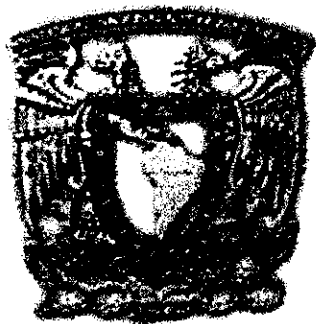


11281



**Universidad Nacional Autónoma  
de  
México  
Facultad de Medicina**

4

**“Caracterización funcional de  
células de Langerhans de la piel y mucosas  
de los anfibios por histoquímica enzimática  
e inmunohistoquímica”**

**Tesis  
que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biomédicas  
presenta el  
M. en C. Andrés Castell Rodríguez**

**Director de Tesis  
Dr. Alfonso Cárabez Trejo**

**Cd. Universitaria, D.F., Junio de 2000**



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.

## INDICE

□ Índice de abreviaturas	
□ Resumen en español	
□ Resumen en inglés	
□ Introducción	1
□ Conceptos de SALT y SIS	2
□ Origen de las células de Langerhans	8
□ Identificación y fenotipo de las células de Langerhans	11
□ Impregnaciones metálicas	11
□ Histoquímicas enzimáticas	11
□ Marcadores inmunológicos	13
□ Ultraestructura de las células de Langerhans	19
□ Origen, destino y función de los gránulos de las células de Langerhans	21
□ Función de las células de Langerhans	27
□ Células de Langerhans en vertebrados no mamíferos	33
□ Planteamiento del problema	35
□ Hipótesis	36
□ Objetivo general	37
□ Objetivos particulares	37
□ Diseño experimental	38
□ Resultados	42
□ Discusión	52
□ Conclusiones	59
□ Perspectivas	60
□ Apéndice (material y métodos)	61
□ Referencias	70

INDICE DE ABREVIATURAS

CL	Células de Langerhans
SALT	Sistema linfoide asociado a piel
SIS	Sistema inmunológico de la piel
CD	Células dendríticas
CLA	Antígeno asociado a linfocitos cutáneos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
ELAM	Moléculas de adhesión leucocitaria expresada por células endoteliales
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
DECT	Células T dendríticas epidérmicas
TCR	Receptor de células T
TNF	Factor de necrosis tumoral
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
IL	Interleucinas
CV	Células veladas
CID	Células interdigitantes
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
HLA	Antígeno leucocitario de histocompatibilidad
ATP <sub>asa</sub>	Adenosintrifosfatasa
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
IgG	Inmunoglobulina G
IgE	Inmunoglobulina E
F <sub>c</sub>	Fracción cristalizable
CR3b	Receptor del tercer componente del complemento
GCL	Gránulo de las células de Langerhans
TNBS	Ácido picrico
DBFB	Dinitrofluorobenceno
ZIO	Zinc-Yodo-Osmio
EDTA	Acido etilenamino tetraacético
AM <sub>20</sub>	Anticuerpo monoclonal que identifica moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad de <i>Xenopus laevis</i> , pero que tiene reacción cruzada con <i>Rana pipiens</i>
NaF	Fluoruro de sodio (inhibidor de la enzima esterasa inespecífica)

## **"CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS DE LA PIEL Y MUCOSAS DE LOS ANFIBIOS POR HISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA E INMUNOHISTOQUÍMICA".**

### **RESUMEN**

Las células de Langerhans de los mamíferos están localizadas en diferentes epitelios planos estratificados. Estas células poseen un patrón ultraestructural característico, una membrana plasmática con actividad de adenosintrifosfatasa, y constitutivamente expresan moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad. Células dendríticas adenosintrifosfatasa positivas y con una morfología similar a las células de Langerhans han sido encontradas con anterioridad en la epidermis de la *Rana catesbeiana*. El objetivo del este trabajo fue demostrar que las células dendríticas de la epidermis de la *Rana pipiens* expresan moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad, tienen actividad de esterasa inespecífica y están presentes en otros epitelios planos estratificados por histoquímica enzimática, inmunohistoquímica y microscopía electrónica. Por otro lado, el análisis de la ontogenia y del efecto de sensibilizadores de contacto en estas células fueron realizados.

Células dendríticas positivas para la adenosintrifosfatasa y para las moléculas clase II fueron observadas en la piel, membrana nictitante y córnea. En la epidermis el número de células dendríticas positivas para la adenosintrifosfatasa fue de  $656 \pm 186/\text{mm}^2$ , mientras que el de las células dendríticas clase II positivas fue de  $119 \pm 45/\text{mm}^2$ . Algunas células dendríticas adenosintrifosfatasa positivas coexpresaron moléculas clase II. Células dendríticas esterasa inespecífica positivas, con un patrón ultraestructural similar, también fueron observadas en los diferentes epitelios. Cuando la ontogenia de estas células fue examinada, células positivas para la adenosintrifosfatasa y para las moléculas clase II fue observada en todos los estadios larvarios, sin embargo en la etapa del címax de la metamorfosis, el número de células positivas para ambos marcadores decreció, y se incrementó nuevamente en la postmetamorfosis. Al aplicar un sensibilizador de contacto en la piel de este anfibio, el número de las células positivas para la adenosintrifosfatasa decreció, mientras que el número de las células positivas para las moléculas clase II se incremento rápidamente.

Estos resultados sugieren la presencia de células homólogas a las células de Langerhans de mamíferos en diferentes epitelios estratificados de la *Rana pipiens*. Más aún, al igual que en mamíferos fue demostrada la existencia de subpoblaciones de células dendríticas en la *Rana pipiens*.

## **"FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF AMPHIBIAN SKIN AND MUCOSA LANGERHANS CELLS BY ENZYMATIC HISTOCHEMISTRY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY"**

### **ABSTRACT**

Mammalian Langerhans cells are antigen-presenting cells located in different epithelia. These cells have a characteristic ultrastructural pattern, present a plasmatic membrane adenosintriphosphatase activity and constitutively express class II molecules of the major histocompatibility complex. Adenosintriphosphatase-positive dendritic cells that are morphologically similar to Langerhans cells have also been found in amphibian epidermis. In order to demonstrate that adenosintriphosphatase-positive dendritic cells of amphibian epidermis express class II molecules, have non-specific esterase activity and, are present in other stratified epithelia, histochemical and immunohistochemical as well as ultrastructural analysis were performed. On other hand, ontogeny and the effect of contact sensitivity substances on these cells were examined.

Adenosintriphosphatase-positive dendritic cells and class II-positive dendritic cells were observed in epidermis, nictitant membrane and cornea. In epidermis the number of adenosintriphosphatase-positive dendritic cells was  $656 \pm 186/\text{mm}^2$  while class II-positive dendritic cells was  $119 \pm 45/\text{mm}^2$ . Some adenosintriphosphatase-positive dendritic cells showed co-expression of class II molecules. Non-specific esterase positive dendritic cells showing similar ultrastructural features were demonstrated too. When the ontogeny of this cells were examined, positive adenosintriphosphatase and class II positive cells were present in all larval stages, however the number of this cells decreased in the climax of metamorphosis stage, and increased again in postmetamorphosis. When a contact sensitivity substance were applied to the skin, the number of the adenosintriphosphatase-positive cells decreased and the number of the class II- positive cells increased quickly.

These results suggest the presence of cells homologous to mammalian Langerhans cells in stratified epithelia of the frog *Rana pipiens*. Moreover, it is demonstrated the existence of dendritic cell subsets in *Rana pipiens* as is clearly demonstrated in mammals.

## INTRODUCCIÓN

Las células de Langerhans (CL) son células presentadoras de antígenos que llevan a cabo una función de inmunovigilancia en la piel y mucosas.

Paul Langerhans describió estas células en 1868<sup>1</sup>, en piel de cadáveres impregnada con cloruro de oro, como una población de células dendríticas intraepidérmicas "que conectaban con fibras nerviosas dérmicas". Basado en sus observaciones y por la afinidad que mostraban por las impregnaciones metálicas, Langerhans consideró que las células descritas formaban un "sistema nervioso intraepidérmico". Desde su descripción, el avance en el conocimiento de las CL fue muy lento y esto debido a que las técnicas de impregnación metálica y tinciones supravitales originalmente empleadas para evidenciarlas, eran caprichosas y no específicas, además de proporcionar una información morfológica "estática". Lo anterior explica porque la "teoría neural" acerca del origen de las CL fue sostenida durante mucho tiempo. La morfología también fue la responsable de emparentar a las CL con los melanocitos lo cual dio lugar a la "teoría melanocítica" del origen de aquellas, y esto basado principalmente en el hecho de que ambas tienen forma dendrítica.

Sólo a partir de la década de los 60<sup>as</sup> y particularmente en los últimos quince años se ha incrementado notablemente el conocimiento que se tiene acerca de las CL y esto por la aparición de nuevas técnicas morfológicas y de biología celular. El primer avance notable fue por la aplicación de técnicas enzimáticas y del microscopio electrónico de transmisión que permitieron no sólo la distinción entre las CL y los melanocitos, sino también su identificación en otros tejidos diferentes a la epidermis. El siguiente avance en relación con las CL, y quizás el más importante, ocurrió cuando se aplicaron técnicas de inmunología y de biología celular al estudio de receptores de superficie de estas células, lo cual les dio el carácter de células con un origen y función inmunológica. Finalmente, en la década pasada, los métodos de identificación inmunomorfológicos y de enriquecimiento de CL en cultivo han contribuido en mucho a un mayor entendimiento de su función in vivo. Por lo anterior, podemos observar que la investigación acerca de las CL ha seguido al desarrollo de la biología celular en general, no sólo con respecto a la disponibilidad de

tecnologías apropiadas y su aplicación a sistemas biológicos, sino también al cúmulo creciente de información científica derivada de ella.

## CONCEPTOS DE SALT Y SIS

Por mucho tiempo, la piel fue considerada como un órgano relativamente inerte, teniendo sólo una función mecánica en la protección del cuerpo, sin embargo, las investigaciones en inmunobiología de la piel han revelado que la epidermis constituye un sistema muy complejo, el cual tiene un papel muy importante en el desarrollo de respuestas inmunológicas a diversos antígenos. En este sentido, las células de Langerhans (CL) han sido el eje para el establecimiento de los conceptos de tejido linfoide asociado a la piel (SALT) y del sistema inmunológico de la piel (SIS).

El SALT ha sido definido como un sistema celular que permite a la piel reaccionar con autonomía frente a retos antigénicos, en analogía con otros sistemas similares en el intestino y en el aparato respiratorio<sup>2</sup>. Los componentes principales del SALT incluyen a: 1) Las células epidérmicas presentadoras de antígenos, CL; 2) Los queratinocitos que secretan citoquinas moduladoras de la respuesta inmunológica<sup>3</sup>, 3) Los linfocitos T dendríticos epidérmicos (Thy-1+/CD3<sup>+</sup>/TCR $\gamma\delta$ +); 4) Subpoblaciones de linfocitos T (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) que tienen un receptor de alta afinidad para la piel; 5) Vénulas postcapilares cutáneas de endotelio alto que expresan moléculas de adhesión cutáneo-específicas que son importantes para el direccionamiento del tráfico de linfocitos y 6) Los vasos y ganglios linfáticos regionales<sup>4-6</sup>. La figura 1 muestra la relación funcional de estos elementos.

En el SALT las CL están consideradas como el componente más periférico de la rama aferente de la respuesta inmune<sup>7</sup>, ya que cuando un antígeno se introduce en la epidermis, las CL lo captan, endocitan y procesan, y finalmente, junto con las citoquinas derivadas de células epidérmicas, activan a linfocitos intraepiteliales. Por otro lado las CL pueden migrar por los vasos linfáticos aferentes hacia la zona paracortical de los ganglios linfáticos regionales donde presentan el antígeno a los linfocitos T, resultando en una expansión clonal de linfocitos T específicos. Una



vez que se ha formado una línea celular de linfocitos que respondan a ese antígeno, estos alcanzan la circulación general y pueden llegar nuevamente a la piel<sup>8</sup>.

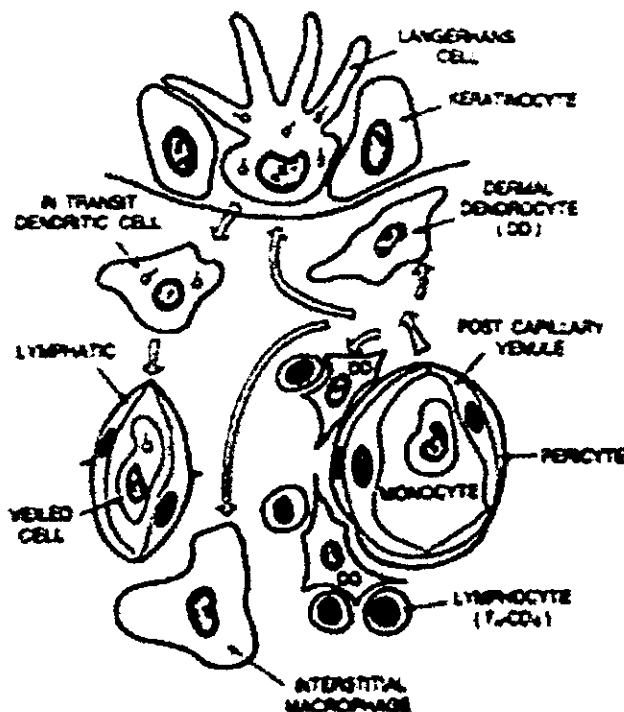


Fig. 1. Están ejemplificados los distintos componentes del sistema linfático asociado a la piel, con excepción de los ganglios linfáticos regionales. Hasta fechas recientes se ha comenzado a considerar a la piel como un órgano linfático.

Por otro lado, en 1988, Bos y Kapsenberg<sup>9</sup> propusieron el término de SIS, el cual describe la complejidad de células asociadas a la respuesta inmune y factores humorales que están presentes en la piel humana normal. La Tabla 1 muestra cuales son los constituyentes del SIS.

Recientemente se han puntualizado las funciones del SIS<sup>10</sup> entre las cuales se encuentran:

- Respuesta inflamatoria epitelial a varios antígenos;
- Atracción epitelial de células dendríticas circulantes; .
- Inducción de respuestas inmunes primarias a antígenos y la migración de células presentadoras de antígenos;
- Existencia de un almacén recirculante de células T cutáneo específicas, e
- Inmunovigilancia en relación con la prevención de tumores.

**Tabla 1. Constituyentes celulares y humorales del SIS**

<b>Celulares</b>	<b>Humorales</b>
<b>Relacionados con la respuesta inmune innata</b>	
Queratinocitos	Fibrinolisinias
Macrófagos tisulares	Péptidos antimicrobianos
Monocitos	Péptidos del complemento
Granulocitos	Eicosanoides
Células cebadas	Neuropéptidos
	Citoquinas
<b>Relacionados con la respuesta inmune adquirida</b>	
Células de Langerhans	Inmunoglobulinas de secreción
Células dendríticas tisulares	Interleucinas e interferones
Células T	Factores estimuladores de colonias
Células endoteliales	Otras citoquinas (TGF, TNF)

Tomado de Bos y Kapsenberg, 1993<sup>10</sup>.

Una característica esencial del SIS es la presencia de diferentes subpoblaciones de linfocitos que son necesarios para el desarrollo de respuestas inmunológicas en el ámbito cutáneo. El número total de linfocitos T presentes en la piel humana normal adulta es de aproximadamente 4 mil millones, de los cuales el 90% se localiza en el tejido conectivo dérmico perivascular<sup>11</sup>. La figura 2 muestra la distribución y fenotipo de los linfocitos T en la piel humana normal.

Análisis realizados en linfocitos cutáneos han revelado que principalmente son células T de memoria CD45R0<sup>12-13</sup>. Estos linfocitos exhiben el fenotipo CD4<sup>+</sup>/CD3TCRαβ o el CD8<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>TCRαβ siendo estas últimas las más abundantes<sup>11, 14-16</sup>.

Interesantemente, se ha descrito en sangre periférica una subpoblación de células T que expresa el antígeno asociado a linfocitos cutáneos (CLA) el cual es reconocido por el anticuerpo monoclonal HECA-452. El CLA es una glucoproteína de membrana de 200 kDa que es expresada por el 16% de linfocitos de sangre periférica. Por otro lado, el 85% de los linfocitos T inflamatorios cutáneos en diferentes enfermedades dermatológicas son HECA-452+ mientras que el 5% de los

linfocitos T que se localizan en sitios extracutáneos es HECA-452<sup>17</sup>. En contraste en piel humana normal sólo el 45% de linfocitos T presentan el antígeno CLA<sup>18</sup>. El receptor del CLA es una molécula de adhesión leucocitaria expresada por las células endoteliales (ELAM-1) de las vénulas postcapilares dérmicas<sup>19, 20</sup>. Es de notar el hecho de que la inmigración hacia la piel de células T de memoria HECA-452+ es dependiente de la expresión de ELAM-1, inducida por daño, en células endoteliales de la microvasculatura dérmica, lo que indica que los linfocitos T presentes en la epidermis humana del adulto son reclutados después de algún daño en la piel. De acuerdo con lo anterior, la epidermis humana representa un sitio de llegada específico y/o blanco para linfocitos antigénicamente sensibilizados en órganos linfoides periféricos.

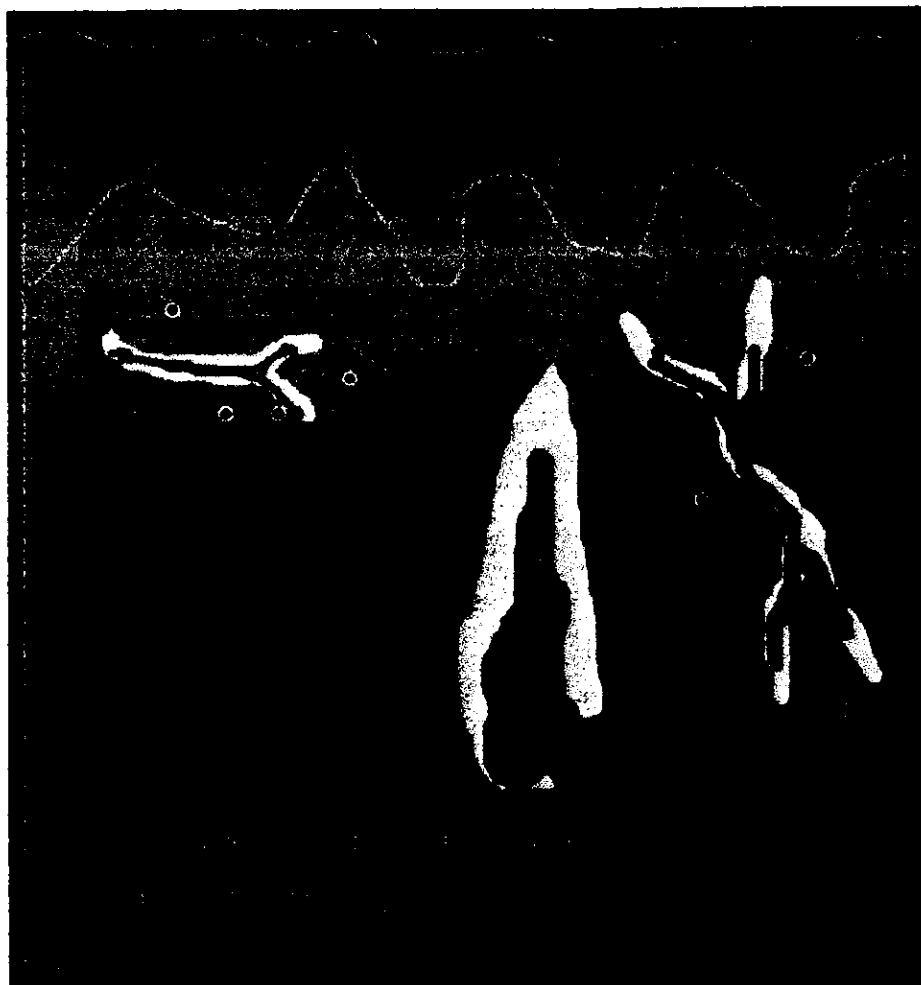


Fig. 2. Esquema que muestra la distribución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos en la piel. El número de linfocitos CD8+ y CD4+ es similar en la dermis (D), localizándose alrededor de vasos sanguíneos (Vs). Sin embargo, en la epidermis (E) el número de linfocitos CD8+ es mayor.

Otra población de células linfoides presentes en la epidermis es la de las células T dendríticas epidérmicas (DECT). Estas células fueron inicialmente descritas en la epidermis del ratón y se caracterizan por expresar en su membrana el antígeno Thy-1<sup>21,22</sup>. Estos linfocitos se originan de células tallo fetales y se diferencian en el timo o en el microambiente epidérmico<sup>23-27</sup> y se caracterizan por expresar en su membrana el complejo CD3/Receptor de células T  $\gamma/\delta$  (TCR)<sup>28-30</sup>. Ya que el TCR de los linfocitos dendríticos Thy-1+ no permite el reconocimiento de antígenos acoplados al complejo principal de histocompatibilidad (MHC), se excluye que los linfocitos dendríticos epidérmicos puedan mediar una respuesta inmune provocada por antígenos extraños. Sin embargo, recientemente, Tigelaar y Lewis<sup>31</sup> puntualizaron el papel funcional de estas células: 1) Inmunovigilancia contra antígenos patógenos intracutáneos como *M. leprae* y contra células epidérmicas dañadas o alteradas; 2) Estimulación de proliferación de queratinocitos por la producción de factores de crecimiento en respuesta al daño epidérmico y 3) Regulación de respuestas inmunes intracutáneas como la inhibición de la hipersensibilidad de contacto y la inhibición de reacciones autoinmunes intraepidérmicas.

Por otro lado, el equivalente de los linfocitos dendríticos epidérmicos Thy-1+ del murino no han sido identificados en la epidermis humana, sin embargo células T con el receptor  $\gamma/\delta$  si han sido descritas en el humano<sup>32</sup>.

Dentro de la epidermis los queratinocitos han sido reconocidos como una fuente importante de citoquinas inflamatorias y de factores de crecimiento<sup>33</sup>. Las citoquinas derivadas de células epidérmicas incluyen a las interleuquinas IL-1a y b<sup>34-36</sup>, IL-3<sup>37</sup>, IL-6<sup>38</sup>, IL-7, IL-8 e IL-10<sup>39</sup>, además del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de factores de crecimiento como el factor de crecimiento básico de fibroblastos, el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$ , el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento nervioso<sup>40-46</sup>. La producción constitutiva de citoquinas, *in vivo* e *in vitro*, por las células epidérmicas es baja, sin embargo después de un estímulo dañino aumenta importantemente<sup>44</sup>. Interesantemente se ha demostrado que las citoquinas derivadas de células epidérmicas tienen una importante función reguladora en la respuesta inmunológica de la piel<sup>47-49</sup>.

Por ejemplo, el TNF $\alpha$  y la IL-1 que regulan la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y ELAM-1<sup>50</sup>, pueden influenciar la adhesión y desprendimiento de leucocitos a las células endoteliales, células epidérmicas y células inmunocompetentes. Por otro lado, la IL-1<sup>36,51</sup> y la IL-6<sup>52</sup> parecen participar en la activación de linfocitos T y tanto la IL-1<sup>53</sup> como la IL-8<sup>54</sup> producen una migración de linfocitos T hacia la epidermis. Además, las citoquinas derivadas de células epidérmicas están involucradas en la modulación de la presentación de antígenos por las CL ya que el GM-FSC en presencia de IL-1 aumenta la expresión de moléculas clase II en las CL.<sup>55</sup> La tabla 2 muestra la secreción de citoquinas producidas por queratinocitos humanos.

**Tabla 2. Citoquinas producidas por queratinocitos humanos *in vitro***

Interleucinas	IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8
Factores estimuladores de colonias	IL-3, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
Interferones	IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$
Factores de necrosis tumorales	TNF- $\alpha$
Factores de crecimiento transformantes	TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$
Factores de crecimiento	PGDF, FGF.

Tomada de Bos J. Kapsenberg ML: *Immunol Today* 14: 75-78, 1993.

Muchas de las características cutáneo-específicas del sistema inmunológico de la piel están relacionadas con su localización superficial y con el hecho de que está en contacto continuo con antígenos extraños. La piel comparte esta exposición continua a antígenos exógenos con los tractos respiratorio y gastrointestinal. Sin embargo, la principal diferencia entre el SALT y el SIS y los sistemas linfoides asociados al intestino y a los bronquios radica en que la piel, en condiciones normales, no tiene nódulos de tejido linfoide en el estroma dérmico, por lo tanto, la amplificación de respuestas inmunológicas no ocurre dentro de la piel *per se*. En este sentido, las CL tienen un papel importante en la presentación de antígenos y en el transporte de éstos hacia los tejidos linfoides para la amplificación de respuestas inmunológicas.

Por otro lado, la piel tiene los elementos necesarios para el desarrollo de respuestas inmunológicas ya que las CL presentadoras de antígenos, los queratinocitos productores de

citoquinas y los linfocitos T epidermotrópicos proveen a la piel de esta capacidad. Así mismo, mucosas como las de la nariz, ojos, boca (tubo digestivo) también tienen los elementos que les permiten responder inmunológicamente<sup>56-59</sup>, de manera similar a como lo realiza la piel.

En las mucosas, al igual que en la piel, las CL tienen una función de inmunovigilancia, la cual es importante para la discriminación de lo propio de lo no propio.

#### ORIGEN DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

Por muchos años, las CL fueron erróneamente consideradas como un componente del sistema nervioso periférico derivado del neuroectodermo. Lo anterior se debió a dos razones: la técnica de cloruro de oro utilizada para evidenciar a las CL también impregna al tejido nervioso y Langerhans<sup>1</sup> e investigadores posteriores<sup>60-62</sup> consideraron que los procesos dendríticos de las CL recordaban a las fibras nerviosas. Otra teoría ampliamente discutida a mediados de siglo, fue la posible relación de las CL con los melanocitos. Las CL fueron consideradas como melanocitos desgastados<sup>63</sup>, estados postdivisionales previos a melanocitos melanogénicos<sup>64</sup> o posiblemente melanocitos inmaduros o en reposo<sup>65</sup>. Sin embargo, al examinar la epidermis y los primordios de extremidades de ratones deprivados experimentalmente de crestas neurales, con microscopía fotónica<sup>66</sup> y electrónica<sup>67</sup>, se demostró la presencia de CL pero no de melanocitos, evidenciando con esto que estas dos células no estaban relacionadas entre sí.

En 1979, dos grupos de investigadores dieron a conocer al mismo tiempo, que las CL derivaban de células de la médula ósea. **Katz y cols.**<sup>68</sup> realizaron dos series de experimentos: el primero consistió en transplantar piel de ratón A/J a ratones híbridos F1 (A/J x Balb/c). Después de tres semanas, con antisueros aloespecíficos, se determinó que las CL dentro de la piel trasplantada no retenían la antigenicidad de las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del donador sino que expresaban la del híbrido, mientras que los queratinocitos retenían la antigenicidad de las moléculas clase I del MHC del donador, indicando que las CL habían derivado de un grupo de células móviles. En el segundo grupo de experimentos, se crearon ratones quiméricos al inyectar intravenosamente células de médula ósea alogénica o semialogénica (híbrido F1) a un ratón irradiado letalmente. En los ratones trasplantados

alogénicamente, a los 32 días, se encontró que el 33% de las CL epidérmicas del receptor expresaban las moléculas clase II del donador y en los ratones trasplantados semialogénicamente se encontró que más del 80% de las CL epidérmicas se habían originado en el tejido donado a los 85 días. Ellos concluyeron que las CL eran derivadas de, y continuamente repobladas por células precursoras móviles que se originaban en la médula ósea. Al mismo tiempo, **Frelinger y cols.**<sup>69</sup> investigaron el origen de las moléculas clase II epidérmicas en la piel de ratones quiméricos, mediante la inmunoprecipitación indirecta de estas moléculas con aloantisueros de ratón. Ellos encontraron que el fenotipo de las moléculas clase II epidérmicas en el ratón quimérico coincidía con el de la médula ósea del donador. A las 10 semanas después del trasplante, las células que sintetizaban las moléculas clase II eran originadas exclusivamente por el tejido donado<sup>70</sup>. Ya que las CL son las únicas células en la epidermis normal que expresan las moléculas clase II, ellos concluyeron que las CL habían derivado de la médula ósea. Estas observaciones en el ratón se confirmaron posteriormente en el humano, al observar que en la piel de una mujer de 19 años que padecía aplasia medular, las CL mostraban fluorescencia nuclear en el cromosoma Y, ya que se le había realizado un trasplante alogénico de médula ósea de un varón<sup>71</sup>.

En la actualidad los estudios acerca del linaje de las CL están encaminados a identificar la célula madre de médula ósea que les da origen. En 1985, **Goordyal y cols.**<sup>72</sup> demostraron en la médula ósea del humano la presencia de células con el fenotipo de CL (CD1 y HLA-DR) y macrófagos. Estudios más detallados en estos progenitores revelaron que las células CD1a<sup>+</sup> de la médula ósea también eran positivas a la lectina aglutinina de cacahuete (PNA<sup>+</sup>) y que expresaban además las moléculas CD4, CD14, CD33, HLA-DR, HLA-DP y receptores para el C3<sub>b</sub> y para el FC de la IgG<sup>73-75</sup>. Además se observó una aparente transformación de macrófagos a CL en la piel de pacientes con diferentes leucemias en los cuales se habían realizado trasplantes de médula ósea<sup>76</sup>. Estos estudios sugirieron que las CL y los macrófagos podían tener un antecesor común.

Recientemente, el cultivo de células de la médula ósea y de células de sangre periférica en presencia de GM-CSF ha permitido la generación de progenitores de células dendríticas<sup>77-80</sup>, algunas de las cuales tienen la morfología y el inmunofenotipo de CL aunada a la capacidad de inducir una gran respuesta proliferativa de células T alogénicas<sup>81</sup>. Además, la adición de TNF $\alpha$  y de

GM-CFS a un cultivo de células de sangre de cordón umbilical de humano, permitió el aislamiento de un precursor que expresaba la molécula CD34<sup>82</sup> y que originó tanto monocitos como células dendríticas/CL que tenían las siguientes características: a) marcadores de membrana CD1, CD4 y moléculas clase II del MHC; b) presencia de gránulos de Birbeck; c) capacidad de internalizar antígenos por endocitosis mediadas por receptor y una gran capacidad estimuladora de linfocitos T alogénicos<sup>83</sup>. En 1996, Rozenzweig, Canque y Gluckman, en unos experimentos muy elegantes, establecieron la vía de diferenciación de las células dendríticas que va desde un precursor CD34<sup>+</sup> que después de algunos días en cultivo se torna en CD34<sup>-</sup> y al mismo tiempo aparecen los antígenos CD13, CD4 y HLA-DR. Posteriormente, la célula expresa el antígeno CD1 y moléculas de adhesión y coestimuladoras. Se puede considerar que los precursores de células dendríticas se diferencian *in vitro*, primero en células CD1a<sup>-</sup>, que recuerdan a las células dendríticas sanguíneas y después en CD1a<sup>+</sup>, que son similares a las CL y células interdigitantes de los órganos linfoides.<sup>84</sup>

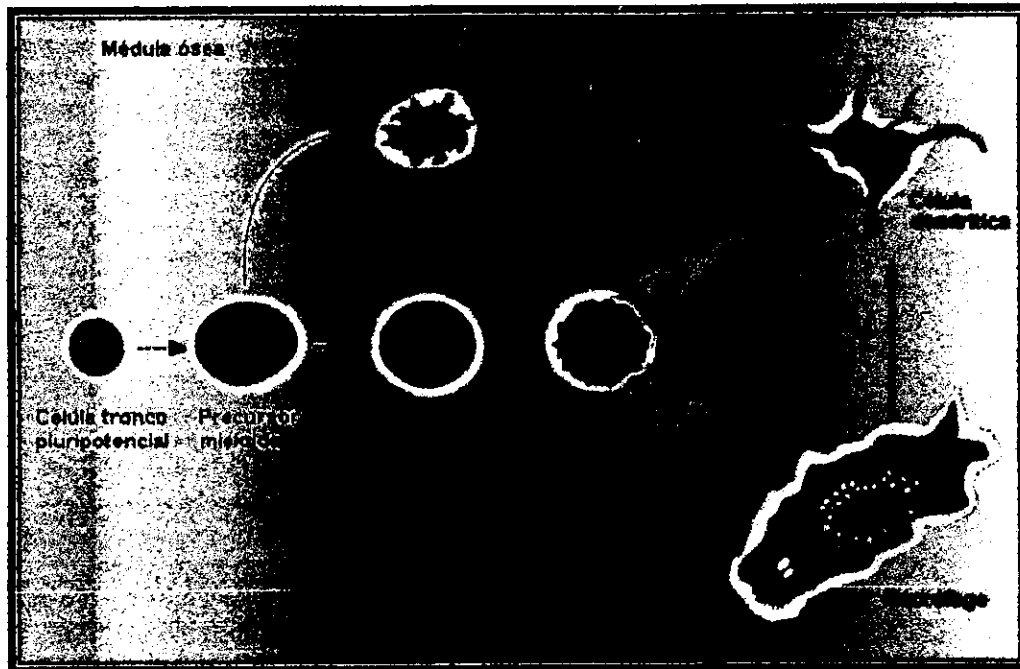


Fig. 3. En esta figura se muestra el posible origen de las CL a partir de un precursor CD34<sup>+</sup> el cual se diferencia tempranamente en médula ósea y que es diferente a monocitos. Si bien existen datos que apoyan la posible derivación de CL a partir de macrófagos y de monocitos, esto todavía necesita más evidencia experimental.



## IDENTIFICACION Y FENOTIPO DE LAS CELULAS DE LANGERHANS.

Las CL no se observan con la fijación y tinción rutinaria de cortes en parafina de piel, ya que con la tinción de hematoxilina-eosina aparecen irregularmente como "células claras en los estratos superficiales de la epidermis"<sup>85</sup>. Sin embargo, las CL muestran un patrón característico de tinción y diversas técnicas se han empleado para la identificación de las CL, entre las que se encuentran las impregnaciones metálicas, histoquímicas enzimáticas, inmunohistoquímicas y microscopía electrónica de transmisión.

### a) Impregnaciones metálicas.

Las CL fueron identificadas originalmente con una impregnación en una solución ácida de cloruro de oro, con la cual se observan como "elementos dendríticos intraepidérmicos cuyas prolongaciones alcanzan la capa córnea y las capas inferiores de la epidermis"<sup>1</sup>. Aunque las CL se impregnan selectivamente, la técnica es caprichosa y los resultados son difíciles de reproducir<sup>86</sup>.

Otra impregnación metálica empleada para identificar a las CL es el método de zinc-iodo-osmio, el cual fue aplicado con éxito para la demostración de CL en piel humana normal y patológica, tanto con microscopía fotónica como electrónica<sup>87, 88</sup>.

### b) Histoquímicas enzimáticas.

Se ha demostrado la presencia de varias enzimas en las CL, como  $\alpha$ -D-manosidasa<sup>89</sup>, fosfatasa alcalina<sup>90</sup>, aminopeptidasa<sup>91</sup>,  $\beta$ -glucuronidasa<sup>92</sup>, colinesterasa<sup>93</sup> y peroxidasa endógena<sup>94</sup>. Sin embargo, los procedimientos enzimáticos más útiles para la observación de las CL son las histoquímicas para demostrar la actividad de ATPasa y de esterasa inespecífica.

A principios de los años 60<sup>88</sup>, varios grupos de investigadores informaron de la actividad de ATPasa en las CL, lo cual fue un hallazgo circunstancial ya que el propósito de las investigaciones era otro. Mustakallio<sup>95</sup>, en 1962, tratando de demostrar que los elementos neurales epidérmicos podían ser teñidos por la reacción histoquímica para ATPasa, describió la tinción de nervios papilares y sus extensiones intraepidérmicas y la red dendrítica de células de Langerhans. Desgraciadamente Mustakallio intentó relacionar a la ATPasa de las células dendríticas con

funciones neurales. En el mismo año, Jarret y Riley<sup>96</sup>, realizaron cortes por congelación de piel fijada con formol calcio y encontraron actividad de ATPasa en "dendrocitos" de la epidermis y la dermis superior, además de una marcada actividad en forma de banda en el estrato granular. Posteriormente se realizaron observaciones de las CL conjugando la histoquímica enzimática para ATPasa y el microscopio electrónico de transmisión, encontrándose el producto de la reacción en la membrana plasmática de las CL. Este estudio concluyó que todas las CL podían ser visualizadas por la reacción de histoquímica enzimática para ATPasa y que el producto de la reacción se encontraba únicamente en estas células y no en otras células epiteliales<sup>97</sup>.

La demostración de la actividad de ATPasa es especialmente útil cuando se utilizan láminas epidérmicas separadas de la dermis, ya que permite observar la morfología dendrítica y distribución espacial y numérica de las CL<sup>98, 99</sup>. Además este método es altamente reproducible y confiable para la identificación de CL en epitelios.

El significado funcional de la presencia de ATPasa en las CL no se conoce con certeza, pero es probable que este involucrada en procesos de endocitosis adsorptiva necesarios para la captación de antígenos<sup>100</sup> o en la transferencia de energía asociada con la movilidad celular.

La actividad de la enzima esterasa inespecífica fue descrita en 1962 en células dendríticas de la epidermis de la cola del ratón<sup>98</sup>. Cuando se investigó la distribución de CL con esta enzima en diferentes regiones de la piel del ratón, las células positivas a la enzima se encontraron en la epidermis en situación basal y suprabasal y distribuidas de manera uniforme en la piel del abdomen, dorso y orejas. En contraste, las CL en láminas epidérmicas de la cola del ratón se localizaron asociadas a folículos pilosos en las regiones ortoqueratóticas, mientras que las paraqueratóticas carecían de CL<sup>101</sup>.

Imelda Campo-Aasen y Pearse<sup>102</sup>, en un artículo clásico pero poco apreciado (por estar escrito en español y haber sido publicado en una revista no muy conocida), encontraron que las CL esterasa inespecífica positivas se encontraban en todas las capas de la epidermis de la piel de ratones albinos. Estos autores fueron los primeros en relacionar a las CL con células del sistema inmune y concluyeron que: 1) las células dendríticas que exhibían actividad de esterasa inespecífica eran CL con intensa actividad hidrolítica; 2) que la enzima demostrada era peculiar a

las CL en la epidermis; 3) que las CL eran de naturaleza conjuntiva y 4) que las CL eran macrófagos de la epidermis debido a que la actividad esterásica entre las dos células era similar.

La esterasa inespecífica en las CL se localiza ultraestructuralmente en la cara externa de la membrana plásmatica<sup>103</sup>. Interesantemente a pacientes con histiocitosis X, que es una proliferación reactiva de CL, se les tomaron biopsias de piel de las que se prepararon suspensiones celulares, las cuales se incubaron en un medio que contenía  $\alpha$ -naftil-acetato con el propósito de demostrar la actividad de esterasa inespecífica<sup>104</sup>. La enzima se localizó en la cara externa de la membrana plasmática de los histiocitos y en la membrana plasmática de un organelo denominado gránulo X, el cual es idéntico al gránulo de las CL.

La demostración de la enzima esterasa inespecífica en CL constituye un método sencillo de realizar y útil para la visualización de estas células en la epidermis.

### c) Marcadores inmunológicos.

Una manera más precisa de identificar a las CL es utilizando anticuerpos para la identificación de marcadores de superficie y citoplásmicos. En este sentido una gran variedad de moléculas han sido identificadas, a nivel de microscopía de luz y electrónica, usando diferentes técnicas de tinción (inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia o marcaje con inmuno-oro) con distintas maneras de procesamiento del tejido (cortes en frío, suspensiones celulares epidérmicas o láminas epidérmicas). Por otro lado, la identificación de estos marcadores le han dado a las CL una identidad característica y han proporcionado una mejor comprensión de su papel funcional en la presentación de antígenos. La tabla 3 muestra el fenotipo de las CL.

Dentro del perfil fenotípico, las moléculas del **complejo principal de histocompatibilidad (MHC)** son esenciales para que las CL desempeñen su función ya que están involucradas en la presentación de antígenos. Estas moléculas se dividen en dos grupos principales: moléculas clase I y clase II los cuales son necesarias para la presentación de péptidos antigénicos<sup>105</sup>. Estos complejos antígeno-molécula del MHC, expresados en la superficie de las células presentadoras de antígenos, pueden ser específicamente reconocidos por linfocitos T a través de sus receptores. Además la interacción entre el complejo MHC-antígeno y el receptor de células T está

acompañado por la unión de moléculas de superficie en los linfocitos con las moléculas MHC. Esto es, las moléculas clase II y clase I de las CL se unen a los antígenos CD4 y CD8, respectivamente, en los linfocitos<sup>106,107</sup>. Las moléculas clase I están involucradas en la presentación de antígenos endógenos (como los antígenos tumorales), mientras que las moléculas clase II lo están en la presentación de antígenos exógenos<sup>108</sup>.

Tabla 3: Perfil fenotípico de CL epidérmicas humanas

Marcador	Presencia	Marcador	Presencia
<b>Específicos de CL</b>		<b>Marcadores de Mo/Mq</b>	
Ag-Lag	+	CD15 (LeuM1) (LeuM2)	-(+) -
<b>Moléculas MHC</b>		CD14 (LeuM3)	-
Clase I (HLA-ABC)	+	CD68	-
Clase II (HLA-DR)	++	OKM5	-
Clase II (HLA-DP)	++		
Clase II (HLA-DQ)	++		
<b>Marcadores de células T</b>		<b>Recept y Mol. de Adhesión</b>	
CD1a	++	CD64 (FcγR <sub>I</sub> )	-
CD1b	-	CDW32 (FcγR <sub>II</sub> )	+
CD1c	+	CD16 (Fcγ R <sub>III</sub> )	-
CD2	-	CD35 (CR1)	-
CD3	-	CD21 (CR2)	-
CD4	+	CD11b (CR <sub>3</sub> ; C <sub>3</sub> biR; gp155/95)	+
CD5	-	CD11c (gp 150/95)	+
CD7	-	CD18 (cadena β CD11a,b,c)	+
CD8	-	CD11a (LFA-1; gp 180/95)	-
Receptor de anticuerpos	-	CD58 (LFA-3)	+(-)
Receptor γδ	-(+)	CD54 (ICAM-1)	+(-)
		CD29 (cadena b de VLA)	+
		CDw49b (VLA-2)	+
		VLA-3	+
<b>Marcadores de células B</b>		CDw49d (VLA-4)	++
CD10	-	CDw49f (VLA-6)	++
CD19	-	CD25 (IL-2R)	-
CD20	-		
CD22	-	<b>Otros Marcadores</b>	
CD24	-	CD45 (T200)	+
CD40	-(+)	S100	+

Tomada de Teunissen: Histochem J 24: 697-716, 1992

Al igual que todas las células nucleadas, las CL expresan moléculas clase I del MHC<sup>109,110</sup> y usando anticuerpos monoclonales contra un determinante monomórfico clase I (W6/32) se encontró que los niveles de estas moléculas eran similares en queratinocitos y CL por inmunofluorescencia y citometría de flujo mientras que otros describieron niveles mayores de las

moléculas clase I en los queratinocitos<sup>111</sup>.

**Rowden**<sup>112</sup> y **Klareskog**<sup>113</sup> fueron los primeros en describir la expresión de moléculas clase II en las CL del humano y desde entonces ha quedado bien establecido que las CL muestran en su superficie moléculas codificadas por los genes HLA-DR (análogos a los I-E murinos<sup>114</sup>), -DQ (análogos a los I-A murinos<sup>114</sup>) y -DP<sup>115</sup>. En la epidermis normal parece existir un traslapamiento completo de estos antígenos en las CL.<sup>115</sup> Con dos excepciones las CL son las únicas células en la epidermis que expresan estas moléculas. Las células acrosiríngicas en epidermis humana normal, las células acrosiríngicas forman la porción intraepidérmica de los conductos de glándulas sudoríparas, son fuertemente positivas para el HLA-DR pero no para el -DQ y -DP<sup>116</sup>. Los queratinocitos en piel con procesos patológicos también pueden expresar moléculas clase II<sup>117</sup>.

Las CL son fuertemente positivas para el HLA-DR, sin embargo, se pueden distinguir dos subpoblaciones por la intensidad de tinción con un anticuerpo anti clase II. Así se ha encontrado que el 25% de las CL en suspensiones epidérmicas<sup>118</sup> y del 5-10% en láminas epidérmicas<sup>119</sup> se tiñen más brillantemente con fluorescencia. Lo anterior parece indicar que las CL más "brillantes" son más capaces en la presentación de los antígenos. También se ha calculado que la cantidad de determinantes DR en las CL es de 50 a 100 veces mayor que la de los monocitos/macrófagos<sup>120</sup>. Esta característica coloca a las CL como las células presentadoras de antígenos por antonomasia.

**Fithian**<sup>121</sup> y **Murphy**<sup>122</sup> observaron, en 1981, que las células de Langerhans del humano se teñían fuertemente con el anticuerpo OKT6. Esta reactividad llamó la atención ya que con anterioridad se había descrito que el antígeno T6 era un antígeno de diferenciación de timocitos<sup>123</sup>. En la actualidad a este antígeno se le conoce como CD1 y está dividido en los subgrupos de diferenciación CD1a (glucoproteína de 49-kDa), CD1b (glucoproteína de 45-KDA) y CD1c (glucoproteína de 43-kDa<sup>124</sup>) Estas glucoproteínas, al igual que las moléculas clase I, están asociadas con la  $\beta$ 2-microglobulina<sup>125</sup> y se ha sugerido que las moléculas CD1 pueden ser la contraparte humana de los antígenos leucémicos del timo del murino<sup>126,127</sup>.

Todas las CL epidérmicas expresan los antígenos CD1a, pero sólo expresan débilmente los antígenos CD1c y no expresan los CD1b<sup>128</sup>. Por otro lado, los queratinocitos no expresan ningún antígeno CD1 por lo que estos antígenos, en especial el CD1a, son muy útiles para la

identificación de las CL<sup>129</sup>.

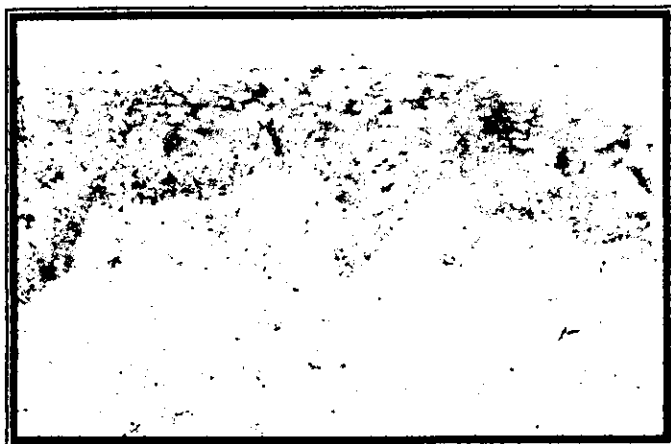


Fig. 4. Microfotografía de piel humana normal teñida para demostrar las moléculas CD1a en CL. Estas moléculas ha permitido la identificación de CL en varios órganos linfoides y no linfoides.

La función de las moléculas CD1 no ha sido dilucidada, sin embargo se ha sugerido que poseen una función análoga a la de las moléculas clase I y II del MHC ya que se ha demostrado que las moléculas CD1a pueden servir como una estructura de reconocimiento para linfocitos con el fenotipo CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> TCR $\alpha/\beta$  y las CD1c pueden servir como estructura de reconocimiento para los linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> TCR $\gamma/\delta$ <sup>130</sup>. Es interesante notar que en la epidermis normal se ha descrito una subpoblación de linfocitos T con el fenotipo CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> TCR $\alpha/\beta$ <sup>131</sup> al cual las CL podrían estar presentando antígenos.

Otro marcador de linfocitos que poseen las CL es el antígeno CD4<sup>132-133</sup>. La expresión de este marcador es baja en las CL de piel normal pero aumenta considerablemente en las CL en enfermedades cutáneas como el liquen plano<sup>134</sup> y el linfoma de células T<sup>135</sup>, lo que sugiere que la expresión es regulada por citoquinas de células inflamatorias. El significado funcional de la presencia del antígeno CD4 en las CL no se conoce, sin embargo, se ha demostrado que este antígeno es el receptor para el HIV-1, por lo tanto las CL pueden ser infectadas por este virus<sup>136-</sup>

<sup>139</sup>.

Por otro lado, aunque las CL de humano comparten algunos marcadores que poseen los macrófagos y los monocitos como los antígenos CD14, CD15 y CD33, los niveles de expresión de éstos son mucho más bajos que en los monocitos/macrófagos<sup>119-142</sup>.

Stingl y cols<sup>143</sup>, empleando eritrocitos bovinos opsonizados con IgG o con complemento, identificaron receptores para el Fc de la inmunoglobulina G (FcγR) y para el tercer componente del complemento (CR3<sub>b</sub>). Posteriormente, con el advenimiento de anticuerpos monoclonales, ha sido demostrado que las CL aisladas expresan niveles bajos del FcγR<sub>II</sub> (CD32) y del CR3<sub>b</sub> (CD11b/CD18), pero no expresan los FcγRI (CD64), FcγRIII (Cd16), CR1 (CD35) y CR2 (CD21)<sup>144</sup>. Además de la expresión membranal de CD32, las CL también son capaces de producir una forma soluble de este receptor<sup>147</sup>.

Interesantemente, Bruynzeel-Koomen y cols<sup>148</sup> demostraron la presencia de moléculas IgE en CL de piel de pacientes con dermatitis atópica, indicando que las CL expresan receptores para la IgE (FcεR). En la actualidad se sabe que las CL expresan el receptor de alta afinidad para la IgE (FcεR<sub>I</sub>)<sup>149,150</sup> por lo que cuando las moléculas de IgE se adhieren a este receptor inducen una activación de estas células, aunque esta activación difiere en CL de individuos normales con respecto a las de individuos con dermatitis atópica<sup>151</sup>. Por otro lado, el receptor de baja afinidad para la IgE (FcεR<sub>II</sub>) está ausente en las CL, sin embargo puede ser inducido su presencia por la estimulación con IL-4 y/o interferón (IFN)-γ<sup>152</sup>. De manera notable, una proteína ligadora de IgE (εBP) ha sido descrita en la superficie de las CL<sup>153</sup>. Esta proteína, la cual es diferente a los receptores FcεR<sub>I</sub> y FcεR<sub>II</sub>, es producida y secretada por los queratinocitos y se une a las CL ya que posee propiedades de lectina<sup>153</sup>. Los tres diferentes receptores de IgE capacitan a la CL para atrapar alérgenos ligados a IgE en una manera muy eficiente, contribuyendo así a la inducción de respuestas alérgicas en presencia de concentraciones pequeñas de alérgenos<sup>154, 155</sup>.

Por otra parte, para que las CL puedan interactuar con linfocitos son necesarias diversas moléculas de adhesión. En este sentido se ha demostrado, por inmunohistoquímica, que las CL "frescas" aisladas (son el equivalente *in vitro* de las CL intraepidérmicas y no tienen más de tres días en cultivo) expresan la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1; CD54) y el antígeno funcional linfocítico-3 (LFA-3; CD58)<sup>144</sup>. Por el contrario, estos mismos antígenos, no se han demostrado en CL cuando se ha empleado un análisis por FACS<sup>119, 156,157</sup>. Las CL no expresan ICAM-2 (CD102)<sup>157</sup>, sin embargo tienen una fuerte expresión constitutiva de ICAM-3 (CD50)<sup>158,159</sup>. En

contraste con otras células presentadoras de antígenos (linfocitos B y monocitos), las CL de humano no expresan ni la proteína ni el RNAm del LFA-1 (CD11a)<sup>157,159</sup>. Es interesante notar que la expresión de la molécula B7-1 (CD80) en CL *in situ* es controversial<sup>160,161</sup>, sin embargo, el RNAm de B7-1 y de B7-2 (CD 86) si ha sido detectado<sup>160,162</sup>. La familia de moléculas de adhesión también comprende a un grupo de moléculas de superficie, llamadas integrinas, las cuales están involucradas en la migración y direccionamiento de las CL. Las moléculas antigénicas muy tardías (VLA) 1 a 6 pertenecen a este grupo de integrinas. Están compuestas por una única cadena  $\alpha$  (CD49a-f) y comparten una cadena común  $\beta_1$  (CD29) y funcionan como receptores para componentes de la matriz extracelular, tales como colágena, fibronectina y laminina. Las CL expresan el CD29, mientras que la expresión de subtipos de CD49 es heterogénea<sup>163, 164</sup>. Las CL también expresan la E-cadherina, una molécula homofílica dependiente de  $Ca^{++}$  que media la unión CL-queratinocito<sup>165</sup>. Por otra parte, las CL tienen una expresión heterogénea del antígeno Lewis (CD15)<sup>166</sup>, que es el ligando de la E-selectina (CD62E) expresada por las células endoteliales. El anticuerpo monoclonal HECA-452, el cual reconoce un determinante sensible a neuraminidasa en CD15, también reacciona con las CL<sup>167</sup>. La molécula CD15 puede estar involucrada en la migración de las CL hacia la piel. La glucoproteína CD83 es expresada por células dendríticas circulantes y puede ser detectada en las CL<sup>168</sup>. Las CL reaccionan con un anticuerpo monoclonal anti pan-CD45<sup>169, 170</sup>. Debido a cortes alternados en la maduración del RNAm, diferentes isoformas del CD45 existen (el CD45 es una proteína tirosina-fosfatasa, también llamada antígeno T200 o antígeno común leucocitario). Al parecer el 85% de las CL frescas aisladas son reactivas con CD45RO, mientras que los antígenos CD45RA y CD45RB no son detectables<sup>170</sup>. El antígeno CD68, una glucoproteína lisosomal, no es detectable por análisis de FACS<sup>144</sup>, pero una tinción positiva puede ser observada cerca del núcleo de las CL por otros métodos<sup>171</sup>. La expresión de CD69 en las CL ha sido documentada<sup>172</sup>, pero el significado de este hallazgo no es claro.

Finalmente, un breve comentario acerca de dos marcadores de las CL. Las CL de humano expresan la proteína citoplásmica S-100<sup>173,174</sup>. Esta proteína también está presente en melanocitos<sup>173</sup>, células dendríticas de la dermis<sup>173, 175</sup>, células interdigitantes de órganos linfoides<sup>148</sup>,



<sup>174,176</sup>, células dendríticas epiteliales de las tonsilas<sup>177</sup> y células gliales del cerebro<sup>175</sup>. En el ratón, las células dendríticas del bazo también son S-100<sup>+</sup> <sup>174</sup>. Las proteínas S-100 están muy conservadas a través de la escala filogenética y comprenden un pequeño grupo de proteínas unidoras de Ca<sup>++</sup>. Entre otras funciones se ha comprobado que participan en el crecimiento de las neuritas<sup>178</sup>. Esta puede ser una explicación del porque de su presencia en tipos celulares que exhiben una forma dendrítica (la única excepción parecen ser las células dendríticas foliculares, las cuales no expresan la proteína S-100<sup>174</sup>). Este marcador diferencia a las CL de los monocitos/macrófagos, ya que estos últimos no la expresan. Por otro lado, existe, hasta el momento actual, sólo un anticuerpo monoclonal específico para las CL, el NLDC-145<sup>179</sup>. Este anticuerpo monoclonal reconoce únicamente a las CL de ratón, pero no a las de otras especies incluido el hombre. La proteína reconocida por el anticuerpo NLDC-145 es un receptor llamado DEC-205<sup>180,181,182</sup>, el cual aparentemente está involucrado en la captación de antígenos. Es de notar que los macrófagos son negativos para el NLDC-145<sup>179</sup>.

#### d) Ultraestructura de las CL.

La microscopía electrónica le dio a las CL una identidad peculiar diferenciándola de las otras células epidérmicas, además de que incrementó de manera considerable el conocimiento acerca de ellas. En un artículo clásico, Birbeck, Breathnach y Everall<sup>183</sup> (1961) describieron el patrón estructural básico de las CL: un núcleo celular con una apariencia marcadamente indentada debido a la presencia de profundas hendiduras, un aparato de Golgi bien desarrollado, un citoplasma "claro" en comparación con los queratinocitos adyacentes, la ausencia de filamentos intermedios de prequeratina, escasos lisosomas, la carencia de desmosomas en su membrana plasmática y la presencia de un organelo citoplásmico característico. Este organelo, al cual se le denominó gránulo de Birbeck o de las CL (GCL), puede tener forma de "bastón" con una longitud variable y el cual se caracteriza por tener una estríación central periódica de 90 Å o se puede observar a este "bastón" con una dilatación en uno de sus extremos lo cual le da un aspecto de "raqueta de tenis". Ocasionalmente estas vesículas pueden ser observadas en ambos extremos o en el centro del "bastón"<sup>184</sup>. Reconstrucciones tridimensionales han evidenciado que el GCL es una estructura membranosa en

forma de disco de tamaño aproximado de 0.3  $\mu\text{m}$ , el cual puede tener una y a veces dos protrusiones vesiculares y puede estar curvado, en forma de copa o torcido sobre sí mismo<sup>185, 186</sup>. La forma tridimensional del GCL ha sido confirmada por estudios realizados con crio-fractura<sup>187</sup> y fácilmente explica por qué, bidimensionalmente, los GCL pueden exhibir patrones morfológicos diferentes y en ocasiones altamente peculiares en diferentes planos de corte. La membrana de la porción vesicular de los GCL, que muestra una cubierta vellosa en su cara interna, se fusiona en una forma parecida a un cierre para formar la porción en forma de "bastón". Un análisis cuidadoso de imágenes de alta resolución ha revelado que la estriación central de los "bastones" está compuesta de dos arreglos lineales de partículas<sup>185</sup>. Si los gránulos son cortados oblicua o tangencialmente las partículas se observan como teniendo un arreglo entrecruzado o de rejilla respectivamente. Dependiendo de la tinción y de los métodos de análisis empleados, los modelos que se han propuesto para la estructura interna del GCL pueden ser algo diferentes<sup>188-190</sup>. Originalmente parecía ser que la membrana limitante del GCL consistía en una lámina externa delineada por una capa interna de partículas<sup>185</sup>, pero esta apariencia fue originada por un artefacto de fijación cuando el tetraóxido de osmio fue empleado como único fijador. Cuando la fijación secuenciada de glutaraldehído y de tetraóxido de osmio es empleada, la membrana limitante del GCL usualmente aparece como una membrana trilaminar sin partículas a lo largo de la cara interna y por lo tanto es morfológicamente similar, sino idéntica, a otras unidades de membrana<sup>188, 191</sup>. Al parecer los métodos de congelamiento rápido<sup>192</sup>, para evitar la fijación química, en combinación con métodos de crio-fractura y cortes ultrafinos pueden ser los más adecuados para dar una respuesta final a la verdadera estructura de los GCL *in vivo*.

Los GCL se localizan asiduamente en la vecindad del aparato de Golgi y con menos frecuencia adheridos a la membrana plasmática. Las porciones vesiculosas de los GCL cercanos al aparato de Golgi recuerdan estructuralmente a endosomas, lo cual parece ser confirmado por el carácter ácido que poseen<sup>193</sup>. En este sentido cabe preguntarnos ¿cuál es el origen de los GCL?



Fig. 5. Micrografía de una CL aislada de la epidermis de humano. Note el núcleo altamente indentado, con un citoplasma claro libre de tonofilamentos. Las flechas señalan dos gránulos de CL, los cuales están magnificados en b y en c. Se muestra la morfología típica de ellos: b. en forma de bastón, y c. en forma de raqueta de tenis.

#### e) Origen, destino y función de los GCL

La mayoría de los GCL se localizan en el citoplasma, pero algunos se encuentran unidos a la membrana plasmática de las CL. Por lo tanto, dos diferentes líneas de pensamiento han sido involucradas: una que propone que los GCL se derivan de evaginaciones del aparato de Golgi implicando por lo tanto que tienen una función secretora y otra que sugiere que los gránulos se forman a partir de invaginaciones de la membrana plasmática sugiriendo que este organelo tiene una función endocítica revisado en 194 y 195.

En un granuloma eosinófilo del cráneo (histiocitosis X/granulomatosis de células de Langerhans) de

una niña de 4 años de edad, Cancilla<sup>196</sup>, utilizando lantano como trazador extracelular, encontró que los GCL cercanos o en continuidad con la membrana plasmática se teñían con este. Por otro lado los GCL citoplásmicos o en las cercanías del aparato de Golgi no lo hicieron así. La conclusión obvia fue que el GCL derivaba de la membrana plasmática, sin embargo, como esta técnica involucró una fijación simultánea a la exposición del trazador extracelular no dio información con respecto a la cinética intracelular del GCL.

Interesantemente, en otros pacientes con histiocitosis X se encontraron GCL "recubiertos"<sup>197</sup>. Casi todos los gránulos que estuvieron adheridos a la membrana plasmática mostraban una cubierta vellosa en toda la periferia o sólo en su extremo distal. En contraste, los GCL citoplásmicos no mostraban esa cubierta con excepción de algunos pocos en la periferia de la célula, sin embargo cuando se realizaron cortes seriados, los GCL periféricos se observaron en continuidad con la membrana plasmática. La cubierta observada en los GCL fue morfológicamente similar a la cubierta de clatrina de las depresiones y vesículas recubiertas<sup>198, 199</sup>. Es de notar que se ha demostrado que las depresiones y vesículas recubiertas están involucradas en el transporte selectivo de moléculas, como la endocitosis mediada por receptores<sup>200-201</sup> y la transferencia de sustancias entre organelos intracelulares y la membrana plasmática<sup>202</sup>. La sugerencia que se derivó de esto es que los GCL pueden llevar a cabo funciones análogas. En este sentido, Ishii y cols<sup>203</sup> examinando la posible correlación entre la formación de GCL y las vesículas recubiertas en piel con vitiligo, observaron invaginaciones tubulares de la membrana plasmática de las CL asociadas a vesículas recubiertas y en conexión con GCL. El análisis de un gran número de cortes sugirió la siguiente secuencia de eventos en la formación de los GCL. 1) la presencia de vesículas recubiertas en la membrana plasmática, 2) la formación de invaginaciones tubulares de la membrana plasmática que se unen a las vesículas recubiertas, 3) el crecimiento de las invaginaciones con la formación de un patrón de banda característico del GCL, y 4) en algunos casos, la vesícula recubierta se separa del GCL o se modifica.

Takahashi y Hashimoto<sup>204</sup> demostraron por primera vez que moléculas de la membrana plasmática podían ser internalizadas en los GCL. Ellos emplearon láminas epidérmicas de humano, incubadas a diferentes tiempos, en un anticuerpo anti-CD1a (OKT6) y posteriormente las fijaron e incubaron en un anticuerpo marcado con peroxidasa. Aunque la técnica de inmunomicroscopía

electrónica tuvo sus limitaciones, el producto electrón-denso de la reacción de la peroxidasa pudo observarse en todos los GCL, ya sea que estuvieran adheridos a la membrana plasmática o en las cercanías del aparato de Golgi. Más tarde, Takigawa y cols.<sup>205</sup> aportaron evidencia inequívoca a este respecto. Ellos incubaron células epidérmicas de cobayo en un medio conteniendo ferritina conjugada con concanavalina A (o con un suero de conejo anti-células epidérmicas seguido de un anticuerpo secundario marcado con ferritina) a 37 °C durante diferentes tiempos. Cuando se observó a las CL con el microscopio electrónico se encontró que a los 5 min. de incubación algunos GCL, en la periferia de la célula, estaban marcados con partículas de ferritina en la porción vesicular. Con una incubación más prolongada, los GCL conteniendo ferritina en su interior, se incrementaron en número y parecieron moverse hacia el área yuxtannuclear. También se observó que los GCL se derivaban de invaginaciones de la membrana plasmática que contenían partículas de ferritina en una extensión en forma de saco en uno de sus extremos. Algunas de estas invaginaciones aparentemente se originaban en vesículas recubiertas. Además, encontraron que la captación del complejo concanavalina A-ferritina fue inhibido por azúcares específicos y que las partículas de ferritina no estaban en los GCL cuando las células fueron expuestas a únicamente a partículas de ferritina o al suero de conejo normal seguido de incubación en un antisuero secundario conjugado con ferritina. Estos autores concluyeron que los GCL más que formarse a partir de endocitosis de fase fluida se originaban en endocitosis adsorptiva mediada por receptores. Basados en sus observaciones ellos propusieron una hipótesis de trabajo sugiriendo que las invaginaciones membranales se desprenden de la membrana plasmática y que posteriormente pierden su cubierta vellosa para formar GCL intracelulares. Entonces estos pueden moverse hacia el citoplasma donde liberan su contenido al fusionarse con prelisosomas y lisosomas (ver figura 6).

Por otro lado, Breathnach<sup>206</sup>, encontró que había gran similitud entre las membranas del GCL y de las vesículas del aparato de Golgi. Posteriormente con el empleo ultraestructural de la técnica de impregnación metálica de zinc-iodo-osmio se encontraron depósitos selectivos del metal en la envoltura nuclear, en el aparato de Golgi, en algunas estructuras lisosomales y en particular en los GCL de piel humana normal y con histiocitosis X (enfermedad de Letterer-Siwe)<sup>87</sup>. Interesantemente, la impregnación metálica no fue observada en los GCL fusionados a la membrana plasmática. Con

estos datos se concluyó que a) la impregnación con zinc-iodo-osmio producía una mejor visualización de los GCL, b) mientras que la mayoría de los GCL localizados en las cercanías del aparato de Golgi mostraban un depósito preferencial del metal, casi todos los gránulos en la periferia de las CL permanecieron sin impregnarse, lo cual podría ser el resultado de diferencias estructurales y/o metabólicas de los gránulos y c) dada la estrecha relación entre el aparato de Golgi y los GCL, estos bien podrían provenir del primero.

Estudios posteriores realizados en secuencias de tiempo-temperatura para rastrear el destino de las moléculas CD1a y HLA-DR expresadas en las CL de humanos apoyaron el concepto anterior<sup>207</sup>.<sup>208</sup> El marcaje de CL humanas con el anticuerpo monoclonal anti-CD1a conjugado con oro coloidal a 4 °C resultó en una distribución difusa de partículas de oro en la superficie celular. Después de la incubación a 15 °C las partículas de oro fueron encontradas en depresiones y vesículas recubiertas. Como estas estructuras son resultado de la endocitosis mediada por receptores<sup>200</sup>, estas observaciones indicaron que la unión del anticuerpo anti-CD1a había inducido un proceso de captación semejante. La captación a través de vesículas no cubiertas fue ocasionalmente observado. Las partículas de oro también fueron encontradas en la cara interna de la membrana de vesículas parecidas a endosomas y en menor cantidad en vesículas recubiertas originadas del "retículo endoplásmico liso paragolgiano". A esta temperatura el marcaje no se observó de ninguna manera en los lisosomas ni en las GCL, aún cuando el tiempo de incubación se prolongó por 3 horas. Este fenómeno estuvo de acuerdo con las observaciones de que a bajas temperaturas (15-20 °C) hay formación de vesículas endocíticas y los ligandos son acumulados en compartimentos prelisosomales como los endosomas<sup>209, 210</sup>. Cuando la temperatura fue elevada a 37 °C, el proceso endocítico prosiguió y los GCL se encontraron en continuidad con endosomas. Interesantemente las partículas estuvieron ahora localizadas en pequeños cúmulos en la región de unión entre los dos organelos. Cuando las CL fueron incubadas por arriba de 37 °C por 25 min, se observó marca en los lisosomas. Además algunos de los GCL localizados en el centro de las CL contenían partículas de oro en la lámina estriada central. El marcaje no sólo fue encontrado ocasionalmente en la luz de la porción vesiculosa de los GCL, sino en contraste con los resultados de Takigawa y cols.<sup>205</sup>, la vesícula de los GCL exhibía una cubierta en el lado citoplásmico. Es de notar que en estos experimentos ningún GCL

adherido a la membrana plasmática fue observado. Por otro lado, con el empleo de doble marcaje de los antígenos CD1a y HLA-DR se observó que se internalizaron a través de depresiones recubiertas típicas y que siguieron un camino intracelular común<sup>207</sup>. Las observaciones de Takigawa y cols<sup>205</sup> difirieron de estos experimentos en que sólo se observaron pocos GCL intracitoplásmicos, pocos de ellos estaban marcados, y más importantemente, los GCL marcados se localizaron en el centro de las CL pero no en la periferia de las mismas. Además en otra serie de experimentos<sup>211</sup> se observaron organelos adheridos a la membrana plasmática que se diferenciaban en algunos aspectos estructurales de los GCL. Aunque estos organelos sugerían que los GCL se originaban a partir de la membrana plasmática, no eran un prerequisite para la aparición de GCL marcados intracitoplásmicamente, por lo que se concluyó que los GCL intracitoplásmicos se derivaban de un compartimento intracelular (posiblemente en endosomas o en el aparato de Golgi) y que acarreaban moléculas de la porción central de las CL hasta algún otro sitio todavía no conocido de las mismas<sup>211</sup>. La hipótesis de trabajo sugerida con estos experimentos propone que los complejos ligando-membrana son endocitados en depresiones recubiertas, que posteriormente se desprenden de la base de procesos vellosos o estructuras parecidas a GCL ("GCL atípicos") para dar lugar a la formación de vesículas recubiertas que se unirán a endosomas. El hallazgo de que las porciones en bastón de los GCL estaban marcados y adheridos a estructuras endosómicas sugirió dos posibilidades: 1) la formación de las porciones en forma de bastón por evaginaciones de endosomas (probablemente un equivalente de la porción tubular del CURL (compartimento de desacoplamiento de receptores y ligandos), o 2) fusión de GCL preexistentes (posiblemente derivados de la región del Golgi) con endosomas. Ambas hipótesis de trabajo se ejemplifican en la figura 6.

En favor de la sugerencia de un origen intracelular (posiblemente aparato de Golgi) está el marcaje de los GCL con un anticuerpo monoclonal específico<sup>212</sup>. Este anticuerpo detecta una glucoproteína de 40 kDa (antígeno *Lag*), la cual por microscopía inmunoelectrónica se localizó en GCL y en vacuolas de aspecto irregular de tamaño mayor que la vesícula de los GCL. No todas las vacuolas de este tamaño mostraban la marca, aunque ninguna vacuola en otras células epidérmicas lo estaba, sugiriendo que las vacuolas marcadas eran estructuras relacionadas a los GCL. Es importante hacer notar que el antígeno *Lag* estuvo ausente en la membrana plasmática y en

lisosomas. Así como sucede en otras proteínas, es muy probable que el antígeno *Lag* sea glucosilado en el aparato de Golgi, así que se concluyó que el antígeno *Lag* se originaba de la región del Golgi.

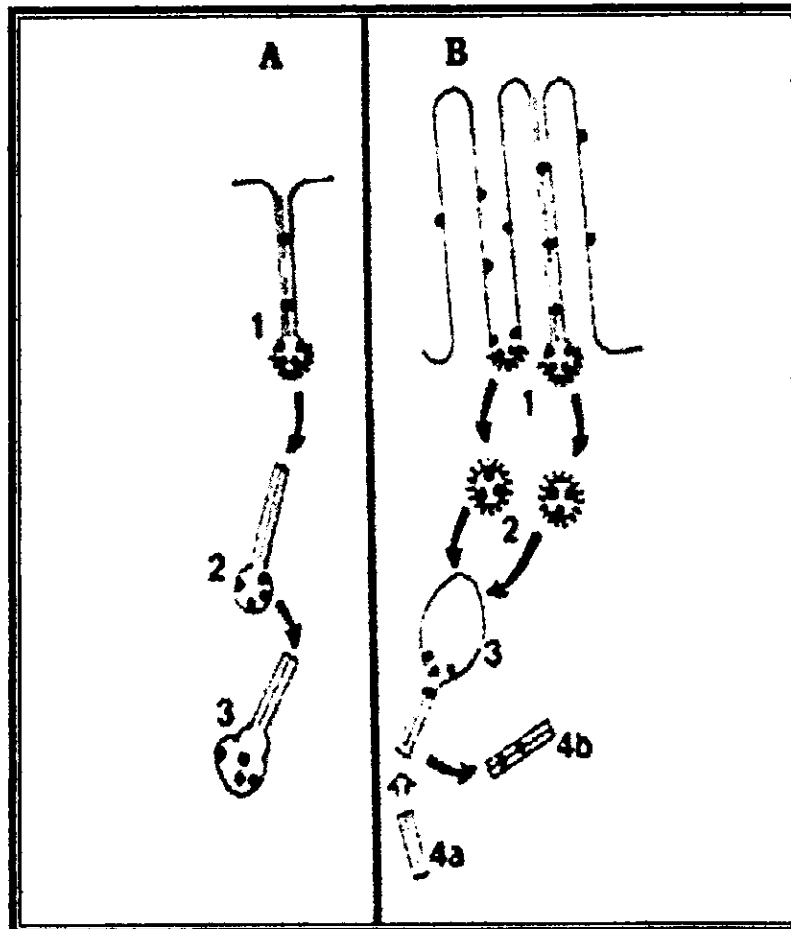


Fig. 6. Hipótesis de trabajo de la formación del gránulo de las CL. Para explicación ver el texto.

Independientemente de los mecanismos de formación del GCL, es probable que alguna parte o todo el organelo sea la representación morfológica de los mecanismos de captación y procesamiento de material antigénico por parte de las CL. Lo anterior está de acuerdo con el hecho de que la estimulación antigénica epicutánea con un hapteno induce un incremento del número de GCL<sup>213, 214</sup>, además de disminuir la actividad de ATPasa en la membrana plasmática de las CL.<sup>215, 216</sup>

En la actualidad existen muchas evidencias de que los GCL están involucrados en el procesamiento del material antigénico<sup>193, 217, 218</sup> captado en los procesos de endocitosis adsorptiva. Ahora bien, si esto es así, aparecen otras interrogantes: ¿Cuáles son los inductores para la formación



del GCL? ¿Cuál es la razón de que otros tipos celulares que son capaces de procesar y presentar antígenos, como los macrófagos y los linfocitos B, no muestran GCL? ¿Por qué los GCL sólo son observados en las células presentadoras de antígenos de la piel (CL) y muy ocasionalmente en otras células dendríticas presentadoras de antígenos de otros sitios como el timo y el bazo? Si los GCL están involucrados en el procesamiento de antígenos, ¿cómo puede uno explicar que las CL de humano muestran muchos GCL en condiciones normales, mientras que las CL de ratón poseen muy pocos? Ciertamente la respuesta a estas interrogantes no es fácil, pero su respuesta nos daría una comprensión más clara de la funcionalidad de las CL y de las patologías en las cuales están involucradas.

#### **FUNCION DE LAS CL**

Tan sólo siete años después de la descripción de las CL realizada por Langerhans, en el año de 1875, **Ranvier**<sup>219</sup> consideró que las CL eran linfocitos, posteriormente, **Arnstein**<sup>220</sup> en 1876 y **Herxheimer**<sup>221</sup> en 1896, las consideraron como leucocitos pasajeros (es decir, en tránsito en la epidermis para dirigirse a otro lugar). En este sentido es pertinente preguntarnos ¿cuáles hubieran sido las consecuencias para la investigación acerca de las CL si se hubiera proseguido por ese camino en esos años? La inmunocompetencia en el contexto de las CL fue primero especulada por **Billingham y Silvers**<sup>222</sup> en 1965 y por **Pruneiras**<sup>223</sup> en 1969, quienes hipotetizaron que las CL podían capturar material antigénico y desempeñar una función en la respuesta inmunológica primaria. Sin embargo, el concepto de que las CL son células presentadoras de antígenos se afirmó por las relaciones estructurales que tenían las CL con otras células epidérmicas. En el curso de estudios ultraestructurales de los eventos celulares que ocurren en las reacciones de hipersensibilidad de contacto en humanos y cobayos, **Silberberg y cols.**<sup>224, 226</sup> observaron la estrecha aposición entre CL y linfocitos, así como la presencia de CL, con antígeno en su superficie, dentro de los vasos linfáticos dérmicos y en los ganglios linfáticos regionales.

Las CL funcionan como células cutáneas presentadoras de antígenos que inducen potentes respuestas inmunológicas primarias dependientes de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>. Para disparar estas respuestas inmunológicas es necesario que los receptores de los linfocitos T (TCR) reconozcan a los

antígenos en asociación con moléculas clase II del MHC. Estos complejos antígeno/moléculas clase II están presentes en la superficie celular de las células presentadoras de antígenos. Sin embargo, para que los linfocitos T puedan reconocer antígenos proteicos se requiere de que estos sean procesados<sup>227</sup>. Lo anterior involucra claramente tres pasos (Fig. 7):

- La captación de antígenos por las células presentadoras de antígenos;
- El procesamiento de los antígenos mediante proteólisis en vesículas intracelulares; y
- La presentación de un péptido conteniendo el determinante antigénico.

Aunque la secuencia anterior es cierta, el reconocimiento de haptenos puede ocurrir por conjugación directa de este con moléculas clase II del MHC en la superficie de las células presentadoras de antígenos<sup>228, 229</sup>.

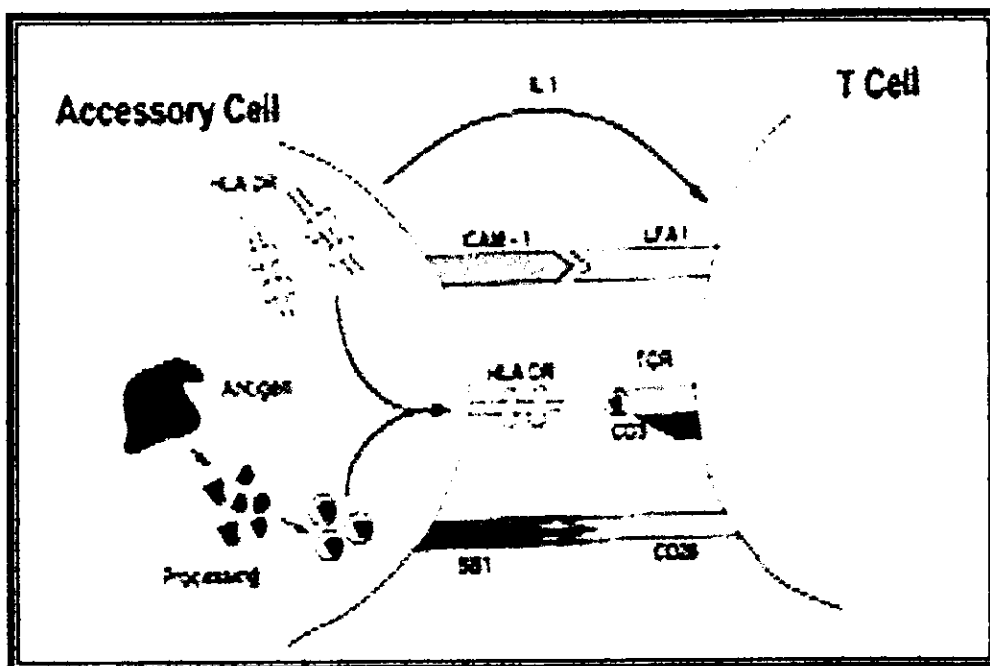


Fig. 7. Las CL captan antígenos (1) y los procesan acoplándolos a moléculas clase II (2). A continuación los reexpresan en la membrana plasmática junto con las moléculas clase II del MHC (3). Por otro lado, otras moléculas como el ICAM1, las moléculas BB1 y la IL-1 son necesarias para que la presentación de los antígenos sea efectiva.

Además, para completar la activación de las células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, las células presentadoras de antígenos están equipadas con otras moléculas de adhesión co-estimuladoras. Estas moléculas presentes en la superficie de las células presentadoras de antígenos interactúan con sus ligandos en

los linfocitos T<sup>230</sup>. Estas interacciones no sólo estabilizan la unión del TCR con el complejo antígeno/moléculas clase II, sino que también proveen señales de activación adicionales<sup>230, 231</sup>. Algunas interacciones receptor/ligando juegan un papel funcional importante en la activación de linfocitos T, por ejemplo: ICAM-1/LFA1, ICAM-3/LFA-1, LFA-1/ICAM-1, LFA-3/CD2, B7-1/CD28, B7-1/CTLA4, B7-2/CD28, B7-2/CTLA4, y CD40/CD40L. La ausencia de señales co-estimuladoras como B7 pueden conducir a una pérdida de respuesta de los linfocitos T a estimulación antígeno-específica subsecuente (anergia)<sup>232</sup>. Por otro lado, las células presentadoras de antígenos pueden producir señales co-estimuladoras a través de la producción de citoquinas como las IL-1, IL-6, IL-12, e IL-15. La IL-12 ha atraído mucha atención ya que esta citoquina derivada de las células presentadoras de antígenos es esencial para la producción de IFN- $\gamma$  y para la generación de linfocitos T ayudadores del tipo 1 (Th1)<sup>233</sup>, los cuales están asociados con la inmunidad mediada por células, incluyendo a la hipersensibilidad de contacto.

Las CL poseen todas las características necesarias de las células presentadoras de antígenos para la activación de linfocitos T. Las CL aisladas en fresco (son el equivalente *in vitro* de las CL intraepidérmicas) pueden eficientemente captar y degradar intracelularmente antígenos complejos<sup>217, 234</sup>. Durante el cultivo *in vitro*, las CL adquieren una fuerte expresión de moléculas clase II del MHC y de moléculas co-estimuladoras como ICAM-1, ICAM-3, LFA-3, B7-1, B7-2 y CD40, las cuales juegan un papel importante en la activación de linfocitos T<sup>157, 159, 160, 163, 235</sup>. Además, las CL son capaces de producir IL-1<sup>236</sup>, IL-6<sup>237</sup>, IL-12<sup>238</sup> e IL-15<sup>239</sup>.

Por otro lado, estudios *in vitro* utilizando co-cultivos de linfocitos T con suspensiones celulares enriquecidas en CL o células epidérmicas totales han demostrado que las CL pueden funcionar como células presentadoras de antígenos en respuestas antígeno específicas de linfocitos T<sup>240-244</sup>, como células estimuladoras en reacciones leucocíticas mixtas alogénicas y autólogas<sup>240, 241, 243, 245</sup>, como células accesorias en respuestas de linfocitos T inducidas por lectinas<sup>243, 246</sup> y como células inductoras en la generación de linfocitos T citotóxicos aloreactivos y hapteno específicos<sup>247-249</sup>. Pruebas de estas capacidades funcionales han sido provistas por las siguientes observaciones: las CL son capaces de reemplazar las funciones estimuladoras de monocitos/macrófagos en respuestas dependientes de células presentadoras de antígenos en linfocitos T; las respuestas de linfocitos T fueron abrogadas

cuando las CL fueron selectivamente depletadas de suspensiones celulares epidérmicas previo al cultivo; y, finalmente, el enriquecimiento de CL provocó un aumento paralelo de las respuestas de linfocitos T.

Las respuestas proliferativas antígeno específicas inducidas por CL en los linfocitos están restringidas por las moléculas clase II del MHC, ya que los anticuerpos monoclonales anti-HLA-D pueden específicamente bloquear esta clase de respuestas<sup>245, 250</sup>. Célula a célula, las CL son significativamente más potentes, como células presentadoras de antígenos, que los monocitos de sangre periférica en la inducción de respuestas contra antígenos y aloantígenos<sup>242, 251-254</sup>. Esta superioridad de las CL fue recalcada por la observación de que clonas níquel específicas de linfocitos T humanos derivados de lesiones cutáneas inducidas experimentalmente, fueron activadas cuando el níquel fue presentado por las CL, mientras que las mismas clonas no respondieron cuando el níquel fue presentado por monocitos sanguíneos<sup>255</sup>. Además, las CL no sólo presentan haptenos como el cloruro de níquel o proteínas solubles como el toxoide tetánico, el derivado proteico purificado (PPD) del *Mycobacterium* o proteínas de *Candida albicans*, sino que también son capaces de presentar antígenos celulares complejos tales como proteínas de eritrocitos de borrego<sup>256</sup>.

Ya que las CL son fuertemente estimuladoras de respuestas inmunes alogénicas, se considera que tienen un papel muy importante en el rechazo de injertos cutáneos<sup>257, 258</sup>. En este sentido, la capacidad de alosensibilización de las CL es muy alta, ya que se ha observado que con tan sólo 10 de estas células un ratón puede ser sensibilizado a moléculas clase I y clase II del MHC<sup>259</sup>.

Mucho de lo que se conoce acerca de la función de las CL ha provenido de estudios de sensibilización en reacciones de hipersensibilidad de contacto (respuesta inmunológica tipo IV). Los sensibilizadores de contacto son químicos relativamente pequeños (haptenos) que al estar unidos a un acarreador proteico llegan a ser inmunogénicos. Frecuentemente el acarreador es una proteína epidérmica. Algunos de estos sensibilizadores de contacto, como el TNBS o el cloruro de níquel, pueden también unirse de manera directa y con gran afinidad a las moléculas clase II del MHC de células presentadoras de antígenos<sup>228-229</sup>. Por otro lado, la inducción de hipersensibilidad de contacto en la piel parece depender de la densidad de la CL. En este sentido, no se logra una inducción de hipersensibilidad de contacto en zonas de piel depletadas naturalmente de CL como

la cola del ratón o en áreas de piel depletadas experimentalmente por radiación ultravioleta, por "stripping" o por químicos<sup>7, 260-262</sup>. El papel crucial de las CL como células presentadoras de antígenos fue establecido por Shelley y Juhlin<sup>263</sup>, quienes demostraron una acumulación específica de sensibilizadores de contacto en CL. El papel selectivo de las CL en este proceso fue sugerido por resultados en experimentos en los que se demostró que los sensibilizadores de contacto se acumulan en la superficie celular de las CL, mientras que otro tipo de sustancias no lo hacen<sup>264</sup>. Otros trabajos han revelado que las CL poseen una alta tasa de endocitosis por medio de la cual captan moléculas extracelulares<sup>265</sup> y que son capaces de unir antígenos por medio de receptores de manosa<sup>266</sup>.

Algunos estudios han demostrado que los sensibilizadores de contacto afectan directamente a las CL. Estos efectos son dosis-dependiente y tiempo-dependiente, y no son inducidos por irritantes o por sustancias que no son sensibilizadoras. Los efectos observados en las CL incluyen un incremento en la expresión de moléculas clase II del MHC<sup>267</sup>, pérdida de actividad de ATPasa<sup>215</sup>, un aumento del retículo endoplásmico rugoso<sup>267</sup>, un incremento en el número de los gránulos de Birbeck<sup>214</sup> y un aumento en la endocitosis mediada por receptores evidenciada por un incremento en el número de vesículas recubiertas, endosomas y lisosomas<sup>214,215</sup>. Sin embargo, también cambios degenerativos pueden ser observados<sup>267-269</sup>.

En experimentos en los que se realizaron aplicaciones de sensibilizadores de contacto se demostró una caída de más del 40 por ciento en el número de CL a las 24 horas siguientes<sup>270</sup>. Muchos estudios<sup>271-277</sup> apoyan el concepto generalmente aceptado de que estas CL "cargadas de antígenos" migran, a través de los vasos linfáticos aferentes, hacia los ganglios linfáticos de drenaje, donde activan a linfocitos CD4<sup>+</sup>. Durante su migración, las CL viajan a través de los vasos linfáticos diferenciándose en células veladas. Una vez que han llegado a los ganglios linfáticos regionales de drenaje, las células veladas adquieren un fenotipo de células interdigitantes. De hecho, los datos experimentales indican que las CL originan tanto a las células veladas como a las interdigitantes, ya que éstas últimas pueden mostrar la presencia de gránulos de CL en un rango de 6 a 72 horas después de la sensibilización con un antígeno en la piel; además, el número de células veladas en la linfa puede ser de hasta 10 veces mayor poco después de la sensibilización con un antígeno; y,

cuando se han utilizado antígenos marcados se ha demostrado que las únicas células que los muestran son las células veladas y las interdigitantes.

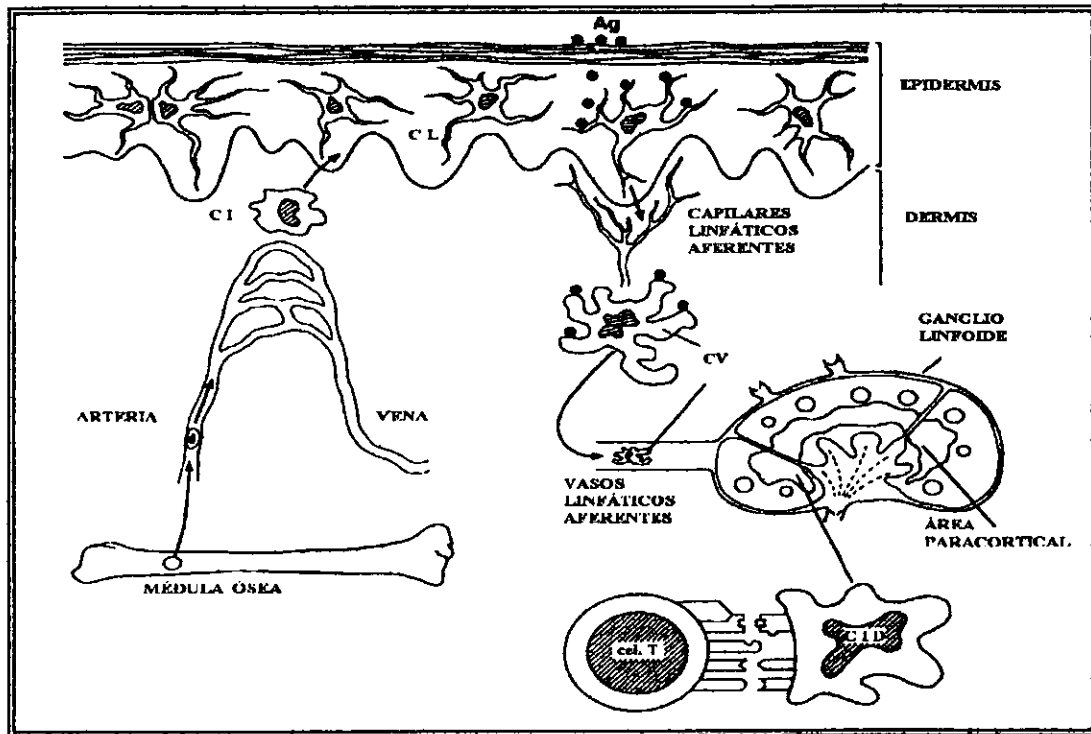


Fig. 8. Las CL se originan en médula ósea y se dirigen de manera específica a la piel y otros epitelios donde son capaces de captar, endocitar y procesar antígenos, para a continuación reexpresarlos en su membrana acoplados a moléculas clase II del MHC. Posteriormente, las CL migran por los vasos linfáticos aferentes donde se diferencian en células veladas (CV). Al llegar a los ganglios linfáticos de drenaje se localizan en las áreas paracorticales (zonas T-dependientes) donde se transforman en células interdigitantes (CID) que presentan los antígenos a los linfocitos T. Una vez que son generados linfocitos T de memoria, estos regresan a la epidermis o a otros

Los mecanismos por los cuales las CL emigran de la epidermis hacia los ganglios linfáticos todavía no se han dilucidado del todo. Sin embargo, se han implicado un aumento en la expresión de moléculas clase II<sup>278</sup>, un cambio en el patrón de secreción de citoquinas por parte de las células epidérmicas<sup>279</sup>, la secreción de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )<sup>280,281</sup> y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ )<sup>282</sup>, y cambios en la expresión de moléculas de adhesión que disminuyan las interacciones adhesivas entre las CL y los queratinocitos y/o la matriz extracelular<sup>283,284</sup>. Una vez en los ganglios linfáticos, estas células se localizan en los compartimentos T-dependientes donde activan, en una manera antígeno-específica, a linfocitos en reposo (CD45RA<sup>+</sup>). Lo anterior conduce al desarrollo y expansión clonal de linfocitos T antígeno-específicos de memoria (CD45RO<sup>+</sup>), los cuales pueden regresar

específicamente a la piel, por circulación sanguínea, si muestran el antígeno CLA. Este ciclo funcional de las CL está resumido en la figura 8.

#### CL EN VERTEBRADOS NO MAMÍFEROS.

Está bien documentada la presencia y función de CL en varias especies de mamíferos que incluyen, al ratón, rata, conejillo de Indias y primates, incluido el hombre<sup>196</sup>. Sin embargo, los trabajos que se han realizado en vertebrados no mamíferos en relación con las CL son muy escasos. En este sentido, se sugirió que el grupo de las aves carecía de CL<sup>285</sup>, sin embargo, en otros estudios se demostró que en la epidermis del *Gallus gallus* había una población celular ATPasa positiva distribuida abundante y homogéneamente. Con el microscopio electrónico se identificaron células dendríticas de citoplasma claro con microfilamentos, sin tonofilamentos ni desmosomas y núcleo redondeado. Estas células no mostraban GCL. A pesar de la ausencia del GCL, estas células si poseían todas las otras características de CL, por lo que este fue el primer informe formal de la existencia de estas células en las aves<sup>286-287</sup>. Posteriormente, se identificaron células dendríticas clase II positivas en la epidermis de diferentes especies de aves<sup>288</sup> y más tarde se demostró que estas células coexpresaban la enzima ATPasa y las moléculas clase II del MHC<sup>289</sup>, por lo que no queda lugar a duda de la presencia de CL en el grupo de las aves.

En cuanto al grupo de los reptiles, la primera sugerencia de la existencia de estas células en estos vertebrados, fue provista por la observación de células similares a las de Langerhans en la epidermis de la lagartija común europea (*Lacerta vivipara*)<sup>290</sup>. Sin embargo, cómo no se observaron GCL en estas células, la presencia de CL en este grupo de vertebrados fue negada. Mas tarde, se demostraron células dendríticas ATPasa positivas, a nivel fotónico y ultraestructural, en la epidermis de la tortuga terrestre *Kinosternum integrum*<sup>291</sup>. En algunas de estas células se pudo observar un organelo parecido al GCL, por lo que la existencia de CL en el grupo de los reptiles fue confirmada.

En 1966, Farquhar y Palade<sup>292</sup>, al examinar la localización de ATPasa a nivel ultraestructural en la piel de diferentes anuros, encontraron que la enzima estaba presente en la membrana plasmática de los queratinocitos. Sin embargo, observaron una reacción más intensa en

células de aspecto dendrítico situadas entre los estratos germinativo y espinoso. Estas células se distinguían por la ausencia de desmosomas y un citoplasma pobremente conservado. Desgraciadamente, ellos no abundaron en la descripción de estas células por no ser el objeto de su investigación y no les dieron mayor importancia. Posteriormente, **Banerjee y Hoshino**<sup>293</sup> buscaron intencionalmente la presencia de CL en la epidermis de *Rana catesbeiana* con tres diferentes técnicas: impregnación con zinc-yodo-osmio (ZIO), ATPasa y microscopía electrónica. Ellos realizaron cortes de piel de la región dorsal de la cabeza y de la porción ventral, cercana a las extremidades anteriores. Con estos métodos, no se pudieron observar células impregnadas con ZIO o con actividad de ATPasa. Con la microscopía electrónica, no se demostraron células con GCL ni en la dermis ni en la epidermis, y sólo ocasionalmente, se apreciaron células migratorias parecidas a linfocitos entre las células de la epidermis. Ellos concluyeron que en la piel de *Rana catesbeiana* estaban ausentes células idénticas a las CL de los mamíferos y que la emergencia de éstas estaba ligada al desarrollo del SALT, el cual aparece por primera vez en las aves. En este sentido, **Castell**<sup>294</sup> y **Carrillo et al.**<sup>295</sup> con objeto de verificar la presencia de CL en el grupo de los anfibios, tomaron muestras de piel de *Rana catesbeiana* y obtuvieron láminas epidérmicas las cuales fueron procesadas para evidenciar la actividad de ATPasa. Al examinar las láminas epidérmicas se observó la presencia de células dendríticas ATPasa positivas distribuidas homogéneamente y que eran claramente distinguibles de los melanocitos tanto por su forma y tamaño como por su localización celular (los melanocitos siempre eran basales). Por otro lado cuando se aplicó una técnica de histoquímica ultraestructural para demostrar la actividad de ATPasa, esta se localizó en la membrana de células dendríticas de citoplasma claro debido a la ausencia de tonofilamentos, con un núcleo indentado y una membrana plasmática sin desmosomas. En estas células no se observaron GCL, sin embargo poseían todas las otras características de las CL de los mamíferos, por lo que se consideró que era la primera demostración formal de CL en el grupo de los anfibios. Más tarde, **DuPasquier y Flajnik**<sup>296</sup>, examinando la ontogenia de moléculas clase II del MHC, demostraron la presencia de células clase II positivas en la epidermis de *Rana pipiens*. Ellos consideraron que probablemente eran el homólogo de las CL de los mamíferos.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los anfibios adultos constituyen un puente importante en el estudio de la filogenia del sistema inmune de los vertebrados, especialmente cuando los consideramos en el contexto de la transición de un hábitat acuático a uno terrestre. Además, estos animales son de gran interés porque sus estadios embrionarios (vida libre) y larvario, hacen posible que se obtenga información relacionada con la ontogenia del sistema inmune. En este sentido son excelentes modelos para el estudio del desarrollo y diferenciación linfocítica, la ontogenia de la inmunidad y para la inducción de tolerancia. Por otro lado, aunque se había negado la existencia de CL en este grupo de vertebrados, nosotros demostramos la presencia de células parecidas a las CL por histoquímica enzimática y por microscopía electrónica. Sin embargo, no se ha demostrado fehacientemente que estas células posean moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad, ni se han examinado otros marcadores que puedan identificarlas. Además, el estudio de la ontogenia de estas células no se ha realizado a la fecha, ni se conoce si están presentes en órganos linfoides y en otros epitelios diferentes a la epidermis. Por lo anterior, el estudio de las CL en estos vertebrados podría darnos una comprensión más exacta de la manera en que los fenómenos de presentación de antígenos y tolerancia se llevan a cabo y aportaría la integración de un sistema celular dendrítico localizado en diversos órganos que se encargaría del procesamiento y presentación de los antígenos a los linfocitos T en el grupo de los anfibios.

## HIPOTESIS

1. Si las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas de *Rana pipiens* son el equivalente de las CL de mamíferos entonces éstas deberían expresar moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad.
2. Si las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas de *Rana pipiens* son el equivalente de las CL, entonces también deben de estar presentes en otros epitelios planos estratificados, además de la piel.
3. Si las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas de *Rana pipiens* son el equivalente de las CL de los mamíferos, entonces también deben tener actividad de esterasa inespecífica.
4. Dado que las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas de *Rana pipiens* tienen algunas características ultraestructurales de células de Langerhans de mamífero, entonces también deben de tener un organelo similar al gránulo de Birbeck.
5. Dado que los anfibios poseen su desarrollo ontogénico de vida libre, entonces las células dendríticas ATPasa-positivas y las células positivas a las moléculas clase II de *Rana pipiens* estarán presentes en la epidermis desde las etapas larvarias. Por otro lado, es posible que disminuyan en número en la metamorfosis ya que existe en estos vertebrados un reordenamiento de antígenos.
6. Si las células ATPasa-positivas y clase II positivas del complejo principal de histocompatibilidad de la epidermis de *Rana pipiens* son colocadas en contacto con un antígeno, entonces se comportarán de manera similar a como lo hacen las CL de los mamíferos.

## OBJETIVO GENERAL

Completar la caracterización morfológica de las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas de *Rana pipiens* equivalentes morfológicamente a las células de Langerhans de los mamíferos y demostrar la homología funcional de ambas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar que las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas de *Rana pipiens* expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II.
2. Demostrar en otros epitelios planos estratificados de *Rana pipiens* la presencia de células dendríticas homólogas a las de la piel.
3. Completar la caracterización morfológica por histoquímica enzimática (esterasa inespecífica) de las células epidérmicas de *Rana pipiens* equivalentes a las células de Langerhans.
4. Demostrar en las células epidérmicas de *Rana pipiens* equivalentes a las células de Langerhans la presencia de un organelo endocítico equivalente al gránulo de Birbeck de los mamíferos.
5. Verificar el número y estado funcional de las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas y clase II-positivas de *Rana pipiens* en respuesta a la aplicación del hapteno dinitrofluorobenceno (DNFB)
6. Demostrar en que estadio del desarrollo aparecen las células de Langerhans en la piel de *Rana pipiens*.

## OBJETIVO GENERAL

Completar la caracterización morfológica de las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas de *Rana pipiens* equivalentes morfológicamente a las células de Langerhans de los mamíferos y demostrar la homología funcional de ambas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar que las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas de *Rana pipiens* expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II.
2. Demostrar en otros epitelios planos estratificados de *Rana pipiens* la presencia de células dendríticas homólogas a las de la piel.
3. Completar la caracterización morfológica por histoquímica enzimática (esterasa inespecífica) de las células epidérmicas de *Rana pipiens* equivalentes a las células de Langerhans.
4. Demostrar en las células epidérmicas de *Rana pipiens* equivalentes a las células de Langerhans la presencia de un organelo endocítico equivalente al gránulo de Birbeck de los mamíferos.
5. Verificar el número y estado funcional de las células dendríticas epidérmicas ATPasa-positivas y clase II-positivas de *Rana pipiens* en respuesta a la aplicación del hapteno dinitrofluorobenceno (DNFB)
6. Demostrar en que estadio del desarrollo aparecen las células de Langerhans en la piel de *Rana pipiens*.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### Animales

Se estudiaron ranas de la especie: *Rana pipiens*. Estos vertebrados fueron recolectados en criaderos del estado de Morelos, ya sea en forma adulta, como renacuajos o como huevos. Se utilizaron para los experimentos de demostración de moléculas clase II del MHC, para demostrar la actividad de esterasa inespecífica por histoquímica enzimática, para observar la ontogenia de las CL, para evidenciar un organelo similar al GCL por microscopía electrónica, para demostrar el sistema de las CL (demostración de células parecidas a las de Langerhans en otros epitelios) y para identificar si ocurren alteraciones en el número y función de las CL en presencia de un hapteno.

Los animales fueron colocados en los siguientes grupos:

### **Grupo 1: Demostración de la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad**

A 15 ejemplares de *Rana pipiens* se les sacrificó con cloroformo y se les tomaron muestras de piel para incubarlas en una solución de EDTA y obtener láminas epidérmicas. Unas láminas fueron procesadas para demostrar la actividad de ATPasa y en otras se realizó una técnica de inmunohistoquímica para evidenciar las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El anticuerpo monoclonal AM20, que identifica a las moléculas clase II del MHC del anuro *Xenopus laevis* (que tiene reacción cruzada con *Rana pipiens*), fue gentilmente donado por M. Flajnik de la Universidad de Maryland. Las células positivas para la ATPasa y para las moléculas clase II fueron cuantificadas con un microscopio equipado con una cámara lúcida, un ocular graduado y con el objetivo de 40X. El campo microscópico en el que las células fueron contadas midió  $46,225 \mu\text{m}^2$ . Por cada animal, 10 campos fueron escogidos al azar, por lo que el total de campos en el que fueron cuantificadas las células positivas fue de 150 para cada una de las técnicas empleadas, ya sea ATPasa o inmunohistoquímica para moléculas clase II. Los resultados fueron convertidos a número de células por  $\text{mm}^2$ .

Algunas muestras fueron procesadas para realizar en ellas una doble tinción de histoquímica enzimática para ATPasa e inmunofluorescencia para moléculas clase II del MHC.

De algunas ranas se obtuvieron fragmentos de piel de 10mm x 1mm x 1mm los cuales fueron procesados para microscopía electrónica y realizar en ellos una técnica de inmunohistoquímica ultraestructural para evidenciar moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

#### **Grupo 2: Demostración de la actividad de la enzima esterasa inespecífica.**

Formado por 10 ranas, *Rana pipiens*, de las que se tomaron muestras de piel ventral para separar láminas epidérmicas con EDTA y cloruro de calcio 2M, las cuales se incubaron en el medio apropiado para demostrar la actividad enzimática de esterasa inespecífica. También se realizaron cortes por congelación de piel que fueron procesados para demostrar la actividad de la enzima. Los controles fueron incubación en el medio sin el sustrato, o con la aplicación del inhibidor de esterasa inespecífica NaF.

Para estudios de histoquímica ultraestructural se obtuvieron fragmentos de piel de 10mm x 1mm x 1mm los cuales fueron fijados con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4. A continuación se realizaron cortes con un vibratomo de 50 micras de espesor y fueron incubados en el medio adecuado con el fin de demostrar la actividad de esterasa inespecífica. Después de este paso se continuó con la técnica de rutina para microscopía electrónica de transmisión.

#### **Grupo 3: Demostración de células dendríticas en otros epitelios.**

A 20 *Rana pipiens* adultas se les sacrificó y se les tomaron muestras de la membrana nictitante y de la mitad anterior del ojo. Estas muestras se incubaron en EDTA, y se obtuvieron láminas mucosas que fueron procesadas para demostrar la actividad de las enzimas ATPasa y esterasa inespecífica, además de la presencia de moléculas clase II del MHC.

#### **Grupo 4: Demostración de gránulos de CL.**

A 5 ranas, *Rana pipiens*, se les tomaron fragmentos de piel ventral que fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión. Se realizaron 15 cortes seriados de 15 células

dendríticas epidérmicas con el propósito de evidenciar un posible organelo citoplásmico equivalente al gránulo de Birbeck de las CL de los mamíferos.

#### **Grupo 5: Ontogenia de células dendríticas.**

Se utilizaron 40 renacuajos de *Rana pipiens* recolectados de lagunas del estado de Morelos en los meses de enero a mayo. A estos animales se les determinó la edad siguiendo la tabla de desarrollo para *Bufo valliceps* de Limbaugh y Volpe<sup>297</sup>. Se dividió el desarrollo larval en premetamorfosis, prometamorfosis, clímax de la metamorfosis y postmetamorfosis. Los animales fueron mantenidos en peceras de 40 litros con oxigenación constante y a una temperatura promedio de 22 °C, óptima para su desarrollo<sup>298</sup>. Los renacuajos fueron sacrificados por descerebración conforme alcanzaban diferentes edades e inmediatamente se les tomó un fragmento de piel ventral, que tiene menos melanocitos y permite más fácilmente la identificación de las células dendríticas. Algunos fragmentos de piel fueron procesados para obtener cortes por congelación y otros fueron fijados en acetona y procesados para realizar en ellos cortes en parafina por el método de AMeX. Este método permite realizar técnicas inmunohistoquímicas en cortes de parafina con una buena estructura morfológica y una buena preservación antigénica. En estas muestras se demostró la actividad enzimática de ATPasa y la presencia de moléculas clase II del MHC. Las células positivas fueron contadas por mm de longitud de epidermis, de acuerdo con el método descrito por Bieber<sup>299</sup>. Para determinar si existían diferencias significativas entre cada una de las edades, se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) entre los diferentes estadios de desarrollo larval.

#### **Grupo 6: Alteraciones morfo/funcionales de las células dendríticas con un hapteno.**

A 8 ranas *Rana pipiens* se les mantuvo en buenas condiciones de alimentación y a una temperatura constante de 25 °C. Se les aplicó el siguiente esquema de sensibilización al dinitrofluorobenceno (DNFB)<sup>300</sup> con el objeto de conocer si las células dendríticas de esta especie, similares a las CL de los mamíferos, se modifican en número y estructura.

A estos animales se les administró una dosis epicutánea única (50 µl) de DNFB al 0.75% en acetona-aceite de oliva 4:1. El sitio de aplicación fue la piel ventral, en un área de 10 mm de

diámetro. Los controles se obtuvieron de muestras de piel de la misma rana (piel ventral del cuello) a los que se les aplicó solamente el vehículo. Dos ranas fueron sacrificadas cada ½ hora hasta llegar a las 2 horas. Se tomaron muestras de piel sensibilizada y control, y de algunas de ellas se obtuvieron láminas epidérmicas y de otras se realizaron cortes por congelación. Ambas muestras fueron procesadas para demostrar la actividad de la enzima ATPasa y la presencia de moléculas clase II del MHC. A otras muestras de piel sensibilizada, con sus respectivos controles, se les procesó para microscopía electrónica de transmisión.

Se realizó un conteo de las células positivas para la enzima ATPasa y para las moléculas clase II del MHC con un microscopio equipado con una cámara lúcida y con un ocular graduado (similar al método empleado en el grupo).



## RESULTADOS

### 1. Resultados de la co-expresión de ATPasa y moléculas clase II del CPH en células dendríticas de los anfibios.

Los resultados de la demostración de células ATPasa-positivas y moléculas clase II-positivas tanto con microscopía fotónica como electrónica y la presencia de estas células en diferentes epitelios están publicados en el artículo: **Andrés E. Castell-Rodríguez, Alberto Hernández-Peñaloza, Enrique A. Sampedro Carrillo, Miguel Herrera-Enriquez, Sara J. Álvarez-Pérez, Adrián Rondán-Zarate: ATPase and MHC class II molecules co-expression in Rana pipiens dendritic cells. Developmental and Comparative Immunology 23: 473-485, 1999.**

Este artículo se anexa a continuación:



PERGAMON

Developmental and Comparative Immunology 23 (1999) 473–485

www.elsevier.com/locate/devcompimm

**Developmental  
& Comparative  
Immunology**

## ATPase and MHC class II molecules co-expression in *Rana pipiens* dendritic cells

Andrés E. Castell-Rodríguez<sup>a,\*</sup>, Alberto Hernández-Peñaloza<sup>a</sup>,  
Enrique A. Sampedro-Carrillo<sup>a,b</sup>, Miguel A. Herrera-Enriquez<sup>a</sup>,  
Sara J. Alvarez-Pérez<sup>a</sup>, Adrián Rondán-Zarate<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología Celular y Tissular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, DF 04510, Mexico

<sup>b</sup>Sección de Microscopía Electrónica, Patología, Hospital Regional ALM, ISSSTE, Mexico

Received 16 February 1999; accepted 21 April 1999

### Abstract

Mammalian Langerhans cells are antigen-presenting cells located in different epithelia. These cells have a characteristic ultrastructural pattern, present a plasmatic membrane ATPase activity and constitutively express class II molecules of the major histocompatibility complex. ATPase-positive dendritic cells that are morphologically similar to Langerhans cells have also been found in amphibian epidermis. In order to demonstrate that ATPase-positive dendritic cells of amphibian epidermis express class II molecules and are present in other stratified epithelia, histochemical and immunohistochemical as well as ultrastructural analysis were performed. ATPase-positive dendritic cells and class II-positive dendritic cells were observed in epidermis, nictitant membrane and cornea. In epidermis the number of ATPase-positive dendritic cells was  $656 \pm 186/\text{mm}^2$  while class II-positive dendritic cells was  $119 \pm 45/\text{mm}^2$ . Some ATPase-positive dendritic cells showed co-expression of class II molecules. These results suggest the existence of dendritic cell subsets in amphibians as is clearly demonstrated in mammals. © 1999 Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Langerhans cells; Dendritic cells; Skin immune system; Class II molecules; ATPase-positive cells; Cornea; Nictitant membrane; *Rana pipiens*

**Abbreviations:** ATP, adenosin triphosphate; ATPase, adenosin-triphosphatase; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; LC, Langerhans cells; LCG, Langerhans cells granules; MHC, major histocompatibility complex; PBS, phosphate buffered saline.

\* Corresponding author. Tel.: +525-623-2192; fax: +525-623-2399.

E-mail address: castell@servidor.unam.mx (A.E. Castell-Rodríguez)

### 1. Introduction

Langerhans cells (LC) constitute a key element in the physiological regulation of immune response [1,2]. Currently, their origin from bone marrow derived specific precursors [3,4] and their essential role in antigen processing and presentation [5,6] is clearly demonstrated. Interaction of specific antigens with LC is crucial for the acti-

vation and proliferation of T cell subsets for establishing and maintaining an effective immune response [7–12].

Although LC were originally described in epidermis [13], where they constitute an essential component of skin immune system [14], later studies demonstrated LC in other epithelial membranes such as cornea [15], vagina [16] and trachea [17].

LC identification rests on the finding of specific morphologic, histochemical and immunophenotypic features, which include: a dendritic outline with numerous and slender cytoplasmic projections; a strong membranous, formalin-resistant  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent adenosine triphosphatase (ATPase) [18,19] and non-specific esterase [20,21] activities; and the constitutive expression of class II molecules encoded by the major histocompatibility complex (MHC) [22–24]. At the ultrastructural level, LC show a clear cytoplasm, a lobulated nucleus, the absence of desmosomes and tonofilaments and the presence of a characteristic organelle termed the Birbeck or LC granule (LCG) [25].

Even though knowledge about LC in mammals is increasing, there are only a few studies in Langerhans-like cells in non-mammalian vertebrates. Specifically in amphibians, the fact that until now, putative dendritic cells have not showed LCG, has led some groups to deny the existence of LC or even Langerhans-like cells in these vertebrates [26]. However, we demonstrated the presence of dendritic cells in *Rana catesbeiana* epidermis by means of enzymatic histochemistry for ATPase [27], and in a study on class II molecules expression during *Xenopus laevis* development, Du Pasquier and Flajnik [28] described class II-positive epidermal dendritic cells.

In order to verify if amphibian ATPase-positive dendritic cells express simultaneously class II molecules, we made double stains in whole mounts epithelial preparations and histochemical as well as immunohistochemical electron microscopy analysis of epidermis and other stratified epithelia, as cornea and nictitant membrane of *R. pipiens*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Juvenile frogs (15), *R. pipiens*, were collected in the Spring and maintained in glass bins of  $1.20 \times 0.50 \times 0.50$  m at 22°C. They were fed with small pieces of fresh chicken liver and flies. The water was changed at each feeding.

### 2.2. Whole epithelial sheets

Frogs were killed by an intraperitoneal injection of 2 ml of Anestestal<sup>R</sup> (1 ml=0.0623 g of sodium pentobarbital). Ventral skin and nictitant membrane specimens were obtained with scissors and then cut into pieces smaller than 9 mm<sup>2</sup> with a razor blade. Both eyes were dissected and sectioned in a coronal plane to obtain the anterior segments. All samples were incubated in 20 mM of Na<sub>2</sub>EDTA (Merck, Germany)/PBS solution, pH 7.4 for 45 min at 37°C. Epithelial sheets were obtained with fine needles under dissecting microscope and rinsed twice in PBS.

### 2.3. ATPase histochemistry

Epithelial sheets were fixed overnight in formaldehyde-cacodylate at 4°C, rinsed twice in PBS and once in 0.25 M, pH 7.2 tris-maleate buffer. The fixed epithelia were then incubated in freshly prepared  $1.32 \times 10^{-3}$  M ATP in 10 ml of 0.25 M tris-maleate buffer solution containing 5% Glucose, 2.5 ml of 0.1 M MgSO<sub>4</sub>, 2.5 ml of 2% Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and 12.5 ml of distilled water [29] for 10 min at 37°C. The reaction was stopped with water and developed with 1% ammonium sulphide (Merck, Germany) for 1 min at room temperature. Control sheets were incubated in the same medium without ATP substrate (Sigma, St Louis). Stained and control epithelial sheets were mounted dermal side up with glycerin jelly (Kaiser) on glass slides.

### 2.4. Immunohistochemistry for class II molecules

Epithelial sheets of skin, cornea and nictitant membrane were fixed in cold acetone for 10 min

and washed three times with PBS for 15 min. Peroxidase activity was blocked with 0.3%  $H_2O_2$  for 10 min and incubated 18 h at 4°C with culture supernatant containing the monoclonal antibody AM20 (AM20 recognizes the class II molecules of the MHC of the amphibian *X. laevis* and has cross reactivity with class II molecules of the frog *R. pipiens*) (Flajnik Rollins-Smith cross reactivity, personal communication). After washing twice in PBS, they were covered with a biotinylated goat anti-mouse IgG (ICN Biomedicals, Costa Mesa) for 1 h at 37°C, rinsed with PBS and treated with streptavidin-peroxidase conjugate (ICN Biomedicals, Costa Mesa) for 1 h at room temperature. Peroxidase activity was visualized by incubating the epithelial sheets with 3,3'-Diaminobenzidine (Sigma, St Louis) (0.5 mg/ml Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.01%  $H_2O_2$ ) for 7 min at room temperature. Control specimens were treated either with a non-relevant mouse monoclonal antibody of appropriate isotype (IgG1) or not treated with primary antibody at all. Stained and control epithelial sheets were mounted dermal side up with glycerin jelly (Kaiser) on glass slides.

### 2.5. Sections of epithelial sheets

Epithelial sheets processed for ATPase histochemistry and class II immunohistochemistry were frozen in OCT (Ames, México) at  $-70^\circ C$ , cut into transversal sections at 7 mm and stained with Mayer's hematoxylin.

### 2.6. Quantitative evaluation of positive cells in epidermal sheets

Epidermal sheets, mounted dermal side up, were utilized to count ATPase-positive and class II-positive cells using an ocular grid, calibrated with a micrometer and with a 40× objective. For each animal, 10 fields were randomly chosen, each measuring  $46,225 \mu m^2$ , and the results were converted to number of cells/ $mm^2$ .

### 2.7. Double-staining for class II molecules/ATPase

Ventral epidermal sheets were fixed with 4%

paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 for 10 min at 4°C, rinsed three times in 0.01% Triton X-100 PBS 10 min each and incubated overnight at 4°C with AM20. After washing with Triton X-100 PBS, the samples were incubated with a goat anti-mouse IgG coupled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:32) (ICN Biomedicals, Costa Mesa) for 30 min at 37°C. The epidermal sheets were abundantly washed in PBS and then were incubated in fresh ATP solution for 5 min at room temperature. The reaction was stopped with water and developed with 0.1% ammonium sulphide. The sheets were mounted dermal side up in 9:1 PBS glycerine and observed in an Olympus BH2-RFCA epifluorescence microscope (Olympus, Tokyo).

### 2.8. Ultrastructural histochemistry

Fragments of ventral skin, nictitant membrane and sclero-corneal junction were sliced with a vibratome to obtain 100  $\mu m$  thick sections that were fixed in 1.5% glutaraldehyde in 0.067 M cacodylate buffer pH 7.4 for 2 h at 4°C. After rinsing in 0.15 M cacodylate buffer pH 7.4, the samples were incubated in ATP solution for 10 min at 37°C, washed in cacodylate buffer and postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer pH 7.4 for 45 min at 4°C. Specimens were dehydrated, embedded in Araldite 6005 and ultrathin silver sections were obtained with a Sorvall ultramicrotome MT6000 (Dupont, USA), stained with uranyl acetate and Reynolds' lead citrate and observed in a Zeiss EM-109 electron microscope (Zeiss, Germany).

Serial sections of ATPase-positive dendritic cells were made and analyzed looking for LCG.

### 2.9. Ultrastructural immunohistochemistry

Whole epidermal sheets were obtained and fixed with 4% periodate-lysine-paraformaldehyde for 3 h at 4°C [30]. After thorough washing with PBS for 6 h, the sheets were incubated with the AM20 monoclonal antibody for 18 h at 4°C, with the biotinylated anti-mouse IgG (ICN, Costa Mesa) for 4 h at room temperature and with the streptavidin-peroxidase complex (ICN

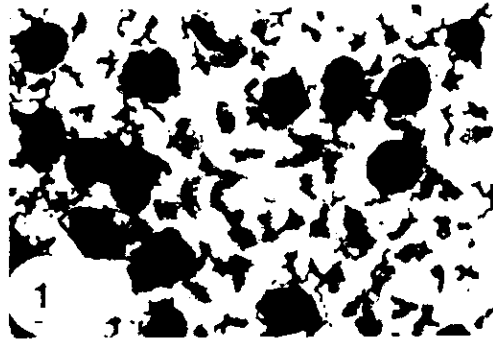


Fig. 1. ATPase enzymatic histochemistry of epidermal frog sheet. Positive dendritic cells are present between keratinocytes ( $\times 400$ ).

Biomedicals, Costa Mesa) for 1 h at room temperature. They were then fixed in 1.5% glutaraldehyde in 0.1 M, pH 7.4 phosphate buffer for 30 min. The tissues were preincubated with 3,3'-Diaminobenzidine (0.5 mg/ml Tris-HCl buffer, pH 7.4) containing 1% Dimethyl Sulfoxide (Sigma, St Louis) for 30 min and then transferred into the same solution plus 0.01%  $H_2O_2$  for 15 min. Dimethyl sulfoxide was added in order to facilitate the diffusion of the 3,3'-Diaminobenzidine. After rinsing with cacodylate buffer, the sheets were sectioned ( $5 \times 1 \times 1$  mm) under stereoscopic microscope, postfixed with 1% osmium tetroxide for 1 h and dehydrated for Epon embedding. Immunohistochemistry control samples were identically treated but without primary antibody. Serial sections of class II-positive dendritic cells were made and analyzed.

### 3. Results

#### 3.1. ATPase staining of epithelial sheets

Light microscopy histochemistry of epidermal sheets showed ATPase-positive dendritic cells with same morphology and spatial distribution as previously described [27]. The positive cells had a polyhedral shape with interdigitating processes between adjacent keratinocytes (Figs. 1 and 2). ATPase-positive cells frequently form clusters, principally in the gland secretion channels. Nictitant membrane sheets showed also ATPase positive cells with long and slender dendrites (Figs. 3 and 4). These cells, as well as those found in epidermis, had more prevalent ATPase activity in the body of the cell rather than in the dendrites. Corneal sheets exhibited rounded or

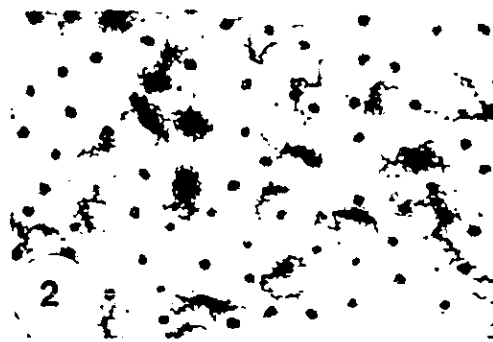


Fig. 2. Immunohistochemistry for class II molecules in epidermal sheet. The long dendritic processes of the cells extend between the epithelial cells ( $\times 250$ ).



Fig. 3. ATPase-positive dendritic cells in nictitant membrane sheet. Note that the long and slender dendrites have low ATPase reaction (arrowheads) whereas it is stronger in the cell's body (arrows) ( $\times 250$ ).

polyhedral ATPase-positive cells which were mainly found in the sclero-corneal junction (Figs. 5 and 6).

The average number of epidermal ATPase-positive dendritic cells was  $656 \pm 186 \text{ mm}^{-2}$ . In cryostat sections of epidermal sheets the ATPase activity was found in basal and suprabasal cells (Figs. 7–10).

### 3.2. Immunohistochemistry staining of epithelial sheets

Immunohistochemistry of epidermal sheets showed class II-positive cells with slender and long dendrites (Fig. 2); the mean number of cells was  $119 \pm 45 \text{ mm}^{-2}$ . Wall epithelial cells of gland secretion channels were also positive to class II-molecules. Sections of epidermal sheets stained for class II immunohistochemistry showed posi-

tive dendritic cells mostly located in the innermost part of the epidermal layer (Fig. 11). In nictitant membrane, class II-positive dendritic cells were observed and like epidermal class II-positive cells, they also form clusters (Fig. 4).

Corneal epithelial sheets showed class II-positive cells with dendritic shapes that were present in a higher density in sclero-corneal junction with a gradual diminution to central cornea (Fig. 6). All controls were consistently negative.

### 3.3. Double FITC-ATPase stain

Epidermal sheets processed for simultaneous stain with class II molecules immunofluorescence and ATPase enzyme histochemistry, were analyzed first under fluorescent light until we found a positive dendritic cell; then, without moving the field, we only changed the illumination con-

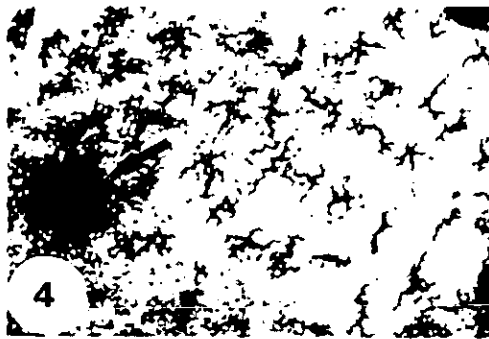


Fig. 4. Immunohistochemistry of nictitant membrane. Several class II-positive cells are seen with their slender dendrites. A cluster of these cells (arrow) is around a mucous gland channel ( $\times 250$ ).

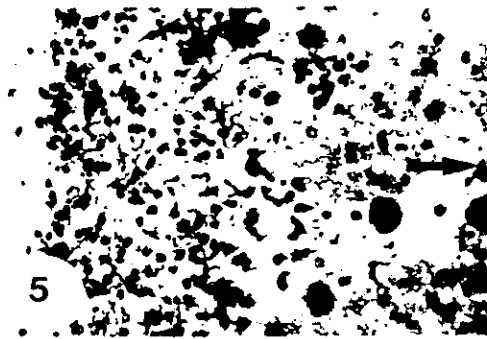


Fig. 5. Corneal sheet showing ATPase-positive dendritic cells in sclero-corneal junction. They have a polyhedral form and the density diminished towards corneal center (arrow) ( $\times 250$ ).

trol and found under white field conditions a clearly positive ATPase reaction in the same cell (Figs. 7a and b; 8a and b, and 9a and b). With this protocol it was clear that all class II-positive dendritic cells were also ATPase-positive, whereas not all ATPase-positive dendritic cells were class II-positive. Taking in account the possibility that these reactive differences could be attributed to a masking of immunofluorescence, we processed epidermal sheets stained by the immunofluorescence technique and some fields with class II-positive dendritic cells were photographed. The epidermal sheets were then processed for the demonstration of ATPase and the same fields were again photographed. The results of this approach were the same as mentioned above.

### 3.4. Ultrastructural ATPase

Ultrastructural ATPase histochemistry of skin, nictitant membrane and cornea showed cells with a well-defined electron-dense deposit in the plasma membrane (Figs. 12-15). These cells were distributed in basal and suprabasal position and had a desmosome-free plasma membrane with an indented nucleus and a clear cytoplasm without tonofilaments. No LCG were observed in all sections.

### 3.5. Ultrastructural immunohistochemistry

Immunoelectron microscopy of ventral skin showed dendritic cells that contained no tonofilaments, no desmosomes and no LCG like the ATPase-positive dendritic cells. We found, as is



Fig. 6. Immunohistochemistry for class II molecules in epithelial corneal sheet. Positive cells are dendritic and are in a similar situation to the cells of the Fig. 5. Corneal center (arrow) ( $\times 250$ ).



Fig. 7. Epidermal sheet processed for double FITC ATPase stain. Same ATPase-positive cells are shown (arrows) in (a) and (b). A dendritic cell (asterisk) has both markers, ATPase and class II-FITC ( $\times 1000$ )



Fig. 8. Epidermal sheet processed for double FITC ATPase stain. Another example of dendritic cell (arrow) coexpressing ATPase activity (a) and class II molecules (b) surrounded by cells which only express ATPase (arrowheads) ( $\times 1000$ )



Fig. 9. Epidermal sheet processed for double FITC ATPase stain. In (a) ATPase reaction only shows the body of a dendritic cell (arrow), whereas in (b) the same cell (arrow) is clearly delineated, including their dendrites by the immunolocalization of class II molecules ( $\times 400$ )





Fig. 10. Section of epidermal sheet showing basal and suprabasal ATPase-positive dendritic cells (arrowheads) ( $\times 400$ ).

well known, that the electron-dense precipitate resulting from diaminobenzidine reaction is thinner than the lead precipitate of ATPase reaction. All class II-positive cells were located in basal position (Fig. 13).

#### 4. Discussion

The presence of ATPase-positive dendritic cells has been previously demonstrated in amphibian epidermis [27]. This study shows cells with similar ultrastructural and histochemical patterns in other stratified epithelia, such as nictitant membrane and cornea. Moreover, double staining demonstrates co-expression of MHC class II molecules in ATPase positive dendritic cells in all studied amphibian epithelia. We used AM20

monoclonal antibody since it specifically recognizes MHC class II molecules from *Xenopus*, and it has been demonstrated on Western blots that also identifies class II  $\beta$  chain of *R. pipiens*, but not of *R. catesbeiana* [31]. Interestingly enough, comparative quantification analysis of ATPase-positive dendritic cells versus class II-positive dendritic cells showed significant differences, in that some cells only express ATPase and others co-express both markers.

In normal mammalian epidermis the only cells that have ATPase activity and constitutively express class II molecules are LC [24,32]. Both markers are considered to be specific and yield morphologically excellent and highly reproducible results. The functional significance of ATPase membrane activity in LC is unknown, but perhaps it is involved in the receptor-mediated endo-



Fig. 11. Section of epidermal sheet processed for class II immunohistochemistry. Positive cells are located only in the basal layer of the epidermis (arrowheads) ( $\times 400$ ).



Fig. 12. Ultrastructural ATPase histochemistry of ventral skin. Suprabasal located dendritic cell lacking tonofilaments and desmosomes showing a strong positive plasmatic membrane reaction (arrows). bar, 10  $\mu$ m

cytosis for antigenic material [33]. Class II molecules are necessary for antigen presentation to activate T-cells [34].

The ultrastructural characteristics of ATPase-positive and class II-positive cells are analogous to those described for LC in mammals, except for the fact that we could not find LCG in serial sections. Some authors consider indispensable the finding of this organelle to identify LC. Nonetheless, it must be remembered that LCG have not been found in all mammalian species in cells that otherwise, are typical LC, as has been reported in the pig [35] and sometimes in man [36], so their absence is not a definitive proof that a cell is not a LC. The absence of LCG in amphibian dendritic cells could have two possible explanations: (a) the extremely low quantity of these organelles, as occurs in mammals [37,38], therefore requiring more serial sections; or (b)

typical LCG could be a phylogenetic trait not yet acquired in amphibians.

The finding of ATPase-positive class II-negative cells may suggest that they represent a cellular population independent from dendritic cells lineage. Nonetheless, this possibility is very unlikely, because although these cells do not express immunodetectable class II antigens, our findings clearly show that their epithelial localization and morphology, both at light and electron microscopy levels, are consistent with those described elsewhere for LC.

We considered that the coexistence of cells with different class II molecules expression, but with similar ATPase activity and morphology, strongly suggest the existence of two subsets of dendritic cells in amphibian. There is evidence for the existence of LC subsets in man [39] and mouse [40,41]. One subset is basal and expresses



Fig. 14 Ultrastructural ATPase histochemistry of nictitant membrane. ATPase-positive cell with a slender projection and the electron-dense reaction product only in the desmosome-free plasmatic membrane (arrows); Bar, 1.0  $\mu$ m.

help with photomicrography. Miss Gabriela Santoyo for correction of manuscript and Dr Martin F. Flajnik (University of Maryland) for his critical review of this paper and for providing AM20.

## References

- [1] Teunissen MBM. Dynamic nature and function on epidermal Langerhans cells in vivo and in vitro: a review, with emphasis on human Langerhans cells. *Histochem J* 1992;24:697-716.
- [2] Grabbe S, Beissert S, Schwartz T, Granstein RD. Dendritic cells and initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today* 1995;16:117-21.
- [3] Mackensen A, Herbst B, Köhler G, Wolff-Vorbeck G, Rosenthal FM, Veelken H, Kulmburg P, Eckart H, Mertelsmann R, Lindenmann A. Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitors cells in vitro. *Blood* 1995;86:2699-707.
- [4] Caux C, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, Vanbervliet B, Jacquet C, Schmitt D, Banchereau J. Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD34<sup>+</sup> progenitors can prime naive CD4<sup>+</sup> T cells and process soluble antigens. *J Immunol* 1995;155:5427-35.
- [5] Katz SI, Cooper KD, Iijima M, Tsuchida T. The role of Langerhans cells in antigen presentation. *J Invest Dermatol* 1985;85:96s-8s.
- [6] Stingl G, Shevach EM. Langerhans cells as antigen-presenting cells. In Schuler G, editor. *Epidermal Langerhans Cells*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991. p. 159-90.
- [7] Stingl G, Katz SI, Clement L, Green I, Shevach EM. Immunological function of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 1978;121:2005-13.
- [8] Braathen LR, Thorsby E. Studies on human epidermal Langerhans cells. I. alloactivating and antigen presenting capacity. *Scand J Immunol* 1980;11:401-8.
- [9] Sontheimer RD. The mixed epidermal cell-lymphocyte reaction: epidermal Langerhans cells are responsible for the enhanced allogeneic lymphocyte stimulating capacity



Fig. 15 Electron micrograph of sclero-corneal junction showing an ATPase-positive dendritic cell. The electron-dense reaction product is located in the plasmatic membrane (arrows), bar: 1.0  $\mu$ m.

- of normal human epidermal cell suspensions. *J Invest Dermatol* 1985;85:215-65.
- [10] Pehamberger H, Stingl LA, Pogantsch S, Steiner G, Wolff K, Stingl G. Epidermal cell-induced generation of cytotoxic T lymphocyte responses against alloantigens or TNP-modified syngeneic cells: requirement for Ia-positive Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1983;81:208-11.
- [11] Faure M, Frappaz A, Schmitt D, Dezutter-Dambuyant Z, Thivolet T. Role of HLA-DR-bearing Langerhans and epidermal indeterminate cells in the *in vitro* generation of alloreactive cytotoxic T cells in man. *Cell Immunol* 1984;83:271-9.
- [12] Steiner G, Wolff K, Pehamberger H, Stingl G. Epidermal cells as accessory cells in the generation of alloreactive and hapten-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. *J Immunol* 1985;134:736-42.
- [13] Langerhans P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchow Archiv Pathol Anat Physiol Klin Med* 1868;44:325-37.
- [14] Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today* 1993;14:75-8.
- [15] van Trappen L, Geboes K, Missoteen L, Maudgal PC, Desmet V. Lymphocytes and Langerhans cells in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Science* 1985;26:320-5.
- [16] Young WG. Epithelial kinetics affect Langerhans cells of mouse vaginal epithelium. *Acta Anat* 1985;123:131-6.
- [17] Holt PG. Regulation of antigen-presenting cell function(s) in lung and airway tissues. *Eur Respir J* 1993;6:120-9.
- [18] Mackenzie IC, Squier CA. Cytochemical identification of ATPase-positive Langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. *Br J Dermatol* 1975;92:523-33.
- [19] Baker KW, Habowsky JEJ. EDTA-separation and ATPase Langerhans cells in the mouse epidermis. *J Invest Dermatol* 1983;80:104-7.
- [20] Jarret A, Riley MB. Esterase activity in dendritic cells. *Br J Dermatol* 1962;75:79-81.
- [21] Maruyama T, Uda H, Yokoyama M. Localization of non-specific esterase and endogenous peroxidase in the murine epidermal Langerhans' cells. *Br J Dermatol* 1980;103:61-6.
- [22] Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler W, Gschnait F, Knapp W, Wolff K. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 1977;268:245-6.
- [23] Tamaki K, Stingl G, Gullino M, Sachs DH, Katz SI. Ia

- antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cells. *J Immunol* 1979;123:784–7.
- [24] Rowden G. Expression of Ia antigens on Langerhans cells in mice, guinea pigs, and man. *J Invest Dermatol* 1980;75:22–31.
- [25] Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans' cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 1961;37:51–63.
- [26] Banerjee TK, Hoshino T. ATPase-positive and metallophilic cells in the skin of frog *Rana catesbeiana*. *Nag J Med Sc* 1984;47:83–90.
- [27] Carrillo J, Castell A, Perez A, Rondán A. Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *J Anat* 1990;172:39–46.
- [28] Du Pasquier L, Flajnik M. Expression of MHC class II antigens during *Xenopus* development. *Dev Immunol* 1990;1:85–95.
- [29] Robins PG, Brandon DR. A modification of the adenosine triphosphatase method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Tech* 1981;56:87–9.
- [30] Hsiao L, Motohiro T, Tatsuyoshi A, Kiyoshi T. An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study of the ontogeny of rat Langerhans cell lineage with anti-macrophage and anti-Ia monoclonal antibodies. *J Invest Dermatol* 1989;93:780–6.
- [31] Flajnik MF, Du Pasquier L. The major histocompatibility complex of frogs. *Immunol Rev* 1990;113:47–63.
- [32] Wolff K, Winkelmann RK. Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1967;48:50–4.
- [33] Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Lepoittevin JP, Stampf JL, Groshans E, Benezra C, Cazenave JP. ATPase and morphologic changes in Langerhans cells induced by epicutaneous application of a sensitizing dose of DNFB. *J Invest Dermatol* 1989;92:689–94.
- [34] Atiba S, Katz SI. The ability of cultured Langerhans cells to process and present protein antigens is MHC-dependent. *J Immunol* 1991;146:2479–87.
- [35] Drexhage HA, Mullink H, de Groot J, Clarke J, Balfour BM. A study of cells present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cell. *Cell Tissue Res* 1979;202:407–30.
- [36] Mommaas M, Mulder A, Vermeer BJ, Koning F. Functional human epidermal Langerhans cells that lack Birbeck granules. *J Invest Dermatol* 1994;103:807–10.
- [37] Takehana S, Kameyama Y, Sato E, Misohata M. Ultrastructural observations on Langerhans cells in the rat gingival epithelium. *J Periodont Res* 1985;20:275–83.
- [38] Romano J, Balaguer R. Ultrastructural identification of Langerhans cells in normal swine epidermis. *J Anat* 1991;179:43–6.
- [39] Dezutter-Dambuyant C, Cordier G, Schmitt D, Faure M, Laquoi C, Thivolet J. Quantitative evaluation of two distinct cell populations expressing HLA-DR antigens in normal human epidermis. *Br J Dermatol* 1984;111:1–11.
- [40] Romani N, Stingl G, Tschachler E, Wutmer MD, Steinman RM, Shevach EM, Schuler G. The Thy-1 bearing cell of murine epidermis: a distinctive leukocyte perhaps related to natural killer cells. *J Exp Med* 1985;161:1368–83.
- [41] Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985;161:526–46.
- [42] Schmitt DA, Hanau D, Bieber T, Pauli G, Cazenave JP. In vitro human epidermal indeterminate cells (CD1a<sup>+</sup>, 40 kD Fe-gamma-R-) are potent immunostimulatory cells for allogenic lymphocytes. *J Invest Dermatol* 1988;91:388 (Abstr).
- [43] Cumberbatch M, Gould SJ, Peters SW, Kimber I. MHC class II expression by Langerhans' cells and lymph node dendritic cells: possible evidence for maturation of Langerhans' cells following contact sensitization. *Immunol* 1991;74:414–9.
- [44] Steinman R. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. In: Paul EW, Fathman CG, Metzger H, editors. *Annual Reviews of Immunology* 9. Palo Alto: Annual Review Inc, 1991. p. 271–96.
- [45] Bigaj J, Plytycz B. Interdigitating cells in the thymus of the frog *Rana temporaria*. *Folia Histochem Citobiol* 1987;24:65–8.
- [46] Alvarez R. Thymus of *Rana perezi*: presence of interdigitating cells. *J Morphol* 1990;204:305–12.
- [47] Barrutia MSG, Villena A, Rasquin B, Gomariz RP, Zapata A. Presence of presumptive interdigitating cells in the spleen of the waterjack *Bufo calamita*. *Experientia* 1985;41:1393–4.

**2. Resultados de la demostración de la actividad de la enzima esterasa inespecífica.**

La demostración de esta enzima en células de aspecto dendrítico con microscopía de luz y electrónica así como la presencia de estas células en diferentes epitelios está escrito en un documento que se envió a publicación en la revista *Histochemical Journal*. Este documento lleva por título: **NON-SPECIFIC ESTERASE-POSITIVE DENDRITIC CELLS IN EPITHELIA OF THE FROG *Rana pipiens***. Los autores de este trabajo son: Andrés E. Castell-Rodríguez, Enrique A. Sampedro-Carrillo, Miguel A. Herrera-Enriquez y Adrián Rondán-Zárate.

Este documento se anexa a continuación, junto con la carta de envío para publicación:

**NON-SPECIFIC ESTERASE-POSITIVE DENDRITIC CELLS IN EPITHELIA OF THE  
FROG *Rana pipiens*.**

**Andrés E. Castell-Rodríguez, Enrique A. Sampedro-Carrillo, Miguel A. Herrera-  
Enriquez, Adrian Rondán-Zárate.**

**Address correspondence to:**

**Dr. Andrés E. Castell-Rodríguez**

Departamento de Biología Celular y Tisular, edif. A, 3<sup>er</sup> piso, Facultad de  
Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510,  
México.

Tel: (525) 623-2192; Fax: (525) 623-2399; Email: [castell@servidor.unam.mx](mailto:castell@servidor.unam.mx)

**Short Title:** Esterase-positive dendritic cells in frogs.

**Key words:** Langerhans cells, Dendritic cells, Antigen presenting cells, Frogs, *Rana  
pipiens*, Non-specific esterase-positive cells, Cornea, Nictitant membrane,  
Skin.

## ABSTRACT

In mammals Langerhans cells are located in different stratified epithelia and function as antigen presenting cells. These cells have a dendritic shape and characteristically show ATPase and non-specific esterase activities and constitutively express class II molecules of the major histocompatibility complex. Ultrastructurally, these cells shown a convolute nucleus, a clear cytoplasm without tonofilaments, a desmosomes-free plasmatic membrane and a shaped tennis racquet organelle called Birbeck granule. Previously, we demonstrated dendritic cells positive for ATPase and class II molecules in the epidermis of the amphibians that are morphologically similar to mammalian Langerhans cells, except for the Birbeck granule. Now we demonstrate non-specific esterase-positive dendritic cells, with light and electronic microscopy, similars to Langerhans cells in epidermis and epithelial sheets of nictitant membrane and cornea of the rana *Rana pipiens*. Results indicate that dendritic cells of the frog epithelia are the homology of the mammalian Langerhans cells, and suggest the existence of an antigen presenting dendritic cellular system in amphibia.



## INTRODUCTION

Enzymatic histochemistry, a classical and very important method for the study of diverse tissues, allows the researcher, to specifically demonstrate enzymatic activities. Numerous studies have shown that some enzymatic activities are clearly restricted to specific cell types; therefore, their histochemical demonstration may be used as a cell marker, for characterization and functional studies. A widely used enzymatic cell marker is non-specific esterase (NSE), which is not really a single enzyme, but a family of them with a wide tissular distribution (Gossrau 1993). Their substrate differences and their sensitivity to inhibitors (Li *et al.*, 1973) can distinguish these enzymes, with probably diverse function *in vivo*.

Although widely distributed in the body (Chessick, 1953), NSE activity has been successfully used in the differential characterization of normal and pathologic leukocyte types (Yam *et al.*, 1971; Li *et al.*, 1973; Horwitz *et al.*, 1977;). NSE activity has been also demonstrated in macrophages (Rademakers *et al.*, 1989; Stadnyk *et al.*, 1990) and Langerhans cells (LC) (Jarret and Riley, 1962; Riley, 1966), which are somehow related to leukocytes.

Langerhans cells play an essential role in antigen presentation (Ker 1985, Stingl and Shevach, 1991; Romani *et al.*, 1989) and are critical for the induction and elicitation of contact hypersensitivity (Toews *et al.*, 1980; Hanau *et al.*, 1989). They represent a minor (3-6%) cell population of epidermis, and are normally found also in stratified and non-stratified epithelia as cornea (van Trappen *et al.*, 1985), vagina (Young, 1985) and trachea (Holt, 1993).

Langerhans cells have a very complex profile usually revealed by enzymatic histochemistry, immunohistochemistry and morphologic techniques. Immunophenotypical studies have showed the expression of class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC) (Rowden, Lewis & Sullivan, 1977; Klareskog *et al.*, 1977) and receptor sites for IgG Fc portion as well as for the third component of

complement (Stingl et al, 1977; Burke & Gigli, 1980). In transmission electron microscopy, LC are characterized by an electron-lucent cytoplasm with few and sparse organelles, a lobulated, frequently convoluted nucleus and a distinctive organelle termed Birbeck or LC granule (Birbeck et al., 1961). The ultrastructural differentiation of LC from surrounding epithelial cells is facilitated by the fact that these cells are completely devoid of desmosomes and tonofilamentes.

LC display strong membranal  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -dependent ATPase (Mackenzie & Squier, 1975) and NSE (Campo-Aasen and Pearse, 1966) activities. Histochemical demonstration of these enzymes has been widely accepted as a highly reproducible and reliable marker for LC in morphologic and functional studies.

Despite increasing knowledge about mammalian LC, only a few studies have examined the occurrence of Langerhans-like cells or equivalents in the skin of lower vertebrates. In amphibians, Banerjee and Hoshino (1984) could not find Langerhans-like cells in bullfrog epidermis, however we demonstrated dendritic cells, at light and ultrastructural levels, with an enzymatic histochemistry for ATPase in epidermis of *Rana pipiens* (Carrillo et al., 1990). Also we demonstrated dendritic cells that co-express ATPase and class II molecules of the MHC in different stratified epithelia of the *Rana pipiens*. (Castell et al, 1999) So, the aim of this study was to demonstrate membranal NSE activity in epidermal amphibian dendritic cells in order to complete their characterization. Also we show the presence of NSE-positive dendritic cells in comea and nictitant membrane.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

10 juvenile frogs, *Rana pipiens*, were collected in the Spring and maintained in glass bins with water, sand and stones at 22 °C. Animals were fed twice each week with small pieces of fresh chicken liver and flies. Water was changed three times each week.

### **Tissues**

Frogs were sacrificed by intraperitoneal injection of 2 ml sodium pentobarbital (Anestosal®, 1 ml = 0.06333g) and fragments of ventral skin, both eyes and nictitant membranes were obtained with scissors. Skin fragments and nictitant membranes were cut in 9 mm<sup>2</sup> pieces whereas the eyes were divided in two segments, anterior and posterior, with a razor blade.

### **Whole Epithelial Sheets**

To obtain epithelial sheets, samples of ventral skin, nictitant membrane and eye's anterior segment were incubated in one of two mediums: a) 2M calcium chloride in water for 8 min at room temperature; or b) 20mM of Na<sub>2</sub>EDTA (Merck, Germany)/PBS solution, pH 7.4 for 45 min at 37 °C. Tissues were washed in distilled water and epithelial sheets were then separated carefully from the connective tissue with fine needles under dissecting microscope. The epithelial sheets were rinsed twice in PBS.

### **Skin Sections**

Samples of frog skin were included in O.C.T. compound (Tissue-Tek®, AMES, México) and freezed at -70° C. Sections of 8 µm were obtained with a cryostat and mounted in polyvinyl/alcohol-coated glass slides.

### **Histochemistry for Nonspecific Esterase**

Tissues were fixed with 1.5% glutaraldehyde in 0.05M cacodylate buffer pH 7.4, containing 1% sucrose for 5 min at 4° C and washed in PBS three times 5 min each. Epithelial sheets or skin sections were dried at room temperature for 30 min. The incubation medium for demonstrate NSE activity was 10 mg of  $\alpha$ -naphthyl acetate in 0.4 ml acetone, 2.4 ml hexazotized pararosanilin in 40 ml of 0.1M phosphate buffer at pH 7.4 and adjusted to pH 6.3. Reaction was observed under microscopic control.

Controls were incubated either in the same medium but without  $\alpha$ -naphthyl acetate or incubated with the inhibitor Na-F.

### **Ultrastructural Histochemistry for Nonspecific Esterase**

Skin samples of 10 x 1 x 1 mm were fixed for 1 h at 4° C in 1.5% glutaraldehyde in 0.05M cacodylate buffer containing 1% sucrose, pH 7.4. The tissues were sliced carefully with a vibratome to obtain 50-100  $\mu$ m sections that were again fixed for 1 h in the same fixative. After three washes in 0.2M phosphate buffer pH 7.4, the sections were incubated in  $\alpha$ -naphthyl acetate medium for 15 min, postfixed in 1% osmium tetroxide for 45 min, dehydrated and embedded in Araldite 6005. Ultrathin sections were obtained with a Sorvall MT6000 ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and Reynold's lead citrate and observed in a Zeiss EM-109 electron microscope.

### **Ultrastructural Histochemistry for ATPase**

In order to compare the ultrastructural characteristics of NSE-positive cells, we made an histochemistry for demonstrate ATPase activity in the cells previously described by us (Carrillo et al, 1989). Fragments of ventral skin of 10 x 1 x 1 mm were fixed in 1.5% glutaraldehyde in 0.067 M cacodylate buffer pH 7.4 for 1 h. The samples

were sliced as mentioned above to obtain very thin sections. Sections were again fixed in the same fixative for another hour at 4 °C. After rinsing three times in 0.15 M cacodylate buffer pH 7.4, the samples were incubated in ATP solution for 10 min at 37 °C. Specimens were washed in cacodylate buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.2M cacodylate buffer pH 7.4 for 45 min at 4 °C, dehydrated, embedded in Araldite 6005 and ultrathin silver sections were obtained.

## RESULTS

Both separation methods,  $\text{CaCl}_2$  and EDTA/PBS, were effective to obtain complete epithelial sheets. However, the reactivity for NSE was more intense in epithelial sheets obtained by  $\text{CaCl}_2$ . Epidermal sheets showed NSE-positive dendritic cells with short processes interdigitating between adjacent keratinocytes. These cells were scattered, but occasionally forming clusters (Fig. 1). A clear distinction between melanocytes and NSE-positive cells was easily attained owing to their different size, outline and enzymatic activity (Fig. 2). Controls were completely negative either without the substrate or incubated with the inhibitor Na-F.

NSE-positive cells were found in nictitant membrane (Fig. 3) as well as cornea (Fig. 4). In both epithelia NSE-positive cells were less abundant and had polygonal or rounded shape. In corneal sheets they were more abundant in sclero-corneal junction (Fig. 4), with a gradually diminution toward paracentral region and exceptionally were found in central cornea.

Cryostat skin sections showed NSE-positive cells basely located with exceptionally parabasal positive cells (Fig. 5,6). NSE-positive cells were also found in dermis (Fig 5).

Samples processed for ultrastructural demonstration of NSE activity showed a weakly reaction in plasmatic membrane of basal cells with an electron-lucent cytoplasm without tonofilaments or desmosomes. Some cells had NSE-positive intracytoplasmic vesicles. No LC granules were observed (Fig. 7).

ATPase activity electron-dense product was located specifically in the plasmatic membrane of basely located cells, which had few organelles and lacked tonofilaments and desmosomes so they had an electron-lucent cytoplasm with no LC granules (Fig. 8).

## DISCUSSION

The results presented here describe for the first time NSE-positive dendritic cells in amphibians. Moreover, these cells are present in three different stratified epithelia of the frog *Rana pipiens*.

Mammalian LC are ATPase-positive and NSE-positive, and both markers are extensively used to identify these cells in normal (Maruyama et al, 1980; Robins and Brandon, 1981) and pathologic epithelia (Jaubert et al, 1980). The presence of these enzymes in amphibian dendritic epithelial cells indicates that they may be Langerhans cells. On other hand, it has been demonstrated in amphibian epidermis the occurrence of ATPase-positive dendritic cells morphologically equivalent to mammalian LC, but without LCG (Carrillo et al, 1990). NSE-positive epithelial dendritic cells of *Rana pipiens* also did not present LCG, contrasting with mammalian LC that show LCG, but they have all others ultrastructural features of LC as electron-lucent cytoplasm free of tonofilaments, a plasmatic membrane without desmosomes and a convoluted nucleus. It is important notice that not all mammalian species LC express Birbeck granules as the pig (Drexhage et al, 1979; Rowden, 1981) and sometimes the man (Mommaas et al, 1981). These cells were called "indeterminate" cells (Zelickson & Mottaz, 1968), but Andersson et al (1981) in skin serial sections and with an electron microscopy equipped with a goniometer found LCG in them, so their absence is not a definitive proof that a cell is not a LC. Probably we do not observed LCG in amphibian dendritic cells because the extremely low quantity of these organelles, as occurs in mammals (36, 37), therefore requiring more serial sections, and typical LCG could be a phylogenetic trait not yet acquired in amphibian.

Interesting two aspects must be emphasized respecting with NSE activity between mammalian LC and amphibian dendritic cells: the substrate and the ultrastructural localization. It has been described that NSE activity in mammalian LC used  $\alpha$ -naphthyl-acetate as substrate, and this reaction is inhibited by NaF (Li et

al, 1973). The NSE activity of amphibian epithelial dendritic cells described here has the same features. On other hand, NSE in mammalian LC has been located ultrastructurally on the outer plasmatic membrane and there was little in cytoplasm vesicles, but not in lisosomes (Maruyama, et al, 1980). Our results are similar, because we found NSE activity in plasmatic membrane and in some cytoplasm vesicles of amphibian dendritic epithelial cells.

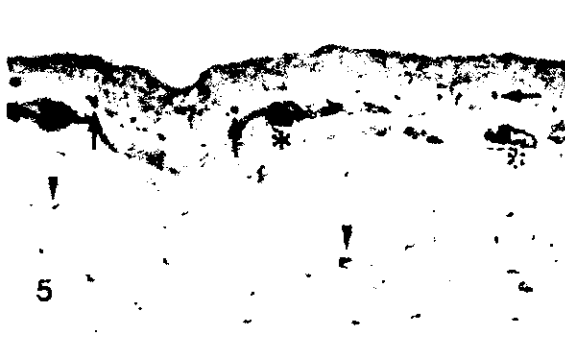
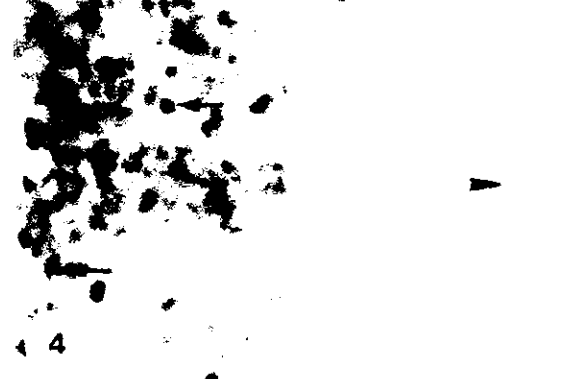
The NSE activity had been related in macrophages with inactivation of toxic products and microorganism and the killing of cells expressing foreign antigens (Buchmuller and Mauel, 1980; Nelson et al, 1981; Monahan et al, 1981) and probably that is their function in mammalian LC. In this sense, it is important notice that the ATPase and NSE enzymatic activity, in cells with similar features to mammalian LC, are conserved phylogenetically, indicating that the function of this cells emerged early in vertebrates as part of the immune system.

Recently, we demonstrated that ATPase and NSE-positive epidermal cells express class II molecules of the MHC (Castell at al, 1999), so, taking in account the enzymatic feature, the expression of class II molecules, the morphologic characteristics and the presence in three different epithelia, we considered that this cells are the morphologic equivalent of the mammalian LC in amphibians.



**Acknowledgements:**

We wish to thank Biol. Beatriz Hernández-Téllez, M.C. Judith Alvarez-Pérez and Mrs Verónica Rodríguez for their excellent technical assistance and to Mr. Francisco Pasos-Nájera for help with photomicrography.





7



8

PLATE 12

## LEGENDS.

**Fig. 1.** Epidermal sheet processed for demonstrated NSE. Positive dendritic cells are scattered between keratynocytes and sometime form clusters (arrows). 100X.

**Fig. 2.** Epidermal sheet showing dendritic cells positive to NSE (arrows). Note that positive cells are smaller than melanocytes (asterisk). 200X

**Fig. 3.** Nictitant membrane sheet with NSE-positive cells in nictitant membrane sheet. They have less dendrites than positive cells of figures 1 and 2. 200X.

**Fig. 4.** Corneal sheet showing NSE-positive cells in sclero-corneal junction. Mostly have rounded or polyhedral form (arrows) and the density diminished toward corneal center (arrowhead). 200X.

**Fig. 5.** Cryo-section of skin. NSE-positive cells are located in the basal stratum of the epidermis (arrows). Also, there are positive cells in dermis. Dermal melanocytes are showed in the dermis (asterisks). 40X.

**Fig. 6.** Cryo-section of skin. Detail of NSE-positive cells located in basal epidermal position. Note dermal melanocytes (asterisk). 1000X

**Fig. 7** Ultrastructural histochemistry to demonstrate NSE activity. A positive cell is basely located (dermis is marked with an asterisk). This cell has an electron-lucent cytoplasm and a desmosomes free plasmatic membrane with a weakly NSE activity (arrows). Bar = 1 $\mu$ .

**Fig. 8** Ultrastructural ATPase histochemistry of ventral skin. A deposit of the ATPase electron-dense product reaction is located only in plasmatic membrane (arrows) of a cell with electron-lucent cytoplasm and without desmosomes. Note that the cell is located immediately above from dermis (asterisk) and is similar to the cell of Fig 7. Bar = 1 $\mu$

## REFERENCES

- Andersson A, Sjöborg S, Elofsson R, Falck B (1981) The epidermal indeterminate cell - A special cell type? *Acta dermato-venereologica* 99, 41-48.
- Banerjee T, Hoshino T (1984) ATPase-positive and metallophilic cells in the skin of frog *Rana catesbeiana*. *Nagoya Journal Medical Science* 47: 83-90.
- Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD (1961) An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans' cells) in vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology* 37, 51-63.
- Braathen LR, Thorsby E (1980) Studies on human epidermal Langerhans' cells. I. Alloactivating and antigen presenting capacity. *Scandinavian Journal of Immunology* 11, 401-408.
- Buchmuller Y, Mauel J (1980) Inhibitors of serine esterases enhance lymphokine induced microbicidal activity in macrophages. *Journal of Reticuloendothelial Society* 27: 89-96.
- Burke K, Gigli I (1980) Receptors for complement on Langerhans' cells. *Journal of Investigative Dermatology* 75, 46-51.
- Campo-Aasen I, Pearse AGE (1966) Enzimología de las células de Langerhans. *Medicina Cutánea* 1: 37-44.
- Carrillo J, Castell A, Pérez A, Rondán A (1990) Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *Journal of Anatomy* 172:39-46.
- Castell-Rodríguez AE, Hernández-Peñaloza A, Sampedro Camillo EA, Herrera-Enriquez MA, Alvarez-Pérez SJ, Rondán-Zárate A. (1999) ATPase and MHC class II molecules co-expression in *Rana pipiens* dendritic cells. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 473-485.
- Chessick, R.D. (1953) Histochemical study of the distribution of esterases. *J. Histochem. Cytochem.* 1, 471-?.

Gossrau, R. (1993) Electron Microscopy Cytochemistry of Enzymes. 1.3 Basic Techniques for Major Groups of Enzymes. I Esterases. In *Electron Microscopic Cytochemistry and Immunocytochemistry in Biomedicine* (edited by Ogawa, K. & Barka, T.), pp. 117-123. Boca Raton: CRC Press.

Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Lepoittevin JP, Stampf JL, Grosshans E, Benezra C, Cazanave JP (1989) ATPase and morphologic changes in Langerhans cells induced by epicutaneous application of a sensitizing dose of DNFB. *Journal of Investigative Dermatology* 92, 689-694.

Horwitz, D.A., Allison, A.C., Ward, P. & Kight, N. (1977) Identification of human mononuclear leucocyte populations by esterase staining. *Clin. Exp. Immunol.* 30, 289-298.

Holt PG (1993) Regulation of antigen-presenting cell function(s) in lung and airway tissues. *European Respiratory Journal* 6, 120-129.

Jarret A, Riley PA: Esterase activity in dendritic cells. *Br J Dermatol* 75: 79-81, 1962.

Jaubert F, Barbey S, Nogues C, Monnet JP, Grun M, Nezelof C (1980) Histocyte X positivity for nonspecific esterase. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 28: 45-46.

Katz, S. I., Cooper, K. D., Iijima, M. and Tsuchida, T. (1985) The role of Langerhans cells in antigen presentation. *J. Invest. Dermatol.* 85, 96s-98s.

Klareskog L, Malmnas-Tjerlund UM, Forsum V, Peterson PA (1977) Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268, 248-250.

Li, C.Y., Lam, K.W., & Yam, L.T. (1973) Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 21, 1-12.

Mackenzie IC, Squier CA (1975) Cytochemical identification of ATPase-positive Langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. *British Journal of Dermatology* 92, 523-533.

- Maruyama T, Uda H, Yokoyama M (1980) Localization of non-specific esterase and endogenous peroxidase in the murine epidermis Langerhans cells. *British Journal of Dermatology* 103: 61-66.
- Mommaas M, Mulder A, Vermeer BJ, Koning F (1994) Functional human epidermal Langerhans cells that lack Birbeck granules. *Journal of Investigative Dermatology* 103: 807-810.
- Monahan RZ, Dvorak HF, Dvorak AM (1981) Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in guinea pig and human monocytes, macrophages, and lymphocytes. *Blood* 58: 1089-1099.
- Nelson RD, Herron MJ, Gracyk JM, Simmons RL (1981) Esterase dependence of human neutrophil functions: lysosome secretion, spontaneous migration, and continuity of the respiratory burst. *Journal of Infectious Disease* 143: 94-100.
- Rademakers, L.H.P.M., van Blokland, W.T.M., de Frankrijker, J.F. de Weger, R.A. & Compier-Spies, PH. I. (1989) Ultrastructural cytochemistry of non-specific esterase in murine peritoneal macrophages. *Histochem. J.* 21, 301-308.
- Riley, P.A. (1966) Esterase in epidermal dendritic cells of the mouse: study of the histochemical properties and distribution of activity of the enzyme in relation to pattering in the tail. *Br. J. Dermatol.* 78, 388-397,
- Robins PG, Brandon DR (1981) A modification of adenosine triphosphatase method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Technology* 56, 87-89.
- Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livinstone AM, Fathman CG, Inaba K, Steinman RM (1989) Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: intact protein is presented best by immature epidermal Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine* 169, 1169-
- Rowden G, Lewis MG, Sullivan AK (1977) Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268, 247-248.



Satdnyk, A.W., Befus, A.D. & Gauldie, J. (1990) Characterization of nonspecific esterase activity in macrophages and intestinal epithelium of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 1-6.

Stingl, G. and Shevach, E. M. Langerhans Cells as Antigen-Presenting Cells. In *Epidermal Langerhans cells*, ed G. Schuler. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, 159-190.

Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler W, Gschnait F, Knapp W, Wolff K (1977) Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* **268**, 245-246.

Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW (1980) Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *Journal of Immunology* **124**, 445-453.

van Trappen L, Geboes K, Missoteen L, Maudgal PC, Desmet V (1985) Lymphocytes and Langerhans cells in normal human cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **26**, 320-325.

Yam, L.T., Li, C.Y. & Crosby, W.H. (1971) Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* **55**, 283-290.

Young WG (1985) Epithelial kinetics affect Langerhans cells of mouse vaginal epithelium. *Acta Anatomica* **123**, 131-131.

Zelickson A, Mottaz J (1968) Localization of gold chloride and adenosintriphosphatase in human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* **51**: 365-372.

**3. Ontogenia de las células dendríticas ATPasa-positivas y clase II-positivas en la epidermis de la *Rana pipiens***

Desde el estadio 26 de desarrollo, segundo de la etapa larvaria, se encontraron células clase II-positivas. Estas células tenían un aspecto variable, ya que algunas eran redondas y otras dendríticas, sin embargo siempre tuvieron una localización basal. Se observaron otros tipos celulares como melanocitos, pero diferían en tamaño, forma y marcaje. Por medio del análisis que se realizó (ANOVA) para comparar el número de células dendríticas entre las distintas edades, se comprobó que no hay diferencias significativas entre los estadios de cada parte del desarrollo larval, pero sí entre las distintas etapas del desarrollo larval.

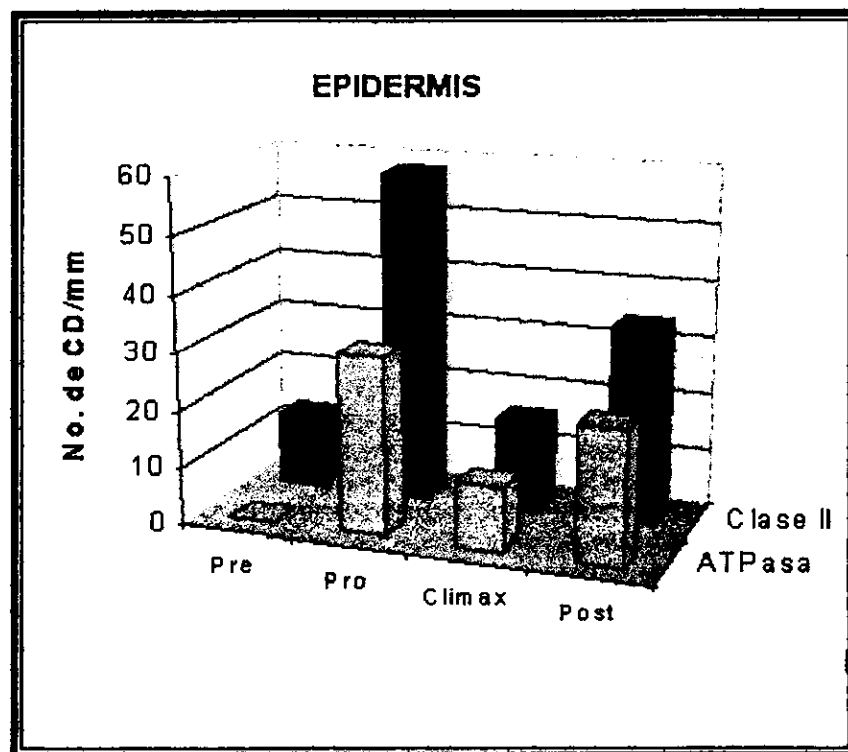
En la tabla 1 se muestra el número promedio, para cada una de las etapas de desarrollo, de células dendríticas positivas a ambos marcadores por mm de longitud de epidermis. Es interesante notar que las células dendríticas aumentan drásticamente de la premetamorfosis a la prometamorfosis, seguido de un decremento durante el clímax. Posteriormente estas células vuelven a elevarse al finalizar la metamorfosis.

Tabla 1

<b>Etapas de Desarrollo</b>	<b>Clase II (cel./mm)</b>	<b>ATPasa (cel./mm)</b>	<b>n</b>
Premetamorfosis	13	0	10
Prometamorfosis	58	31	16
Climax	16	11	9
Postmetamorfosis	34	23	3

Tabla 1. Número de células dendríticas epidérmicas positivas para moléculas clase II y ATPasa durante el desarrollo del renacuajo de la *Rana pipiens*. n es el número de animales por etapa de desarrollo.

Interesantemente, las células dendríticas ATPasa-positivas aparecen hasta la etapa de premetamorfosis, sin embargo, se muestran un comportamiento similar al de las células positivas a las moléculas clase II. Es decir, disminuyen en densidad durante el clímax de la metamorfosis, para posteriormente elevarse gradualmente en la postmetamorfosis. En la figura siguiente están graficados los valores de la tabla 1.



Gráfica 1. Es notorio que las células clase II-positivas aparecen desde las primeras etapas de la premetamorfosis y después se elevan en la prometamorfosis para a continuación, en el clímax de la metamorfosis, disminuir drásticamente. Las células ATPasa-positivas siguen el mismo patrón.

En las figuras 1 y 2 se muestran algunas células dendríticas positivas para moléculas clase II y ATPasa en diferentes etapas.

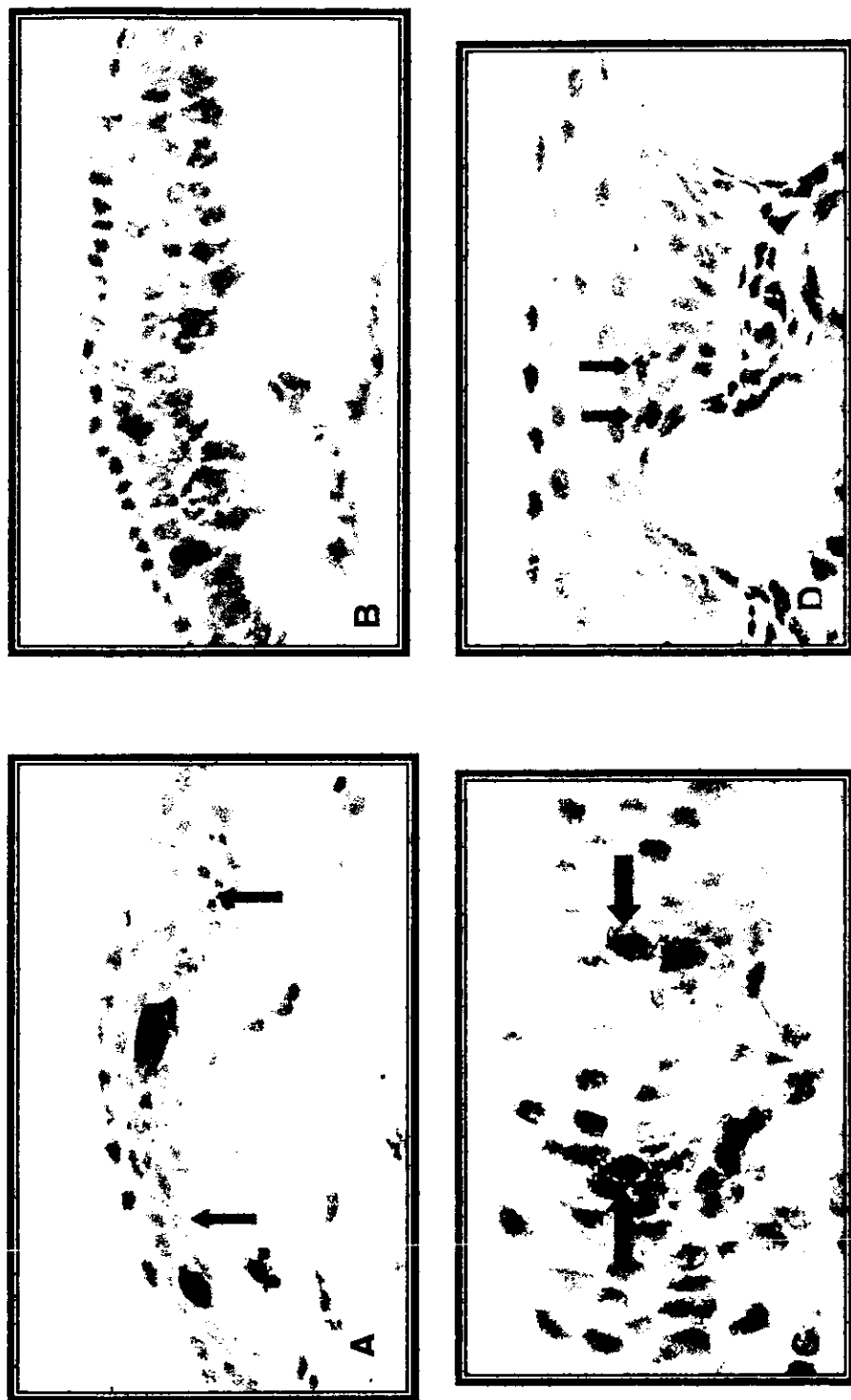


Fig. 1. Cortes transversales de piel de renacuajo en donde se observan células positivas para las moléculas clase II del CPH. a. Premetamorfosis; b. Prometamorfosis; c. Clímax de la metamorfosis; d. Postmetamorfosis. Las flechas señalan a las células positivas.

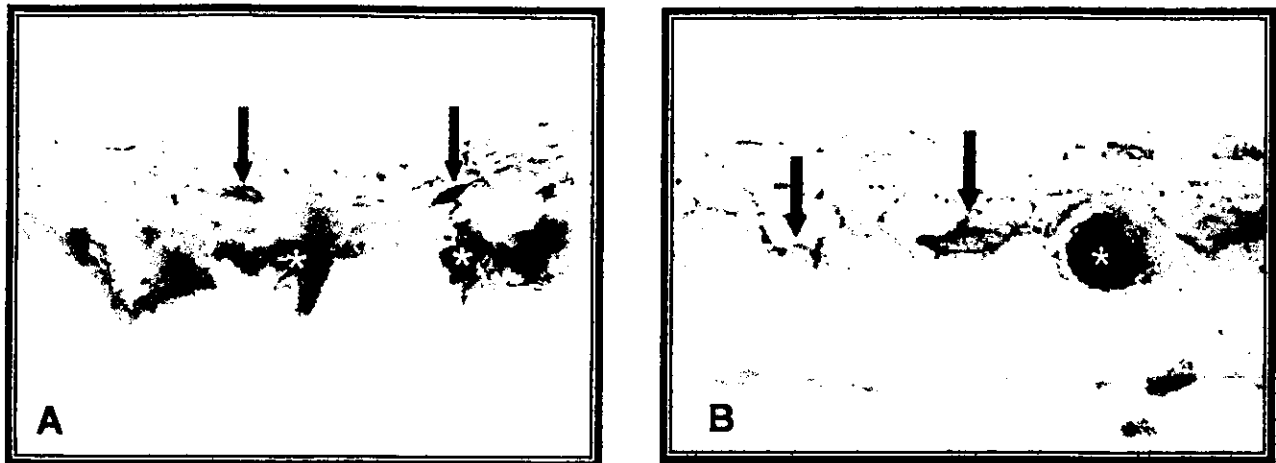


Fig. 2. Cortes de piel de renacuajo de *Rana pipiens* en los que se aprecian células positivas para la ATPasa (flechas). Los melanocitos están marcados con un asterisco

#### 4. Demostración de gránulos de CL en células dendríticas de anfibios.

Se realizaron cortes seriados de muestras de piel para observar con el microscopio electrónico la ultraestructura de las células dendríticas de la piel de ranas adultas. Se observaron 15 células, y a pesar de la seriación, no se pudieron apreciar organelos parecidos a los GCL de las CL de los mamíferos. Se observó que la membrana plasmática de estas células no muestra desmosomas y que presentan un citoplasma claro debido a la ausencia de tonofilamentos. De manera general, en estas células se aprecia un citoplasma poco organizado ya que tienen escasos organelos. Por otra parte, la forma de los núcleos no es muy constante, ya que en algunas células son redondos y en otras células muestran indentaciones.

A pesar de que en las células dendríticas de la piel de ranas adultas no se observaron GCL, si se observó un organelo similar al GCL en una célula dendríticas de la piel de renacuajo. Este organelo se localizó en las inmediaciones de la membrana plasmática y tenía la forma de una "raqueta de tenis". Por otro lado, mostraba una porción vesiculosa con una cubierta "vellosa" en su cara interna. Este organelo mide 200 nm aproximadamente. Es de notar que este hallazgo fue fortuito, ya que en otras células dendríticas de la piel de los renacuajos de *Rana pipiens* no se observaron organelos similares. La figura 3 muestra a una célula dendrítica de renacuajo con el organelo parecido al gránulo de las CL.

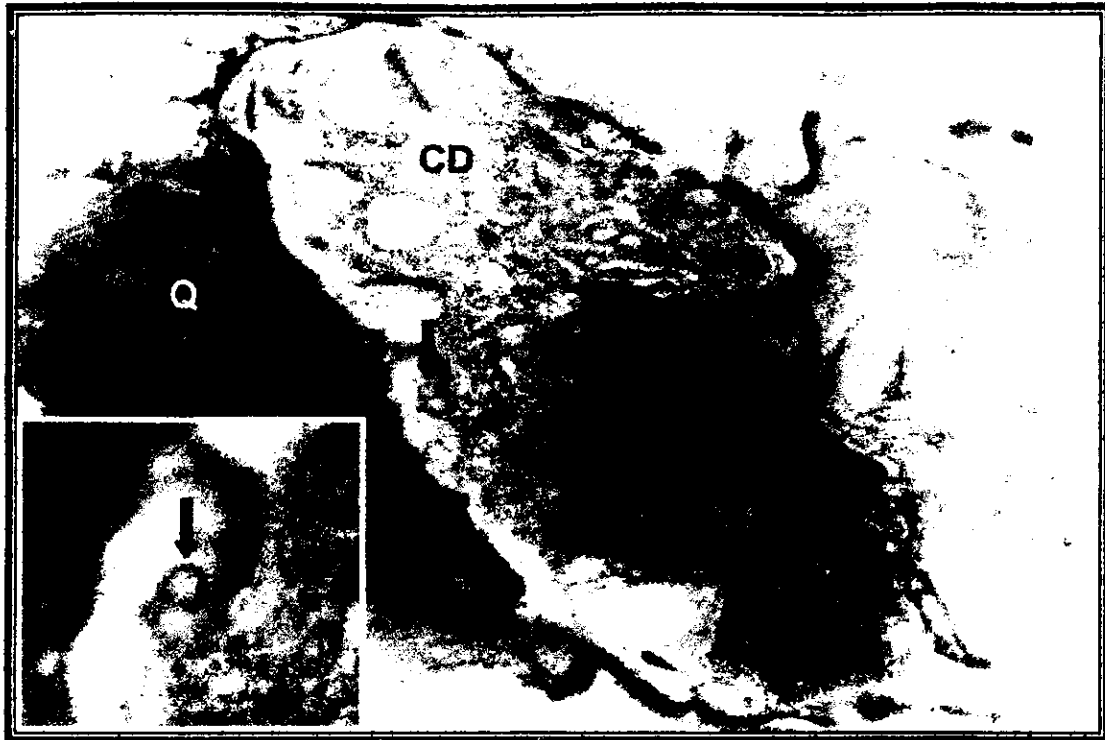


Fig. 3. Micrografía electrónica de una célula dendrítica de renacuajo mostrando un organelo (flecha) parecido al gránulo de las CL de mamífero. Note la forma del granulo que recuerda a una raqueta de tenis y la cubierta "vellosa" en el interior de la membrana plasmática de la porción vesiculosa (asterisco). Célula dendrítica: CD; Queratinocito: Q. Barra = 1μm

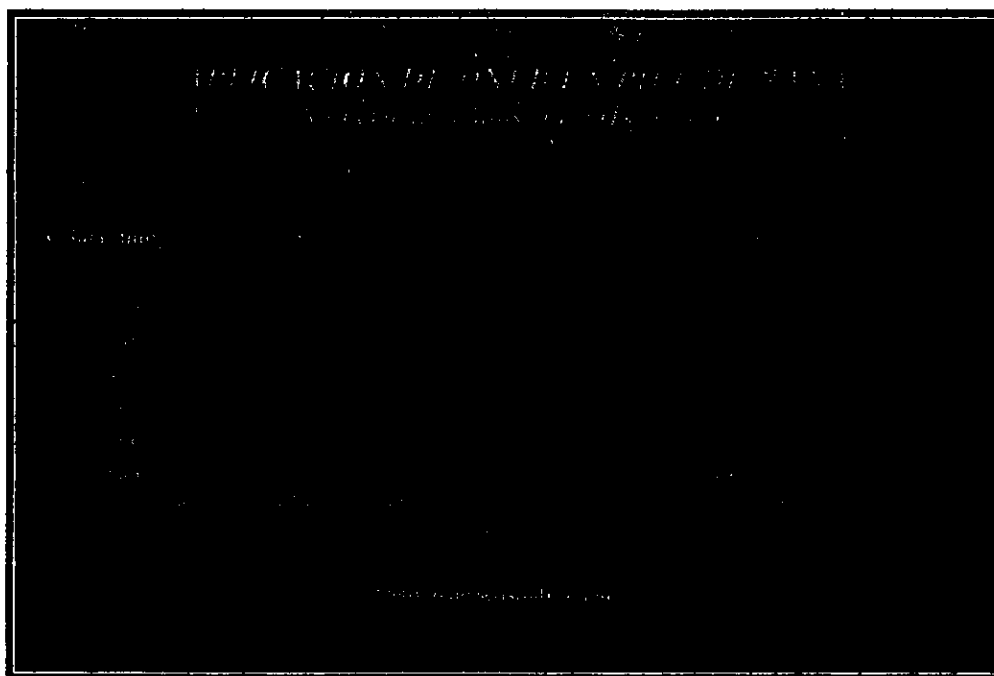
##### 5. Resultados del efecto de la aplicación tópica de DNFB en la piel de ranas adultas.

La aplicación epicutánea del hapteno dinitrofluorobenceno indujo un aumento en el número de células dendríticas clase II-positivas dentro de la epidermis en los primeros 30 minutos; una hora después las CL eran muy dendríticas y parecían expresar más moléculas clase II ya que eran intensamente fluorescentes. En número de células positivas se fue incrementando notablemente hasta llegar a las 2 horas. El número de células en la piel control no varió de manera significativa. El número de células positivas a las moléculas clase II del CPH en piel control y sensibilizada se muestra en la tabla 2, mientras que la gráfica de barras 2 muestra la relación en las células positivas entre las pieles sensibilizada y control.

En la dermis, el número de células clase II-positivas se incrementó importantemente desde la ½ hora de sensibilización (fig. 4).

**Tabla 2**  
**Quantificación de células positivas a las moléculas clase II del CPH en**  
**piel sensibilizada con DNFB y pieles controles**

	½ hora	1 hora	1 ½ horas	2 horas
<b>Control</b>	<b>128</b>	<b>113</b>	<b>135</b>	<b>109</b>
<b>Sensibilizada</b>	<b>315</b>	<b>418</b>	<b>516</b>	<b>550</b>



**Gráfica 2.** Se observa con claridad un aumento notable en el número de células dendríticas clase II-positivas posterior a la aplicación de DNFB. El número de células se mantuvo constante en las pieles controles.

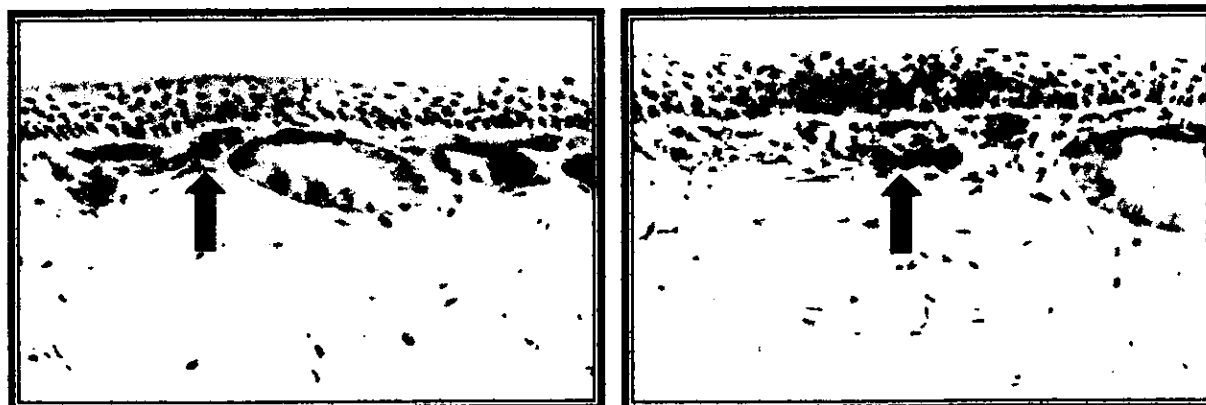


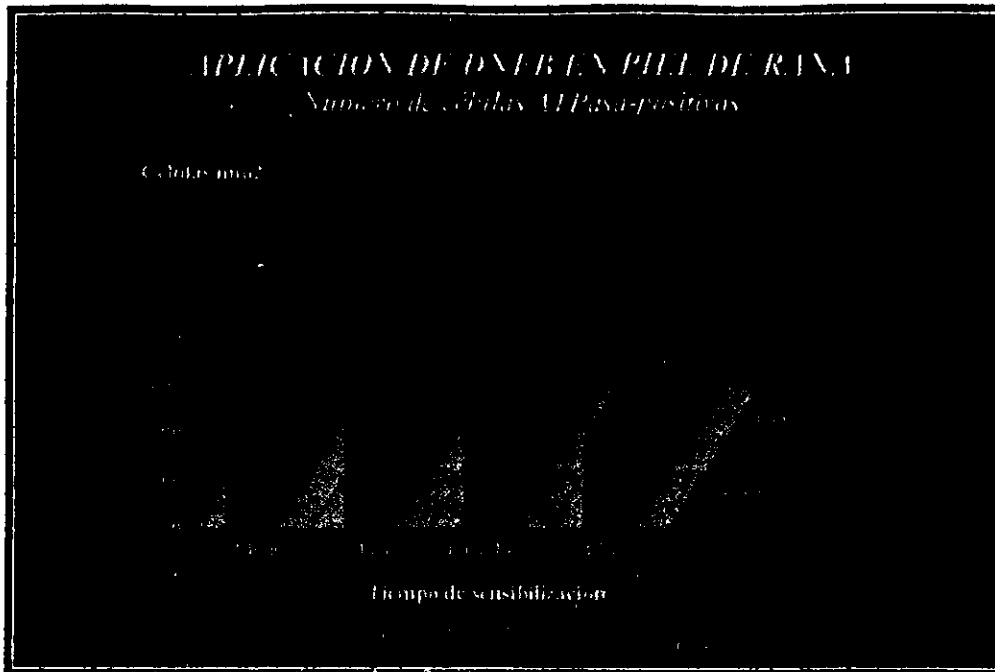
Fig. 4. Fotomicrografías de piel de rana sensibilizadas con DNFB. a) Piel a la ½ hora de sensibilización. Se nota que existe un aumento de células dendríticas clase II-positivas en la dermis (flecha). b) Piel 1½ horas después de la sensibilización. El número de células positivas a las moléculas clase II en la epidermis se ha incrementado de manera muy importante (asterisco). También el número de células en la dermis aumentó considerablemente (Flecha).

En las células dendríticas ATPasa-positivas hubo un decremento en el número por la aplicación de DNFB. Esta disminución se inició a partir de la hora y continuó disminuyendo hasta las 2 horas. Por otro lado, el número de células ATPasa-positivas en las pieles controles se mantuvo sin cambios significativos. Estos datos se encuentran en la tabla 2 y en la gráfica 3.

**Tabla 3**  
**Quantificación de células dendríticas con actividad de ATPasa**  
**en pieles sensibilizadas con DNFB y pieles controles**

	½ hora	1 hora	1 ½ horas	2 horas
<b>Control</b>	<b>590</b>	<b>620</b>	<b>650</b>	<b>610</b>
<b>Sensibilizada</b>	<b>650</b>	<b>460</b>	<b>420</b>	<b>390</b>

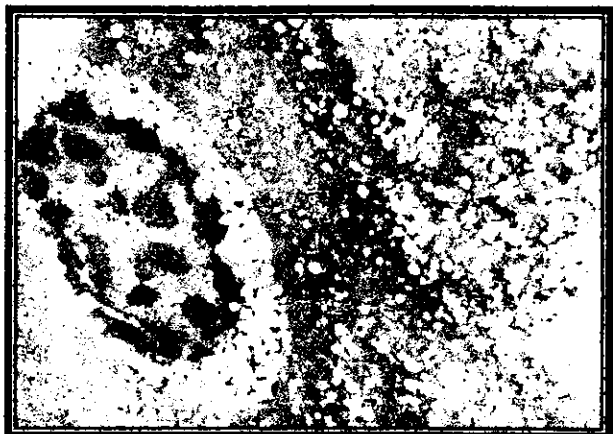




**Gráfica 3.** Después de la aplicación de DNFB las células con actividad de ATPasa disminuyeron mientras que las mismas células en las muestras controles se mantuvieron



**Fig. 5.** Micrografía de célula dendrítica de piel sensibilizada con DNFB. Se aprecian vesículas en el citoplasma con un poco de material amorfo en su interior (flechas).



**Fig. 6.** Queratinocitos con numerosas vesículas en el citoplasma. Piel sensibilizada con DNFB.

Con el microscopio electrónico se identificaron numerosas vesículas con un material amorfo en su interior en el citoplasma de las células dendríticas (fig. 5). Al parecer este aumento en vesículas en el interior de las células dendríticas es compatible con un aumento en la endocitosis. A pesar de lo anterior, no se observaron gránulos de CL en estas células. Por otro lado, también los queratinocitos mostraron un aumento en el número de vesículas citoplásmicas. (Fig. 6).

## DISCUSIÓN.

Las CL epidérmicas de los mamíferos no pueden ser identificadas en cortes histológicos de rutina teñidos con anilinas, por lo que la identificación de estas células descansa en los hallazgos de una morfología específica y patrones histoquímicos e inmunofenotípicos característicos, como: una forma dendrítica con numerosas y largas proyecciones citoplásmicas; una gran actividad enzimática de ATPasa<sup>97</sup> y de esterasa inespecífica en la membrana plasmática; y la expresión constitutiva de moléculas clase II codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad. A nivel ultraestructural las CL muestran un citoplasma claro, un núcleo lobulado, la ausencia de desmosomas y tonofilamentos y la presencia de un organelo característico denominado el gránulo de las CL. En este sentido, los hallazgos contenidos en esta tesis demuestran, por primera vez, que en el grupo de los anfibios, y en particular en la *Rana pipiens*, existen células similares a las de Langerhans de los mamíferos. Más aún, los datos aportados permiten sugerir, como en los mamíferos, que existe un sistema celular dendrítico distribuido en diferentes epitelios y órganos linfoides (datos no publicados, pero realizados en nuestro laboratorio) de los anfibios y que posiblemente tenga la función de la inmunovigilancia.

Con anterioridad nosotros identificamos, en la piel de la *Rana catesbeiana*, la presencia de células dendríticas ATPasa-positivas<sup>294,295</sup>, y Du Pasquier y Flajnik<sup>296</sup> demostraron la presencia de células clase II-positivas en la piel de *Xenopus laevis*. Cuando nosotros realizamos ambas técnicas en *Rana pipiens*, el número de células positivas para ambos marcadores fue diferente (ver resultados en artículo anexo, ref. 301). Esto hizo pensar que posiblemente fueran dos tipos celulares distintos, sin embargo, cuando ambas técnicas se hicieron en la misma lámina epitelial, se demostró que todas las células dendríticas positivas a las moléculas clase II eran también positivas para la actividad de ATPasa. Evidentemente, no todas las células ATPasa-positivas eran clase II-positivas. Además, interesantemente, las características ultraestructurales de las células positivas para ambos marcadores fue similar. En este sentido, la coexistencia de células ATPasa+/clase II+ con células ATPasa+/clase II- con la misma morfología, sugiere fuertemente la existencia de subpoblaciones de células de Langerhans en esos vertebrados. En los mamíferos existe evidencia de que las CL intraepidérmicas pueden no formar una población enteramente homogénea. Por ejemplo, se han caracterizado diferentes glucoconjugados en la membrana plasmática de CL del conejillo de Indias

con distintas lectinas, evidenciando que pudieran representar diferentes subpoblaciones de estas células<sup>302</sup>. La evidencia de la existencia de subpoblaciones de CL en humanos y murinos proviene de estudios ultraestructurales, de inmunofluorescencia y citometría de flujo para las moléculas clase II del CPH. Es evidente que existe una subpoblación que es fuertemente positiva a las moléculas clase II del CPH<sup>303</sup> y otra que es débilmente positiva. La población débilmente positiva es más abundante y se localiza suprabasalmente en la epidermis. Por otro lado, los rangos reportados para la subpoblación fuertemente positiva para las moléculas clase II varían desde el 5%<sup>303</sup> hasta el 25%<sup>304</sup> de todas las CL. Estas CL fuertemente positivas para las moléculas clase II difieren del resto de las CL epidérmicas en 4 aspectos:

1. Están localizadas en una posición más basal;
2. Tanto en el humano como en el ratón contienen pocos gránulos de CL;
3. Estas células se parecen en su fenotipo a las CL que han estado en cultivo durante varios días y a las células dendríticas linfoides; y
4. Existen estudios que sugieren que son muy potentes en la estimulación de la reacción linfocítica mixta primaria<sup>305</sup>.

La relevancia morfológica y funcional de estas subpoblaciones de CL en murinos y humanos todavía no está establecida, sin embargo se ha sugerido que las CL fuertemente positivas para las moléculas clase II pudieran ser células que recientemente han llegado a la epidermis o, lo más plausible, que pudieran ser células que han captado antígenos y que están migrando desde la epidermis, vía los vasos linfáticos aferentes, hacia los ganglios linfáticos regionales donde presentarán antígenos a los linfocitos en las áreas paracorticales<sup>306</sup>. Este pudiera ser el caso de las subpoblaciones de células dendríticas de los anfibios, donde las células ATPasa+/clase II-, localizadas suprabasalmente, pueden endocitar antígenos, mientras que las células ATPasa+/clase II+, localizadas basalmente, pueden migrar y presentar antígenos a los linfocitos T. En este sentido son importantes los hallazgos encontrados después de la aplicación de DNFB. Cuando se aplicó el DNFB a la piel de las ranas, el número de células ATPasa positivas disminuyó, posiblemente porque esta enzima se agotó en el proceso de endocitosis. Se ha sugerido que la función de la enzima ATPasa en

la membrana plasmática de las CL de los mamíferos está relacionada con la captación de material antigénico llevada a cabo por endocitosis mediada por receptores<sup>215</sup>. Además, la disminución de la actividad de esta enzima después de la aplicación epicutánea de un hapteno se ha reportado en mamíferos<sup>216</sup>. Por estos estudios se sugiere que las células dendríticas suprabasales de los anfibios pudieran agotar su actividad de ATPasa al captar antígenos y comiencen a expresar más moléculas clase II, al mismo tiempo que se mueven hacia la base de la epidermis. Esto explicaría tanto el descenso en el número de células ATPasa-positivas, como el aumento en el número de células clase II positivas desde la ½ hora posterior a la aplicación del hapteno. En los mamíferos, las CL después de que han captado un antígeno se vuelven más positivas a las moléculas clase II<sup>267</sup>, pero en contraposición a nuestro estudio, estas mismas células decaen en número rápidamente en la epidermis, para después de varias horas volver a aumentar. No hay una explicación clara del por qué de esta diferencia en ambas especies. Ahora bien, en los mamíferos, al poco tiempo de la aplicación de DNFB existe un aumento de células dendríticas con características de CL en la dermis superior<sup>307</sup>.<sup>308</sup> En nuestro estudio nosotros observamos lo mismo. En este sentido, existen dos posibilidades: o que las células dendríticas clase II están saliendo de la epidermis con el antígeno captado o que nuevas células están llegando a ella. Hay estudios que apoyan las dos posibilidades<sup>309, 310</sup>, sin embargo, cabe preguntarse en el caso de los anfibios, si las células están saliendo de la epidermis, ¿a dónde migran? En los mamíferos esta migración se lleva a cabo hacia los ganglios linfáticos, pero hay datos de que en los anfibios no existen ganglios linfáticos regionales y mucho menos vasos linfáticos. Sólo existen en los anuros algunos órganos linfomieloides del cuello, el bazo y el timo<sup>311, 312</sup>. Quizás la migración se lleve a cabo por vía sanguínea hacia estos sitios. Por otra parte, debe tenerse en mente la posibilidad de que la presentación de antígenos a los linfocitos se lleve a cabo en la piel. En este sentido sería interesante analizar el fenotipo de los linfocitos tanto epidérmicos como dérmicos, así como el número de ellos y la relación que guardan con las células dendríticas. Esta posibilidad actualmente la estamos explorando en el laboratorio.

Por otro lado, la aplicación de DNFB induce un aumento considerable de gránulos de CL en los mamíferos<sup>214, 215</sup>. Este no fue el caso nuestro, ya que sólo se observaron numerosas vesículas citoplásmicas, tanto en las células dendríticas de los anfibios como en los queratinocitos. Al parecer,

estas vesículas manifestaron la actividad endocítica de ambas células. Nosotros no observamos gránulos de CL, quizás porque la dosis de DNFB era alta, ya que se manifestaron efectos irritativos como un ligero hinchamiento de mitocondrias y disrupción de algunas membranas.

Interesantemente, cuando nosotros realizamos cortes seriados de piel de rana adulta a nivel ultraestructural, no observamos organelos parecidos al gránulo de las CL. Sin embargo, al examinar una muestra de la piel de un renacuajo observamos en una célula dendrítica un organelo parecido al gránulo de las CL de los mamíferos. Este organelo tenía forma de raqueta de tenis y poseía una cubierta vellosa en el interior de la porción vesiculosa. Estas características son similares a las de las CL de los mamíferos. Además, también el organelo de las células dendríticas de los anfibios similar al gránulo de CL es comparable en tamaño. Si este organelo es un gránulo de CL, entonces esta es la primera comunicación formal de que los anfibios poseen en sus CL este tipo de organelos. Por otro lado, debemos reconocer que este hallazgo fue fortuito, sin embargo cabe preguntarnos ¿por qué no se observaron organelos semejantes en las células dendríticas de la piel de rana adulta en las cuales se realizaron cortes seriados? No es fácil dar una explicación, pero quizás no observamos suficientes cortes seriados o puede ser que la densidad de estos gránulos en las CL de los anfibios sea tan baja que pasen desapercibidos. No es raro que en las diferentes especies de mamíferos los gránulos de CL varíen en densidad. En este sentido, hay reportes de que en los humanos puede variar el número de gránulos de CL, o incluso faltar<sup>313</sup>, y en los cerdos estos organelos no han sido observados<sup>314</sup>, por lo que la ausencia de este organelo no es una prueba definitiva para que se considere que una célula que tiene las otras características de las de Langerhans no sea verdaderamente una CL. Por otro lado, hay evidencia de que la densidad de estos organelos en algunos mamíferos puede ser extremadamente baja<sup>315,316</sup>, lo cual puede ser el caso de los anfibios.

Cuando se examinaron los diferentes epitelios para verificar si las células dendríticas de los anfibios poseían actividad de esterasa inespecífica, se observaron células que poseían las mismas características morfológicas, a nivel fotónico y ultraestructural, de las células ATPasa-positivas y de las células clase II-positivas. Además de la epidermis, estas células se localizaron también en otros epitelios planos estratificados como la córnea y la membrana nictitante. La demostración de la actividad de la enzima esterasa inespecífica proveyó el primer indicio de que las CL de los mamíferos

tuvieran un origen a partir de médula ósea<sup>101, 102</sup>. El por qué de lo anterior se debe a que los macrófagos también tienen esta actividad enzimática<sup>317</sup>. Interesantemente, dos aspectos con respecto a la actividad de esta enzima deben ser enfatizados entre las CL de mamíferos y las células dendríticas de los anfibios: el sustrato de la enzima y la localización ultraestructural. Se ha descrito que la enzima esterasa inespecífica en las CL de los mamíferos utiliza  $\alpha$ -naphthil acetato como sustrato, y esta reacción es inhibida por el inhibidor NaF<sup>318</sup>. La actividad de la enzima esterasa inespecífica en las células dendríticas epiteliales de los anfibios tiene el mismo patrón. Por otro lado, esta enzima se ha localizado, ultraestructuralmente, en la membrana plasmática de las CL de los mamíferos y muy poco en algunas vesículas citoplásmicas, pero no en lisosomas<sup>103</sup>. Nuestros resultados fueron similares ya que localizamos la actividad de esta enzima en la membrana plasmática y en algunas vesículas citoplásmicas de las células dendríticas epiteliales de los anfibios.

Es interesante notar que las actividades enzimáticas de la ATPasa y de la esterasa inespecífica, así como la expresión de moléculas clase II están presentes en células que tienen las mismas características morfológicas de las CL de los mamíferos, indicando una gran conservación filogenética, y sugiere que posiblemente la función de estas células emergió tempranamente en los vertebrados como parte del sistema inmune.

En los mamíferos está perfectamente establecido que existe una familia de células presentadoras de antígenos que comprende un grupo de células que tiene un origen a partir de un precursor de médula ósea. Es generalmente aceptado que este precursor entra en los tejidos en un estado relativamente inmaduro. Estas células básicamente se localizan en tres compartimentos corporales:

1. Tejidos no-linfoides: como las CL en la epidermis y las células dendríticas intersticiales de pulmón<sup>319, 320</sup> y de corazón<sup>321, 322</sup>.
2. La circulación: especialmente las células dendríticas de la sangre<sup>323</sup>, y las células veladas de los vasos linfáticos aferentes<sup>324, 325</sup>.
3. Organos linfoides: como las células interdigitantes de las zonas T-dependientes de los ganglios linfáticos, bazo y del borde córtico-medular del timo<sup>326-328</sup>.

Estas células son definidas por su características morfológicas similares y por su patrón de marcadores de superficie, además de por su función, y forman un sistema que está conectado entre sí por la movilidad de las células.

Información acerca de este grupo celular en vertebrados ectotérmicos es escasa. Sin embargo, nuestros datos apuntan hacia el establecimiento de este sistema celular en el grupo de los anfibios. El hecho de que estén presentes no sólo en la epidermis, sino también en otros epitelios planos estratificados como la córnea y la membrana nictitante así lo indican. Por otro lado se han descrito, sólo a nivel ultraestructural pero no con marcadores de superficie, otras células de este sistema en los anfibios. Las células interdigitantes del timo de los anfibios son voluminosas con un citoplasma electrón lúcido e interdigitaciones largas y delgadas que hacen múltiples contactos con linfocitos y otras células. Característicamente, no poseen gránulos de CL, sin embargo la homología con las células interdigitantes de los mamíferos ha sido establecida<sup>329-332</sup>. Además, en el bazo del anuro *Bufo calamita* se ha descrito la presencia de células interdigitantes en los márgenes internos de los folículos linfoides<sup>333</sup>, y nosotros hemos observado la presencia de células inmunofenotípicamente similares a las interdigitantes en el bazo de la *Rana pipiens* tanto en etapas adultas<sup>334</sup>, como en etapas larvarias<sup>335</sup> (estos son los únicos estudios de marcadores de superficie en estas células de los anfibios). Con estos datos, y los mostrados en esta tesis, se sugiere fuertemente la existencia de un sistema celular dendrítico presentador de antígenos en los anfibios, similar al de los mamíferos. Faltaría probar todavía las capacidades de presentación de antígenos de estas células, posibilidad que estamos explorando en nuestro laboratorio.

En cuanto a la ontogenia de las células dendríticas de estos animales hay datos interesantes que vale la pena considerar. Estas células fueron observadas desde etapas tempranas del desarrollo larvario de la *Rana pipiens*. Como ya se ha mencionado (ver tabla 1), se observaron células dendríticas positivas desde el estadio 26 de la premetamorfosis; posteriormente, en la prometamorfosis, estas células aumentaron para después disminuir en la etapa del clímax de la metamorfosis. Por último, en la postmetamorfosis, estas células vuelven a aumentar en número. En los mamíferos y en especial en los humanos, las CL aparecen desde la decimocuarta semana de gestación<sup>336</sup> y no expresan moléculas clase II sino hasta la semana 24<sup>337</sup>, aunque algunos han

encontrado células clase II-positivas y ATPasa-positivas desde la semana 10 de gestación<sup>338</sup>. Sin embargo, estas células aumentan paulatinamente en número hasta llegar al momento del nacimiento en el que prácticamente el número de CL es igual al de los adultos. En los anfibios es de notar que en el clímax de la metamorfosis existe una caída dramática en el número de células ATPasa-positivas y clase II-positivas. ¿Cómo explicar esto? Es importante señalar que las larvas de los anfibios son animales de vida libre que se encuentran en un medio potencialmente muy antigénico, por lo que grandes cúmulos de células que expresan moléculas clase II se localizan en aquellas zonas que tienen contacto directo con los antígenos<sup>296, 311</sup> por lo que es fácil entender por que células que expresan moléculas clase II se encuentran en la epidermis de estos vertebrados en una etapa del desarrollo tan temprana. Posteriormente, en la prometamorfosis conforme el sistema inmunológico se desarrolla, también las células presentadoras de antígenos van aumentando. Sin embargo, al llegar al clímax de la metamorfosis, ocurre una disminución importante en la producción de células hematopoyéticas con una atrofia de órganos linfoides<sup>340</sup>, entre otros cambios. Estos cambios en los órganos linfomieloides durante el clímax de la metamorfosis podrían explicar la disminución en el número de CL. Pero hay que tener en cuenta otra posibilidad: la del rearme de antígenos<sup>341</sup>. Es decir, algunos antígenos larvarios se están suprimiendo mientras que otros están apareciendo. En este sentido es plausible que las células dendríticas de la piel de los anfibios, y posiblemente de otros órganos linfoides, disminuyan para inhibir el reconocimiento y presentación de los nuevos antígenos y con ello evitar el desencadenamiento de respuestas inmunológicas. Una vez que se han suprimido antígenos y aparecido los nuevos, es decir, al final de la metamorfosis, entonces las células dendríticas presentadoras de antígenos podrían volver a aumentar de número, como lo demuestran nuestros datos. Si lo anterior es cierto, entonces estos vertebrados podrían ser utilizados en estas etapas, sobre todo durante el clímax de la metamorfosis, como excelentes modelos de estudio para los fenómenos de tolerancia y de presentación de antígenos<sup>342</sup>.



## CONCLUSIONES

1. En los anfibios, o por lo menos en *Rana pipiens*, existen células que por morfología, localización en diferentes epitelios, patrón de actividad enzimática que despliegan y por la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad son homólogas a las CL de los mamíferos.
2. Al parecer, estas células poseen organelos similares al gránulo de las células de Langerhans.
3. Los datos aportados en esta tesis apuntan fuertemente a la presencia de subpoblaciones de células de Langerhans en la epidermis de los anfibios.
4. El hecho de que se hayan observado células de Langerhans en diferentes epitelios de la *Rana pipiens*, y tomando en cuenta los estudios mencionados con anterioridad, indica la presencia un sistema celular dendrítico en estos vertebrados similar al de los mamíferos.
5. Los experimentos de sensibilización con DNFB parecen indicar que las células dendríticas epiteliales de los anfibios tienen una función de presentación de antígenos.
6. Los datos de la ontogenia de las células dendríticas ATPasa-positivas y clase II-positivas de la piel de los anfibios, sobre todo en el clímax de la metamorfosis, sugieren que estas células participan en el reconocimiento de antígenos. Por otro lado, el estudio de estas células en estos vertebrados y en estas etapas de desarrollo es un modelo interesante para el estudio de la tolerancia y la histocompatibilidad.

## PERSPECTIVAS

1. Se necesita hacer un estudio ultraestructural más fino (más cortes seriados) y con distintas dosis de DNFB aplicadas epicutáneamente en la piel de los anfibios, con el objeto de verificar si los haptenos inducen formación de gránulos de CL en estos vertebrados. La demostración de más gránulos, y no sólo uno, completarán el estudio morfológico de estas células en estos vertebrados.
2. El aislamiento de estas células de los anfibios y su posterior cultivo en presencia de un hapteno y después el co-cultivarlas con linfocitos podría demostrar si estas células presentan antígenos y si lo hacen en una manera similar a como se realiza en mamíferos. Sería interesante verificar la presencia de otras moléculas necesarias para la presentación de antígenos estas células.
3. Con el propósito de establecer de manera definitiva si en los anfibios existe un sistema celular dendrítico, sería muy interesante verificar si las células interdigitantes del timo y de los órganos linfomileoides del cuello, descritos sólo ultraestructuralmente, poseen marcadores de células dendríticas, ya que en el bazo de la rana lo hemos verificado con anterioridad.
4. El realizar injertos entre especies de anfibios en el momento del clímax de la metamorfosis y el estudio del comportamiento de estas células dendríticas epidérmicas de los anfibios en esa condición ayudaría a entender el establecimiento de fenómenos de tolerancia y de histocompatibilidad.

**APENDICE:**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**TÉCNICA PARA DEMOSTRAR ACTIVIDAD DE ATPasa EN LÁMINAS EPIDÉRMICAS**

1. Obtención de la muestra: después de sacrificar al animal se obtendrán fragmentos de piel de 1 cm<sup>2</sup> cuadrado aproximadamente.
2. Incubar los fragmentos de piel en alguna de las soluciones para separar láminas epidérmicas (ver adelante).
3. Separación mecánica de la epidermis.
4. Lavar perfectamente en solución salina balanceada durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Fijar en formol-cacodilato durante 20 a 60 minutos a 4 grados centígrados. Aquí pueden permanecer las láminas hasta por 24 h).
6. Lavar en solución salina balanceada, 3 cambios de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente.
7. Lavar en solución tris-maleato (pH 7.2, 0.25M) durante 5 minutos.
8. Incubar en solución de ATP recién preparada, a 37 grados centígrados, durante 10 a 60 minutos.
9. Lavar perfectamente en agua destilada, 2 cambios de 5 minutos cada uno.
10. Revelar en sulfuro de amonio al 1% hasta que se vea cambio de color (dorado-café tabaco).
11. Lavar en agua destilada, 2 cambios de 5 minutos cada uno. Aquí pueden permanecer hasta el montaje.
12. Montar en gelatina glicerizada (de Kaiser).

**SOLUCIONES PARA LA TECNICA DE ATPasa EN LÁMINAS EPIDÉRMICAS**  
**SOLUCION SALINA BALANCEADA CON EDTA (ácido etilen-diamino-tetraácetico) 20mM**

Solución Salina Balanceada 500 ml.

EDTA	3.8 g.
------	--------

También deberá ajustarse el pH a 7.2-7.4 como se mencionó anteriormente.

**SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA (SSB)**

NaCl	6.83 g
KCl	0.20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.20 g
H <sub>2</sub> O dest	1000 ml

Se agregan unas 6 a 8 gotas de rojo fenol al 1% (0.12 ml) para indicar si la solución ha quedado ácida o básica y así ajustar el pH a 7.2-7.4 con NaOH 1 N o HCl 1 N según se requiera.

**FORMOL CACODILATOS**

Sucrosa (sacarosa)	6.85 g
Formol 38-40%	10 ml
Ac. Cacodílico 0.2M	40 ml
H <sub>2</sub> O dest.	50 ml

El Ácido cacodílico se prepara previamente a la solución fijadora de la siguiente manera:

Acido cacodilico (PM: 138.0)	1.38 g.
Agua destilada	50 ml.

**TRIS-MALEATO pH 7.2 0.25M**

Tris salt	12.10 g
Ácido maléico	11.60 g
Hidróxido de sodio	4.0 g
H <sub>2</sub> O dest.	400 ml

**SOLUCIÓN DE ATP**

Glucosa	1.25 g
ATP disódico	0.02 g
H <sub>2</sub> O dest.	12.50 ml
Sol. Tris-maleato	10.0 ml
Sulfato de magnesio (0.1-M)	2.5 ml
Nitrato de plomo 2%	2.75 ml

Se prepara momentos antes de ser usada, debe filtrarse ya que pueden formarse precipitados al estarla constituyendo, para evitar estos precipitados el nitrato de plomo debe agregarse gota a gota.

**SULFATO DE MAGNESIO 0.1 M**

Sulfato de magnesio (PM 246.48)	2.46 g.
Agua destilada	100 ml.

Todas las soluciones deberán guardarse en refrigeración y de preferencia no usarse después de 3 semanas de haber sido preparadas.

**GELATINA GLICERINADA (de Kaiser).**

Gelatina	7 g.
Glicerina	50 g.
Agua destilada	42 cc.
Acido fénico	1 g.

Una vez pesada la gelatina, se coloca en un cristizador y con una pipeta Pasteur se gotea agua destilada en cantidad suficiente para hidratar perfectamente los gránulos de gelatina, teniendo cuidado de que los del fondo también reciban el agua. En un vaso de precipitados se disuelve el ácido fénico en glicerina.

La gelatina hidratada durante unos minutos se coloca en baño de María agregando el resto del agua destilada. Debe mezclarse cuidadosamente para no formar burbujas utilizando una barra de vidrio. Lo mejor es dejar que por sí sola se disuelva la gelatina.

La solución de ácido fénico-glicerina se agregará a la gelatina ya disuelta procurando que oscurezca

por las paredes del cristizador para evitar la formación de burbujas. Es importante que el agua del baño de María este al nivel de la gelatina glicerizada para permitir la mezcla adecuada de todos los ingredientes.

Finalmente se retira del baño y se deja enfriar a la temperatura ambiente o en refrigeración. Si en la superficie de la gelatina han quedado burbujas, estas pueden ser eliminadas con una hoja de rasurar hasta que la gelatina esté solidificada y fría.

### TECNICA HISTOQUIMICA PARA DEMOSTRAR LA ACTIVIDAD DE ESTERASA INESPECIFICA.

1. Separar láminas epidérmicas con cloruro de calcio 2 M.
2. Lavar en PBS durante 3 h a 4 °C.
3. Lavar en amortiguador de fosfatos ph 7.6
4. Fijar durante 15 seg. en fijador para esterasa inespecifica.
5. Lavar en amortiguador de fosfatos 3 x 10 min. a temperatura ambiente.
6. Secar láminas epidérmicas durante 20 min.
7. Incubación en el medio conteniendo  $\alpha$ -naftil-acetato, durante 45-90 min, temperatura ambiente.
8. Lavar en agua destilada.
9. Montar en resina sintética o gelatina glicerizada.

#### Soluciones para la Histoquímica para Esterasa inespecifica.

Solución Fijadora	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	20 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	100 mg
Agua destilada	30 ml
Acetona	45 ml
Formaldehido 37%	25 ml

Guardar a 4 °C. Ajustar el pH a 6.6

**Amortiguador de Fosfatos 1/15 M pH 7.6**

**Solución A:**

Fosfato monobásico de potasio 9.08 g

Agua destilada	1000 ml
----------------	---------

**Solución B:**

Fosfato dibásico de potasio 9.47 g

Agua destilada	1000 ml
----------------	---------

Para lograr la molaridad y el pH final mezclar 13 ml de A más 87 ml de b.

**Solución de Pararosanilina Hexazotizada**

**Solución A:**

Pararosanilina 250 mg

Agua destilada	5 ml
----------------	------

HCl	1.25 ml
-----	---------

Calentar suavemente, enfriar y filtrar.

**Solución B.**

Nitrito de Sodio 4 g

Agua destilada	100 ml
----------------	--------

Mezclar volúmenes iguales de a) y b) y dejar reaccionar por un minuto.

**Solución de alfa-naftil-acetato**

$\alpha$ -naftil-acetato	50 mg
eter monometil etilenglicol	2.5 ml

**Mezcla de Incubación**

Pararosanilina Hexazotizada	3 ml
Alfa-naftil-acetato	2.5 ml
Amortiguador de fosfatos	45 ml

Se ajusta el pH a 6.1 +/- 0.3 con NaOH 1N. La mezcla se filtra antes de usarse.

**DEMOSTRACION ULTRAESTRUCTURAL**

1. Tomar muestras para microscopía electrónica de transmisión.
2. Fijar en glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos 0.1M, pH 7.2 durante dos horas a 4 °C.
3. Postfijar en tetraóxido de osmio al 1% en buffer de cacodilatos 0.2 M durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Deshidratar en alcoholes de concentración creciente.
5. Incluir en EPON y cortar a 400-600 amstrongs.
6. Contrastar en acetato de uranilo y citrato de plomo.



### INMUNOHISTOQUIMICA PARA MOLECULAS TIPO II.

El anticuerpo primario que se utilizará es el AM20, cedido gentilmente por el Dr. Martin F. Flajnik de la Maryland University, USA. Este anticuerpo es específico para las moléculas clase II del CPH de *Xenopus laevis* (rana sudafricana), sin embargo tiene reacción cruzada contra *Rana pipiens* (rana leopardo), pero no contra *Rana catesbeiana* (rana toro).

1. Obtener láminas epidérmicas separadas con EDTA.
2. Lavar en PBS 2 x 5 min.
3. Fijar en acetona 30 seg. a temperatura ambiente.
4. Lavar en PBS 2 x 5 min.
5. Inhibir peroxidasa endógena incubando en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en agua destilada durante 10 min.
6. Lavar en PBS 3 x 5 min.
7. Incubar en el AM20 durante 18 hrs, a 4°C..
8. Lavar en PBS 2 x 5 min.
9. Incubar en anti-IgG cabra contra ratón biotilado durante 1 hr, a 37°C.
10. Lavar en PBS 3 x 5 min.
11. Incubar en estreptoavidina-peroxidasa durante 2 hrs.
12. Revelar con peróxido de hidrógeno al 0.3% en agua destilada.
13. Lavar y montar en gelatina.

### CONTROLES

- a) Incubar en un anticuerpo no relacionado, pero del mismo isotipo que el AM20.
- b) Muestras sin incubar en anticuerpo primario (AM20).
- c) Muestras sin incubar en anticuerpo secundario biotilado (Anti-IgG e cabra contra ratón).
- d) Muestras sin ninguna incubación y reveladas con diaminobencidina.

**SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS, pH 7.4**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.43 g
NaCl	7.0 g
H <sub>2</sub> O dest.	1000 ml

**SOLUCION SUSTRATO CROMOGENA O REVELADORA PARA PEROXIDASA**

a) Tris Maleato	tris-maleato salt	2.423 g
	H <sub>2</sub> O dest	100 ml
b) HCl 37%	HCl	0.833 ml
	H <sub>2</sub> O dest.	100 ml
Mezcla:	Solución a)	5 ml
	Solución b)	8 ml
	H <sub>2</sub> O dest.	7 ml

**Solución reveladora.**

A 10 ml. de la mezcla de soluciones agregar 0.3 ml. de peróxido de hidrógeno al 0.3%.

A los 10 ml. restantes agregar 5 mg de diaminobencidina.

A la solución que contiene diaminobencidina se le agregará 0.1 ml. de la que contiene peróxido de hidrógeno inmediatamente antes de usarla.

**AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS), Ph 7.4, CON ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (ASB) 0.01%, Y TWEEN 20 al 0.01%**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.43 g
NaCl	7.0 g
Albúmina sérica bovina	1.0 g
Tween 20	0.5 ml
H <sub>2</sub> O dest.	1000 ml

**SOLUCIÓN PARA SENSIBILIZAR ANFIBIOS**

Solución sensibilizadora:

2,4-dinitro-1-fluorobenceno (DNFB) al 0.75% en acetona, emulsificado 4:1 en aceite de oliva

**MÉTODOS PARA SEPARAR LAMINAS EPIDERMICAS.**

**1. EDTA:**

NaCl———3.415 g.

KCl———0.10 g.

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> ——0.575 g.

KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> ——0.10 g.

EDTA———3.8 g.

Agua destilada-500 ml.

Rojo fenol 1%—6 a 8 gotas.

Ajustar pH a 7.2-7.4 con NaOH 1Nó HCl 1N.

Incubar de 20 a 90 minutos a 37 °C.

**2 CLORURO DE CALCIO:** en una solución 2M de cloruro de calcio, incubar las muestras de piel durante 20 a 40 minutos a temperatura ambiente.

REFERENCIAS

1. Langerhans P: Uber die nerven der menschlichen haut. *Virchows Arch Pathol Anat* 44: 325-337, 1868.
2. Streilein JW: Lymphocyte traffic, T cell malignancies and the skin. *J Invest Dermatol* 71: 167-171, 1978.
3. Streilein JW: Skin-associated lymphoid tissue (SALT): Origins and functions. *J Invest Dermatol* 80, 12s-16s, 1983.
4. Luger TA, Kock A, Danner M: Production of distinct cytokines by epidermal cells. *Br J Dermatol* 113 (Suppl 28): 145-146, 1985
5. Streilein JW: Skin-associated lymphoid tissue. In Norris DA (ed). *Immune Mechanism in Cutaneous Disease*. Marcel Dekker Inc., New York, 1989, pages 73-94.
6. Tigelaar RE, Lewis JM, Bergstresser PR: TCR  $\gamma\delta$ + dendritic epidermal T cells as constituents of skin-associated lymphoid tissue. *J Invest Dermatol* 94 (suppl): 58S-63S, 1990.
7. Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW: Langerhans cells: sentinels of skin-associated lymphoid tissue. *J Invest Dermatol* 75: 78-82,
8. Skin-associated lymphoid tissue in human immunodeficiency virus-1, human papillomavirus, and herpes simplex virus infections. *J Invest Dermatol* 105: 99S-104S, 1995.
9. Bos JD, Kapsenberg ML: The skin immune system: its cellular constituents and their interactions. *Immunol Today* 7: 235-240, 1986.
10. Bos JD, Kapsenberg ML: The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today* 14: 75-78, 1993.
11. Bos JD, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, van der Loos CM, Kapsenberg ML: The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol* 88, 569-573, 1987.
12. Bos JD, Hagenaars Ch, Das PK, et al.: *Arch Dermatol Res* 281: 23-30, 1989.
13. Luger TA: The skin associated immune system. *Path Biol* 42: 81-82, 1994.
14. Smolle J, Ehall R, Kerl H: Inflammatory cell types in normal human epidermis: an immunohistochemical and morphometric study. *Acta Derm Venereol* 65: 479-483, 1985.
15. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB: Human lymphocytes bearing T cell receptor  $\alpha\beta$  are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 169: 1277, 1989.
16. Foster CA, Yokozeki H, Rappeersberger K, Koning F, Volc-Platzer B, Coligan JE, Wolff K, Stingl G: Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing  $\alpha\beta$  T cell receptor. *J Exp Med* 171: 976, 1990.
17. Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC: *Am J Pathol* 136: 1053-1068, 1990.
18. Bos JD, Tibosch E, De Boer OJ, Das PK, Pals ST. *J Invest Dermatol* 98: 545a, 1992.
19. Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 349: 796-799, 1991.
20. Mackay ChR. *Nature* 349: 737-738, 1991.
21. Bergstresser PR, Tigelaar RE, Dees JH, Streilein JW: Thy-1 antigen-bearing dendritic cells populate murine epidermis. *J Invest Dermatol* 81: 286-288, 1983.
22. Tschachler E, Schuler G, Hutterer J, Ieibl H, Wolff K, Stingl G: Expression of Thy-1 antigen by murine epidermal cells. *J Invest Dermatol* 81: 282-285, 1983.
23. Havran WL, Allison JP: Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* 335: 443-445, 1988.
24. Ito K, Bonneville M, Takagaki Y, Haas W, Nakanishi N, Kanagawa O, Krecko EG,

- Tonegawa S: Different gd T-cell receptors are expressed on thymocytes at different stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 631-635, 1989.
25. Lafaille JJ, DeCloux A, Bonneville M, Takagaki Y, Tonegawa S: Junctional sequences of T cell receptor gd genes: implications for gd T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59: 859-870, 1989.
  26. Havran WL, Allison JP: Origin of Thy-1 dendritic epidermal cells of adult mice from fetal thymic precursors. *Nature* 344: 68-70, 1990.
  27. Payer E, Elbe A, Stingl G: Circulating CD3+/T cell receptor Vg3+ fetal murine thymocytes home to the skin and give rise to proliferating dendritic epidermal T cells. *J Immunol* 146: 2436-2543, 1991.
  28. Stingl G, Koning F, Yamada H, Yokoyama WM, Tschachler E, Bluestone JA, Steiner G, Samelson LE, Lew AM, Coligan JE, Shevach EM: Thy-1+ epidermal cells express T3 antigen and the T cell receptor g chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4586-4590, 1987.
  29. Asarnow DM, Kuziel WA, Bonyhadi M, Tigelaar RE, Tucker PW, Allison JP: Limited diversity of gd antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Cell* 55: 837-847, 1988.
  30. Havran WA, Poenie M, Tigelaar RE, Tsien RY, Allison JP: Phenotype and functional analysis of gd T cell receptor-positive murine dendritic epidermal clones. *J Immunol* 142: 1422-1428, 1989.
  31. Tigelaar RE, Lewis JM: Immunobiology of mouse dendritic epidermal T cells: A decade later, some answers, but still more questions. *J Invest Dermatol* 105: 43S-49S, 1995.
  32. Dupuy P, Heslan M, Fraitag S, Hercend T, Dubertret L, Bagot M: T-cell receptor-gd bearing lymphocytes in normal and inflammatory human skin. *J invest Dermatol*. 94: 764-768, 1990.
  33. Luger T, Schwarz t: Epidermal cell derived secretory regulins. In *Langerhans cells*, G Schuler (ed), CRC Press, Boca Raton, pages, 218-251, 1990.
  34. Ansel JC, Luger TA, Lowry D, Perry P, Roop DR, Mountz JD. The expression and modulation of IL-1a in murine keratinocytes. *J Immunol* 140: 2274- , 1988.
  35. Kupper TS, Ballard D, Chua AO, McGuire JS, Flood P, Horowitz MC, Langdon R, Lightfoot L, Gubler U: Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 mRNA. *J Exp Med* 164: 2095, 1986.
  36. Luger TA, Stadler BM, Luger BM, Mathieson BJ, Mage M, Schmidt JA, Oppenheim JJ: Murine epidermal cell derived thymocyte activating factor resembles murine interleukin 1. *J Immunol* 128: 2147, 1983.
  37. Luger TA, Köck A, Kirnbauer R, Schwarz T, Ansel JC: Keratinocyte interleukin 3 production. *Ann NY acad Sci* 548: 253- , 1988.
  38. Kirnbauer R, Köck A, Schwarz T, Urbanski A, Krutmann J, Borth W, Ansel JC, Luger TA: Interferon b2, B-cell differentiation factor 2, hybridoma growth factor (interleukin 6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. *J immunol* 142: 1922-, 1989.
  39. Kupper TS, Horwitz M, Lee F, Coleman D, Flood P: Molecular characterization of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 88: 501A, 1987.
  40. Akhurst RJ, Fee F, Balmain A: Localized production of TGF-b mRNA in tumor promotor-stimulated mouse epidermis. *Nature* 331: 363, 1988.
  41. Kupper TS, Lee F, Coleman D, Chodakewitz J, Flood P, Horowitz M. Keratinocyte derived T-cell growth factor (KTGF) is identical to granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *J Invest Dermatol* 91: 185-; 1988.
  42. Langdon RC, Halaban R, McGuire J: Cultured human keratinocytes produce mRNA for basic fibroblast growth factor (bFGF). *Clin Res* 36, 1988.
  43. Spriggs D, Imamura K, Rodriguez C, Horiguchi J, Kufe DW: Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc. Natl Acad Sci USA* 84: 6563-, 1987.

44. Oxholm A, Oxholm P, Staberg B, Bendtzen K: Immunohistological detection of interleukin 1-like molecules and tumor necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo. *Br J Dermatol* 118: 369-, 1988.
45. Coffey RJ, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR: Production and autoinduction of transforming growth factor- $\alpha$  in human keratinocytes. *Nature* 328: 817-, 1987.
46. Gottlieb AB, Chang GK, Posnett DN, Fanelli B, Tam JP: Detection of transforming growth factor- $\alpha$  in normal, malignant, and hyperproliferative human keratinocytes. *J Exp Med* 167: 670-, 1988.
47. Robertson B, Gahring L, Newton R, Daynes R: In vivo administration of interleukin 1 to normal mice depresses their capacity to elicit contact hypersensitivity responses: prostaglandins are involved in this modification of immune function. *J Invest Dermatol* 88: 380-387, 1987.
48. Yoshikawa T, Kurimoto I, Streilein JW: Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity. *Immunology* 76: 264-271, 1992.
49. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI: An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 $\beta$  in the initiation of primary immune responses in skin. *J Immunol* 150: 1698-1704, 1993.
50. Dejana E, Brevario F, Erroi A, Bussolino F, Mussoni L, Grmase M, Pintucci G, Casali B, Dinarello CA, vanDamme J, Mantovani: Modulation of endothelial cell function by different molecular species of interleukin-1. *Blood* 69:695, 1987.
51. Mizel SB: Interleukin 1 and T-cell activation. *Immunol Today* 8: 330-332 1987.
52. Kupper T, May L, Birchall N, Sehgal P: Keratinocyte produce interleukin 6, a cytokine which can provide the 2nd signal in the activation of T cells. *J Invest Dermatol* 90: 578, 1988.
53. Miossec P, Yu CL, Ziff M: Lymphocyte chemotactic activity of human interleukin 1. *J Immunol* 133: 2007, 1984.
54. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K: The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T-lymphocytes. *Science* 243: 1464, 1989.
55. Heufler C, Köck F, Schuler G: Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 167: 700-705, 1988.
56. Kagnoff MF: Mucosal immunology: new frontiers. *Immunology Today*, Febrero de 1996.
57. Maric I, Holt P, Perdue M, Bienenstock J: Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *J Immunol* 156: 1408-1414, 1996.
58. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, van Breda PJC, Sminia T: The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 13: 219-223, 1992.
59. Pabst R. Is BALT a major component of the human lung immune system? *Immunol Today* 13: 119-121, 1992.
60. Weidmann A: Studien über das neurohormonale System der menschlichen Haut, *Acta Neuroveg*, 3: 354-372, 1951.
61. Ferreira-Marquez J: Systema sensitivum intra-epidemicum. Die Langerhansschen Zellen als Rezeptoren des Hellen Schmelers: Doloriceptors. *Arch Dermatol Syph Wien* 193: 191-250, 1951.
62. Richter R: Studien zur Neurohistologie der nervosen vegetativen peripherie der Haut bei nerschiedenen chronischen infektiösen granulomen mit besonderer Deruchsiktigung der Langerhansschen Zellen. I to IV, *Arch Kin Exp Dermatol* 202: 468-555, 1956.
63. Masson P: Pigment cells in man. In: *The Biology of the melanosome* (M. Gordon, ed.) *Spec Publ NY Acad Sci* 4: 15-51, 1948.

64. Zelickson AS: The Langerhans cell. *J Invest Dermatol* 44: 201-212, 1965.
65. Zelickson AS: Granule formation in the Langerhans cell. *J Invest Dermatol* 47: 498-499, 1969.
66. Silvers WK: An histological and experimental approach to determine the relationship between gold impregnated dendritic cells and melanocytes. *Am J Anat* 100: 225-240, 1957.
67. Breathnach AS, Silver WK, Smith S, Heyner S: Langerhans cell in mouse skin experimentally deprived of its neural crest component. *J Invest Dermatol* 50: 147-160, 1968.
68. Katz SI, Tamaki K, Sachs D: Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282: 324-326, 1979.
69. Frelinger GJ, Hood L, Hill S, Frelinger JA: Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* 282: 321-324, 1979.
70. Frelinger JA, Frelinger JG: Bone marrow origin of Ia molecules purified from epidermal cells. *J Invest Dermatol* 75: 68-70, 1980.
71. Volc-Platzer B, Stingl G, Wolff K, Hinterberger W, Schnedl W: Cytogenetic identification of epidermal Langerhans cells in a bone-marrow-graft recipient. *New Engl J Med*. 310: 1123-1124, 1984.
72. Goordyal P, 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.
73. Gothelf Y, Sharon N, Gazit E: Fractionation of human bone marrow mononuclear cells with peanut agglutinin: phenotypic characterization with monoclonal antibodies. *Human Immunol* 17: 37-44, 1986.
74. Gothelf Y, Sharon N, Gazit E: a subset of human cord blood mononuclear cells is similar to Langerhans cells of the skin: a study with peanut agglutinin and monoclonal antibodies. *Hum immunol* 15: 164-174, 1986.
75. De Fraissinette A, Schmitt D, Dezutter-Dambuyant C, Guyotat D, Zabot MY, Thivolet J: Culture of putative Langerhans cell bone marrow precursors: characterization of their phenotype. *Exp Hematol* 16: 764-768, 1988.
76. Murphy G, Messadi D, Fonferko E, Hancock W: Phenotypic transformation of macrophages to Langerhans cells in skin. *Am J Pathol* 123: 401-406, 1986.
77. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 176: 1693-1702, 1992.
78. Scheicher C, Mehlig M, Zecher R, Reske K: Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods* 154: 253-264, 1992.
79. Inaba K, Steinman RM, Witmer Pack M, Aya H, Inaba M, Sudo T, Wolpe S, Schuler G: Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 175: 1157-1167, 1992.
80. Reid C, et al: Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood* 76: 1139-1149, 1990.
81. Egner W, Mckenzie JL, Smith SM, Beard MEJ, Hart DNJ, identification of potent mixed leukocyte reaction-stimulatory cells in human bone marrow. putative differentiation stage of human blood dendritic cells. *J Immunol* 150: 3043-3053, 1993.
82. Santiago-Schwarz F, Belilos E, Diamond B, Carsons SE: TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells and macrophages. *J Leuk Biol* 52: 274-281, 1992.
83. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J: GM-CSF and TNF $\alpha$  cooperate in generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261, 1992.
84. Rosenzweig M, Canque B, Gluckman JC: Human dendritic cell differentiation pathway from CD34+ hemopoietic precursor cells. *Blood* 87: 535-544, 1996.

85. Breathnach AS: The cell of Langerhans. *Int Rev Cytol* 18: 1-28, 1975.
86. Zelickson A, Mottaz J: Localization of gold chloride and adenosintriphosphatase in human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 51: 365-372, 1968.
87. Niebauer G, et al: Osmium zinc iodide reactive sites in the epidermal Langerhans cell. *J Cell Biol* 43: 80-89, 1969.
88. Rodríguez E, Caorsi I: A second look at the ultrastructure of the Langerhans cell of the human epidermis. *J Ultrastruc Res* 65: 279-295, 1978.
89. Elleder M: Activity of  $\alpha$ -D-mannosidase in human langerhans epidermal cells. *Virchows Arch B Cell Path* 19: 93-96, 1975.
90. Khalil hM, Nitiuthai S, Allen J: Alkaline phosphatase-positive Langerhans cells in the epidermis of cattle. *J Invest Dermatol* 79: 47-51, 1982.
91. Gschnait F, Brenner W: kinetics of epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 73: 566-569, 1979.
92. 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.
93. Lyne AG, Chase HB: Branched cells in the epidermis of the sheep. *Nature* 209: 1357-1358, 1966.
94. 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.
95. Mustakallio K: Adenosine triphosphatase activity in neural elements of human epidermis. *Exp Cell Res* 28: 449-451, 1962.
96. Jarret A, Riley PA: Esterase activity in dendritic cells. *Br J Dermatol* 75: 79-81, 1962.
97. Wolff K, Winkelmann RK: Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 48: 50-54, 1967.
98. Mackenzie IC, Squier CA: Cytochemical identification of ATPase-positive Langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. *Br J. dermatol* 92: 523-533, 1975.
99. Robins PG, Brandon DR: A modification of the adenosine triphosphatase method to demonstrate epidermal Langerhans cell. *Stain Tech* 56: 87-89, 1981.
100. Lynch DH, Gurish MF, Daynes RA: Relationship between epidermal Langerhans cell density, ATPase activity and the induction of contact hypersensitivity. *J Immunol* 126: 1892-1897, 1981.
101. Riley PA: Esterase in epidermal dendritic cells of the mouse: study of the histochemical properties and distribution of activity of the enzyme in relation to patterning in the tail. *Br. J Dermatol* 78: 388-397, 1966.
102. Campo-Aasen I, Pearse AGE: Enzimología de las células de Langerhans. *Med Cut* 1: 37-44, 1966.
103. Maruyama T, Uda H, Yokoyama M: Localization of non-specific esterase and endogenous peroxidase in the murine Langerhans cells. *Br J Dermatol* 103: 61-66, 1980.
104. Jaubert F, Barbey s, Nogues C, Monnet JP, Grun M, Nezelof C: Histiocyte X positivity for nonspecific esterase. *J Histochem Cytochem* 28: 45-46, 1980.
105. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility complex. *Nature* 329: 512-518, 1987.
106. Doyle C, Strominger JL: Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330: 256-259, 1987.
107. Norment AM, Salter RD, Parham P, engelhard VH, Littman DR: Cell-cell adhesion mediated by CD8 and class I molecules. *Nature* 336: 79-81, 1988
108. Acolia RS, Adorini L, Sartoris S, Sinigaglia F, Guardiola J; MHC: orchestrating the immune response. *Immunol Today* 16: 8-11, 1995.



109. Bronstein BR, Murphy GF, Harrist TJ, Ruitter DJ, Mihm MC, Bhan AK: Location of HLA-A,B,C antigens in dendritic cells of normal human skin: an immunoelectron microscopic study. *J Invest Dermatol* 80: 481, 1983.
110. Staquet MJ, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D: Reactivity patterns of the panel of antibodies for clustering in the T cell section in normal human skin (keratinocytes and Langerhans cells). *Tissue Antigens* 33: 121, 1989.
111. Gielen V, Schmitt D, Thivolet J: HLA class I antigen (heavy and light chain) expression by Langerhans cells and keratinocytes of the normal human epidermis: ultrastructural quantification using immunogold labeling procedure. *Arch Dermatol Res* 280: 131, 1988.
112. Rowden G, Lewis MG, Sullivan AK: Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268: 247-248, 1977.
113. Klareskog L, Malmnas-Tjertlund U, forsum U, Peterson PA: Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268: 248-249, 1977.
114. Kaufman JF, Aufray C, Korman AJ, Shakleford DA, Strominger J: The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex *Cell* 36: 1, 1984.
115. Sontheimer RD, Stastny P, Nunez G: HLA-D region antigen expression by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 87: 707-710, 1986.
116. Murphy GF, et al: Ultrastructural documentation of HLA-DR antigen reactivity in normal human acrosyringeal epithelium. *J Invest Dermatol* 81: 181, 1983.
117. Auböck J, et al: HLA-DR expression on keratinocytes is a common feature of diseased skin. *Br j Dermatol* 114: 465-472, 1986.
118. Dezutter-Dambuyant C, Cordier G, Schmitt D, Faure M, laquoi C, Thivolet J: Quantitative evaluation of two distinct cell populations expressing HLA-DR antigens in normal human epidermis. *Br J Dermatol* 111: 1-11, 1984.
119. Romani N, Lenz A, Glassel H, Stössel H, Stanzl U, Majdic O, Fritsch P, Schuller G: Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 93: 600-609, 1989.
120. Bjercke S, Gaudernack G, Braathen LR: Enriched Langerhans cells express more HLA-DR determinants than blood-derived adherent cells (monocytes and macrophages). *Scan J Immunol* 21: 489-492, 1985.
121. Fithian E, Kung p, Goldstein G, Rubenfeld M, Fenoglio, Edelson R: Reactivity of Langerhans cells with hibridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci* 78: 2541-2544, 1981.
122. Murphy GF, Bahn AK, Sato S, Mihm MC, Harrist TJ: A new immunologic marker for human Langerhans cells. *New England J Med* 304: 791-792, 1981.
123. Reinherz EL, Sclossman SF: The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19: 821, 1980.
124. Calabi F, Jarvis JM, Martin L, Milstein C: Two classes of CD1 genes. *Eur J Immunol* 19: 285-292, 1989.
125. Amiot M, Bernard A, Raynal B, Knapp W, Desclidre C, Boumsell L: Heterogeneity of the first cluster of differentiation: characterization and epitopic mapping of three CD1 molecules on normal human thymus cells. *J Immunol* 136: 1752, 1986.
126. Knowles RW, Bodmer WF: A monoclonal antibody recognizing a human thymus leukemia-like antigen associated with b2-microglobulin, *Eur J Immunol* 12: 676, 1982.
127. Lerch PG, van de Rijn M, Schrier P, Terhosrt C: Biochemical comparison of the T6 antigen and HLA A,B, antigens. *Human Immunol* 6: 13-30, 1983.
128. Schmitt D, Dezutter-Dambuyant C, Brochier J, Thivolet J: Subclustering of CD1 monoclonal antibodies based on the reactivity on human Langerhans cells. *Immunol Lett* 12: 231-235, 1986.
129. Ashworth J, Kahan MC, Breatnach SM: Flow cytometric analysis and sorting of HLA-DR<sup>+</sup>

- CD1<sup>+</sup> Langerhans cells. *Br J Dermatol*; 114: 11-18, 1989.
130. Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhosh C, Bleicher PA: Recognition of Cluster of differentiation 1 antigens by human CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes. *Nature* 341: 447-450, 1989.
131. Groh V, Fabbi M, Hochstenbach F, Maziarz RT, Strominger JL: Double negative (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) lymphocytes bearing T-cell receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chains in normal human skin. *Proc Natl Acad. Sci* 86: 5059-5063, 1989.
132. Wood GS, Warner NL, Warnke RA: Anti-Leu3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans cell lineage. *J Immunol* 131: 212-216, 1983.
133. de Panfilis G, Manara GC, Ferrari C, Torresani C: Simultaneous colloidal gold immunoelectronmicroscopy labeling of CD1a, HLA-DR, and CD4 surface antigens of human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 91: 547-552.
134. Matthews JB, Scully CM, Potts AJC: Oral lichen planus: an immunoperoxidase study using monoclonal antibodies to lymphocyte subsets. *Br J Dermatol* 111: 587-595, 1984.
135. Groh V, Tani M, Harrer A, Wolff K, Stingl G: Leu3/T-4 expression on epidermal Langerhans cells in normal and diseased skin. *J Invest Dermatol* 86: 115-120, 1986.
136. Tschachler E, Groh V, Popovic M, Mann DL, Konrad K, Safai B, Eron L, diMarzo Veronese F, Wolff K, Stingl G: Epidermal Langerhans cells - a target for HTLV-III/LAV infection. *J Invest Dermatol* 88: 233, 1987.
137. Rappersberger K, Gatner S, Schenk P, Stingl G, Groh V, Tschachler E, Mann E, Wolff K, Konrad K, Popovic M: Langerhans cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirology* 29: 185, 1988.
138. Braathen LR, Ramirez G, Kunze ROF, Gelderblom H: Langerhans cells as primary target cells for HIV infection. *Lancet*, ii, 1094, 1987.
139. Zambruno G, Gianetti A, Bertazzoni U, Girolomoni G: Langerhans cells and HIV infection. *Immunol Today* 16: 520, 1995.
140. van Voorhis WC, Steinman RM, Hair LS, Luban J, Witmer MD, Koide S, Cohn ZA: Specific antimononuclear phagocyte monoclonal antibodies. Application to the purification of dendritic cells and the tissue localization of macrophages. *J Exp Med* 158: 126, 1983.
141. Hsu SM, Yang K, Jaffe ES: Phenotypic expression of Hodgkin's and Reed-Stenberg cells in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 118: 209, 1985.
142. de Fraissinette A, Dezutter-Dambuyant C, Staquet MJ, Schmitt D, Thivolet J: Epidermal Langerhans cells and cord blood monocyte-like CD1a-positive cells express specific myelomonocytic membrane markers: CD14 and CD33. *J Invest Dermatol* 92: 429A, 1989.
143. Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Knapp W, Wolff K: Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268: 245-246, 1977.
144. Teunissen MBM, Wormmeester J, Krieg SR, Peters PJ, Kapsenberg ML, Bos JD: Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphologic and phenotypical changes during in vitro culture. *J Invest Dermatol* 94: 166, 1990.
145. Schmitt DA, Hanau D, Bieber T, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Fabre M, Pauly G, Cazenave JP: Human epidermal Langerhans cells express only the 40-kilodalton Fc $\gamma$ R (FcRII). *J Immunol* 144: 4284, 1990.
146. Wood GS, Turner RR, Shiurba RA, Eng L, Warnke RA: Human dendritic cells and macrophages. In situ immunophenotype definition of subsets that exhibit specific morphologic and microenvironmental characteristics. *Am J Pathol* 119: 73, 1985.
147. Astier A, de la Salle H, de la Salle C, Bieber T, Esposito-Farese ME, Freund M, Cazenave JP, Fridman WH, Tellaud JL, Hanau D: Human epidermal Langerhans cells secrete a soluble receptor for IgG (Fc $\gamma$ R/CD32) that inhibits the binding of immune complexes to Fc $\gamma$ R<sup>+</sup> cells. *J Immunol* 152: 201, 1994.
148. Bruynzeel-Koomen C, Van Wichen DF, Toonstra J, Berrens L, Bruynzeel PLB: The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic

- dermatitis. Arch Dermatol Res 278: 199, 1986.
149. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, de la Salle C: Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI). J Exp Med 175: 1285, 1992.
  150. Grabbe J, Haas N, Haman K, Kolde G, Hakimi J, Czarnetzki BM: Demonstration of the high affinity-IgE receptor on human Langerhans cells in normal and diseased skin. Br J Dermatol 129: 120, 1993.
  151. Jürgens M, Wollenberg A, Hanau D, de la Salle H, Bieber T: Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, FcεRI. J Immunol 155: 5184, 1995.
  152. Bieber T, Rieger A, Neuchrist C, Prinz JC, Rieber EP, Bolz-Nitulescu G, Scheiner O, Kraft D, Ring J, Stingl G: Induction of FcεR2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant interleukin 4 and γ interferon. J Exp Med 170: 309, 1989.
  153. Wollenberg A, de la Salle H, Hanau D, Liu FT, Bieber T: Human keratinocytes release the endogenous b-galactoside-binding soluble lectin immunoglobulin E (IgE-binding protein) which binds to Langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms. J Exp Med 178: 777, 1993.
  154. Mudde GC, Bheeka R, Bruynzeel-Koomen C: Consequences of IgE/CD23-mediated antigen presentation in allergy. Immunol Today 16: 380, 1995.
  155. Van der Heijden FL, Van Nøerven RJJ, Van Katwijk M, Bos JD, Kapsenberg ML: Serum-IgE-facilitated allergen presentation in atopic disease. J Immunol 150: 3643, 1993.
  156. Teunissen MBM, Wormmeester J, Rongen HAH, Kapsenberg ML, Bos JD: Conversion of human epidermal Langerhans cells into interdigitating cells *in vitro* is not associated with functional maturation. Eur J Dermatol 1: 45-54, 1991.
  157. Teunissen MBM, Rongen HAH, Bos JD: Function of adhesion molecules lymphocyte function-associated antigen-3 and intercellular adhesion molecule-1 on human epidermal Langerhans cells in antigen-specific T cell activation. J Immunol 152: 3400-3406, 1994.
  158. Acevedo A, Del Pozo MA, Arroyo AG, Sánchez-Mateos P, González-Amaro R, Sánchez Madrid F: Distribution of ICAM-3-bearing cells in normal human tissues. A novel counter-receptor for LFA-1 in epidermal Langerhans cells. Am J Pathol 143: 774-783, 1993.
  159. Teunissen MBM, Koomen CW, Bos JD: Intercellular adhesion molecule-3 (CD50) on human epidermal Langerhans cells participates in T-cell activation. J Invest Dermatol 104: 995-998, 1995.
  160. Girolomoni G, Zambruno G, Manfredini R, Zacchi V, Ferrari S, Cossarizza A, Gianetti A: Expression of B7 costimulatory molecule in cultured human epidermal Langerhans cells is regulated at the mRNA level. J Invest Dermatol 103: 54-59, 1994.
  161. Vandenberghe P, Delabie J, de Boer M, de Wolf-Peeters C, Ceuppens JL: In situ expression of B7/BB1 on antigen-presenting cells and activated B cells: an immunohistochemical study. Int Immunol 5: 317, 1993.
  162. Symington FW, Brady W, Linsley PS: Expression and function of B7 on human epidermal Langerhans cells. J Immunol 150, 1286, 1993.
  163. Staquet MJ, et al: A surface glycoprotein complex related to the adhesive receptors of the VLA family, shared by epidermal Langerhans cells and basal keratinocytes. J Invest Dermatol 92: 739, 1989.
  164. Le Varlet B, et al: Human epidermal Langerhans cells express integrins of the β1 subfamily. J Invest Dermatol 96: 518, 1991.
  165. Blauvelt A, Katz SI, Udey MC: Human Langerhans cells express E-cadherin. J Invest Dermatol 104: 293-296, 1995.
  166. Tabata N, et al: Sialyl Lewis x expression on human Langerhans cells. J Invest Dermatol 101: 175, 1993.
  167. Koszik F, et al: Expression of monoclonal antibody HECA-452-defined E-selectin

- ligands on Langerhans cells in normal and diseased skin. *J Invest Dermatol* 102: 773-780, 1994.
168. Zhou LJ, et al: A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 149: 735, 1992.
169. Wood GS, et al: Langerhans cells react with pan-leukocyte monoclonal antibody: ultrastructural documentation using a live cell suspension immunoperoxidase technique. *J Invest Dermatol* 82: 322, 1984.
170. Bieber T, et al: Characterization of the protein tyrosine phosphatase CD45 on human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 98: 317, 1995.
171. Richters CD, et al: Isolation and characterization of migratory human skin dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 98: 330, 1994.
172. Bieber T, et al: CD69, an early activation antigen on lymphocytes, is constitutively expressed by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 98: 771, 1992.
173. Cocchia D, Michetti F, Donato R: immunochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 294: 85, 1981.
174. Rowden G, Boudreau S, Higley H: Langerhans cells and extra-epidermal dendritic cells, an investigation in laboratory animals and man with immunomorphological methods. *Scand J Immunol* 21: 471, 1985.
175. Wen DR, Bhuta S, Herschman HR, Gaynor RB, Cochran AJ: S-100 protein: a marker for melanocytic tumors. *Ann NY Acad Sci* 487: 261, 1990.
176. Takahashi K, et al: Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system. *Am J Pathol* 116: 497, 1984.
177. Weinberg DS, Pinkus GS, Murphy GF: Tonsillar epithelial dendritic cells: demonstration by lectin binding, immunohistochemical characterization, and ultrastructure. *Lab Invest* 56: 622, 1987.
178. Kligman D, Hilt DC: The S-100 protein family. *Trends Biochem Sci* 13: 437, 1988.
179. 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, 1986.
180. Swiggard WJ, et al: DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the antibody NLDC-145: Purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cell Immunol* 165: 302, 1995.
181. Inaba K; et al: Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. 1a. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse lymphocytes. *Cell Immunol* 163: 148, 1995.
182. Witmer-Pack MD, et al: Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell Immunol* 163: 157, 1995.
183. Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD: An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37, 51-64, 1961.
184. Breathnach AS: Ultrastructural morphology of Langerhans cells of normal human epidermis, in *The epidermis in disease*, Marks R and Christophers E, Eds., MTP Press, Lancaster, 1981, 501.
185. Wolff K: The fine structure of the Langerhans cells granule. *J Cell Biol* 35: 466, 1967.
186. Sagebiel RW, Reed TH: Serial reconstruction of the characteristic granule of the Langerhans cell. *J Cell Biol* 36, 595, 1968.
187. Caputo R, Peluchetti D, Monti M: Freeze-fracture of Langerhans granules. A comparative study. *J Invest Dermatol* 68, 297-301, 1976.
188. Rodríguez EM, Caorsi I: A second look at the ultrastructure of the Langerhans cell of the human epidermis. *J Ultrastruct Res* 65: 279, 1978.

Caracterización de células de Langerhans en anfibios

189. Runge W, Young B, Zelickson AS: Optical transforms of epidermal Langerhans' cell granules. *J Invest Dermatol* 77: 421-429, 1981.
190. Lindeberg M, Hebert J, Forslind B: Periodic structures in the Langerhans cell: an optical diffraction study. *Acta Dermatovener* 59: 356, 1979.
191. Falck B, Andersson A, Elofsson R, Sjöberg S: New views on epidermis and its Langerhans cells in the normal state and in contact dermatitis. *Acta Derm Venereol* 99 (Suppl): 3, 1981.
192. Plattner H, Bachmann L: Cryofixation: a tool in biological ultrastructural research. *Int Rev Cytol* 79: 237, 1982.
193. Stössel H, Koch F, Kämpgen E, Stöger P, Lenz A, Heuffer C, Romani N, Schuler G: Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 172: 1471-1482, 1990.
194. Wolff K: The Langerhans cell. *Curr Probl Dermatol* 4: 79, 1972.
195. Rowden G: The Langerhans cell. *Crit Rev Immunol* 3: 95, 1981.
196. Cancilla P: Demonstration of Langerhans granules by lanthanum. *J Cell Biol* 38: 248-252, 1968.
197. Schuler G, Romani N, Stingl G, Wolff K: Coated Langerhans cell granules in histiocytosis X cells. *Ultrastruct Pathol* 5: 77, 1983.
198. Pearse BM: Coated vesicles. *Trends Biochem Sci* 5: 131, 1980.
199. Ockleford CD, Whyte A: Coated vesicles, Cambridge University Press, Cambridge, 1980.
200. Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS: Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279, 679, 1979.
201. Pearse BMF, Bretscher MS: Membrane recycling by coated vesicles. *Annu Rev Cell Biol* 50: 85, 1981.
202. Rothman JE, Fine RE: Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 780, 1980.
203. Ishii M, Terao Y, Kitajima J, Hamada T: Sequential production of Birbeck granules through adsorptive pinocytosis. *J Invest Dermatol* 82: 28, 1984.
204. Takahashi S, Hashimoto K: Derivation of Langerhans cell granules from cytomembrane. *J Invest Dermatol* 80: 345, 1983.
205. 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.
206. Breathnach A: Observations on cytoplasmic organelles in Langerhans cells of human epidermis. *J Anat* 99: 265-270, 1964.
207. Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Garaud JC, Pauly G, Tongio M, Mayer S, Cazenave JP: Human epidermal Langerhans cells cointernalize by receptor-mediated endocytosis "non-classical" major histocompatibility complex class I molecules (T6 antigens) and class II molecules (HLA-DR antigens). *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2901-2905, 1987.
208. Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Satmpf JL, Garaud JC, Bieber T, Grosshans E, Benezra C, Cazenave JP: Human epidermal Langerhans cells internalize by receptor-mediated endocytosis T6 (CD1 "NA1/34") surface antigen. Birbeck granules are involved in the intracellular traffic of the antigen. *J Invest Dermatol* 89: 172, 1987.
209. Dunn WA, Hubbard AL, Avonson NN: Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytic vesicles and lysosomes during heterophagy of <sup>125</sup>I-asiolofetuin by the perfused liver. *J Biol Chem* 255, 5971, 1980.
210. Marsh M, Griffiths G, Dean GE, Mellman L, Helenius A: Three-dimensional structure of endosomes in BHK-21 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2899, 1986.

211. Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Garaud JC, Pauly G, Cazenave JP: Appearance of Birbeck granules-like structures in anti-T6 antibody-treated human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 90: 298, 1988.
212. Kashihara M, Ueda M, Horiguchi Y, Furukawa F, Hanaoka M, Imamura S: A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 87: 602, 1986.
213. Elofsson R, Andersson A, Faick B, Sjöberg S: Evidence for endocytic mechanisms in the epidermal Langerhans cells. *Acta Dermatovener (Suppl)* 99: 29, 1981.
214. Kolde G, Knop J: Different cellular reaction patterns of epidermal Langerhans cells after application of contact sensitizing, toxic, and tolerogenic compounds. A comparative ultrastructural and morphometric time-course analysis. *J Invest Dermatol* 89: 19, 1987.
215. Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Lepoittevin JP, Stampf JL, Grosshans E, Benezra C, Cazenave JP: ATPase and morphologic changes in Langerhans cells induced by epicutaneous applications of a sensitizing dose of DNFB. *J Invest Dermatol* 92: 689-694, 1989.
216. Hanau D, et al: La formation des granules de Langerhans semble liee a l'activite ATPasique membranaire de cellules de Langerhans epidermiques. *CR Acad SC Paris* 301: 167-172, 1985.
217. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livinstone AM, Fathman CG, Inaba K, Steinman RM: Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: intact protein is presented best by immature epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 169: 1169, 1989.
218. Anderson RGW, Falck JR, Goldstein JL, Brown MS: Visualization of acidic organelles in intact cell by electronmicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 4338, 1984.
219. Ranvier L: *Traité technique d'histologie*. Savy ed., Paris 1875.
220. Arnstein SB: Die nerven bei behaarten haut. *Acad Wiss Wein Math-Nat Kl* 74: 203, 1876.
221. Herxheimer K: Über pemphigus vegetans nebst bemerkungen über die natur der Langerhansschen zellen. *Arch Derm Syph (Berlin)* 36: 140, 1896.
222. Billingham RE, Silvers WK: Some unsolved problems in the biology of skin. In *Biology of the skin and hair growth*. Lyne AG and Short BF eds. Angus & Robertson, Sydney, 1965.
223. Prunieras M: Interactions between keratinocytes and dendritic cells. *J Invest Dermatol* 52: 1-17, 1969.
224. Silberberg I: Ultrastructural studies of Langerhans cells in contact-sensitive and primary irritant reactions to mercuric chloride. *Clin Res* 19: 715 (Abst), 1971.
225. Silberberg I: Studies by electron microscopy in epidermis after topical application of mercuric chloride: morphologic and histochemical findings in epidermal cells of human subjects who do not show allergic of primary reactions to mercuric chloride (0.1%). *J Invest Dermatol* 56: 147-160, 1971.
226. Silberberg I: Apposition of the mononuclear cells to Langerhans cells in contact allergic reactions. An ultrastructural study. *Acta Dermatovener (Stockh)* 53:1-12, 1973.
227. Unanue ER, Allan PM: The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236: 551, 1987.
228. Clement LT, Shevach EM: Characterization of MHC antigens on TNP-modified cells. *Mol Immunol* 16: 67, 1979.
229. Sinigaglia F: The molecular basis of metal recognition by T cells. *J Invest Dermatol* 102: 398, 1994.
230. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425, 1990.
231. Geppert TD, et al: Accessory cells signals involved in T-cell activation. *Immunol Rev* 117: 5, 1990.
232. Jenkins MK: The role of cell division in the induction of clonal anergy. *Immunol Today* 13: 69, 1992.
233. Trinchieri G: Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol Today* 14: 335, 1993.

234. Streilein JW, et al: Functional dichotomy between Langerhans cells that present antigen to naive and to memory/effector T lymphocytes. *Immunol Rev* 117, 159, 1990.
235. Péguet-Navarro J: Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 155, 4241, 1995.
236. Sauder DN, Dinarello CA, Morhenn VB: Langerhans cell production of interleukin-1. *J Immunol* 82: 605, 1984.
237. Schreiber S: Cytokine patterns of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures. *J Immunol* 149: 3525, 1992.
238. Kang K: IL-12 synthesis by human Langerhans cells. *J Immunol* 156: 1402, 1996.
239. Blauvelt A: Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes, Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and its down regulated by ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol* 106: 1047, 1996.
240. Stingl G, Katz SI, Clement L, Green I, Shevach E: Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 121: 2005-2013, 1978.
241. Braathen LR, Thorsby E: Studies on human epidermal Langerhans cells. I. Allo-activating and antigen presenting capacity. *Scand J Immunol* 11: 401-408, 1980.
242. Bjercke S, Elgo J, Braathen L, Thorsby E: Enriched epidermal Langerhans cells are potent antigen-presenting cells for T cells. *J Invest Dermatol* 83: 286-289, 1984.
243. Teunissen MBM, Wormmeester J, Kapsenberg ML, Bos JD: Enrichment of unlabeled human Langerhans cells from epidermal cell suspensions by discontinuous density gradient centrifugation. *J Invest Dermatol* 91: 358-362, 1988.
244. Hauser C, Katz SI: Activation and expansion of hapten and protein-specific T helper cells from nonsensitized mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5625-5628, 1988.
245. Pollack MS, Goldenhersh M, Chin-Louis J, Safai B: The function study of DR-positive human epidermal Langerhans cells in mixed cell cultures with allogeneic lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 24: 15-25, 1982.
246. Scheynius A, Grovnik Ko, Anderson J: Epidermal Langerhans cells as accessory cells in Con A stimulation of thymocytes in guinea pig. *Scand J Immunol* 17: 283-290, 1983.
247. Pehamberger H, et al.: Epidermal cell-induced generation of cytotoxic T-lymphocyte responses against alloantigens or TNP-modified syngeneic cells. Requirement for Ia-positive Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 81: 208-211, 1983.
248. Faure M, et al: Role of HLA-DR bearing Langerhans cells and epidermal indeterminate cells in the *in vitro* generation of alloreactive cytotoxic T cells in man. *Cell Immunol* 83: 271-279, 1984.
249. Steiner G, et al: Epidermal cells as accessory cells in the generation of allo-reactive and hapten-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. *J Immunol* 134: 736-741, 1985.
250. Braathen LR, Thorsby E: Studies on human epidermal Langerhans cells. IV: HLA-DR restriction of Langerhans cell-dependent antigen activation of T lymphocytes. *Scand J Immunol* 15: 55-61, 1982.
251. Sontheimer RD: The mixed epidermal cell-lymphocyte reaction. I. Human epidermal cells elicit a greater allogeneic lymphocyte response than do autologous peripheral blood lymphoid cells. *J Immunol* 130: 2612-2614, 1983.
252. Braathen LR, Thorsby E: Human epidermal Langerhans cells are more potent than blood monocytes in inducing some antigen-specific t-cell responses. *Br. J. Dermatol* 108: 139-146, 1983.
253. Räsänen L, et al: Human epidermal Langerhans cells and peripheral blood monocytes. Accessory cell function, autoactivity and alloactivity capacity and ETAF/IL-1 production. *Scand J Immunol* 24: 503-508, 1986.
254. Res P, et al: The crucial role of human dendritic antigen-presenting cell subsets in nickel-specific T-cell proliferation. *J Invest Dermatol* 88: 550-554, 1987.

255. Kapsenberg ML, et al: Nickel-specific T lymphocyte clones derived from allergic nickel-contact dermatitis lesions in man: heterogeneity based on requirement of dendritic antigen-presenting cell subsets. *Eur J Immunol* 17: 861-865, 1987.
256. Halliday GM, Muller HK: Langerhans cell presentation of sheep red blood cells induces antibody production. *Immunol Cell Biol* 65: 71-76, 1987.
257. Streilein JW, Longsberry LW, Bergstresser PR: Depletion of epidermal Langerhans cells and la immunogenicity from tape-stripped mouse skin. *J Exp Med* 155:863-871, 1982.
258. Rico MJ, Streilein JW: Comparison of alloimmunogenicity of Langerhans cells and keratinocytes from mouse epidermis. *J Invest Dermatol* 89: 607-610, 1987.
259. McKinney EC, Streilein JW: ON the extraordinary capacity of allogeneic epidermal Langerhans cells to prime cytotoxic T cells in vivo. *J Immunol* 143: 1560-1564, 1989.
260. Stingl G, Gazze-Stingl LA, Aberer W, Wolff K: Antigen-presentation by murine epidermal Langerhans cells and its alteration by ultraviolet B light. *J Immunol* 127, 1707, 1981.
261. Sauder DW, Tamaki K, Moshell AN, Fujiwara H, Katz SI. Induction of tolerance to topically applied TNP-conjugated UV-irradiated epidermal cells. *J Immunol* 127: 261, 1981.
262. Rheins LA, Nordlund JJ. Modulation of the population density of identifiable epidermal Langerhans cells associated with enhancement or suppression of cutaneous immune reactivity. *J Immunol* 136, 867-876, 1986.
263. Shelley WB, Juhlin L. Selective uptake of contact allergens by the Langerhans cell. *Arch Dermatol* 113: 187, 1977.
264. Botham PA, Rattray NJ, Walsh ST, Riley EJ. Control of the immune response to contact sensitizing chemicals by cutaneous antigen-presenting cells. *Brit J Dermatol* 117: 1-9, 1987.
265. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151, 1995.
266. Sallusto F, Cella M, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 289, 1995.
267. Picut CA, Lee CS, Lewis RM: Ultrastructural and phenotypic changes in Langerhans cells induced in vitro by contact allergens. *Br. J. Dermatol* 116: 773-784, 1987.
268. Silberberg-Sinakin I, Gigli I, Bear RL, Thorbecke GJ: Langerhans cells: role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages. *Immunol Rev* 53: 203-32, 1980.
269. Zhao B, Wang BH: Cytochemical and ultrastructural studies of the Langerhans cells. Sequential observations in experimental contact allergy reaction. *Int J Dermatol* 24: 653-659, 1985.
270. Weinlich G, Sepp N, Koch F, Schuller G, Romani N: Evidence that Langerhans cells rapidly disappear from the epidermis in response to contact sensitizers but not to tolerogens/nonsensitizers. *Arch Dermatol Res* 281: 556A, 1989.
271. Hoefsmid ECM, Duijveestijn AM, Kamperdijk EWA: Relation between Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells. *Immunobiol* 161: 255, 1982.
272. Knight SC: Veiled cells: "dendritic cells" of peripheral lymph. *Immunobiol* 168: 349, 1984.
273. Larsen CP, et al: Migration and maturation of langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 172: 1483, 1990.
274. Macatonia SE, et al: Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J Exp Med* 166: 1654, 1988.
275. Kripke ML, et al: Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 145: 2833, 1990.



276. Van Wilsem EJJ, et al: Antigen-bearing Langerhans cells in skin draining lymph nodes: phenotype and kinetics of migration. *J Invest Dermatol* 103: 217, 1994.
277. Knight KL, et al: The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizers. I. in vivo exposure to antigen. *Cell Immunol* 94: 427, 1985.
278. Yamashita K, Yano A: Migration of murine epidermal Langerhans cells to regional lymph nodes: engagement of major histocompatibility complex class II antigens induces migration of Langerhans cells. *Microbiol Immunol* 38: 567, 1994.
279. Enk AH, Katz SI: Early molecular events in the induction phase of contact hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1398, 1992.
280. Enk AH, et al: An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 $\beta$  in the initiation of primary immune responses in the skin. *J Immunol* 150: 3698, 1993.
281. Rambukkana A, et al: Effects of contact allergens on human Langerhans cells in skin organ culture: migration, modulation of cell surface molecules and early expression of interleukin-1 $\beta$  protein. *Lab Invest* 74: 422, 1996.
282. Cumberbatch M, Kimber I: Dermal tumor necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to lymph nodes and possibly provides one stimulus for Langerhans cell migration. *Immunol* 75: 257, 1992.
283. Kobayashi Y, et al: Development of motility of Langerhans cell through extracellular matrix by in vitro hapten contact. *Eur J Immunol* 24: 2254, 1994.
284. Staquet M, et al: Role of specific successive contacts between extracellular matrix by in vitro hapten contact. *Eur J Cell Biol* 68: 342, 1995.
285. Reams WM, Tompkins SP: A developmental study of murine epidermal Langerhans cells. *Dev Biol* 31: 114-123, 1973.
286. Pérez Torres A: Caracterización Morfológica de las Células de Langerhans del Pollo Doméstico (*Gallus gallus*). Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Fac. de Medicina, UNAM. México, diciembre de 1989.
287. Carrillo J, Pérez A, Castell A, Antuna A: Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). *J Anat* 176: 1-8, 1991.
288. Akhter N, Kobayashi M, Hoshino T: Avian epidermis contains ATPase- and Ia-positive Langerhans-like cells. *Cell Tiss Res* 271: 103-106, 1993.
289. Perez A, Millán D: Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis. *J Anat* 184: 591-596, 1994.
290. Breathnach AS, Poyntz SV: Electron microscopy of pigment cells in tail skin of *Lacerta vivipara*. *J Anat* 100 549-569, 1966.
291. Perez a, Millán A, Rondán A: Epidermal Langerhans cells in the terrestrial turtle *Kinosternum integrum*. *Dev Comp Immunol* 3: 225, 1995.
292. Farquhar M, Palade G: Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. *J Cell Biol* 30: 359-379, 1966.
293. Banerjee TK, Hoshino T: ATPase-positive and metallophilic cells in the skin of frog *Rana catesbeiana*. *Nag J Med Sci* 47: 83-90, 1985.
294. Castell A: Caracterización Morfológica de las Células de Langerhans de Anfibios. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, UNAM. México, Diciembre de 1989.
295. Carrillo J, Castell A, Pérez A, Rondán A: Langerhans like cells in amphibian epidermis. *J Anat* 172: 39-45, 1990.
296. Du Pasquier L, Flajnik MF: Expresión of MHC class II antigens during *Xenopus* development. *Dev Immunol* 1: 85-95, 1990.
297. Porter KR: Herpetology. Ed. Saunders, U.S.A., pags: 351-359, 1972.
298. Dodd, MHI, Dodd JM: Biology of Metamorphosis. In: Physiology of the Amphibia. Vol 3, ed. Lofts B, USA.
299. Bieber T, Ring J, Braun-Falco O: Comparison of different methods for enumeration of Langerhans cells in vertical cryosections of

- human skin. Br. J. Dermatol 111: 385-392, 1988.
300. Tahan AM, Jurd RD: Delayed hypersensitivity in *Ambystoma mexicanum*. Dev Comp Immunol 3:299-301, 1979.
301. Castell-Rodríguez AE, Hernández-Peñaloza A, Sampedro-Carrillo EA, Herrera-Enriquez MA, Alvarez-Pérez SJ, Rondán-Zárate A: ATPase and MHC class II molecules co-expression in *Rana pipiens* dendritic cells. Dev Comp Immunol 23:473-485, 1999.
302. Schuler G, Romani N, Linert J, Shevach EM, Stingl G: Subsets of epidermal Langerhans cells as defined by lectin binding profiles. J Invest Dermatol 81:397, 1983.
303. Dezutter-Dambuyant C, Cordier G, Schmitt D, Faure M, Laquoi C, Thivolet J: Quantitative evaluation of two distinct cell populations expressing HLA-DR antigens in normal human epidermis. Br J Dermatol 111:1, 1984.
304. Romani N, et al: The thy-1 bearing cell of murine epidermis. A distinctive leukocyte perhaps related to natural killer cells. J Exp Med 161: 1368, 1985.
305. Schmitt DA, et al: In vitro human epidermal indeterminate cells (CD1a+, 40 kD Fc-gamma-R-) are potent immunostimulatory cells for allogenic lymphocytes. J Invest Dermatol 91:388 (Abstr), 1988.
306. Cumberbatch M, et al: MHC class II expression by Langerhans' cells and lymph node dendritic cells: possible evidence for maturation of Langerhans' cells following contact sensitization. Immunol 74:414-419, 1991.
307. Poulter LW, et al: Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man Cell Immunol 74: 358, 1982.
308. Scheynius A, et al: Phenotypic characterization in situ of inflammatory cells in allergic and irritant contact dermatitis in man. Clin Exp Immunol 55: 81, 1982.
309. Roberts L, et al: Correlation between the inducible keratinocyte expression of Ia and the movement of Langerhans cells into the epidermis. J Invest Dermatol 134:3781, 1985.
310. Breathnach SM: Immunologic aspects of contact dermatitis. Clin Dermatol 4:5, 1986.
311. Horton JJ: Ontogeny of immune system in amphibians. Am Zool 11:219-228, 1971.
312. Manning MJ: The involution of vertebrate lymphoid organs. In Aspects of developmental and comparative immunology. Ed. J. B. Salomon. Oxford. Pergamon Press. pags: 62-72.
313. Drexhage HA, et al: A study of cells 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.
314. Mommaas M, et al: Functional human epidermal Langerhans cells that lack Birbeck granules. J Invest Dermatol 103: 807-810, 1994.
315. Takehana S, et al: Ultrastructural observations on Langerhans cells in the rat gingival epithelium J Periodont Res 20: 275-283, 1985.
316. Romano J, Balaguer R: Ultrastructural identification of Langerhans cells in normal swine epidermis. J Anat 179:43-46, 1991.
317. Satdnyk AW, Befus AD, Gaudie J: Characterization of nonspecific esterase activity in macrophages and intestinal epithelium of the rat. J Histochem Cytochem 38:1-6, 1990.
318. Li CY, Lam, KW, Yam LT: Esterases in human leukocytes. J. Histochem. Cytochem. 21:1-12, 1973.
319. Havenith CEG, et al: Separation of alveolar macrophages and dendritic cells via autofluorescence: phenotypical and functional characterization. J Leukocyte Biol 53:504-510, 1993.
320. Holt P, et al: Funtion(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. J Exp Med 177:379-407, 1993.
321. Austyn JM: Lymphoid dendritic cells. Immunol 62:161-170, 1987.
322. Rao AS, et al: In "Dendritic cells in fundamental and clinical immunology". Eds: EWA Kamperdijk, P Nieuwenshuis and ECM Hoefsmit, pp 507-512. Plenum, London, 1993.
323. Knight SC, et al : Non-adherent, low density cells from human peripheral blood contain

- dendritic cells and monocytes, both with veiled morphology. *Immunol* 57:595-603, 1986.
324. Hoefsmit ECM: In "The reticuloendothelial system". Eds. I Carr and WT Daems, pp 417-468. Plenum Publ Corp, New York, 1980.
325. Kamperdijk EWA: Macrophages in different compartments of the non-neoplastic lymph node. *Curr Topics Pathol* 84:219-245, 1990.
326. Veerman AJP, van Ewijk W: White pulp compartments in the spleen of rats and mice. *Cell Tissue Res* 156:416-441, 1975.
327. Kamperdijk EWA, et al: Characterization of dendritic cells, isolated from normal and stimulated lymph-nodes of the rat. *Cell Tissue Res* 242:469-474, 1985.
328. Duijvestijn AM, Kamperdijk EWA: Birbeck granules in interdigitating cells of thymus and lymph node. *Cell Biol Int Rep* 6:655, 1982.
329. Plytycz B, Bigaj J: Seasonal cyclic changes in the thymus gland of the adult frog *Rana temporaria*. *Thymus* 5: 327-344, 1983.
330. Bigaj J, Plytycz B: cytoarquitecture of the thymus of the adult frog *Rana temporaria*. *Folia Histochem and Cytobiol* 22: 63-70, 1984.
331. Bigaj J, Plytycz B: Interdigitating cells in the thymus of the frog *Rana temporaria*. *Folia Histochem and Cytobiol* 24:65-68, 1987.
332. Alvarez R: Thymus of *Rana perezi*: presence of interdigitating cells. *J Morphol* 204: 305-312.
333. Barrutia Presence of presumptive interdigitating cells in the spleen of the natterjack *Bufo calamita*. *Experientia* 41:1393-1394, 1985.
334. Hernández-Penaloza A: Identificación de células dendríticas en el bazo de la rana *Rana pipiens*. Tesis de licenciatura en Biología. Asesor: Andrés Castell Rodríguez. Fac. de Ciencias, UNAM, 1997.
335. Herrera-Enriquez M: "Ontogenia de las células dendríticas epidérmicas de la rana leopardo *Rana pipiens*. Tesis de licenciatura en Biología. Asesor: Andrés Castell-Rodríguez. Fac. de Ciencias, UNAM., 1998.
336. Brethnach AS, Wyllie LM: Electron microscopy of melanocytes and Langerhans cells in human fetal epidermis at fourteen weeks. *J Invest Dermatol* 44:51-60, 1965.
337. Natali PG, et al: Ontogeny of human Ia antigens. *Cewl Immunol* 73:385-392, 1982.
338. Foster CA, Holbrook KA, Farr AG: Ontogeny of Langerhans cells in human embryonic and fetal skin: expression of HLA-DR and OKT6 determinants. *J Invest Dermatol* 86: 240-248, 1986.
339. Baculi BS, Cooper EL: Lymphoid changes during antibody synthesis in larval *Rana catesbeiana*. *J Exp Zool* 183:185-192, 1970.
340. Jones SE, Ruben N: Internal histocompatibility during amphibian metamorphosis? *Immunol* 43:741-745, 1981.
341. Chardonens X, Du Pasquier L: Induction of skin allograft tolerance during metamorphosis of the toad *Xenopus laevis*: a possible model for studying generation of self tolerance to histocompatibility antigens. *J Immunol* 3:569-573, 1973.