horta-Barbosa L, Fuccillo DA, Sever J: Birbeck granules (Langerhans cell granules) in human lymph nodes. Am J Clin Pathol 60:771-779, 1973.
 149. Kelly RH, Balfour BM, Armstrong JA, Griffiths S: Functional anatomy of lymph nodes. II. Peripheral lymph-

- borne mononuclear cells. *Anat Rec* 190: 5-22, 1978.
150. S eberg B, Summers T, Balfour BM: The role of the afferent lymph in the induction of contact sensitivity. *Adv Exp Med Biol* 64: 191-196, 1976.
 151. Kamperdijl EWA, Hoefsmit ECM: Birbeck granules in lymph node macrophages. *Ultramicroscopy* 3: 137-, 1978.
 152. Solokowski J, Jakobsen E, Johannssen JV: Cells in peripheral leg lymph of normal men. *Lymphology* 11: 202-, 1978.
 153. Spry CJF, Pflug AJ, Janossy G, Humphrey JH: Large mononuclear (Veiled) cells in "Ia-like" membrane antigens in human afferent lymph. *Clin Exp Immunol* 39: 750-755, 1980.
 154. Lampert IA, Pizzolo G, Thomas A, Janossy G: Immunohistochemical characterization of cells involved in dermatopathic lymphadenopathy. (ref. en 157).
 155. Rowden G, Boudreau S, Hingley H: Langerhans cells and extraepidermal dendritic cells. An investigation in laboratory animals and man with immunomorphological methods. *Scan J Immunol* 21: 471-478, 1985.
 156. Goordyal F, Isaacson PG: Immunocytochemical characterization of monocyte colonies of human bone marrow: A clue to the origin of Langerhans cells and interdigitating reticulum cells. *J Pathol* 146: 189-195, 1985.
 157. Takahashi K, Yamaguchi H, Ishizeki T, Nakajima T, Nakazato Y: Immunohistochemical and immunoelectron microscopic localization of S-100 in the interdigitating reticulum cells of the human lymph node. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 37: 125-135, 1981.
 158. Cocchia D, Michetti F, Donato R: Immunocytochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 294: 85-87, 1981.
 159. Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G: Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163: 981-997, 1986.
 160. Steinman RM, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantification, and tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-1162, 1973.
 161. Nossal GJV, Abbott A, Mitchell J, Lummus Z: Antigen in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. *J Exp Med* 127: 277-290, 1968.
 162. Steinman RM, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 139: 380-397, 1974.
 163. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J Exp Med* 139: 1431-1445, 1974.

164. Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* 141: 804-820, 1975.
165. Steinman RM, Witmer MD: Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5132-5136, 1978.
166. Bach FH, Widner MB, Bach LM, Klein J: Serological defined and lymphocyte-defined components of the major histocompatibility complex in the mouse. *J Exp Med* 136: 1430-1444, 1972.
167. Fathman CG, Handwerker BJ, Sachs DH: Evidence for a role of Ir-Associated alloantigens in mixed lymphocyte culture stimulation. *J Exp Med* 140: 853-858, 1974.
168. Steinman RM, Kaplan G, Witner MD, Cohn ZA: Identification and purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 149: 1-16, 1979.
169. Steinman RM, Witner MD, Nussenzweig MC, Chen LL, Schlesinger S, Cohn ZA: Dendritic cells of the mouse: Identification and characterization. *J Invest Dermatol* 75: 14-16, 1980.
170. Schuler G, Steinman RM: Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 161: 526-546, 1985.
171. Kamperdijk EWA, Kapsenberg ML, Van Den Berg M, Hoefsmit ECM: Characterization of dendritic cells, isolated from normal and stimulated lymph nodes in the rat. *Cell Tissue Res* 242: 469-474, 1985.
172. Lents JW, Drexhage HA, Benson W, Balfour BM: A study of cells present in lymph draining from a contact allergic reaction in pigs sensitized to DNFB. *Immunology* 49: 415-422, 1983.
173. Hoefsmit ECM, Duijvestijn AM, Kamperdijk EWA: Relation between Langerhans cells, veiled cells and interdigitating cells. *Immunobiology* 161: 255-265, 1982.
174. Nussenzweig MC, Steinman RM: Contribution of the dendritic cells to stimulation of murine syngeneic mixed lymphocyte reaction. *J Exp Med* 152: 1196-1212, 1980.
175. Hart DNJ, Fabre J: Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissue of rat heart and other tissue but not brain. *J Exp Med* 153: 347-61, 1981.
176. Faustman DL, Steinman RM, Gebel HM, Hauptfeld V, Lacy PE: Prevention of rejection of murine islet allograft by pretreatment with antidendritic cell antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3864-3868, 1984.
177. Ortega LG, Mellors RC: Cellular sites of formation of gamma globulins. *J Exp Med* 106: 627-640, 1957.
178. Sordat B, Sordat M, Hess W, Stoner RD, Lottier H: Specific antibody within lymphoid germinal center cells

- of mice after primary immunization with horseradish peroxidase: A light and electron microscopic study. *J Exp Med* 131: 77-92, 1970.
179. Wakefiel JD, Thorbecke GJ: Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. I. Evidence for the formation of small lymphocytes upon transfer of primed splenic white pulp to syngeneic mice. *J Exp Med* 128: 153-168, 1968.
 180. Nossal GJV, Ada GL, Austin CM, Pye J: Antigens in immunity. VII. Localization of ¹²⁵I-labeled antigens in the secondary response. *Immunology* 9: 349-356, 1965.
 181. Nossal GJV, Austin CM, Pye J, Mitchell J: Antigen in immunity. XII. Antigen trapping in spleen. *Int Arch Allergy appl Immunol* 29: 368-383, 1966.
 182. Chen LL, Adams JC, Steinman RM: Anatomy of germinal centers in mouse spleen, with special references to "follicular dendritic cells". *J Cell Biol* 77: 149-164, 1978.
 183. Dijkstra CD, Kamperdijk EWA, Döpp EA: The ontogenetic development of the follicular dendritic cell. An ultrastructural study by means of intravenously injected horseradish peroxidase (HRP) anti-HRP complexes as marker. *Cell Tissue Res* 236: 203-206, 1984.
 184. Humphrey JH, Grenman D, Sundaran V: The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on the . *Eur J Immunol* 14: 859-864, 1984.
 185. Müller-Hermelink HK, Housermann U, Stuttle HJ: Enzyme histochemical observations on the localization and structure of the T cell and B cell regions in the human spleen. *Cell Tissue Res* 154: 167-179, 1974.
 186. Gerdes J, Stein H, Mason D, Ziegler A: Human dendritic reticulum cells of lymphoid follicles: Their antigenic profile and their identification as multinucleated giant cells. *Virchows Arch. B. Cell Pathol* 42: 161-172, 1983.
 187. Barthelemy H, et al: Demonstration of OKT-6 antigen on human thymic dendritic cells in culture. *Lab Invest* 55: 540-545, 1986.
 188. Barclay AN, Mayrhofer G: Bone marrow origin of Ia positive cells in the medulla of rat thymus. *J Exp Med* 153: 1166-1671, 1981.
 189. Misra B, Hingley H, Mikol D, Rowden G: S-100 as a cytoplasmic marker for dendritic cells (CD) in lymphoid organs. *Fed Proc* 42: 1374 (abstr), 1983.
 190. Accini S, et al: Immunoreactivity for S-100 protein in dendritic and in lymphocyte-like cells in human lymphoid tissue. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 52: 129-141, 1986.
 191. Weinberg DS, Pinkus GS, Murphy GF: Tonsillar epithelial dendritic cells. *Lab Invest* 56: 622-628, 1987.
 192. Tew JB, Ellis NK, Schnizlein CT: Characterization of mouse follicular dendritic cell in vitro. *Fed Proc* 42: 1374 (abstr), 1983.

193. Vantrappen L, Geboes K, Missotten L, Maudgal FC, Desmet V: Lymphocytes and Langerhans cells in normal human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 320-325, 1985.
194. Chandler JW, Cummings M, Gillette TE: Presence of Langerhans cells in the central corneas of normal human infant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 113-116, 1985.
195. Bhan AK, Fujikawa LS, Foster S: T-cell subsets and Langerhans cells in normal and diseased conjunctiva. *Am J Ophthalmol* 94: 205-212, 1982.
196. Kelley JG, Ohashi Y, Friedlander MH: Langerhans cells alterations in the guinea pig cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1293-1296, 1985.
197. Hutchens LH, Sagebiel RW, Clarke M: Oral epithelial dendritic cells of the rhesus monkey—histologic demonstration, fine structure and quantitative distribution. *J Invest Dermatol* 56: 325-336, 1971.
198. Daniel TE: Human mucosal Langerhans cells: postmortem identification of regional variations in oral mucosa. *J Invest Dermatol* 82: 21-24, 1984.
199. Takehana S, Kameyama Y, Sato E, Mizohata M: Ultrastructural observations on Langerhans cells in the rat gingival epithelium. *J Periodont Res* 20: 276-283, 1985.
200. Carrillo J, Montalvo C, Carmona G: Células de Langerhans en el cobayo albino. Estudio morfométrico. *Patología* 23: 27-37, 1985.
201. Böck P: Fine structure of Langerhans cells in the stratified epithelial of the esophagus and stomach of mice. *Z Zellforsch* 147: 237-247, 1974.
202. Al Yassin TM, Toner DG: Langerhans cells in human oesophagus. *J Anat* 122: 435-445, 1976.
203. Gemmell RT: Langerhans cells in the ruminal epithelium of the sheep. *J Ultrastruct Res* 43: 256-258, 1973.
204. Gernecke WH: Langerhans cells in the epithelium of the bovine forestomach. Their role in the primary immune response. *J South Afr Vet Assoc* 48: 187-192, 1977.
205. Younes MS, Robertson EM, Bencosme SA: Electron microscope observations on Langerhans cells in the cervix. *Am J Obstet Gynecol* 102: 397-403, 1968.
206. Young WG: Epithelial kinetics affect Langerhans cells of mouse vaginal epithelium. *Acta Anat* 123: 131-134, 1985.
207. Young WG, Newcomb GM, Hosking AR: The effect of atrophy, hiperplasia, and keratinization accompanying the estrus cycle on Langerhans cells in mouse vaginal epithelium. *Am J Anat* 174: 173-186, 1985.
208. Morris HNG, et al: Langerhans cells in human cervical epithelium. An immunohistological study. *Br J Obstet Gynecol* 90: 400-411, 1983.
209. Barbey S, Nezelof C: Le Système Langerhansien. Définition. Modifications physiologiques et pathologiques. *Path Biol* 34: 259-273, 1986.
210. Banerjee TK, Hoshino T: ATPase-positive and metallophilic

- cells in the skin of frog *Rana catesbeiana*. Nagoya J Med Sci 47: 83-90, 1984.
211. Castell A, Pérez A, Rondán A, Carrillo J: Presencia de células de Langerhans en anfibios. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Querétaro, México. Agosto de 1988.
 212. Breathnach AS, Poyntz SV: Electron microscopy of pigment cells in tail skin of *Lacerta vivipara*. J Anat 100: 549-569, 1966.
 213. Reams WM, Tompkins SF: A developmental study of murine epidermal Langerhans cells. Dev Biol 31: 114-123, 1973.
 214. Rowden G: The Langerhans cell. CRC Critical Rev Immunol 3(2): 95-180, 1981.
 215. Roit I, Brostoff J, Male D: Evolution of Immunity. In: Immunology. Ed Gower Medical Publishing Ltd. Cap 15, pp 15.1-15.12. London, England. 1986.
 216. Hodges RD: The integumentary system. In: The histology of the fowl. Academic Press. pp 1-11. London, England. 1974.
 217. Cane AK, Spearman RIC: A histochemical study of keratinization in the domestic fowl (*Gallus gallus*). J Zool 153: 337-352, 1967.
 218. Matoltsy AG: Keratinization of avian epidermis. An ultrastructural study of the newborn chick skin. J Ultrastruct Res 29: 438-458, 1969.
 219. Pirlot P: Sistema Tegumentario. En: Morfología evolutiva de los cordados. Ed. Omega S.A. Cap. 17, pp 868-896, Barcelona, España. 1976.
 220. Weichert CK, Presch W: Sistema Tegumentario. En: Elementos de Anatomía de los Cordados. Mc Graw-Hill. Cap 5, pp 68-106. Mexico. 1984.
 221. Young JZ. Life in the air. In: The life of the vertebrates. Oxford University Press. Third edition. cap 15, pp 323-371. New York, USA. 1981.
 222. Prentice PI, Eastlick HL: The presence of pigment in the White Plymouth Rock fowl. Anat Rec 117: 617-618, 1953.
 223. Lucas AM, Stettenheim PR: Growth of follicle and feathers. Color of feathers and integument. In: Avian Anatomy. Cap 9. pp 391-417, Washington D.C. USA. 1972.
 224. White RF, Eastlick HL: The development of melanophores in the down feathers and skin of the Silkie fowl. Pult Sci 32: 239-247, 1953.
 225. Maguirre H, Rank R, Weidanz W: Allergic contact dermatitis: A fowl deed. J Invest Dermatol 64: 24 (abst), 1975.
 226. Maguirre HC, Rank RG, Weidanz WP: Allergic contact dermatitis to low molecular weight allergens in the chicken. Int Archs Allergy appl Immunol 50: 737-744, 1976.
 227. Weidanz WP, Weber WT, Maguirre HC: Allergic contact dermatitis in the B-cell deficient chicken. Int Archs Allergy appl Immunol 50: 755-758, 1976.
 228. Wolff K: The Langerhans cell. Curr Prob Derm 4: 79-145,

- 1972.
229. Drexhage HA, Mullink H, DeGroot J, Clarke J, Balfour BM: A study of the cell present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cell. *Cell Tissue Res* 202: 407-430, 1979.
 230. Andersson A, Sjöberg S, Elofsson R, Falck B: The epidermal indeterminate cell—a special celltype? *Acta Dermatovener (Stockh) Suppl* 99: 41-43, 1981.
 231. Burkhardt A, Bos IR, Löning T, Gebbers JO, Ottho HF, Seifert G: Interepithelial cells of the oral mucosa in mice. *Virchows Archiv. A. Pathol Anat Histol* 384: 223-244, 1979.
 232. Bos JD, Kapsenberg ML: The skin immune system. Its cellular constituents and their interactions. *Immunol Today* 7: 235-240, 1986.
 233. Stingl G, Roman N, Wolff K: Langerhans cells: A distinctive member of bone marrow derived dendritic cells. *Adv Dermatol* 2: 269-282, 1987.
 234. Schweizer J, Marks F: Lack of relationship between Langerhans cells, epidermal cell proliferation and epidermal G1 chalone. *Experientia* 34: 1235-1237, 1978.
 235. Potten Cs, Allen TD: A model implicating the Langerhans cell in keratinocyte proliferation control. *Differentiation* 5: 43-47, 1976.
 236. Marks R, Knight A, Laider P: Disorders of keratinization. In: *Atlas of skin pathology*. MTP Press Limited. Cap 4, pp 41-44. Lancaster, England. 1986.
 237. Riley FA: The Langerhans cell. In: *Physiology and Pathophysiology of the skin*. Jarret A. Acad Press Inc. pp 1199-1218, New York, USA, 1974.
 238. Jarret A, Wrench R, Mahmoud B: Granular layer induction following the topical application of proliferating agents. *Arch Dermatol Res* 264: 143-, 1979.
 239. Lang R, Fridlaender M, Schoenrock B: Langerhans cell induction and migration in the guinea pig cornea. *ARVO Abstracts. Invest Ophthalmol Vis Sci* 21 (suppl): 1, 1981.
 240. Rowden G: Expression of Ia antigen on Langerhans cells in mice, guinea pig, and man. *J Invest Dermatol* 75: 22-31, 1980.
 241. Newcomb GM, Seymour GJ, Powell RN: Association between plaque accumulation and Langerhans cell number in the oral apithelium of the attached gingiva. *J Clin Periodont* 9: 297-304, 1982.
 242. Luger TA, Stadler BM, Katz SI, Oppenheim JJ: Epidermal cell (keratinocyte) derived thymocyte-activating factor (ETAF). *J Immunol* 127: 1493-1498, 1981.
 243. Sauder DN, Carter CS, Katz SI, Oppenheim JJ: Epidermal cell production of thymocyte-activating factor (ETAF). *J Invest Dermatol* 79: 34-39, 1982.
 244. Charon JA, Luger TA, Mergerhagen SE, Oppenheim JJ: Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during inflammation. *Infect Immunol* 38: 1190-1195,

- 1982.
245. Grabner G, Luger TA, Smolin G, Oppenheim JJ: Corneal epithelial thymocyte activating factor (CETAF). Invest Ophthalmol Vis Sci 184 (Ref. en 246).
 246. Luger TA, Szein MB, Schmidt JA, Murphy P, Grabner G, Oppenheim JJ: Properties of murine and human epidermal cell-derived thymocyte-activating factor. Fed Proc 42: 2772-2776, 1983.
 247. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Steeg PS: Interleucinas e interferones. En: Immunología Básica y Clínica. Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, Wells JV. Edit. El Manual Moderno. 5a. Edición. Cap. 8. pp 85-102, México D.F. 1985.
 248. Walsh LJ, Seymour GJ, Powell RN: Interleukin-1 modulate T6 expression on putative intra-epithelial Langerhans cell precursor population. J Dent Res 65: 1424-1426, 1986.
 249. Walsh LJ, Seymour GJ, Powell RN: Modulation of gingival Langerhans cell T6 antigen expression in vitro by interleukin 1 and an interleukin 1 inhibitor. Clin Exp Immunol 64: 334-341, 1986.
 250. Steiner G y colaboradores (8): Interleukin 2 receptors on cultured murine epidermal Langerhans cells. J Immunol 137: 155-159, 1986.
 251. Sauder DN, Dinarello CA, Morhenn VB: Langerhans cell production of Interleukin-1. J Invest Dermatol 82: 605-607, 1984.
 252. Frazier JA: Ultrastructure of the chick thymus. Z Zellforsch 136: 191-205, 1973.