

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

“Análisis inmunofenotípico de las células del sistema inmunológico de la piel y mucosas del pollo”

**Tesis
presentada por Armando Pérez Torres
para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas
(Morfología)**

**Director de la tesis
Dr. Alfonso Cárabez Trejo**

Cd. Universitaria, D.F. mayo de 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

A mis padres, Olimpia y Cesáreo, a quienes todo debo y de quienes tanto soy.

A mis hijos, Mariana, Adriana y Luis Enrique, por comprender que soy de cierta manera y quererme.

A mis Maestros, Profesor Benigno Tapia, por haber hecho fundamental mi sexto año de primaria, y al Dr. Joaquín Carrillo Farga, que me mostró el camino de lo que hago.

A mi esposa Martha, por todo.

A mis alumnos del pasado, del presente y del futuro.

AGRADECIMIENTO

Al pueblo de México y a la UNAM, sobra decir porqué.

Al Dr. Alfonso Cárabez Trejo, por la confianza que depositó en mí para la realización de diversas actividades del pasado y por su amistad.

Al Jurado, que revisó y mejoró con sus sugerencias la presente tesis.

Al Dr. Max D. Cooper (Universidad de Alabama, Birmingham, Alabama) por la donación del anticuerpo monoclonal Tap-1 (específico para moléculas clase II de CPH de pollos) y de otros anticuerpos para otros estudios.

A mis hermanos, por mantenerme siempre junto a ellos.

Al personal del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM:

-Biol. Martha Ustarroz Cano, por mantenerse de este lado.

-Histotecnólogas Maria Luisa Rodríguez, Mabel Vega y Verónica Rodríguez, por la excepcional calidad de su trabajo.

- M.C. Adrián Rondán y M.C: Silvia Antuna, por los viejos tiempos en la excelencia de la microscopía electrónica.

- Sr. Francisco Pasos y Sr. Tomás Méndez, por su empeño en que cualquier imagen sea siempre sensacional.

-Biol. Armando Zepeda, por hacer que mis horas de vuelo en la microscopía electrónica fueran más y mejores.

- Sr. José Luis Ramírez, por su apoyo en el laboratorio y por su amistad.

- A Enrique Sampedro, anatomopatólogo, por insistir permanentemente que terminara esto y dejara de ejercer sin grado.

B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Resumen-Summary	1
Reseña histórica de las células de Langerhans	2
Identificación de las células de Langerhans	4
Histoquímica enzimática	4
Adenosintrifosfatasa	4
Esterasa no específica	5
Peroxidasa endógena	5
Otras enzimas	5
Microscopía electrónica	6
Inmunofenotipo	7
Ontogenia de las células de Langerhans	9
Distribución de las células de Langerhans	10
Densidad de células de Langerhans en roedores	11
Localizaciones de las células de Langerhans	12
Figuras 1	13
Figura 2	14
Figura 3	15
Función de las células de Langerhans	16
Funciones <i>in vitro</i>	16
Funciones <i>in vivo</i>	17
Origen y diferenciación de las células de Langerhans	19
Migración y maduración de las células de Langerhans	21
Arribo a la piel	22
"Homeing" y permanencia en la epidermis	22
Emigración de la epidermis	22
Movimiento a través de la dermis	22
Entrada a los vasos linfáticos y búsqueda de la paracorteza	23
Búsqueda de la región paracortical. Papel de CCR7	24
Papel de IL-1 β y TNF- α en la migración de las células de Langerhans	24
Citocinas cutáneas e inhibición de la migración de células de Langerhans	26
Células de Langerhans en vertebrados no mamíferos	27
Peces	27
Anfibios	27
Reptiles	28
Aves	28
Planteamiento del problema	30
Hipótesis	30
Objetivo general	30
Objetivos particulares	30
Resultados	31
Artículo: la antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis.	32

C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Artículo: Demonstration of Birbeck (Langerhans cells) granules in the normal chicken epidermis.....	39
Artículo: Langerhans cells-like dendritic cells in the cornea, tongue and oesophagus of the chicken (<i>Gallus gallus</i>).....	45
Artículo: Diferencias sexuales poseclosión en las células de Langerhans epidérmicas del pollo doméstico (<i>Gallus gallus</i>).....	55
Hipersensibilidad por contacto al dinitrofluorobenceno y cambios en las células de Langerhans del pollo, durante la fase de sensibilización a este hapteno.....	62
Introducción.....	62
Materiales y métodos.....	64
Animales.....	64
Sensibilización y reto con DNFB.....	64
Cuantificación de la respuesta de hipersensibilidad de contacto.....	64
Sensibilización al DNFB y cambios en las células de Langerhans.....	64
Cuantificación de las células de Langerhans epidérmicas clase II positivas en láminas epidérmicas.....	65
Resultados.....	65
Hipersensibilidad por contacto al DNFB en pollos adultos.....	65
Sensibilización al DNFB. Estudio histopatológico.....	65
Sensibilización al DNFB. Inmunofluorescencia para moléculas clase II del CPH en láminas epidérmicas y en cortes tangenciales de la dermis subyacente.....	66
Sensibilización al DNFB. Estudio ultraestructural.....	67
Gráfica 1.....	68
Gráfica 2.....	69
Figura 1.....	70
Figura 2.....	71
Figura 3.....	72
Figura 4.....	73
Figura 5.....	74
Figura 6.....	75
Figura 7.....	76
Figura 8.....	77
Figura 9.....	78
Figura 10.....	79
Figura 11.....	80
Figura 12.....	81
Figura 13.....	82
Discusión.....	83
Conclusiones generales.....	87
Perspectivas.....	88
Referencias.....	91

RESUMEN

Las células de Langerhans (CL) de los mamíferos son miembros de una familia de células originadas en la médula ósea, especializadas en la presentación de antígenos, conocidas como células dendríticas (CD). Se localizan en la interfase entre el organismo y el medio ambiente, principalmente dentro del epitelio plano estratificado de la piel y los epitelios de numerosas mucosas. La identificación de las CL requiere de la demostración histoquímica de la actividad de adenosintrifosfatasa (ATPasa), de la microscopía electrónica para la búsqueda de un organelo citoplásmico característico llamado gránulo de las CL o gránulo de Birbeck y la demostración de la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH). Las CL migran a través de los vasos linfáticos aferentes hacia los linfonodos o ganglios linfáticos después de la aplicación epicutánea de un hapteno y pasan por un proceso de maduración que las transforma de células procesadoras de antígenos a células presentadoras de antígenos.

En el presente trabajo se demostró que las células epidérmicas ATPasa positivas del pollo pueden ser identificadas como CL, con base a que expresan moléculas clase II del CPH, a que poseen organelos similares al gránulo de Birbeck y a su respuesta migratoria luego de la aplicación epicutánea de una dosis de sensibilización del hapteno 2,4-dinitro-1-fluorobenceno. Además, fue demostrada la presencia de células dendríticas parecidas a CL ATPasa positivas/moléculas clase II positivas, las cuales no presentaron gránulos de Birbeck, en los epitelios planos estratificados de las mucosa del ojo, la lengua y el esófago. Finalmente, se observó que las CL epidérmicas del pollo tienen una ontogenia posteclosión peculiar con dimorfismo sexual.

ABSTRACT

Mammalian Langerhans cells (LC) are members of a family of highly specialized bone-marrow derived antigen-presenting cells termed dendritic cells. They reside at the interface between the organism and the environment, mainly within stratified squamous epithelia of skin and mucosa. Identification of LC requires the use of adenosine triphosphatase (ATPase) histochemistry, electron microscopy for searching the unique trilaminar cytoplasmic organelles, the LC granules or Birbeck granules, and the expression of major histocompatibility complex (CPH) class II molecules. Following epicutaneous application of hapten, LC migrates via the afferent lymphatics vessels to lymph nodes and undergoes a maturation process from an antigen processing to an antigen-presenting cells.

In the present work was demonstrated that ATPase-positive dendritic cells of the chicken epidermis can be identified as LC, based in their expression of CPH class II molecules, in the presence of an organelle similar to Birbeck granules, and in their reactivity and migratory response to a sensitizing dose of the hapten 2,4-dinitro-1-fluorobenzene applied epcutaneously. In addition, was demonstrated the presence of ATPase-positive/CPH class II-positive LC-like dendritic cells, which lacked Birbeck granules, within stratified squamous epithelia of mucosal surface of the eye, tongue and oesophagus. Finally, was observed that epidermal LC of the chicken has a peculiar posthatching ontogeny with sexual dimorphism.

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESEÑA HISTORICA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

En 1868, Paul Langerhans (Langerhans, 1868) evidenció las células epidérmicas que hoy llevan su nombre, describiéndolas como "cuerpos negros, los cuales son muy distintos de las células epiteliales" (Figura 1a, b). Seguramente influido por la forma dendrítica de las células, por la afinidad de éstas a la impregnación con cloruro de oro y porque estaba estudiando el sistema nervioso de la piel, Langerhans propuso que se trataba de células nerviosas. Durante casi un siglo, se planteó que las células de Langerhans (CL) eran receptores para el dolor y el tacto, células precursoras de las células de Merkel, de células ganglionares autonómicas o de células de Schwann y que por ello desempeñarían funciones neurovegetativas, neurohormonales o neurosensoriales dentro de la epidermis (revisado por Shelley & Juhlin, 1978). De hecho, la primera búsqueda histoquímica de la actividad de ATPasa en las CL se diseñó pensando en que la presencia de la enzima sería favorable a la conducción de impulsos nerviosos, al actuar como bomba de iones (Mustakallio, 1962). Hasta ahora, la única relación anatomofuncional entre las CL y el sistema nervioso se da a través de las terminaciones nerviosas que liberan el neuropéptido CGRP. Este, inhibe la función presentadora de antígenos de las CL al inducir una hiporregulación de la molécula coestimuladora B7 (Hosoi *et al.*, 1993; Asahina *et al.*, 1995).

Durante un tiempo, las CL fueron conocidas como "células claras suprabasales de Masson" debido a que este investigador propuso que las CL eran "melanocitos desgastados, inmaduros o postdivisionales" (Masson, 1948; Billingham & Medawar, 1953). Como ya se había demostrado que los melanocitos derivaban de las crestas neurales (Rawles, 1948), la observación de células dendríticas (CD) aureofílicas (es decir CL) en la piel de los primordios de las extremidades de ratones experimentalmente privados de las crestas neurales (Silvers, 1957) era una evidencia en contra del origen melanocítico y nervioso de las CL. Poco después, se demostró que las CL presentaban características ultraestructurales de una célula metabólicamente activa y no de una "célula desgastada", con un organelo distintivo que al corte era similar a un bastón o a una raqueta de tenis, el gránulo de las CL (GCL) o gránulos de Birbeck (Figura 2a, d, e y 3) (Birbeck *et al.*, 1961). Finalmente, los resultados de los experimentos de privación de crestas neurales en ratones fueron reproducidos al identificarse ultraestructuralmente que las CD aureofílicas correspondían a CL (Breathnach *et al.*, 1968).

Entre 1965 y 1976, se aportaron evidencias que culminaron con la demostración del origen de las CL en la médula ósea. Las primeras evidencias de la relación de las CL con el sistema fagocítico-mononuclear surgen con el descubrimiento de que las células proliferantes en la histiocitosis X (hoy granulomatosis de CL) presentaban un organelo similar al GCL (Basset & Turiaf, 1965; Tarnowski & Hashimoto, 1967). Casi al mismo tiempo, se demuestra, en cortes de piel y en láminas epidérmicas de ratón, que las CL presentan actividad de esterasa no específica (Figura 2c, g) y se sugiere que son macrófagos intraepidérmicos (Campo-Aasen & Pearse, 1966) o fagocitos intraepiteliales que se mantienen o renuevan por mitosis o a partir de "histiocitos" dérmicos que atraviesan la membrana basal para entrar a la epidermis (Hashimoto & Tarnowski, 1968). Congruentes con estas ideas fueron las observaciones de que las CL eran capaces de capturar materiales antigénicos (Pruneiras, 1969) y que en las reacciones de hipersensibilidad retardada a alérgenos aplicados epicutáneamente, algunas células parecidas a linfocitos establecen contactos estrechos con CL, las cuales se incrementan

notablemente en los vasos linfáticos (llevando consigo el alergeno) y en los linfonodos regionales (Silberberg, 1971; 1973; Silberberg *et al.*, 1975; 1976).

La posible función inmunológica de las CL, sugerida por los trabajos de hipersensibilidad por contacto, fue robustecida al demostrarse histoquímicamente que estas células captaban selectivamente haptenos de contacto como algunos metales, aminos y aldehídos, tanto en los cobayos como en los humanos, formando un "sistema reticuloepitelial", relacionado con el sistema fagocítico-mononuclear (o reticuloendotelial) (Shelley & Juhlin, 1976). La conclusión general de los trabajos antes mencionados fue que si las CL eran células inmunocompetentes deberían poseer algunos marcadores característicos de las células con funciones inmunológicas conocidas.

A finales de los años 70s se demostró que las únicas células de una suspensión epidérmica que formaban rosetas con eritrocitos cubiertos eran las CL (Figura 2i). De acuerdo al diseño experimental, se concluyó que las CL poseían receptores para el fragmento cristalizante (Fc) de la IgG (pero no para el de la IgM) y para el factor C3b del complemento (Stingl *et al.*, 1977, Berman & Gigli 1979). Igualmente relevante fue la demostración que las CL poseían moléculas clase II (Ia, HLA-DR) de Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) (Rowden *et al.*, 1977, Klareskog *et al.*, 1977, Tamaki *et al.*, 1979). Estos resultados sugirieron que las CL estaban relacionadas ontogénicamente con los macrófagos y, por lo tanto, podrían originarse en la médula ósea. Lo anterior fue estudiado en ratones irradiados subletalmente y tratados posteriormente con trasplante de médula ósea, en los que se estudió la especificidad de los antígenos Ia y H-2 (homólogos a HLA A, B y C de humanos), en células epidérmicas. En un sistema alogénico, (ratones C57BL/6 irradiados y transfundidos con células de médula ósea de ratones BALB/c) el 45% de las CL tenía especificidad del donador de médula ósea a los 62 días de la quimerización, mientras que en un sistema semialogénico (ratones B10.A irradiados y transfundidos con médula ósea de ratones F1 (B10 X B10.A) el porcentaje de CL era del 80% después de 85 días de quimerización; interesantemente, los queratinocitos siempre tuvieron la especificidad del receptor de la médula ósea (Katz *et al.*, 1979, Frelinger *et al.*, 1979). En los humanos se obtuvieron resultados similares cuando se estudió la piel de una paciente que había recibido un trasplante alogénico de médula ósea proveniente de su hermano. En este caso se demostró que las CL de la paciente poseían cuerpos Y, segmento distal del cromosoma Y que fluoresce con mostaza de quinacrina (Volk-Platzer *et al.*, 1984).

Lo anterior sugirió que las CL constituían una población de células derivadas de precursores circulantes provenientes de la médula ósea, que al entrar a la epidermis asumirían localmente las características morfológicas de las CL. Estos precursores menos diferenciados originarían casi la totalidad de las CL ya que se sabía que menos del 1% de éstas hace mitosis *in situ* (Giacometti & Montana 1967, Mackenzie 1975).

Más de cien años después de su descubrimiento, las CL iniciaban su consolidación como células del sistema inmunológico, con una identidad morfológica, ontogénica y funcional propia, que las han llevado a ser consideradas en la actualidad como los "adyuvantes inmunológicos de la naturaleza".

IDENTIFICACION DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

Las CL son células de forma dendrítica localizadas en la parte basal y suprabasal de la epidermis, dentro de la cual forman una red contigua de prolongaciones citoplásmicas. En los humanos, constituyen el 2 al 8% del total de la población de células epidérmicas. La densidad de CL muestra grandes variaciones numéricas que oscilan entre 200 a 1000 CL/mm² en láminas epidérmicas, siendo en la cara y en el cuello donde son más abundantes (Berman *et al.*, 1983). Las variaciones numéricas también se han observado entre cepas de ratones y cobayos, asociado principalmente a los patrones regionales de cornificación (revisado en Saint-André Marchal *et al.*, 1997), siendo la cola la región con menor densidad (Bergstresser *et al.*, 1980). Las CL no se identifican con las técnicas de tinción ordinarias como la hematoxilina y eosina. Sin embargo, pueden observarse con impregnaciones metálicas (Langerhans 1868, Gairns 1930, Billingham & Medawar 1953, Silvers 1957, Niebauer *et al.*, 1969), histoquímica enzimática, microscopía electrónica o con técnicas inmunohistológicas. Debido a que las tres últimas son las más empleadas en el estudio de las CL, serán abordadas con mayor extensión.

HISTOQUIMICA ENZIMATICA

Adenosintrifosfatasa (ATPasa). Las primeras demostraciones de la actividad de ATPasa en CL se realizaron en cortes de piel humana (Mustakallio, 1962; Jarret & Riley, 1962; Bradshaw *et al.*, 1963) aunque no eran diferenciadas de otras "células dendríticas de la epidermis", como los melanocitos. Posteriormente, se planteó que las CL eran las únicas células ATPasa positivas de la epidermis del cobayo (Wolff, 1964), lo cual fue confirmado ultraestructuralmente al observarse que el producto electrondenso de la reacción enzimática estaba confinado a la membrana plasmática, libre de desmosomas, de células con citoplasma claro que poseían GCL (Wolff & Winkelmann, 1967). A partir de entonces, la demostración histoquímica de ATPasa es considerada como marcador altamente específico para identificar CL epidérmicas y de mucosas, comparable a la demostración inmunofenotípica de otros marcadores. La técnica es particularmente útil cuando se emplea para demostrar CL en láminas epidérmicas separadas, ya que esto permite cuantificar fácilmente las células ATPasa positivas por mm² y observar su morfología y distribución espacial (Mackenzie & Squier, 1975). (Figura 2b)

Hasta ahora no se conoce cuál es la importancia funcional de la actividad de ATPasa para las CL. La enzima podría ser modificada por factores normales y patológicos y la ausencia de tinción no significaría, necesariamente, ausencia o número menor de las CL (Pérez-Torres *et al.*, 1995). Se ha sugerido que la actividad de ATPasa desaparece en aquellas CL que incrementan su actividad endocítica, manifestada por un mayor número de GCL y de vesículas, después de la aplicación epicutánea del hapteno dinitrofluorobenceno (Hanau *et al.*, 1989). Por otro lado, la aplicación tópica y sistémica de corticosteroides y testosterona disminuye el número y la dendricidad de las CL, probablemente por un deterioro selectivo en la expresión de ATPasa (Belsito *et al.*, 1982, Berman *et al.*, 1983, Koyama *et al.*, 1989). La presencia o ausencia de la actividad de ATPasa en las CL epidérmicas podría ser un factor importante en la respuesta a estímulos migratorios (Kimber *et al.*, 2000). Las CL ATPasa positivas serían resistentes a los efectos del ATP extracelular y permanecerían en el microambiente epidérmico, mientras que las que son

ATPasa negativas, un 20% aproximadamente, responderían al ATP extracelular (Girolomoni *et al.*, 1993) liberando IL-1 β , como ocurre con macrófagos (Perregauz & Gabel, 1994; Griffiths *et al.*, 1995), proceso que está mediado por receptores purinérgicos P2Z (Ferrari *et al.*, 1997) y que las CL también expresan (Di Virgilio, 1995). La fuente principal de IL-1 β epidérmico son las CL (Heufler *et al.*, 1992) y junto con TNF α , son dos de las citocinas proinflamatorias fundamentales para la movilización de CL (ver capítulo migración de CL).

Esterasa no específica.

La demostración de la actividad de esterasa no específica en CL repercutió importantemente en la investigación de estas células, ya que se propuso que se trataba de macrófagos intraepidérmicos (Campo-Aasen & Pearse, 1966). Sin embargo, su utilidad se ha restringido a pocos estudios de CL en ratones (Figura 2c, g) (Jarret & Riley, 1962; Riley, 1966; Maruyama *et al.*, 1980) y más recientemente de CL en piel y mucosas de la rana *Rana pipiens* (Castell *et al.*, 2001). No se ha demostrado que las CL de piel humana normal sean esterasa no específica positivas pero sí las que se encuentran en piel afectada por micosis fungoides (Stery & Steigleder, 1979) y en las células proliferantes de la histiocitosis X (Jaubert *et al.*, 1980). Ultraestructuralmente, la actividad enzimática se localiza en la membrana plasmática y en los GCL (Maruyama *et al.*, 1980; Jaubert *et al.*, 1980), pero no se conoce la importancia de esta enzima para la función de las CL.

Peroxidasa endógena.

La actividad de peroxidasa endógena en las CL de humanos (Dubertret *et al.*, 1981; 1982) y de murinos (Maruyama *et al.*, 1980) está dada probablemente por una enzima similar a la de monocitos adherentes y de macrófagos humanos (Bodel *et al.*, 1977; Beelen *et al.*, 1978) ya que también se localiza en la cubierta nuclear y en el retículo endoplásmico y es inhibida por las mismas sustancias, como el fijador de Karnovsky, la mezcla aldehído-ácido tánico y el 3-amino-1,2,4, triazol (Dubertret *et al.*, 1981; 1982). Sin embargo, el papel funcional de esta enzima en las CL es desconocido.

Otras enzimas: La piel de algunos primates prosimios africanos (Montagna & Ellis, 1959; Yasuda *et al.*, 1961; Montagna & Yun, 1962) y la de bovinos contiene CL fosfatasa alcalina positivas (Khalil *et al.*, 1982). En estos, la enzima se localiza en la membrana plasmática y en el GCL. En el cobayo albino, las CL también presentan actividad de aminopeptidasa en condiciones normales y la conservan después de la aplicación de dinitroclorobenceno o de "stripping" (Gschnait & Brenner, 1979). Las CL de la piel y la mucosa oral de murinos, pero no de humanos ni de monos rhesus, muestran una gran positividad perinuclear a la β -glucuronidasa (Mackenzie *et al.*, 1982; Mackenzie & Bickenbach, 1985). Este patrón de tinción se ha observado en las CL manosidas positivas de la piel de pacientes con algunas enfermedades lisosomales (Elleder, 1975). La ausencia de la actividad de lisozima, antitripsina y antiqumotripsina en las CL, se ha interpretado como reflejo de su nula o escasa actividad fagocítica (Holden *et al.*, 1982). De acuerdo a lo anterior, poca actividad de fosfatasa ácida se ha demostrado con histoquímica ultraestructural (Rowden, 1967). Finalmente, se sabe que las CL de murciélagos y de ovejas presentan actividad de colinesterasa específica, que es inhibida con fisostigmina y diisopropilfluorofosfato (Bourlond *et al.*, 1962; Lyne & Chase, 1966).

Aunque abundante y heterogénea, la relevancia funcional de la actividad enzimática para las CL es, en gran parte, desconocida.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

La microscopía electrónica ha dado a las CL su identidad. Las características ultraestructurales básicas, principalmente su marcador morfológico distintivo, el GCL (Birbeck *et al.*, 1961), han permitido demostrar CL en la mayoría de las especies estudiadas y en otros sitios distintos a la epidermis, como la dermis, los vasos y ganglios linfáticos, el timo y diferentes mucosas. A pesar de que sigue siendo casi enigmático en su origen y función, la gran mayoría de los estudios sobre CL establecen que la característica absoluta para designar a una célula como CL es la presencia del GCL (Figuras 1c; 2a, d, e y 3). Además de este organelo, las CL se distinguen entre las células de la epidermis por presentar un citoplasma claro debido a la ausencia de tonofilamentos, desmosomas, melanosomas y a la presencia de un núcleo indentado. La descripción original del GCL los refiere como estructuras lineales con extremos redondeados y atravesados a todo lo largo y por el centro, por una línea estriada. Más que parecidos a bastones, los GCL semejan estructuras laminadas o discoideas de 0.3 μm de diámetro, con un arreglo bidimensional de partículas, responsable de la estriación de la línea central (Birbeck *et al.*, 1961; Breathnach, 1964).

A partir de las observaciones ultraestructurales, derivaron dos hipótesis sobre el origen del GCL; una postulaba que los gránulo en forma de varilla o bastón se originaba por colapso de las vesículas vecinas al complejo de Golgi (teoría secretoria) (Hashimoto & Tarnowski, 1968) o que por la continuidad entre las membranas del GCL y la plasmática, el gránulo se originaba por invaginaciones de la membrana celular (teoría endocítica) (Breathnach, 1964). A partir de aquí, el GCL suscitó numerosos trabajos tendientes a conocer su origen, su estructura y su función. La metodología empleada ha sido muy variada e incluye la microscopía electrónica de transmisión rutinaria (MET) (Breathnach, 1964; Wolf, 1967) y con trazadores del espacio extracelular (Cancilla, 1968; Hashimoto, 1970), la MET de cortes seriados y reconstrucción tridimensional (Sagebiel & Reed, 1968), la impregnación metálica ultraestructural (Niebauer *et al.*, 1969, Rodríguez & Caorsi, 1978), la criofractura (Caputo *et al.*, 1976), la difracción óptica de la MET (Caputo *et al.*, 1976, Runge *et al.*, 1981), la microdensitometría ultraestructural (Rodríguez & Caorsi, 1978) y la inmunohistoquímica ultraestructural (Takahashi & Hashimoto, 1986). Los resultados obtenidos constituían evidencias estáticas y circunstanciales que apoyaban a alguna de las dos teorías mencionadas. Sin embargo, la teoría endocítica se consolidó más que la secretoria debido a que correspondía satisfactoriamente con las funciones reconocidas de las CL (Hashimoto, 1970; Ishii *et al.*, 1984; Takigawa *et al.*, 1985; Takahashi & Hashimoto, 1986).

La observación de vesículas cubiertas unidas a invaginaciones tubulares de la membrana plasmática, con el patrón típico estriado de un GCL y la posterior separación de éste de la membrana celular fue interpretado como evidencia de la participación del gránulo en una forma especializada de endocitosis adsorptiva, que transporta complejos receptor-ligando desde la superficie celular hacia los lisosomas primarios o al compartimento endosomal (Figura 3) (Ishii *et al.*, 1984; Takigawa *et al.*, 1985; Bartosik, 1992). La demostración inicial de que los GCL de CL en suspensión incorporan selectivamente ferritina acoplada a concanavalina A, pero no sola, sugirió que el mecanismo de endocitosis estaría mediado

por lectinas, mismo que era inhibido con el pretratamiento de las suspensiones de CL con mannosidasa (Takigawa *et al.*, 1985).

El incremento en el número de GCL en la dermatitis de contacto alérgica (Elofsson *et al.*, 1981) hizo pensar que la unión de haptenos, antígenos o algún otro ligando, induciría la formación del organelo. En este sentido, es interesante que el GCL en CL de humano pueda formarse por incubación con un anticuerpo (Ac) anti-CD1 (T6) y cointernalize moléculas clase II (HLA-DR) (Hanau *et al.*, 1987a; 1987b; 1988) ya que, en conjunto, antígenos (Ag) exógenos y receptores de las CL podrían coexistir dentro del GCL, sugiriendo un papel de este organelo en la captación y transporte intracelular de Ag. Por otro lado, la localización preferencial de GCL en los sitios de contacto entre CL y linfocitos generó el concepto de que la formación del organelo estaría relacionada con la presentación de Ag (Concha *et al.*, 1988)

Los GCL en los humanos poseen una glucoproteína de 40 kDa que es reconocida por el Ac monoclonal (AcMo) Lag (Kashihara *et al.*, 1986) y que se emplea para la identificación de CL o de células relacionadas a las CL, a nivel de microscopía fotónica. Otro AcMo, el DCGM4, al parecer identifica la misma molécula, que ha sido rebautizada como Langerina, la cual es una lectina tipo II dependiente de Ca^{++} , con especificidad para manosa. El DCGM4 se une a la membrana de CL aisladas y es internalizado hacia los GCL, lo que sugiere que la Langerina es una molécula que capturaría Ag y los canalizaría hacia los GCL y así crear una vía no clásica de procesamiento de Ag no dependiente de moléculas clase II (Valladeau *et al.*, 1999; 2000). Es interesante que la transfección de fibroblastos con cDNA de Langerina resulta en la formación de GCL (Valladeau *et al.*, 2000).

Una hipótesis reciente sobre la biogénesis y función de GCL establece que si la Langerina es una molécula que se acumula en el compartimiento endosomal, el GCL representaría un subdominio de dicho compartimiento, sirviendo como reservorio de los Ag, antes que las CL maduren a CD presentadoras de Ag, cambio que se acompaña de depleción de los GCL (Mc Dermott *et al.*, 2002). A pesar de lo antes mencionado, la naturaleza exacta de las señales que disparan la formación del GCL es desconocida y aún es debatible si este gránulo juega un papel crítico en la capacidad de las CL para estimular linfocitos. Es vieja también la idea de que el GCL representa solamente un marcador del microambiente epidérmico y que su presencia dependería del grado de queratinización del epitelio donde se encuentran las CL (Hoefsmit, 1982). Otra propuesta interesante es la que considera al GCL como un marcador de las vías de diferenciación de las CL a partir de sus precursores circulantes (Mackensen *et al.*, 1995; Strunk *et al.*, 1996).

INMUNOFENOTIPO

Tal vez uno de los temas más complejos con relación a las CL es su fenotipo, ya que está determinado por cambios moleculares de los diferentes microambientes en los que se encuentran estas células. Aunque no se conoce la relevancia de ciertos marcadores inmunológicos de las CL, muchos de ellos son moléculas que se usan para identificarlas, otros están involucrados en la función de captar y presentar Ag, algunos son receptores para quimocinas, citocinas y factores de crecimiento o son moléculas que participan en la migración y de localización (homing) de las CL. Como todos los leucocitos, las CL son CD45 positivas (T200, Ly-5, antígeno común leucocitario) y expresan los marcadores mieloides CD13 y CD33, tanto en humanos (Wood *et al.*, 1984; Flotte *et al.*, 1984; Cooper

et al., 1985; Romani *et al.*, 1989) como en ratones (Haines *et al.*, 1983; Leibl *et al.*, 1985), mientras que son negativas para CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56.

Como todas las células nucleadas, las CL de humanos (Bronstein *et al.*, 1983; Gielen *et al.*, 1988) y de algunos murinos (Witmer *et al.*, 1988; Lenz *et al.*, 1989) expresan moléculas clase I del CPH, las cuales están formadas por una cadena pesada polimórfica y la cadena no polimórfica β_2 microglobulina. La expresión de estas moléculas podría conferir a las CL la capacidad de presentar Ag a los linfocitos citotóxicos CD8 positivos Ag específicos, restringidos por moléculas clase I, siguiendo una vía de procesamiento de Ag endógenos o citoplásmicos como Ag virales, tumorales o de parásitos que sobreviven intracelularmente, escindidos por proteasomas multicatalíticos hacia péptidos que son llevados al retículo endoplásmico (RE) por un transportador asociado con la presentación de Ag. En el RE, los péptidos son asociados a las moléculas clase I con la participación de β_2 microglobulina y, subsecuentemente, este complejo molecular es transportado a través del complejo de Golgi y sale de la red transGolgi en la membrana de vesículas de secreción, quedando incorporado a la membrana plasmática donde es reconocido por los linfocitos CD8 positivos (York & Rock, 1996).

Desde que se describió que las CL de humanos expresan moléculas clase II del CPH (Figura 2h) (Rowden *et al.*, 1977; Klareskog *et al.*, 1977), se ha establecido que en láminas epidérmicas hay una imbricación completa entre las moléculas codificadas por el HLA-DR (análogo a I-E de murinos) (Kaufman *et al.*, 1984), el HLA-DQ (análogo del I-A de murinos) (Kaufman *et al.*, 1984) y el HLA-DP (Sontheimer *et al.*, 1986). Se ha demostrado la existencia de un porcentaje menor al 10% de CL intensamente positiva a moléculas clase II en láminas epidérmicas de humano (Romani *et al.*, 1985; 1989) y un porcentaje mayor a 30% en suspensiones celulares (Dezutter-Dambuyant *et al.*, 1984). La causa y la importancia de la existencia de esta subpoblación de CL grandes y activadas *in situ* no ha sido determinada, pero se ha propuesto que son CL que están por emigrar de la epidermis ya que tienen una posición basal, contienen pocos GCL, expresan CD40 y RFD1 y pocos niveles de FcRII (Romani *et al.*, 1991). Ya que son estimuladores potentes de la reacción leucocítica mixta primaria (Schmitt *et al.*, 1990), son equivalente a las CL que han madurado *in vitro*.

La expresión de moléculas clase II del CPH está relacionada con la función presentadora de antígenos de las CL ya que estas moléculas poseen un ranura especial en la que unen no covalentemente a los péptidos derivados de Ag exógenos. Después de ser sintetizadas en el RE, las moléculas clase II se asocian no covalentemente a la cadena invariante (CD74) (Claesson-Welsch *et al.*, 1986) para prevenir la unión de Ag endógenos con la ranura de las moléculas clase II. La cadena invariante se mantiene unida a la ranura durante el paso de las moléculas clase II a través del complejo de Golgi y la red transGolgi hasta el compartimento endosomal, donde es eliminada por proteólisis. Esto permite la unión de los Ag exógenos con la ranura especial de las moléculas clase II, formándose un complejo CPH/Ag que es expresado en la membrana celular para ser reconocido por el receptor de células T (TCR) de linfocitos CD4+ Ag específicos (Watts, 1987).

En los humanos se ha demostrado que las CL expresan una molécula de diferenciación de timocitos: el antígeno T6, identificado originalmente con el AcMo OKT6 (Fithian *et al.*, 1981; Murphy, 1981), actualmente conocido como CD1a. Ya que CD1a no se expresa en ninguna otra célula de la epidermis, se le considera como el marcador más confiable para identificar CL epidérmicas humanas (Chu *et al.*, 1982; Van de Rijn *et al.*, 1984; Dezutter-

Dambuyant *et al.*, 1985), aunque también se ha comprobado que casi todas las CL que son CD1a positivas son HLA-DR positivas y ATPasa positivas (Liu *et al.*, 1986). Las CL humanas también expresan CD1c, pero débilmente (Schmitt *et al.*, 1986). La isoforma CD1b no ha sido demostrada en ninguna célula epidérmica pero sí en células dendríticas de la dermis (Nestle *et al.*, 1993; Lenz *et al.*, 1993). Las isoformas de CD1 están relacionadas estructuralmente a las moléculas clase I del CPH, aunque a diferencia de estas que son polimórficas y codificadas por el cromosoma 6, aquellas son no polimórficas y están codificadas por el cromosoma 1 (Calabi & Milstein, 1986). La importancia de las moléculas CD1 es que representan una familia nueva de moléculas presentadoras de Ag, que presentan lípidos y glucolípidos típicamente encontrados en las paredes celulares bacterianas (Porcelli & Modlin, 1999). Al parecer no se conoce si esto ocurre en las CL, pero si existe, esta vía de presentación de Ag involucraría la captación de glucolípidos por receptores de manosa expresados en la CL y luego la liberación de aquellos en el compartimento endosomal, donde se formaría el complejo CD1/lípido-glucolípidos (Prigozy *et al.*, 1997). En los murinos, CD1 presenta una ranura similar a la del CPH, de naturaleza hidrofóbica, ideal para presentar lípidos hidrofóbicos o glucolípidos a células T (Zeng *et al.*, 1997).

Las CL de murinos y otras CD expresan una glucoproteína integral de membrana de 205 kDa, el receptor multielectina del tipo C, llamado DEC-205, que es reconocido por el AcMo NLDC-145 (Kraal *et al.*, 1986; Swiggard *et al.*, 1995). DEC-205 posee 10 dominios externos contiguos (Jiang *et al.*, 1995) con una alta homología con el receptor de manosa de macrófagos (Ezekowitz *et al.*, 1990) aunque es hasta 100 veces superior a éste en la función presentadora de Ag (Mahnke *et al.*, 2000). En los humanos, DEC-205 presenta un 77% de homología con su contraparte del ratón y se incrementa su expresión durante la diferenciación y activación de las CD (Kato *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2000). Hasta ahora, no se conoce la especificidad de unión del receptor DEC-205 y con ello poder determinar su función en la captación de Ag. Las CL de los humanos no expresan el receptor de manosa de macrófagos (Mommaas *et al.*, 1999); sin embargo, expresan Langerina, la cual tiene sitios de unión específica para manosa y podría estar involucrada en la internalización y procesamiento de moléculas que contienen este carbohidrato (Valladeau *et al.*, 2000).

De acuerdo con su capacidad de captar Ag, las CL son las únicas células epidérmicas que expresan receptores para el Fc de la IgG del tipo II (CD32) (Romani *et al.*, 1991; de la Salle *et al.*, 1992). Además, poseen receptores de alta y baja afinidad para la porción Fc de la IgE (Fc α -RI y Fc ϵ -RII (CD23)), todos ellos implicados en la captación de alérgenos (Bieber *et al.*, 1992a, b, c; Rieger *et al.*, 1992).

ONTOGENIA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

En embriones humanos de 6 a 7 semanas de edad gestacional, se ha demostrado la presencia de CL HLA-DR positivas y ATPasa positivas en láminas epidérmicas (Foster *et al.*, 1986). Antes de los 60 días de gestación, la mayoría de estas células son CD1a negativas (menos de 10/mm²) pero a las 11 ó 12 semanas hay un incremento significativo de la positividad a CD1a. (Foster *et al.*, 1986; Cattoreti *et al.*, 1989). Esta edad gestacional es interesante porque coincide con el momento de la actividad hematopoyética de la médula ósea (Miller, 1983); antes de las 11 semanas, las CL provenientes del saco vitelino o del hígado parecen ser incapaces de sintetizar y expresar CD1 o la epidermis aún no

presenta ciertas características microambientales que induzcan algunos rasgos en la diferenciación de las CL. Alrededor de las 10 semanas de gestación, las CL son más pequeñas, menos dendríticas y más heterogéneas en su fenotipo, en comparación a las fetales y las del adulto. A las 14 semanas de gestación, las CL ya expresan CD1a, HLA-DR y presentan GCL (Breathnach & Willie 1965; Breathnach, 1983; Monti, 1985), aunque el número es de sólo 100 CL/mm² (Foster *et al.*, 1986).

Por lo anterior, se concluye que las CL de humanos se originan muy temprano en el desarrollo y migran a la epidermis durante el primer trimestre; en el segundo trimestre son menos numerosas por unidad de área pero son similares fenotípica y morfológicamente a las del adulto. Interesantemente, las CL estarían presentes en la epidermis mucho antes de que el sistema inmunológico sea reactivo o funcional (Hayward, 1981).

Los fetos de ratón de 16 días poseen CL ATPasa positivas que carecen de GCL, los cuales aparecen hasta los 6 ó 18 días posnatalmente (Reams & Tompkins, 1973; Weiss & Zelickson, 1975). A los 18 días de gestación, la epidermis del ratón contiene alrededor de 280 CL ATPasa positivas/mm² pero sólo se identifica 1 CL la positiva/mm². La expresión del antígeno Ia, junto con la adquisición de las características estructurales, es considerada como un rasgo de madurez de las CL (Romani *et al.*, 1986), por lo que la epidermis fetal y neonatal de los murinos, a diferencia de la de fetos humanos, parece contener CL no totalmente diferenciadas. Sin embargo, es interesante mencionar que cuando las CL ADPasa positivas/CD45 positivas/la negativas de la epidermis fetal de ratones son cultivadas, rápidamente se hacen las positivas y, al mismo tiempo, adquieren la capacidad de estimular células T alogénicas (Elbe *et al.*, 1989).

En la rata, las CL llegan a la epidermis e incrementan significativamente su número entre los días 17 y 20 de gestación. Las CL aparecen primero en la epidermis de la cabeza y después se distribuyen caudalmente a todo el cuerpo, a lo largo del eje anteroposterior; simultáneamente, adquieren forma dendrítica y son la positivas. A los 21 días de gestación o pocos días después del nacimiento las CL la positivas presentan GCL. La capacidad proliferativa de las CL fetales de rata parece asegurar la expansión de la población en esa etapa, ya que el índice de marcaje con 5-bromo-2'-deoxiuridina es del 18% a los 17 días, y luego disminuye a 5-6% en el periodo posnatal (Hsiao *et al.*, 1989; Mizoguchi *et al.*, 1992). Finalmente, en las ovejas, las CL se identifican hasta el día 103 de gestación (Hollis & Lyne, 1972).

DISTRIBUCION DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

Las CL de humano y de roedores son, sin duda, las más conocidas. De acuerdo a los criterios ultraestructurales, histoquímicos, histoquímicos enzimáticos e inmunocitoquímicos mencionados, todos los mamíferos estudiados contienen CL. Más aún, la presencia de CL ya no está restringida a la epidermis. Además de ésta y sus derivados, las CL se localizan en epitelios de diferentes mucosas como la bucal, esofágica, conjuntival, corneal, vesical, traqueobronquial, vaginal y del cuello uterino (De Fraissinette, 1989).

El número de CL muestra grandes variaciones regionales y aún dentro de una misma región, entre diferentes sujetos, pueden identificarse diferencias significativas (Brown *et al.*, 1967; Lisi, 1973; Friedmann, 1981; Bermann *et al.*, 1983; Thomas *et al.*, 1984; Horton *et al.*, 1984; Thiers *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1985; Ashworth *et al.*, 1986; Bieber *et al.*, 1988). Es recomendable saber que el rango numérico de las CL en el humano va de 460

a 1000 células/mm² y que representan del 2 al 8% de la población total de células epidérmicas. Esto es importante y debe tomarse en cuenta cuando se quiere investigar la variación en el número de CL en circunstancias experimentales o en lesiones cutáneas; el mejor control será el número de CL del sitio sano adyacente a la lesión.

El número de CL también cambia con la edad. La piel lateral del antebrazo de personas mayores de 64 años tiene menos CL ATPsa positivas (670/mm²) que en individuos menores de 25 años (1014/mm²); en estos grupos el número de CL/mm² en la piel de glúteos es de 853 y 990, respectivamente (Thiers *et al.*, 1984). Esto ha sido confirmado para todas las regiones corporales, resaltándose que las zonas expuestas a la radiación solar son las que presentan menos CL (Scheibner *et al.*, 1983), como la piel con daño actínico solar, en la que la reducción del número de CL es de hasta un 50% en comparación a las mismas regiones sanas (Delo *et al.*, 1981; Gilchrest *et al.*, 1983).

Los roedores también muestran variaciones regionales en el número de CL, identificándose notorias diferentes interespecie e intraespecie. En los cobayos, el número promedio de CL ATPsa positivas es de 900/mm², sin haber variaciones regionales significativas (Wolff & Winkelmann, 1967). Sin embargo, se han informado resultados diferentes en especies de roedores, incluido el cobayo (ver la siguiente tabla) (Bergstresser *et al.*, 1980a, b y c). En la rata, la epidermis del cojinete plantar, de la cola y de la oreja tiene menos CL que la del dorso (Chen & Silvers, 1983).

A diferencia de los humanos, en los ratones hay dimorfismo sexual en el número de CL; el número de CL en la epidermis de oreja y miembros posteriores es significativamente menor en machos que en hembras y esta diferencia se pierde después de la orquiectomía (Koyama *et al.*, 1987).

DENSIDAD DE CL/mm² EN TRES ESPECIES DE ROEDORES

	cobayo	hamster sirio	ratones C57BL/6
Dorso	1460	1300	760
Oreja	900	620	470
Boca	950	130 (abazón)	690
Cojinete plantar	830	760	820
Cola	-	-	110
Córnea	ausentes	ausentes	ausentes

Un hecho interesante es que dentro de una misma región hay variaciones numéricas de CL, aparentemente relacionadas con el patrón de la queratinización y con la presencia o no del estrato granuloso. En la cola del ratón, las CL son más numerosas en las zonas interescamosas ortoqueratinizadas, mientras que están prácticamente ausentes en las escamas, que son paraqueratóticas (Figura 2g) (Schweizer & Marks, 1977; Schweizer 1980). La naturaleza de la interrelación de CL y procesos de queratinización es un enigma y prácticamente no ha sido estudiada.

Con el empleo de algunas de las metodologías mencionadas anteriormente se ha demostrado que las CL tienen una distribución muy amplia en el organismo. Han sido identificadas en todos los anexos cutáneos, en la circulación sanguínea y linfática, en la zona paracortical de ganglios linfáticos, en la región corticomedular del timo y en la

mayoría de las mucosas, sobre todo las que están revestidas por epitelios planos estratificados. La siguiente lista es una referencia de las principales localizaciones de las CL:

Localizaciones de la CL:

1. Vaina radicular externa del folículo piloso y conductos de glándulas sebáceas (Breathnach, 1963; Jimbow *et al.*, 1969)
 2. Conductos de glándulas apocrinas (Ito *et al.*, 1976).
 3. Dermis normal de feto y adulto (Zelickson, 1965; Hashimoto & Tarnowski, 1968; Wolff, 1972; Breathnach, 1977, 1978; Murphy *et al.*, 1983).
 4. Capilares sanguíneos dérmicos (Silberberg *et al.*, 1974; Zelickson, 1979).
 5. Vasos linfáticos en piel normal y con dermatitis por contacto (Silberberg *et al.*, 1975 y 1976; Breathnach, 1977 y 1978).
 6. Sangre periférica normal (Dezutter-Dambuyant *et al.*, 1984; Wood *et al.*, 1984).
 7. Sangre periférica de pacientes quemados (Wood *et al.*, 1984; Gothelf *et al.*, 1988).
 8. Sangre del cordón umbilical (Gothelf *et al.*, 1986).
 9. Timo (Hoshino *et al.*, 1970; Warchol *et al.*, 1984).
 10. Linfonodos (Kondo, 1969; Jimbow *et al.*, 1969; Vermon *et al.*, 1973; Silberberg *et al.*, 1976; Rausch *et al.*, 1977; Kobayashi & Hashimoto, 1977).
 11. Epitelios planos estratificados:
 - Lengua, mejillas y encías (Waterhouse & Squier, 1967; Hutchens, 1971; Al Yassin & Toner, 1976).
 - Esófago (Al Yassin & Toner, 1976; Hopwood *et al.*, 1978).
 - Nasofaringe (Jahnke, 1974).
 - Tonsilas (Mootz *et al.*, 1971).
 - Vagina y cuello uterino (Younes *et al.*, 1968; Hackemann *et al.*, 1968; Figueroa & Caorsi, 1980).
 - Conjuntiva (Böck & Hanak, 1971).
 - Limbo corneal (Vantrappen *et al.*, 1985).
 12. Urotelio vesical (Lellouch-Tubiana *et al.*, 1986).
 13. Epitelio traqueobronquial (Richard *et al.*, 1987).
-

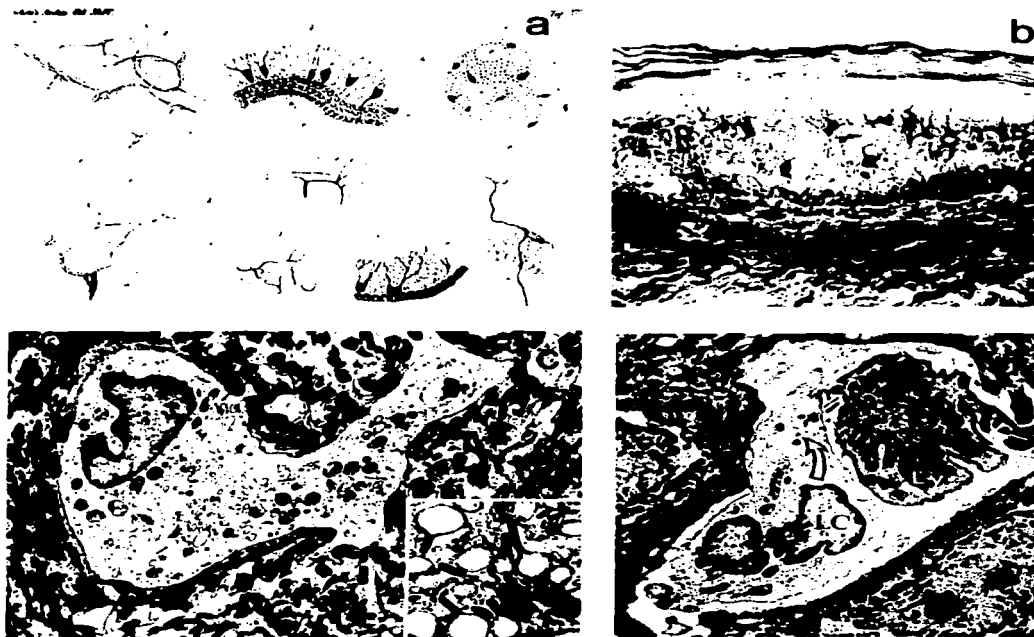


Figura 1. Paul Langerhans (1868) describió las células dendríticas aureofílicas en la piel humana, hoy llamadas células de Langerhans (CL), como cuerpos negros, distintos a las células epiteliales, cuyas prolongaciones alcanzan el estrato córneo y se extienden hasta la dermis (a). Las CL tienen una posición basal y suprabasal dentro de la epidermis (b); por su morfología, se postuló que eran elementos del sistema nervioso o melanocitos inactivos y en proceso de descamación. Estas ideas permanecieron durante 100 años, hasta que se demostró que las CL no tienen ninguna relación ontogénica con melanocitos o con células nerviosas. Por el contrario, las CL poseen características ultraestructurales propias, como es el núcleo indentado, un citoplasma claro por la ausencia de tonofilamentos y melanosomas, cuya membrana no establece uniones tipo desmosoma con los queratinocitos vecinos (c, d). Sin embargo, el rasgo distintivo en la identidad de las CL es el gránulo de las CL o gránulo de Birbeck (c, recuadro), organelo endosomal involucrado en la captación y procesamiento de antígenos. La aposición de CL y linfocitos intraepidérmicos (d) en piel normal y, sobre todo, en reacciones de hipersensibilidad por contacto, cambió el concepto de las CL. La presencia de estas células dentro de vasos linfáticos (células veladas) y su arribo a las regiones paracorticales T dependientes de los ganglios linfáticos (células interdigitantes), sugirió que las CL captan antígenos en la piel, los procesan durante su migración y los presentan a los linfocitos T, induciendo respuestas inmunológicas primarias.

(Figuras tomadas de "Epidermal Langerhans cells", Ed. G. Schuler, CRC Press, 1991)

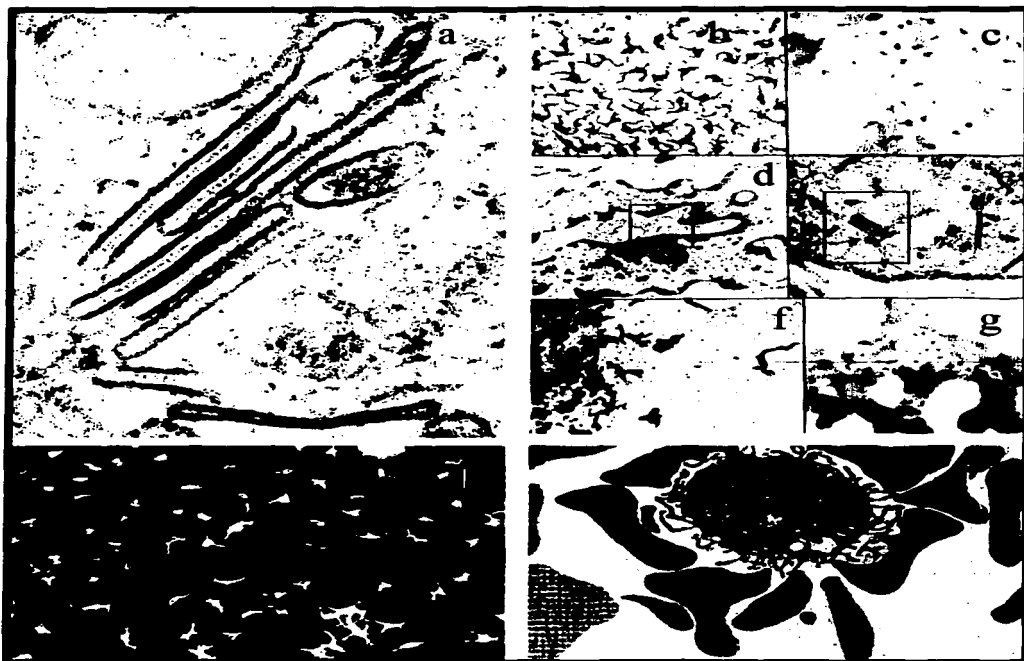


Figura 2. Características morfológicas e inmunofenotípicas fundamentales de las células de Langerhans (CL) de los mamíferos. Las CL presentan un organelo en forma de bastón o de raqueta de tenis llamado gránulo de las CL (o de Birbeck) (a, d y e, recuadro y figura 3). Los marcadores histoquímicos más confiables para identificar a las CL en láminas epidérmicas son la demostración de la actividad de ATPasa (b) y de esterasa inespecífica (c). En algunas regiones como la córnea (f) y la cola de roedores (g), las CL presentan una distribución peculiar que se ha asociado a las propiedades inmunológicas particulares de estas regiones corporales. Desde el punto de vista inmunofenotípico, las CL expresan moléculas clase II de Complejo Principal de Histocompatibilidad (moléculas Ia) (h) y receptores para el Fc de la IgG, receptores para C3b pero no para el Fc de la Ig M, de acuerdo al ensayo de formación de rosetas (i).

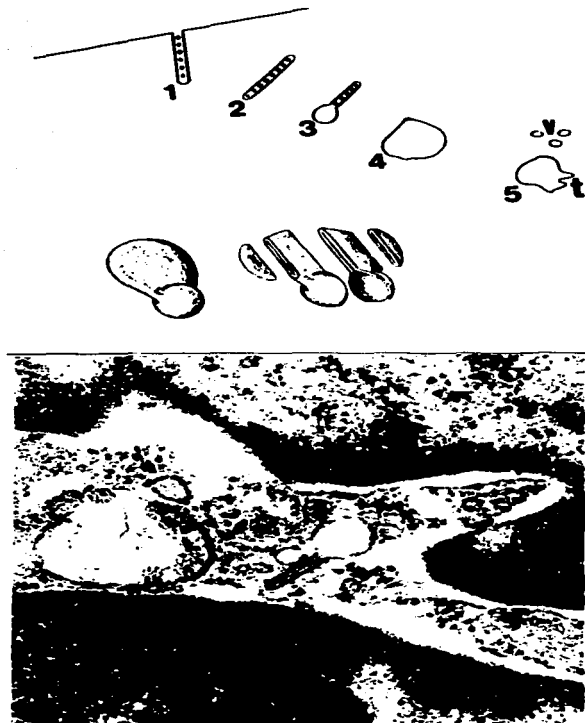


Figura 3. El esquema superior representa los eventos en la formación del gránulo de las CL de acuerdo a la teoría endocítica. Formación del GCL (1) e internalización del GCL (2); vesiculación parcial (3) y total del GCL (4); fusión del GCL con otras estructuras del sistema endosomal (5, v, t). (Tomada de Bartosik, 1992). En la micrografía electrónica inferior se observa en el centro un GCL con la típica imagen de raqueta de tenis, de 450 nm de longitud.

FUNCION DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

La demostración ultraestructural de la aposición de CL y linfocitos intraepidérmicos en dermatitis por contacto (Figura 1d) y la similitudes histoquímicas e inmunofenotípicas de las CL con las células del sistema fagocítico-mononuclear fueron el punto de partida para investigar si, además, compartían propiedades funcionales. Ahora está perfectamente establecido que las CL son muy importantes en las fases inductivas de las respuestas inmunológicas originadas en la piel. Numerosas evidencias obtenidas de estudios *in vitro* e *in vivo* en humanos y en animales fundamentan el concepto de que las CL son potentes estimuladores de la activación de células T. La mayoría de los estudios *in vitro* han empleado cocultivos de linfocitos T purificados y suspensiones de células epidérmicas totales o enriquecidas de CL. Las principales conclusiones de estos trabajos son: 1) las CL son células presentadoras de antígenos (CPAg) en respuestas antígeno específicas de células T; 2) las CL son estimuladores en las reacciones leucocíticas mixtas alogénicas y autólogas; 3) las CL son células accesorias en respuestas de células T inducidas por lectinas y 4) son células accesorias en la generación de linfocitos T citotóxicos alorreactivos y hapteno-específicos. Los hallazgos que fundamentan estas conclusiones son que las CL son más eficiente que los monocitos/macrófagos en estas funciones estimuladoras, las cuales son abolidas cuando las suspensiones de células epidérmicas son depletadas de CL y, finalmente, a que las respuestas de células T se incrementan en paralelo al incremento del porcentaje de CL presentes en los enriquecidos de células epidérmicas. A continuación se mencionan los principales trabajos que fundamentan lo antes mencionado.

Funciones *in vitro*. La primera evidencia de la capacidad de las CL para funcionar como CPAg surgió de la observación de que los linfocitos T de cobayos sensibilizados previamente con albúmina de huevo, mostraban una respuesta proliferativa muy intensa cuando se incubaban con suspensiones de células epidérmicas (obtenidas de animales singénicos o alogénicos no sensibilizados) y enriquecidas con CL pulsadas con albúmina de huevo. Esta proliferación, observada a los 3 días de cultivo, estaba prácticamente abolida cuando se utilizaban suspensiones depletadas de CL o que habían sido pretratadas con anticuerpos anti-Ia y complemento (Stingl *et al.*, 1978). Con algunas variaciones, sobre todo en la manera de depletar CL y usando otros antígenos, se han obtenido resultados similares en humanos (Braathen & Thorsby, 1980; Braathen *et al.*, 1980; Braathen & Kaaman, 1983; Bjercke *et al.*, 1984; Bagot *et al.*, 1985) y en ratón (Stingl *et al.*, 1981; Gurish *et al.*, 1983; Aberer *et al.*, 1986). El empleo de suspensiones epidérmicas en estos trabajos planteaba la posibilidad de que los queratinocitos participaran en la presentación de antígenos. Esta cuestión fue parcialmente resuelta al utilizarse suspensiones celulares en las que las CL la positivas constituían más del 95% y demostrarse que la función de presentación de antígenos recaía en las CL (Inaba *et al.*, 1986).

También se demostró que una suspensión de células epidérmicas enriquecida con CL haptinizadas con trinitrofenil (TNP) provocaba una respuesta proliferativa intensa en linfocitos T singénicos reactivos a TNP (Stingl *et al.*, 1978). Posteriormente, se observó que con tan sólo 6000 CL la positivas, "haptinizadas" *in vitro* con TNP e inoculadas por vía intravenosa, se inducía un estado sistémico de hipersensibilidad de contacto manifestado intensamente al desafiar con el mismo hapteno (TNP) la oreja de animales singénicos (Sullivan *et al.*, 1985). Igualmente relevante fue la demostración de que este

efecto no se obtenía al utilizar queratinocitos puros haptinizados. En este contexto están los hallazgos en pacientes alérgicos al níquel, cuyos linfocitos son estimulados intensamente por CL "haptinizadas" con sulfato de níquel (Braathen, 1980; Braathen & Torsby, 1983; Rasanen, 1986; Res *et al.*, 1987; Kapsenberg *et al.*, 1987). Los estudios funcionales *in vitro* pusieron de manifiesto, además, que las CL modifican importantemente sus características histoquímicas, ultraestructurales, inmunofenotípicas y funcionales, en relación directa con el tiempo de cultivo. Las CL recién aisladas de la epidermis son muy débiles estimuladoras de la reacción leucocítica mixta primaria y de la respuesta humoral, mientras que las CL obtenidas después de 72 h de cultivo y estimuladas con las citoquinas derivadas de los queratinocitos, se parecen a las células dendríticas esplénicas en su capacidad para evocar respuestas primarias de células T y B (Inaba *et al.*, 1986). Esto confirmaba la hipótesis de que las CL recién aisladas de la epidermis representaban células dendríticas inmaduras (Schuler & Steinman 1985), las cuales, luego de periodos cortos de cultivo, pierden o disminuyen, entre otras características, el número de GCL, la actividad de ATPasa y de esterasa no específica y la expresión de los receptores para el Fc de la IgG; por el contrario, incrementan la expresión de moléculas clase I y II (Witmer-Pack *et al.*, 1988; Shimada *et al.*, 1987) y de receptores para IL-2 (Steiner *et al.*, 1986). Posteriormente, se demostró que estos cambios son mediados en gran parte por ciertas citoquinas como el GM-CSF e IL-1 (Witmer-Pack 1987; Heufler *et al.*, 1988).

Funciones *in vivo*. La primera función explorada *in vivo* de las CL fue la hipersensibilidad por contacto (HC). La afinidad especial de las CL por diferentes alérgenos (Shelley & Juhlin, 1978) y la estrecha aposición entre CL y linfocitos observada ultraestructuralmente en la piel con HC, sugirió que aquéllas podrían jugar un papel importante en la fase inductiva de la HC (Silberberg, 1973). Posteriormente, se demostró que la aplicación epicutánea del hapteno dinitrofluorobenceno (DNFB) en sitios naturalmente deficientes de CL, como la cola del ratón y la "bolsa" bucal del hamster, o artificialmente depletados de CL, como la piel irradiada con UV, no inducía HC sino un estado específico de no respuesta inmunológica o de tolerancia (Toews *et al.*, 1980; Elmets *et al.*, 1983). Los injertos de piel de ratón tratada previamente con DNFB, sensibilizan a receptores singénicos pero no a los alogénicos, indicando que los requerimientos inmunológicos asociados a la presentación de un Ag y a la inducción de HC, se cumplen dentro de la piel misma (Streilein *et al.*, 1984). La administración subcutánea de macrófagos haptinizados, induce un estado de sensibilización en el receptor mientras que se provoca una no respuesta específica cuando se aplican por vía intravenosa (Ptak *et al.*, 1980). Cuando esto último se realiza conjuntamente con suspensiones celulares enriquecidas con CL haptinizadas, no sólo se induce sensibilización sino que se revierte o se elimina el efecto tolerizador de los macrófagos haptinizados aplicados por vía intravenosa (Ptak *et al.*, 1980, Sullivan *et al.*, 1986). Uno de los posibles mecanismos de lo anterior es la generación de células T hapteno-específicas capaces de mediar directamente la fase efectora de la HC (Hauser, 1990).

A partir de estudios morfológicos se sugirió que después de la aplicación epicutánea de un hapteno, las CL salían de la piel para migrar a los ganglios linfáticos regionales (Silberberg-Sinakin *et al.*, 1976, Silberberg-Sinakin *et al.*, 1978). La evidencia directa de que estas CL migratorias fueran funcionales apareció poco a poco. La aplicación isotiocianato de fluoresceína (FITC) en la piel de ratones no sólo produce reacciones de

hipersensibilidad similares a las observadas con DNFB, sino que va seguida de la aparición de células con el fluorocromo en los ganglios linfáticos regionales. Dichas células, 18 a 24 h después de aplicado el FITC, son capaces de inducir HC cuando se inyectan en el cojinete plantar de ratones singénicos normales (Thomas *et al.*, 1980). Por otro lado, el cultivo de linfocitos singénicos normales con células FITC positivas aisladas de ganglios linfáticos, origina una fuerte respuesta proliferante de linfocitos T citotóxicos hapteno-específicos (Macatonia *et al.*, 1986). Las células responsables de estos efectos se caracterizan por ser radiorresistentes (Thomas *et al.*, 1980; Okamoto & Kripke, 1987), la positivas (Okamoto & Kripke, 1987), de morfología dendrítica (Macatonia *et al.*, 1986) y algunas poseen el GCL (Macatonia *et al.*, 1987). En otros estudios se ha enfatizado, con evidencias más directas, que las células la positivas/FITC positivas de los ganglios linfáticos se originan en la piel y migran después de la aplicación de un hapteno. En los trasplantes de piel de ratones C3H a ratones BALB/c desnudos y tratados con FITC a través del injerto, se ha observado que las células la positivas/FITC positivas aisladas de los ganglios linfáticos, algunas con GCL, son capaces de inducir HC cuando se transfieren a ratones C3H. Estos resultados permitieron elucidar que las CL y las CD de los ganglios linfáticos son diferentes formas o momentos del mismo tipo celular, cuyo fenotipo y características ultraestructurales dependen del microambiente que las rodea. Un hecho esencial surgido de los experimentos anteriores fue la observación de la capacidad migratoria de las CL, monitoreada directamente en láminas epidérmicas obtenidas de aloinjertos, isoinjertos y explantes, en las que se observó que las CL incrementaban su tamaño y la expresión de moléculas clase II mientras que su número disminuía a 1/3 del normal a las 24 h de realizado cualquiera de los tres procedimientos mencionados. A ese mismo tiempo, el mayor número de CL se ubicaba a nivel de la unión dermoepidérmica; 3 días después de iniciados los experimentos, estas células parecen formar cordones asociados a los vasos linfáticos dérmicos, antes de abandonar la piel. Otro hallazgo interesante del mismo trabajo fue el incremento espontáneo de células migratorias la positivas en el medio de cultivo, mismas que presentaban un fenotipo heterogéneo y una capacidad inmunoestimuladora superior a la de CD esplénicas, sobre todo a los 3 a 5 días de cultivo (Larsen *et al.*, 1990).

En piel humana mantenida en cultivo de órganos se han obtenido resultados similares a los anteriores (Lenz *et al.*, 1993; Pope *et al.*, 1995; Rambukkana *et al.*, 1995; Richters *et al.*, 1995; Lukas *et al.*, 1996). Esto ha permitido postular que la maduración funcional de las CL comienza en la epidermis y continúa durante su migración, o en el cultivo, y que no necesitan ser totalmente maduras en fenotipo y función antes de abandonar la piel. Lo anterior fundamentaba, con evidencia menos circunstancial, la idea de que las CL tienen capacidad de migrar desde la epidermis a los vasos linfáticos dérmicos y de aquí a los ganglios linfáticos regionales, tanto en condiciones normales como en HC.

Un desafío a lo mencionado anteriormente es la demostración de que las CL dérmicas observadas en reacciones de hipersensibilidad retardada se originan, en número considerable, de células circulantes en la sangre (Kaplan *et al.*, 1987). Hasta ahora, el recambio exacto de CL en condiciones normales, experimentales o patológicas, casi no se ha estudiado, por lo que su conocimiento podría definir aún más el papel de éstas y otras células en las fases de la HC.

Las diferencias fenotípicas y funcionales entre las CL *in situ*, las recién aisladas y las cultivadas han generado un concepto muy atractivo a partir de los resultados funcionales mencionados. Se sabe muy bien que las propiedades funcionales de las CL están

determinadas por diferentes estados de diferenciación, maduración y activación. Así, las CL intraepidérmicas, al igual que otras CD de los órganos no linfoides, poseen una potencia limitada para estimular linfocitos T en reposo vírgenes (naïve), pero son altamente eficientes en la captación de Ag (Romani *et al.*, 1989). Aunque los mecanismos implicados no se conocen del todo, las CL son capaces de captar grandes partículas, desde esferas de latex (Wolff & Honrad, 1972) hasta amastigotes de *Leishmania major* (Blank *et al.*, 1993). Las CL cultivadas, o después de ciertos estímulos microambientales, pasan por un proceso conocido como activación o maduración de las CL (Schuler & Steinman, 1985). Como consecuencia de ello, las CL pierden la capacidad de captar Ag pero adquieren la capacidad de procesarlos y presentarlos y, con ello, estimular a los linfocitos T en reposo vírgenes, para el desempeño de funciones cooperadoras y de citotoxicidad. Los Ag que son presentados por las CL para la inducción de respuestas inmunológicas primarias incluyen a los aloantígenos (Aberer *et al.*, 1982; Inaba *et al.*, 1986), a haptenos y Ag proteicos solubles (Hauser & Katz, 1988; Hauser, 1990), a Ag tumorales (Grabbe *et al.*, 1991; Celluzi & Falo, 1977) y microorganismos (Moll *et al.*, 1993; Konecny *et al.*, 1999). La función inmunoestimuladora de las CL ha sido estudiada ampliamente hasta el presente y se conoce mucho de los factores moleculares (citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y péptidos) involucrados en la activación y maduración de estas CD inmaduras de la epidermis. Sin embargo, poco se conoce de las moléculas que mantienen a las CL en su estado inmaduro o que inhiben su migración y con ello, por lo tanto, evitan la expresión funcional de estas células.

Las CL humanas pueden madurar por la acción de LPS, TNF α o IL-1 β , pero la acción de TGF- β 1, secretado constitutivamente por los queratinocitos y las mismas CL inmaduras, previene esta maduración (Geissman *et al.*, 1999). Asimismo, los queratinocitos normales producen pequeñas cantidades de IL-10, misma que se incrementa después de varias dosis bajas de radiación UVB y que podría mediar la abolición de la respuesta a la aplicación de haptenos por contacto e inducir tolerancia (Niizeki & Streiling, 1997). En este sentido, IL-10 podría también participar en el mecanismo de evasión inmunológica observado en algunos melanomas (Enk *et al.*, 1997). En los humanos, la migración de CL *in vitro* es inhibida por IL-4 a través de la hiporregulación de la expresión del receptor II de TNF (Takayama *et al.*, 1999).

La función presentadora de Ag de las CL cultivadas es inhibida por el péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP) liberado por fibras nerviosas que están en estrecha aposición a las CL (Hosoi *et al.*, 1993). Estos y otros factores pueden ser relevantes en la inducción de anergia o tolerancia para la prevención o tratamiento de enfermedades autoinmunes o del rechazo de trasplantes, en donde estarían involucradas las CL.

ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

Un concepto ampliamente aceptado y fundamentado es el que las CL son leucocitos CD45 positivos que expresan marcadores característicos del linaje mieloide como CD13 y CD33 y que, por lo tanto, sus precursores se originan en la médula ósea (MO). El conocimiento actual que se tiene del origen y diferenciación de las CL es el resultado de numerosos estudios *in vitro* realizados en los últimos 10 años. La determinación de que las CL pertenecen a la familia de las CD y que son inmaduras en comparación a las CD de los órganos linfoides (Schuler & Steinman, 1985) promovió que las CL y sus precursores fueran estudiados intensamente dentro del contexto de las CD. Así, la

generación de CD/CL a partir de la MO o de sangre periférica en murinos (Inaba *et al.*, 1992a; 1992b) y a partir de sangre obtenida de cordón umbilical humano (Caux *et al.*, 1992) es el comienzo de la conformación de una red ontogénica muy compleja de las CL/CD (revisado por Ardavin *et al.*, 2001)

Las CD mieloides pueden ser generadas *in vitro* a partir de progenitores CD34 positivos obtenidos de MO o de sangre de cordón umbilical, en presencia de GM-CSF y TNF- α (Santiago-Schwartz *et al.*, 1992; Caux *et al.*, 1992). Esta diferenciación de CD sigue dos vías independientes y mutuamente excluyentes de acuerdo a la expresión de CD1a y de CD14 (Caux *et al.*, 1996). La estimulación continua de los intermediarios CD1a positivos/CD14 negativos origina CD parecidas a CL, de acuerdo a los marcadores fenotípicos y funcionales que expresan como GCL, E-cadherina y antígeno Lag, siendo esta vía independiente de TGF- β ; en las mismas condiciones de cultivo, los intermediarios CD14 positivos/CD1a negativos originan macrófagos o CD con morfología, fenotipo y función diferentes a las CL.

La diferenciación de CL también puede lograrse a partir de una fracción celular CD11b negativa obtenida de los intermediarios CD14 positivos/CD1a negativos, en una vía dependiente de TGF- β 1 (Jaksits *et al.*, 1999). De la misma manera, las CL pueden ser diferenciadas a partir de monocitos (Geissmann *et al.*, 1998) o de CD CD1a positivas/CD11c positivas (Ito *et al.*, 1999) incubados en una mezcla de GM-CSF, IL-4 y TGF- β 1 y, subsecuentemente, incubando en TNF- α e IL-1 para lograr la maduración de las CL. Se ha sugerido que la vía de diferenciación de CL independiente de TGF- β 1, tanto en ratones como en humanos, puede reflejar un defecto en el proceso de diferenciación o maduración de CL o en la expresión de marcadores, no relacionado a la contraparte fisiológica *in vivo* de las CL (Ardavin *et al.*, 2001).

La importancia de TGF- β 1, por encima de GM-CSF, TNF- α e IL-4, en la diferenciación más completa y funcional de las CL (incluido el "homing" a la piel) está claramente demostrada por la observación de que los ratones TGF- β -1 carecen de CL, hecho que no se debe a un defecto a nivel del progenitor (Borkowski *et al.*, 1996; 1997). Recientemente, se ha demostrado que también el Ligando FLT3 podría ser relevante en promover una diferenciación más fisiológica de las CD de humanos y ratones, tanto *in vitro* como *in vivo* (Maraskovsky *et al.*, 1996; 2000; Brasel *et al.*, 2000; Curti *et al.*, 2001), aunque está en duda si induce una diferenciación preferencial hacia CL (Maurer & Stingl, 1999).

Otro marcador fundamental que delinea los precursores de las CL de humanos, a partir de las células progenitoras CD34 positivas de sangre periférica, es la molécula CLA (skin-homing receptor cutaneous lymphocyte-associated antigen) ya que solamente los progenitores circulantes CD34 positivos/CLA positivos expandidos *in vitro* se diferencian a CL con GCL (Strunk *et al.*, 1996; 1997).

La complejidad en la ontogenia de las CD se ha incrementado recientemente con la identificación *in vitro* de una población de CD de origen linfóide que expresa la molécula de superficie CD8 α (Saunders *et al.*, 1996). En condiciones normales, aún no se ha demostrado la presencia de estas células en la piel de humanos y de ratones. En este sentido, es interesante que los ratones Ikaros, los cuales carecen de todas las poblaciones derivadas del linaje linfóide, tengan un número normal de CL epidérmicas, enfatizando el origen mielóide de estas células. (Georgopoulos *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1997) Por otro lado, la alteración de los genes que codifican para el factor de transcripción relB produce ratones con una ausencia casi completa de CD en órganos linfoides pero

con un número normal de CL en la epidermis (Burkly *et al.*, 1995). Por todo lo anterior, está claro que las CL tienen un origen mieloide; sin embargo, falta mucho por conocerse de la influencia de los factores microambientales locales presentes en la circulación o en la piel que promueven la diferenciación final y fisiológica de las CL.

MIGRACION Y MADURACION DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

La propiedad migratoria de las CL es un componente esencial de su función. Durante la migración, las CL se transforman de una células "inmadura" que capta y procesa Ag a una células madura que los presenta (Schuler & Steinman, 1985). Algunos estímulos como IL-1, GM-CSF, TNF- α (Heufler *et al.*, 1988) y LPS (revisado en Banchereau & Steinman, 1998) promueven la maduración de las CL. Este cambio fundamental en las CL se caracteriza por la hiperregulación de moléculas clase I y II, de moléculas de adhesión como ICAM-1, de moléculas coestimuladoras como CD24, CD40, CD50/ICAM-3 CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3, CD80/B7-1 y CD86/B7-2 (Maurer & Stingl, 2001); asimismo, se induce la síntesis de IL-1 β , IL-6 (Schreiber *et al.*, 1992), IL-12 (Kang *et al.*, 1996), IL-15 (Blauvelt *et al.*, 1996) e IL-18 (Stoll *et al.*, 1998). También se incrementa la expresión de algunos receptores de citocinas y factores quimiotácticos, como los receptores α (CD116) y β (CD131) de GM-CSF, el receptor II de IL-1 (CD121b), los receptores α (CD25) y β (CD122) de IL-2 y CCR7 (Maurer & Stingl, 2001). Concomitantemente, las CL maduras disminuyen la expresión de los receptores para Fc de IgG (receptor II/CD32), la actividad de ATPasa y esterasa, y disminuye el número de GCL y la expresión de Langerina asociada a estos organelos. La consecuencia de lo antes mencionado es que las CL adquieren la capacidad de estimular linfocitos vírgenes en reposo para que manifiesten actividad cooperadora y/o citotóxica. Como ya se mencionó, los Ag que pueden ser presentados por las CL e inducir respuestas inmunológicas primarias incluyen a aloantígenos (Aberer *et al.*, 1982; Inaba *et al.*, 1986), Ag proteicos solubles y haptenos (Hauser & Katz 1988; Hauser 1990), Ag tumorales (Grabbe *et al.*, 1991) y microorganismos (Konecny *et al.*, 1999).

Un asunto que empieza a ser conocido es el de los mecanismos intrínsecos que regulan la entrada de los precursores de las CL a la piel, su estancia y emigración epidérmica y el movimiento posterior hacia los ganglios linfáticos. Los progenitores o precursores de CL y las CL se enfrentan a diferentes microambientes durante su migración. Lo anterior inicia con un movimiento transendotelial desde los vasos sanguíneos hacia el tejido conectivo de la dermis y de aquí hacia la epidermis, atravesando la lámina basal. Dentro de la epidermis, las CL deben mantenerse en movimiento y guardar su posición basal y suprabasal, "caminando contra la corriente" de queratinocitos, que se desplazan desde los estratos basales hacia los estratos superficiales para descamarse. Si hay un estímulo antigénico o no, las CL salen de la epidermis y se enfrentan a los mismos caminos de matriz extracelular como son la ámina basal y la dermis papilar, antes de interactuar con los capilares linfáticos, entrar en ellos y, a través del flujo linfático, llegar a los ganglios o linfonodos regionales, ubicándose en la zona T dependiente paracortical, sitio en el que presentarán los Ag a los linfocitos T.

A continuación revisaremos brevemente las evidencias de la regulación molecular del patrón migratorio de las CL.

Arribo a la piel. Este es uno de los aspectos que menos se conocen de la movilidad de las CL. Los precursores de las CL parecen ser reclutados desde la sangre y guiados hacia la epidermis por la quimocina MIP-3 α /CCL20, que es producida constitutivamente por los queratinocitos y por el endotelio vascular de la piel. Los precursores CD34 positivos-CD1a positivos de las CL expresan el único receptor conocido para MIP-3 α /CCL20, el CCR7 (Dieu *et al.*, 1998; Charbonnier *et al.*, 1999; Dieu-Nosjean *et al.*, 2000). Por otro lado, la ausencia de CL en la epidermis de ratones knockout para TGF- β 1, pero no de sus precursores circulantes, manifiesta la importancia de dicha molécula en la entrada de las CL a la epidermis (Borkowski *et al.*, 1996; 1997).

“Homing” y permanencia en la epidermis. Las CL expresan altos niveles de E-cadherina, molécula de adhesión que media la unión selectiva entre queratinocitos y CL *in vitro* (Tang *et al.*, 1993; Blauvelt *et al.*, 1995). Hasta un 40% de las CL activadas *in situ* por alérgenos o por citoquinas proinflamatorias, disminuyen la expresión de E-cadherina, lo que podría interpretarse como un hecho preparatorio para la migración de las CL. Las dos citoquinas proinflamatorias más relevantes en la inducción de la emigración de las CL, IL-1 β y el TNF- α (Cumberbatch *et al.*, 1997), parecen actuar, por lo menos en parte, a través de la reducción de la expresión de E-cadherina (a nivel de RNAm y de la molécula de adhesión en membrana), y con ello, atenúan la unión entre CL y queratinocitos (Jacob & Udey, 1998). E-Cadherina también se reduce en las CL después de la aplicación de haptóenos por contacto (Schwarzenberger & Udey, 1996), lo cuales son potentes inductores de la neosíntesis de IL-1 β y TNF α y otros mediadores proinflamatorios (Enk & Katz 1992; Enk *et al.*, 1993; Rambukkana *et al.*, 1996).

Emigración de la epidermis. Debido a la acción de los estímulos arriba mencionados, las CL empiezan a moverse activamente para enfrentar y atravesar la membrana basal y la dermis. La lámina densa de la membrana basal está formada principalmente de colágena tipo IV, que es un sustrato específico para las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), como MMP-9 y MMP-2 (Shapiro, 1998). Las CL tienen la capacidad de atravesar membranas basales reconstruidas artificialmente (Kobayashi *et al.*, 1994) y todo sugiere que lo hacen a través de la acción de MMP (Uchi *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999; Ratzinger *et al.*, 2000), particularmente MMP-9, ya que la inyección de Ac anti-MMP-9, antes de la aplicación de haptóenos por contacto, bloquea la emigración de las CL desde la epidermis (Kobayashi *et al.*, 1999; Lebre *et al.*, 1999; Ratzinger *et al.*, 2000). Interesantemente, la MMP-9 es activada por TNF- α e IL-1 β (Zhang *et al.*, 1998), que, como ya se mencionó, promueven la emigración de CL probablemente al hiporregular la expresión de E-cadherina.

Movimiento a través de la dermis. Es muy probable que las MMP y el sistema multienzimático activador del plasminógeno (Chapman 1997; Ferrero *et al.*, 2000) participen en la migración de CL a través del tejido conectivo dérmico. Sin embargo, son las integrinas la que han recibido mayor atención al respecto. Las integrinas β 2 son moléculas de adhesión heterodiméricas que median las interacciones célula-matriz y célula-célula. La matriz extracelular y la lámina basal contienen colágenas, fibronectina y laminina, que unen selectivamente a las combinaciones de integrinas α y β (Hynes, 1992). Varias integrinas β (VLA-1 a VLA-6) se han identificado en las CL (Le Varlet *et al.*, 1991; Aiba *et al.*, 1993). La integrina α 6 β 4 parece jugar un papel en la emigración de las CL

epidérmicas de murinos ya que los Ac anti $\alpha 6$ que bloquean la unión de esta integrina con la laminina, inhiben la migración espontánea de CL en explantes de piel *in vivo*, inducida por TNF- α y haptenos por contacto (Price *et al.*, 1997). Adicionalmente, la integrina $\alpha 6 \beta 4$ parece ser importante en la transmigración de las CL a través de lámina basal.

Las CL en migración expresan varias isoformas de la molécula CD44, que es un receptor para el ácido hialurónico, componente fundamental de la matriz extracelular. Algunos Ac anti-CD44 inhiben la migración espontánea de CL en explantes de piel y en la fase de inducción de la HC. Algunas isoformas de CD44 están implicadas en la localización de las CL maduras en las regiones paracorticales de los ganglios linfáticos (Osada *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1997; 1998).

Entrada a los vasos linfáticos y búsqueda de la paracorteza.

Una de las primeras evidencias de las propiedades migratorias de las CL es la identificación de estas células dentro de los vasos linfáticos aferentes, después de la aplicación de haptenos por contacto (Silberberg *et al.*, 1976). Hoy se sabe que estímulos diferentes son capaces de inducir la migración y maduración de las CL, entre ellos: activación de factores del complemento (Morelli *et al.*, 1996), lipopolisacárico (Roake *et al.*, 1995), haptenos fluorescentes (Macatonia *et al.*, 1987), radiación con luz ultravioleta B (Moodycliffe *et al.*, 1992), trasplantes de piel alogénica y explantes de piel (Austyn & Larsen 1990; Larsen *et al.*, 1990) e inmunización genética (Condon *et al.*, 1996; Progador *et al.*, 1998).

Muy poco se sabe de las moléculas involucradas en la "intravasación" de las CL a los vasos linfáticos. Es importante recordar que los capilares linfáticos presentan una pared muy delgada, cuyas células endoteliales tienen una lámina basal discontinua y entre ellas existen grandes espacios. Lo anterior podría facilitar la entrada de las CL a la circulación linfática. Sin embargo, hay evidencia de que esto podría estar regulado por quimocinas. En los ratones, las células endoteliales de los vasos linfáticos expresan la quimocina SLC/6Ccina/CCL21 (Gunn *et al.*, 1998; Saeki *et al.*, 1999), cuya administración exógena incrementa el número de CD que emigran de explantes de piel de ratón (Kellermann *et al.*, 1999), mientras que su bloqueo deteriora la emigración de CD maduras de la dermis *in vivo* (Saeki *et al.*, 1999). Una primera consecuencia de la maduración de las CL es la pérdida de funciones como la captación de Ag, lo cual ocurre asociado a la hiporregulación de receptores endocíticos y a un rearrreglo del citoesqueleto. Otro cambio que ocurre es que la respuesta a la mayoría de las quimocinas también se pierde rápidamente, probablemente por desensibilización secundaria a la saturación de receptores debido a la producción endógena del ligando por las CD activadas (Sallusto *et al.*, 1998; 1999) o por hiporregulación del receptor a nivel de RNAm (Dieu *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1998).

Las CD maduras (Dieu *et al.*, 1998) y las CL mismas (Yanagihara *et al.*, 1998; Saeki *et al.*, 1999) expresan el receptor para quimocinas -7 (CCR7) cuyos ligandos exclusivos son las quimocinas MIP-3 β , también llamada ELC (Epstein-Barr virus-induce molecule 1 ligand chemokine) y SLC (Secondary Lymphoid tissue Chemokine). Estas quimocinas se conocen como CCL19 (ELC/MIP-3 β /Exodus-3) y CCL21 (SLC/6Ccina/Exodus-2) de acuerdo a una reciente nomenclatura (Zlotnik & Yoshine, 2000). Ambas ejercen una acción de quimioatracción muy poderosa para CD y CL (Yanagihara *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1999; Kellermann *et al.*, 1999; Saeki *et al.*, 1999; Stoitzner *et al.*, 2001). Interesantemente, todas las CD maduras humanas, sin importar su origen pero que

expresen CCR7, responden de la misma manera a CCL19 y CCL21 (Dieu *et al.*, 1998).

Búsqueda de la región paracortical. Papel de CCR7. En los órganos linfoides secundarios de ratones y del hombre, CCL21 se expresa en las vénulas poscapilares de endotelio alto (Gunn *et al.*, 1998; Dieu-Nosjean *et al.*, 1999), mientras que CCL19 es expresada constitutivamente por las células estromales de las regiones T-dependientes de los órganos linfoides secundarios, como es la paracorteza ganglionar (Dieu *et al.*, 1998; Ngo *et al.*, 1998). Estas observaciones sugieren que las CL maduras que expresan CCR7, emigran a través de los vasos linfáticos aferentes CCL21 positivos y son "jaladas" o conducidas hacia las zonas T-dependientes de los ganglios linfáticos, una vez que llegan al seno marginal o subcapsular, en respuesta a la expresión y producción de CCL19 y CCL21 por las células estromales de esta región ganglionar.

La relevancia de estas quimocinas y de CCR7 en el reclutamiento de CL/CD está manifestada también en los ratones naturalmente deficientes de CCL21 (Gunn *et al.*, 1999) y en ratones que no expresan CCR7 (Forster *et al.*, 1999). Estos animales tienen órganos linfoides histológicamente desorganizados por la ausencia o disminución notable de células T y CD.

Seguramente otras quimocinas están involucradas, como lo sugiere la acumulación de CD maduras alrededor de los linfáticos dérmicos de ratones deficientes del receptor CCR2 (Sato *et al.*, 2000), el cual une a MCP (Macrophage Chemoattractant Protein), en los cuales hay emigración normal de CL de epidermis a la dermis pero no a los ganglios linfáticos.

Papel de IL-1 β y TNF α en la migración de las CL. Las CL adquieren la capacidad de presentar Ag después de 24 a 48 h de cultivo, en presencia de citoquinas apropiadas, o *in vivo* durante la migración desde la epidermis hacia los vasos linfáticos. Se asume, en todos los casos, que el inicio de la migración de las CL se asocia al inicio de cambios fenotípicos como parte de un proceso de maduración hacia CD inmunoestimulatorias. Esta maduración funcional de las CL está mediada por citoquinas epidérmicas, siendo las más importantes GM-CSF, IL-1 β y TNF- α (Witmer-Pack *et al.*, 1987; Heufler *et al.*, 1988; Picut *et al.*, 1988; Koch *et al.*, 1990; Furue *et al.*, 1996; Ozawa *et al.*, 1996). La aplicación epicutánea de alérgenos de contacto o de irritantes induce la liberación de estas y otras citoquinas por los queratinocitos; dos de ellas son señales mandatarias para la movilización de CL: IL-1 β y TNF- α . La aplicación intradérmica de TNF- α en ratones, provoca una reducción rápida, en los primeros 30 min, en el número de CL en la epidermis suprayacente al sitio de la inyección; a las 2 h, se observa un incremento en el número de CD en los linfonodos regionales (Kimber & Cumberbatch 1992; Cumberbatch & Kimber 1992; Cumberbatch *et al.*, 1994). En los humanos, TNF α tiene un efecto similar al observado en ratones (Groves *et al.*, 1995; Cumberbatch *et al.*, 1999). La inyección intraperitoneal de Ac anti-TNF- α en ratones, abole la migración de CL e inhibe la inducción de hipersensibilidad por contacto a oxazolona (Cumberbatch & Kimber, 1995). Además, la inhibición de la producción *de novo* de TNF- α por dexametasona, también inhibe la migración de CL inducida por alérgenos cutáneos (Cumberbatch *et al.*, 1999), pero no la provocada por la inyección intradérmica de TNF- α .

Las CL expresan exclusivamente el receptor 2 para TNF (TNF-R2) (Koch *et al.*, 1990; Ryffel *et al.*, 1991; Larregina *et al.*, 1996), así que los efectos paracrinos directos de TNF- α sobre las CL serían a través de este receptor. Los ratones knockout deficientes de TNF-

R1 presentan una migración normal de CL dependiente de TNF- α (Wang *et al.*, 1996) mientras que los deficientes de TNF-R2 la tienen notablemente inhibida (Wang *et al.*, 1997).

Los efectos de TNF- α sobre la migración de CL parecen ser dosis dependientes y especie-específicos (Kimber & Cumberbatch, 1992; Cumberbatch & Kimber, 1992). Un efecto aparentemente paradójico de TNF- α es que a ciertas dosis evita el movimiento de las CL desde la epidermis (Vermeer & Streilein, 1990); lo que puede estar ocurriendo en esta circunstancia es que TNF- α también promueva una repoblación rápida de la epidermis por precursores de CL circulantes en la sangre (Stoitzner *et al.*, 1997; Cumberbatch *et al.*, 1999).

Interleucina-1 β , cuya secreción por las CL es constitutiva e inducible, también es necesaria para una migración eficiente de las CL hacia los ganglios linfáticos, aunque lo hace más lentamente que TNF- α (Cumberbatch *et al.*, 1997). Se ha propuesto que la diferente dinámica de la migración de las CL inducidas por ambas citoquinas se debe a que IL-1 β es la primera señal necesaria para que los queratinocitos secreten TNF- α (Enk *et al.*, 1993), que es la segunda señal, que activa al TNF-R2 en las CL y dispara la migración. Además de lo anterior, IL-1 β parece ser importante en otro aspecto de la migración de las CL. Esta citoquina ejerce un efecto autocrino sobre las CL induciendo la expresión del receptor tipo I para IL-1 β (IL-1RI), necesario para la migración exitosa de las CL (Cumberbatch *et al.*, 1998; 1999). La importancia de IL-1 β queda manifestada por el hecho de que su neutralización con Ac inhibe significativamente la inducción de hipersensibilidad por contacto (Enk *et al.*, 1994) y porque no se induce sensibilización a trinitrofluorobenceno en ratones knockout para IL-1 β (Shornick *et al.*, 1996).

Como ya fue mencionado, es posible que una consecuencia de la acción de IL-1 β y TNF- α sea la modificación en la expresión de moléculas de adhesión entre las CL y los queratinocitos. El tratamiento sistémico de ratones con Ac anti-IL-1 β y luego intradérmicamente con TNF- α no induce migración de CL; las CL permanecen en las láminas epidérmicas y tienen un aspecto redondeado, separadas de los queratinocitos vecinos. Está demostrado que la movilización de CL se asocia a la pérdida de la expresión de E-cadherina (Tang *et al.*, 1993; Borkowski *et al.*, 1994; Blauvelt *et al.*, 1995; Cumberbatch *et al.*, 1996) y que este efecto puede deberse a TNF- α , a otras citocinas proinflamatorias y a alérgenos por contacto (Schwarzenbarger & Udey, 1996; Jacob & Udey, 1998).

Un hecho interesante es que sólo un 20% a 30 % de las CL migran después de la estimulación con haptenos o con IL-1 β o TNF- α . Este porcentaje es similar al número de CL ATPasa negativas presentes en la epidermis (Girolomoni *et al.*, 1993) y es posible que estas CL sean las que preferentemente liberen IL-1 β , siendo necesaria la participación de la p-glicoproteína, una proteína de membrana que confiere a las células resistencia múltiple a drogas y que es una bomba dependiente de ATP. Lo idea anterior es con base a que la inhibición de la p-glicoproteína con Ac o con antagonistas como el verapamil, inhibe la migración de CD en explantes de piel y causa retención de CL dentro de la epidermis (Randolph *et al.*, 1998). Esta hipótesis que destaca la presencia o ausencia de actividad de ATPasa en las CL como un factor importante para las respuestas a estímulos migratorios, requiere aún de pruebas.

La inhibición de la inducción de HC por el tratamiento con Ac contra ICAM-1 y LFA-1, sugiere que estas dos moléculas también estarían involucradas en la migración de las CL hacia los ganglios linfáticos (Ma *et al.*, 1994; Murayama *et al.*, 1997).

Citocinas cutáneas e inhibición de la migración de CL. Interleucina-10 es una citocina producida por los queratinocitos normales y en respuesta a la sensibilización cutánea (Enk & Katz, 1992) que inhibe o previene la actividad funcional de las CL (Peguet-Navarro *et al.*, 1994; Ozawa *et al.*, 1996), debido a la regulación que ejerce en la expresión de moléculas coestimuladoras como B7-1/CD80 (Chang *et al.*, 1995; Ozawa *et al.*, 1996). Por lo anterior, IL-10 es un potente inhibidor de las reacciones inflamatorias cutáneas (Berg *et al.*, 1995) y puede inducirse un estado de tolerancia con CD tratadas con ella (Steinbrink *et al.*, 1997). Significativamente, más que los ratones normales, los ratones knockout para IL-10 muestran una acumulación muy notable de CD en los ganglios linfáticos de drenaje, después de la aplicación epicutánea de un hapteno, además de tener una producción incrementada de TNF- α e IL-1 β (Wang *et al.*, 1999). Así, la participación de IL-10 en la inhibición de la migración de las CL parece operar a nivel de la síntesis de citocinas proinflamatorias y el balance entre estas moléculas sería importante en determinar la magnitud de la migración. Otra citocina que también puede ser relevante en la inhibición de la migración y maduración de las CL es IL-4, ya que ejerce un efecto hiporregulador del TNFRII de las CL humanas (Takayama *et al.*, 1999), lo cual interfiere con la acción paracrina de TNF- α y, por ende, con su efecto promotor de la migración de estas células.

CELULAS DE LANGERHANS EN VERTEBRADOS NO MAMIFEROS

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y funciona como un sistema de defensa general. Para la mayoría de los organismos, la piel constituye la primera barrera física de contacto con el medio en que viven. No es sorprendente que la mayor parte de las adaptaciones estructurales y funcionales de la piel estén relacionadas con el tipo de habitat. Además de esto, y de igual o mayor importancia, la piel ejerce una función de defensa más compleja, la cual podría ser denominada como "inmunológica". Al parecer, los componentes del sistema inmunológico asociados a la piel (revisado por Cooper, 1997) han evolucionado como una línea de defensa complementaria (Bos & Kapsenberg, 1986). Se han propuesto varios modelos para explicar esta particularidad de la piel dentro del sistema inmunológico. Los dos más conocidos son: el concepto de tejido linfoide asociado a la piel (SALT), constituido por queratinocitos, CL, linfocitos epidermotróficos, células endoteliales y los vasos y ganglios linfáticos regionales (Streilein, 1983); y el concepto de sistema inmunológico de la piel (SIS), más complejo que el primero, que incluye, además de las células antes mencionadas, a monocitos/macrófagos, granulocitos, mastocitos y componentes "humorales" como peptidos antimicrobianos, complemento, inmunoglobulinas, citocinas, neuropeptidos, fibrinolisin, eicosanoides, prostaglandinas y radicales libres (Bos & Kapsenberg, 1986). Los vasos y ganglios linfáticos no están considerados dentro del concepto de sistema inmunológico de la piel. Prácticamente es desconocida la forma en que ha evolucionado la relación íntima entre la función general de defensa y la función más específica, inmunológica, de la piel. Por ello, es pertinente y apropiado trazar el origen evolutivo de los componentes del SALT o del SIS, comparando su estructura y función en animales representativos de los diferentes grupos de vertebrados.

Peces. No existen informes acerca de la presencia de CL en los peces. Sin embargo, se ha especulado que células similares a las CL de los mamíferos presentan Ag a los linfocitos de la epidermis de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Peleteiro & Richards, 1985). Más recientemente, se han identificado *in vitro* CD obtenidas del bazo de esta trucha, que presentan una sorprendente similitud morfológica y en su movilidad (Ganassin & Bols, 1996) con las CD esplénicas de ratones (Steinman & Conn, 1983). En nuestro laboratorio es motivo de una tesis de licenciatura la demostración y caracterización morfológica de las CL de la epidermis del bagre *Arius seemannii* Günther, 1864. Hasta ahora, sabemos que estos animales contienen CD epidérmicas ATPasa positivas, con todas las características ultraestructurales para ser llamadas CL, incluido un organelo muy similar al GCL (Pérez-Torres *et al.*, en preparación).

Anfibios. La primera observación de CD ATPasa/ADPasa positivas en los anfibios se realizó en la epidermis de *Rana pipiens*, *Rana catesbeiana* y *Bufo marinus* (Farquhar & Palade, 1966). Aunque fueron consideradas similares a las descritas en los humanos, no se le dio importancia a este hallazgo, casi fortuito. Posteriormente, las CD ATPasa positivas de la epidermis de *Rana catesbeiana* fueron mejor caracterizadas (Carrillo *et al.*, 1990) y en *Rana pipiens* se demostró que no sólo la epidermis sino que también el epitelio periférico de la cornea y el de la membrana nictitante contienen CD ATPasa positivas (Castell *et al.*, 1999) y esterasa inespecífica positivas (Castell *et al.*, 2001). Alrededor del 30% de las CD ATPasa positivas de la epidermis coexpresaron moléculas clase II del

CPH (Castell *et al.*, 1999). Las características ultraestructurales de estas CD de los anfibios son similares a las de las CL de los mamíferos; sin embargo, no ha sido posible, hasta ahora, la identificación de un organelo equivalente al GCL.

En la rana *Xenopus laevis*, también ha sido demostrada la presencia de CD epidérmicas que expresan moléculas clase II del CPH durante una etapa del desarrollo o de la metamorfosis (Du Pasquier & Flajnik, 1990).

Reptiles. En la lagartija común europea *Lacerta vivipara* se describieron células epidérmicas de la piel de la cola, claramente diferentes de los queratinocitos y de los melanocitos, con todas las características ultraestructurales de las CL, excepto por la ausencia del GCL. Por lo anterior, se concluyó que estos animales carecían de CL típicas (Breathnach & Poyntz, 1966).

Nuestro grupo ha demostrado la presencia de CD ATPasa positivas en la epidermis de la piel de la tortuga terrestre *Kinosternum integrum*, que fueron identificadas como CL ya que reúnen todas las características ultraestructurales, incluyendo la presencia de organelos citoplásmicos morfológicamente similares a los GCL de las CL de los mamíferos (Pérez-Torres *et al.*, 1995). Interesantemente, notamos que esta especie de tortuga presenta variaciones estacionales en el número de CL, probablemente relacionadas con una disminución o pérdida de la actividad de la ATPasa de membrana. Así, el número máximo fue de 192 ± 5.5 CL/mm² en la primavera; en el otoño hubo 153 ± 10 CL/mm², en el verano 57 ± 4 y el número menor fue 10 ± 2 CL/mm² durante el invierno. Hasta ahora, no existen otros informes de la presencia de CL en las diferentes especies de reptiles.

Aves. La presencia de CL en la piel de las aves había sido negada por algunos investigadores (Reams & Tompkins, 1973). Posteriormente, se informó de la presencia de células ATPasa positivas en la epidermis del pollo, cuyas características no eran similares a las CL, además de carecer del GCL (Rowden, 1981). Poco después, se demostró que la piel del pollo poseía CD B-L positivas (la positivas) que recordaban a las CL de los mamíferos (Hala *et al.*, 1984; Wick *et al.*, 1984), pero no fueron caracterizadas morfológicamente.

En nuestro laboratorio, demostramos la presencia de CD ATPasa positivas, con un número de 688 ± 265 /mm² en la epidermis del pollo doméstico (*Gallus gallus*), cuyas características ultraestructurales son similares a las CL, aunque no fueron observados los GCL (Carrillo *et al.*, 1991). En un estudio realizado en varias especies de aves, se obtuvieron resultados similares y se corroboró que las CD epidérmicas del pollo y de codornices expresan moléculas clase II del CPH (Akhter *et al.*, 1993) aunque no se aportaron evidencias de que las células ATPasa positivas y las la positivas de estos animales fueran el mismo tipo celular. Esto se demostró posteriormente al realizarse una doble tinción para ambos marcadores, utilizando láminas epidérmicas (Pérez-Torres & Millán, 1994, ver artículo anexo). La identidad definitiva de las CD de la epidermis del pollo se logró recientemente al demostrarse que poseen organelos morfológicamente similares al GCL (Pérez-Torres & Ustarroz, 2001, ver artículo anexo). Además, hemos observado que durante el periodo de 35 días postcierre, los pollos muestran una depleción natural y dimorfismo sexual en el número CL, de acuerdo a la expresión diferencial de la actividad de la ATPasa y de moléculas clase II de CPH (Pérez-Torres *et al.*, 2002, ver artículo anexo).

Estos trabajos se han extendido a las mucosas del pollo y ahora sabemos que los epitelios de la córnea, de la lengua y del esófago contienen CD ATPasa positivas/ moléculas clase II positivas, en las que falta demostrar que poseen GCL para llamarlas CL (Pérez-Torres *et al.*, 2003, ver manuscrito anexo).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a los antecedentes presentados, es necesario aportar otras evidencias que completen la identificación de las células dendríticas adenosintrifosfatasa positivas de la epidermis del pollo, con el fin de establecer una homología con las células de Langerhans de los mamíferos. Para ello, es fundamental conocer que aquellas poseen marcadores típicos adicionales como son: 1) la presencia de un organelo similar al gránulo de Birbeck o gránulos de las células de Langerhans, 2) la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad, 3) la participación o reactividad ante la aplicación epicutánea de un hapteno durante la fase inductora de hipersensibilidad por contacto. Asimismo, es importante abordar los aspectos del desarrollo ontogénico de las células dendríticas epidérmicas del pollo y saber si, como las células de Langerhans de los mamíferos, presentan tropismo por los epitelios planos estratificados que revisten algunas mucosas.

HIPOTESIS

Para que las células dendríticas adenosintrifosfatasa positivas de la epidermis del pollo sean consideradas células de Langerhans, deben poseer un organelo similar al gránulo de Birbeck, expresar moléculas clase II de complejo principal de histocompatibilidad, ser reactivas en la inducción de hipersensibilidad por contacto y mostrar tropismo por los epitelios planos estratificados que revisten algunas mucosas.

OBJETIVO GENERAL

Completar la identificación y caracterización morfológica de las células dendríticas adenosintrifosfatasa positivas de la epidermis del pollo y plantear una similitud funcional con las células de Langerhans.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad en las células dendríticas adenosintrifosfatasa positivas epidérmicas del pollo.
2. Demostrar la presencia de gránulos de Birbeck en las células parecidas a las CL de la epidermis del pollo.
3. Inducir hipersensibilidad por contacto a un hapteno y estudiar a las células dendríticas epidérmicas del pollo durante la fase de inducción de la hipersensibilidad.
4. Demostrar la presencia de células dendríticas adenosintrifosfatasa positivas/moléculas clase II positivas en algunas mucosas con epitelios planos estratificados y buscar si poseen gránulos de Birbeck.
5. Conocer el desarrollo ontogénico de las células dendríticas parecidas a las células de Langerhans, en la epidermis del pollo.

RESULTADOS

Los resultados del este trabajo están representados por los siguientes 4 artículos:

1. Pérez-Torres A, Millán Aldaco D: Ia antigen s are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis. *J Anat* 184:591-596, 1994.
2. Pérez-Torres A, Ustarroz Cano M: Demonstration of Birbeck (Langerhans cells) granules in normal chicken epidermis. *J Anat* 199:493-497, 2001.
3. Pérez-Torres A, Ustarroz Cano M, Millán Aldaco D: Langerhans cell-like dendritic cells in the cornea, tongue and oesophagus of the chicken (*Gallus gallus*). *Histochem J* 00:1-9, 2003 (en prensa).
4. Pérez-Torres A, Zárate Garduño L, Ustarroz Cano M: Diferencias sexuales posteclosión en las células de Langerhans epidérmicas del pollo doméstico (*Gallus gallus*). *Lab-acta* 14:107-112, 2002.

Cada uno está precedido de un resumen en el que se destaca el objetivo, los resultados y las conclusiones principales.

A final de la parte de resultados, está el trabajo: "Hipersensibilidad por contacto al dinitrofluorobenceno y cambios en las células de Langerhans durante la fase de sensibilización a este hapteno", con su propia introducción, metodología, resultados y conclusiones.

Artículo: la antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis.

La función como células presentadora de antígenos de las CL está relacionada, en parte, con la expresión de moléculas clase II de CPH. Por ello, la demostración de la expresión de moléculas clase II en las células dendríticas ATPasa positivas de la epidermis del pollo es un criterio necesario para establecer una homología entre estas células y las CL de los mamíferos.

En este artículo se buscó demostrar la presencia de CD en la epidermis del pollo que expresaran moléculas clase II del CPH, que éstas y las CD ATPasa positivas son el mismo tipo celular y saber si hay subpoblaciones de CD epidérmicas de acuerdo a la expresión de estos dos marcadores.

Se realizó inmunofluorescencia indirecta en láminas epidérmicas y en cortes por congelación, utilizando el AcMo TaP1 específico para los antígenos B-L, homólogos a las moléculas clase II del CPH de mamíferos. Algunas láminas fueron procesadas para doble tinción secuencia con inmunofluorescencia e histoquímica enzimática para ATPasa.

Los resultados indican que la epidermis del pollo contiene CD clase II positivas, con una distribución espacial y numérica idéntica a las CD ATPasa positivas y que no hay CD que expresen uno u otro marcador.

Concluimos que las CD ATPasa positivas/clase II positivas de la epidermis del pollo son equivalentes a las CL de los mamíferos.

Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis

ARMANDO PÉREZ TORRES AND DIANA A. MILLAN ALDACO

Department of Cell and Tissue Biology, Faculty of Medicine, Autonomous National University of Mexico

(Accepted 14 December 1993)

ABSTRACT

Langerhans cells (LC) are antigen-presenting dendritic cells located in mammalian epidermis and in other stratified epithelia. We recently demonstrated the presence of Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken using ultrastructural histochemistry for adenosine triphosphatase (ATPase). The aim of the present study was to test whether ATPase-positive dendritic cells also express class II histocompatibility molecules (Ia antigens) encoded by the major histocompatibility complex (MHC), using a double staining technique, in separated chicken epidermal sheets. We concluded that the epidermal dendritic cells observed are the LC of the chicken, based on their morphology and spatial distribution, but mainly on the complete overlap for ATPase reaction and Ia antigen expression, these being reliable markers for the identification of mammalian LC.

Key Words: Langerhans cells; ATPase; major histocompatibility complex.

INTRODUCTION

Langerhans cells (LC) (Langerhans, 1868) are bone marrow-derived dendritic cells (Katz et al. 1979) located among basal and suprabasal keratinocytes in the epidermis of all mammalian species (Rowden, 1981), in stratified epithelia (Hutchens et al. 1971; Gemmill, 1973; Böck, 1974; Figueroa & Caorsi, 1980; Takehana et al. 1985; van Trappen et al. 1985), and have recently been described in nonstratified epithelia (Schon-Hegrad et al. 1991). Langerhans cells are the only cells within these sites that possess the Ca^{++}/Mg^{++} -dependent ectoenzyme adenosine triphosphatase (ATPase) (Wolff & Winkelmann, 1967; Baker & Habowsky, 1983), and constitutively express several immunological receptors and antigens on their surface, including the class II (Ia) molecules encoded by the major histocompatibility complex (MHC) (Stingl et al. 1977; Tamaki et al. 1979; Rowden, 1980). The expression of membrane-associated Ia antigens implies that LC are potent antigen-presenting cells, able to induce a specific T cell response (Stingl et al. 1978; Braathen & Thorsby, 1980; Green et al. 1980). In this

sense, LC can be considered primary immunocompetent cells that reside in immunologically strategic anatomical sites.

Few studies have been carried out as yet to demonstrate the existence of Langerhans-like cells in the skin of nonmammalian vertebrates. We recently demonstrated the presence of ATPase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of bullfrogs (*Rana catesbeiana*) and chickens (*Gallus domesticus*), using whole mount epidermal tissue preparations and by ultrastructural histochemistry (Carrillo-Farga et al. 1990, 1991). Akhter et al. (1993) reported the occurrence of Ia-positive dendritic cells in the quail and chicken epidermis. However, their results provided no conclusive evidence since they did not demonstrate that ATPase-positive and Ia-positive cells had a similar spatial and numerical distribution and their attempt to stain ATPase and Ia simultaneously on the same cell was unsuccessful.

The aim of the present study was to test whether the ATPase-positive Langerhans-like cells of chicken epidermis also express MHC class II (Ia) antigen by simultaneous staining of epidermal sheets.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Ten 6-month-old chickens of both sexes were used. Pectoral arterias were cleaned with 70% ethanol and anaesthetised with 1 ml of 1% lidocaine (Xylocaine) using an insulin syringe. Skin specimens were obtained with a 4 mm punch biopsy.

Whole epidermis preparations

Skin specimens were incubated in 2 M CaCl_2 for 20 min at room temperature (Riley, 1966). Dermis was separated from the epidermis with fine forceps under dissecting microscope control.

ATPase staining of epidermal sheets

For ATPase histochemistry, the epidermal sheets were washed 3 times in distilled water for a total of 15 min at room temperature, and then fixed for 60 min in formaldehyde-cacodylate (pH 7.4) at 4 °C. After fixation, the samples were washed 3 times with 0.2 M tris-maleate buffer (pH 7.2), and then incubated for 60 min at 37 °C in 1.32×10^{-3} M ATP incubation mixture. Finally, they were washed again with distilled water and developed in 1% ammonium sulphide for 30 s at room temperature. Control epidermal sheets were incubated in the same medium without the substrate and control epidermal sheets were mounted with the dermal side upwards in 1:9 glycerol-phosphate-buffered saline (PBS) on glass slides (Robins & Brandon, 1981).

Immunofluorescence staining of epidermal sheets

Epidermal sheets obtained as described above were washed 3 times in PBS with 0.01% triton X-100 for a total of 30 min at 4 °C, and then fixed with acetone for 10 min at room temperature. They were rehydrated with PBS and incubated with culture supernatant containing the monoclonal antibody TaP1 for 18 h at 4 °C. TaP1 recognizes chicken B-L (Ia-like) antigens (Guillemot et al. 1984). The epidermal sheets were washed with PBS 3 times during 30 min and then incubated in goat antimouse IgG coupled with fluorescein isothiocyanate (ICN) diluted 1:32 for 60 min at 37 °C. Finally, they were washed as described above and mounted in 1:9 glycerol-PBS on glass slides. Control epidermal sheets were incubated with an isotype-matched irrelevant antibody or the 1st antibody was omitted.

Cryostat sections of skin (8–12 μm) were fixed with acetone for 2 min at room temperature, air-dried for 30 min and stored in a closed container (4 °C) until staining (not longer than 2 wk). The sections were processed in the same way as the epidermal sheets but the incubation time was reduced to 60 min and performed in a moisture chamber (Bergstresser & Juárez, 1984; Kraal et al. 1986; Olah et al. 1992). Preparations were observed with a fluorescence microscope (Olympus BH2-RFCA).

Double staining of epidermal sheets

For the simultaneous demonstration of Ia-like antigens and ATPase activity in the same dendritic cells, epidermal sheets were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 8% sucrose for 60 min at 4 °C. Initially they were stained by the immunofluorescence technique described above and some fields with Ia-positive dendritic cells were photographed. The epidermal sheets were then processed for the demonstration of ATPase as soon as possible, and the same fields were again photographed.

RESULTS

ATPase staining of epidermal sheets

ATPase-positive cells were observed in the epidermal sheets, which had the identical number, morphology and spatial distribution as previously described by us (Carrillo-Farga et al. 1991). Most of them had a characteristic dendritic appearance, but some exhibited long and slender processes and only a few had a polyhedral shape or very short processes (Figs 2, 4).

Immunofluorescence staining of epidermal sheets

Indirect immunofluorescence staining with the monoclonal antibody TaP1 demonstrated the presence of Ia-positive dendritic cells, whose immunoreactivity seemed to be located in the plasma membrane but was also observed as a bright intracellular patch, often concentrated in the cell body (Figs 1, 3). The distribution of these brightly stained cells was not uniform: they frequently formed high density clusters, although their shape and number otherwise resembled the ATPase-positive dendritic cells. In cryostat sections of skin, Ia-positive cells were located suprabasally in the epidermis, beneath the dermo-epidermal junction and in the dermal papillae (Figs 5, 6).

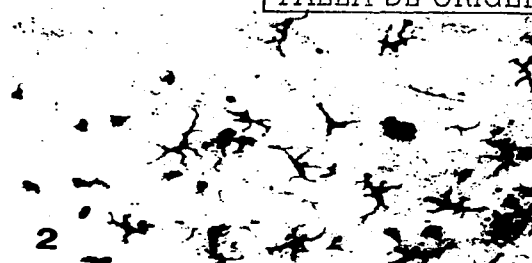


Fig. 1. Ia-positive dendritic cells in the epidermis of the chicken. Some cells show long and slender processes (arrow); others have a polyhedral shape or short processes (arrowhead). $\times 200$.

Fig. 2. ATPase-positive dendritic cells in an epidermal sheet. In their spatial and numerical distribution these cells resemble the immunofluorescent cells in Figure 1. $\times 200$.

Fig. 3. High magnification of Ia-positive dendritic cells in an epidermal sheet. Note the bright immunoreactivity located in the cell body (arrows) and the dendritic processes interdigitated with keratinocytes (arrowhead). $\times 400$.

Fig. 4. ATPase-positive dendritic cells. Note that the shape of these cells is similar to the Ia-positive dendritic cells in Figure 3. $\times 400$.

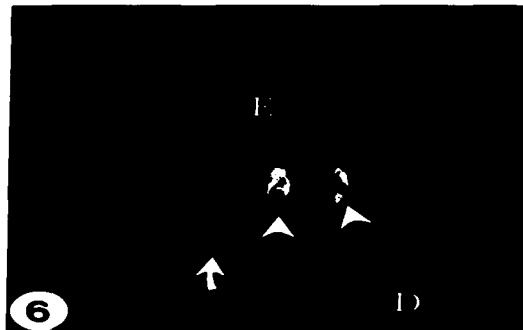
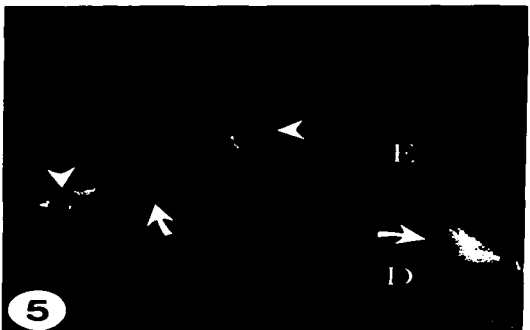
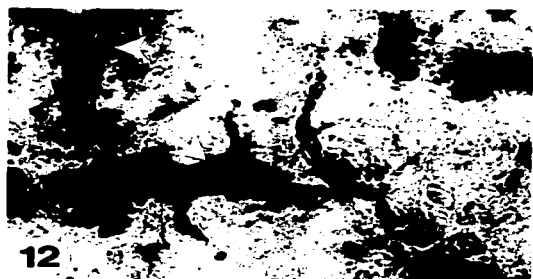
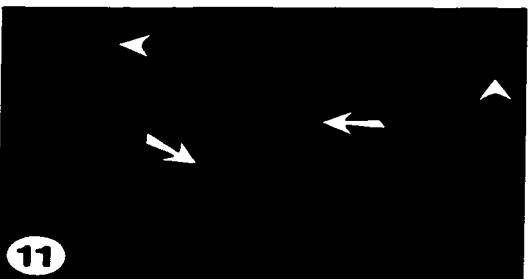


Fig. 5. Cryostat section of the chicken skin stained with monoclonal antibody TaP1. Ia-positive dendritic cells are located within the epidermis (arrowheads) and beneath the dermo-epidermal junction (arrows). E, epidermis; D, dermis. $\times 400$.

Fig. 6. Immunofluorescence staining of cryostat section of the chicken skin. 2, probably migrant, Ia-positive cells can be observed in dermal papillae (arrowheads) and the dendritic cytoplasm of another is seen within the epidermis (arrow). E, epidermis; D, dermis. $\times 400$.



Figs 7, 8. Corresponding pairs of mirror photomicrographs of the same epidermal sheet after staining consecutively with an immunofluorescence technique for Ia antigens and then by ATPase enzyme histochemistry. Note that all Ia-positive dendritic cells are also ATPase-positive and vice versa. Asterisks indicate some cells. $\times 150$.

Figs 9, 10. Mirror photomicrographs of the same field with several Ia-positive (Fig. 7) and ATPase-positive (Fig. 8) Langerhans-like cells in an epidermal sheet. Note the complete overlap between the 2 markers (asterisks). $\times 150$.

Figs 11, 12. High magnification of epidermal sheet stained consecutively to demonstrate Ia antigen and ATPase activity in epidermal dendritic cells. There is an apparent discrepancy in the overlap between the 2 markers because immunofluorescence is obscured by the ATPase reaction product (arrowheads) and only a few Ia-positive dendritic cells are evident (arrows). $\times 1000$.

Double staining of epidermal sheets

Double staining of the epidermal sheets, first with the monoclonal antibody to Ia-like antigens and then with ATPase enzyme histochemistry, revealed a complete overlap for both markers in the epidermal dendritic cells. The same dendritic cells presented Ia-like antigens and were ATPase-positive (Figs 7-10). Since the ATPase reaction product after double staining was faint, the matching of Ia-positive dendritic cells with ATPase-positive dendritic cells had to be performed carefully (Figs 7-10). If the epidermal sheets are not observed until after double staining the overlap between dendritic cells is not evident since the stronger ATPase reaction masks the immunofluorescence (Figs 11, 12). In all animals, the results were highly reproducible when the staining techniques were made as described. The sequence for the double staining—immunofluorescence, photomicrography enzymatic histochemistry—is critical in order to obtain reliable results. Occasionally in some epidermal sheets from the same animal it was not possible to demonstrate a complete overlap between the 2 markers, possibly because after 24 h ATPase activity was exhausted.

DISCUSSION

The present study demonstrates the presence of MHC class II-positive dendritic cells in the chicken epidermis, which show the same morphology and distribution pattern observed previously for ATPase-positive dendritic cells in these animals (Carrillo-Farga et al. 1991). The results obtained with the double staining of epidermal sheets provide strong evidence that ATPase-positive and Ia-positive dendritic cells are the same. In the normal mammalian epidermis only LC are ATPase-positive and constitutively express MHC class II antigens (Wolff & Winkelmann, 1967; Rowden, 1980). Both features have therefore been extensively used as reliable markers for these cells. The functional significance of the membrane ATPase on LC is unknown. It has recently been proposed that LC are resistant to the lytic effects of extracellular ATP and that ATPase is involved in such resistance (Girolomoni et al. 1993). To exert their accessory cell function, LC have to express MHC class II antigens and interact with T lymphocytes (Katz et al. 1985). In this sense, preliminary results obtained in our laboratory indicate the presence of intraepidermal T lymphocytes, phenotypically equivalent to CD8-positive lymphocytes,

which were identified with a monoclonal antibody (Chan et al. 1988).

A minor subpopulation of epidermal LC forming clusters which stain more brightly for MHC class II antigens have been described in man (Dezutter-Dambuyant et al. 1984) and the mouse (Romani et al. 1985). It has been proposed that these LC that have matured in situ and which are able to leave the epidermis and migrate via the afferent lymph to the paracortical areas of regional lymph nodes (Schuler & Steinman, 1985; Steinman, 1991). The functional significance of these subsets of class II rich LC is unknown. However, Schmitt et al. (1988) demonstrated an increased stimulatory capability of these cells in the allogeneic mixed leucocyte reaction. Chicken epidermis also has clusters of Ia-positive dendritic cells that stain more brightly and which could be similar to those described in mammals. In addition, the immunofluorescent cells observed in the chicken dermis seem to be migrant Langerhans-like cells.

Based on the morphology, enzyme histochemistry and the characteristics of Ia-antigen expression, we conclude that epidermal dendritic cells in the chicken epidermis described in the present work are homologous to LC. Their functional properties will be analysed in an allogeneic mixed lymphocyte reaction employing Langerhans-like cell-enriched epidermal cell suspensions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We greatly appreciate the gift of the TaPl monoclonal antibody from Dr Max D. Cooper, Howard Hughes Medical Institute, University of Alabama at Birmingham, and the technical assistance of María Luisa Rodríguez. We thank Dr Marcela Ramírez Escoto and Dr Ingeborg Becker for their assistance in revising the manuscript.

REFERENCES

- AKHTER N, KOBAYASHI M, HOSHINO T (1993) Avian epidermis contains ATPase- and Ia-positive Langerhans-like cells. *Cell and Tissue Research* **271**, 103-106.
- BAKER KW, HAWOWSKY JEJ (1983) EDTA separation and ATPase Langerhans cells staining in the mouse epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **80**, 104-107.
- BERGSTRESSER PR, JUÁREZ DV (1984) Detection by immunocytochemical techniques of cell surface markers on epidermal Langerhans cells. *Methods in Enzymology* **108**, 683-691.
- BÖCK P (1974) Fine structure of Langerhans cells in the stratified epithelia of the oesophagus and stomach of mice. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **147**, 237-247.
- BRAATHEN LR, THORSBY E (1980) Studies on human epidermal Langerhans cells. I. Allo-activating and antigen-presenting capacity. *Scandinavian Journal of Immunology* **11**, 401-411.

- CARRILLO-FARGA J, CASTELL A, PÉREZ A, RONDÁN A (1990) Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *Journal of Anatomy* **172**, 39-45.
- CARRILLO-FARGA J, PÉREZ TA, CASTELL RA, ANTUNA BS (1991) Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). *Journal of Anatomy* **176**, 1-8.
- CHAN MM, CHEN CH, AGER LL, COOPER MD (1988) Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *Journal of Immunology* **140**, 2133-2138.
- DEZUTTER-DAMBUYANT C, CORDIER G, SCHMITT D, FAURE M, LAQUI C, THIVOLET J (1984) Quantitative evaluation of two distinct cell populations expression HLA-DR antigens in normal human epidermis. *British Journal of Dermatology* **111**, 1-11.
- FIGUEROA CD, CAORSI I (1980) Ultrastructural and morphometric study of the Langerhans cell in normal human exocervix. *Journal of Anatomy* **131**, 669-682.
- GEMMELL RT (1973) Langerhans cells in the ruminal epithelium of the sheep. *Journal of Ultrastructure Research* **43**, 256-258.
- GIROLOMONI G, SANTANTONIO ML, PASTORE S, BERGSTRESSER PR, GIANNETTI A, CRUZ PD (1993) Epidermal Langerhans cells are resistant to the permeabilizing effects of extracellular ATP: in vitro evidence supporting a protective role of membrane ATPase. *Journal of Investigative Dermatology* **100**, 282-287.
- GREEN I, STINGL G, SHEVACH EM, KATZ SI (1980) Antigen presentation and allogeneic stimulation by Langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology* **75**, 44-45.
- GUILLEMOT FP, OLIVER PD, PEULT BM, LEDOUARIN NM (1984) Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *Journal of Experimental Medicine* **160**, 1803-1809.
- HUTCHENS LH, SAGEHEL RW, CLARKE M (1971) Oral epithelial dendritic cells of the rhesus monkey: histologic demonstration, fine structure and quantitative distribution. *Journal of Investigative Dermatology* **56**, 325-336.
- KATZ SI, TAMAKI K, SACHS DH (1979) Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* **282**, 324-326.
- KATZ SI, COOPER KD, IJIMA M, TSUCHIDA T (1985) The role of Langerhans cells in antigen presentation. *Journal of Investigative Dermatology* **85** (Suppl.), 96-98.
- KRAAL G, BREEL M, JANSE M, BRUIN G (1986) Langerhans cell, veiled cells and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *Journal of Experimental Medicine* **163**, 981-987.
- LANGERHANS P (1868) Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* **44**, 325-337.
- OLAH I, KENDALL C, GLICK B (1992) Anti-vimentin monoclonal antibody recognizes a cell with dendritic appearance in the chicken's Bursa of Fabricius. *Anatomical Record* **232**, 121-125.
- RILEY PA (1966) Esterase in epidermal dendritic cells of the mouse. *British Journal of Dermatology* **78**, 388-397.
- ROHNS PG, BRANDON DR (1981) A modification of the adenosine triphosphate method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Technology* **56**, 87-89.
- ROMANI N, STINGL G, TSCHACHLER E, WITMER MD, STEINMAN RM, SHEVACH EM et al. (1985) The Thy-1 bearing cell of murine epidermis. A distinctive leukocyte perhaps related to natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine* **161**, 1368-1383.
- ROWDEN G (1980) Expression of Ia antigens on Langerhans cells in mice, guinea pig, and man. *Journal of Investigative Dermatology* **75**, 22-31.
- ROWDEN G (1981) The Langerhans cell. *CRC Critical Reviews in Immunology* **3**, 95-180.
- SCHMITT DA, HANAU D, BIEBER T, PAULY G, CAZENAVE JP (1988) In vitro human epidermal indeterminate cells (CD1a+, 40 KD Fc-gamma-R-) are potent immunostimulatory cells for allogenic lymphocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **91**, 388.
- SCHON-HEGRAD MA, OLIVER J, MCMENAMIN PG, HOLT PG (1991) Studies on density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in conducting airways. *Journal of Experimental Medicine* **173**, 1345-1356.
- SCHULER G, STEINMAN RM (1985) Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *Journal of Experimental Medicine* **161**, 526-546.
- STEINMAN RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review of Immunology* **9**, 271-296.
- STINGL G, WOLFF-SCHREINER EC, PICHLER WJ, GSCHNIT F, KNAPP W, WOLFF W (1977) Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* **268**, 245-246.
- STINGL G, KATZ SI, CLEMENT I, GREEN I, SHEVACH EM (1978) Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *Journal of Immunology* **121**, 2005-2013.
- TAKEHANA S, KAMEYAMA Y, SATO E, MIZOHATA M (1985) Ultrastructural observations on Langerhans cells in the rat gingival epithelium. *Journal of Periodontal Research* **20**, 276-283.
- TAMAKI K, STINGL G, GULLINO M, SACHS DH, KATZ SI (1979) Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cells. *Journal of Immunology* **123**, 784-787.
- VAN TRAPPEN L, GEBOES K, MISSOTEN L, MAUDGAL PC, DESMET V (1985) Lymphocytes and Langerhans cells in normal human cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **26**, 320-325.
- WOLFF K, WINKELMANN RK (1967) Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology* **48**, 50-54.

Artículo 2: Demonstration of Birbeck (Langerhans cells) granules in the normal chicken epidermis.

Las CL son las únicas células de la epidermis normal que expresan actividad de ATPasa de membrana y que expresan moléculas clase II del CPH. A nivel ultraestructural, el único criterio confiable para darle el nombre de CL a una CD epidérmica es que presente gránulos de Birbeck o gránulos de las CL. La forma más frecuente de estos organelos es la discoide, con una dilatación periférica, lo que les da la apariencia de un bastón o raqueta, con una estriación o línea central, cuando son cortados longitudinalmente. En cortes tangenciales se observan como estructuras ovales o redondas, con un diámetro entre 250 a 450 nm. El origen y la función de gránulo de Birbeck aún no se ha aclarado. Al parecer es un componente del compartimento endosomal de las CL, involucrado en la captación y procesamiento de antígenos.

El objetivo del presente artículo fue demostrar la presencia de gránulos de Birbeck en las CD epidérmicas del pollo. Para ello, se tomaron 3 biopsias de piel de ateria pectoral de 3 pollos clínicamente sano y se procesaron con la técnica para microscopía electrónica convencional. Se observaron cortes semiseriados y se buscó el gránulo en Birbeck en 50 imágenes de cuerpos celulares y de prolongaciones citoplásmicas de CD epidérmicas, por animal.

Los resultados indican que las CD epidérmicas del pollo poseen organelos en forma de bastón, en forma de raqueta, con una estriación central u ovales, morfológicamente similares a los gránulos de Birbeck de las CL de mamíferos. En un trabajo previo, habíamos demostrado que todas las CD epidérmicas del pollo con citoplasma claro, sin desmosomas, tonofilamentos y melanosomas, son ATPasa positivas (Carrillo *et al.*, 1991). En el artículo precedente, demostramos que todas las CD ATPasa positivas son clase II positivas y viceversa. Considerando todo en conjunto, puede afirmarse que los tres marcadores identificados están presentes en las que ya podríamos denominar CL epidérmicas de los pollos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Short Report

Demonstration of Birbeck (Langerhans cells) granules in the normal chicken epidermis

ARMANDO PÉREZ-TORRES AND MARTHA USTARROZ-CANO

Departamento de Biología Celular y Tissular, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico

(Accepted 25 June 2001)

ABSTRACT

Mammalian Langerhans cells (LC) are epidermal dendritic cells which originate in bone marrow and migrate toward the T cell area of lymph nodes, where they act as professional antigen-presenting cells. A variety of cell surface markers, such as the ectoenzyme adenosine triphosphatase (ATPase), Ia and CD1a antigens, have been used extensively to identify LC. Ultrastructural identification of this cell type in the mammalian epidermis is made by the demonstration of a typical and unique cytoplasmic organelle, the Birbeck granule (BG). Although we had earlier demonstrated the coexpression of ATPase and Ia antigens on epidermal dendritic cells of the chicken epidermis, the presence of the BG has not previously been documented. The aim of the present study was to investigate whether chicken epidermal LC-like cells possess an organelle similar to the BG, and thus to complete their identification. Our findings are the first demonstration of characteristic rod-shaped, racket-shaped and disc-shaped intracytoplasmic organelles, morphologically similar to the mammalian BG, in avian LC.

Key words: Dendritic cells; birds; skin.

INTRODUCTION

Dendritic cells (DC) of the immune system are bone marrow-derived leukocytes that comprise a family of professional antigen-presenting cells involved in the effective generation of antigen-specific T-cell responses (Steinman, 1991). In mammalian skin, epidermal Langerhans cells (LC) are considered to be immature DC that pick up antigens by pinocytosis and phagocytosis (Reis e Sousa et al. 1993; Sallusto et al. 1995); subsequently they migrate via afferent lymphatic vessels in the papillary layer of the dermis to regional lymph nodes, where they arrive as mature cells homing to the T-cell-dependent areas where they activate resting T cells (Macatonia et al. 1987; Kripke et al. 1990).

At the light microscopic level, the classic markers to identify LC in normal mammalian skin are the cell surface expression of the enzyme adenosine triphosphatase (ATPase) (Wolff & Winkelmann, 1967), class II (Ia) molecules encoded by major histo-

compatibility complex (MHC) (Klareskog et al. 1977; Rowden et al. 1977) and CD1a antigen (Fithian et al. 1981). At the ultrastructural level, the only reliable criterion to designate a cell as an LC is the presence of the typical and unique intracellular organelle termed the Birbeck (Langerhans cell) granule (BG) (Birbeck et al. 1961). Three-dimensional reconstructions showed that the BG may assume a variety of shapes, from a disc shape to a cup shape (Sagebiel & Reed, 1968). The most common sectional profile of the BG is a rod-shaped structure of variable length with a central linear density between 2 limiting membranes; occasionally an electron-lucent vesicular portion is found at one end which gives the BG a tennis racket-like appearance (Wolff, 1967). If the granule is cut tangentially it appears as a rounded or oval body containing a square lattice of particles, with a vesicle located in the periphery (Wolff, 1967; Sagebiel & Reed, 1968).

Although we had demonstrated the presence of epidermal Langerhans-like cells in the chicken epi-

dermis using ultrastructural histochemistry for ATPase (Carrillo-Farga et al. 1991) that also expresses MHC class II (Ia) antigens (Pérez-Torres & Millán, 1994), the presence of organelles similar to the BG was not investigated. The purpose of this study is to make an extensive ultrastructural search for the BG in epidermal LC-like cells of the normal chicken skin.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Three 8-wk-old male chickens were used. The apparently normal skin of pectoral arteries were cleaned with 70% ethanol and anaesthetised with 1 ml of 1% subcutaneous lidocaine (Xylocaïne); 4 mm punch biopsies were obtained and immediately rinsed with sterile distilled water, cut manually into 1–2 mm pieces and processed for transmission electron microscopy.

Transmission electron microscopy

Biopsy samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 2.5 h at 4 °C. After 3 washes in 0.15 M cacodylate buffer (pH 7.4) at 4 °C, skin fragments were postfixed with 1% osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4) during 45 minutes at 4 °C, dehydrated in gradually increasing concentrations of ethanol, transferred to propylene oxide and embedded in Araldite 6005. Ultrathin sections, obtained with a diamond knife and contrasted with uranyl acetate and lead citrate, were examined with a Zeiss EM-109 electron microscope.

At least 50 images of the cell body and dendritic processes of epidermal clear dendritic cells per animal were examined.

RESULTS

Clear dendritic cells identical to those described before (Carrillo-Farga et al. 1991) were observed among basal keratinocytes of epidermal stratified squamous epithelium and consequently identified as LC-like cells.

BG-like organelles were recognised inside of many cytoplasmic processes and occasionally in the cell body. They have a characteristic rod-shaped profile made of parallel membranes enclosing a central electron-dense line (Fig. 1, insert *a-e*), of variable length and about 13–15 nm in thickness. The longer BG-like organelles resembled more a tubular structure but were quite similar to the cross-section of a disc-shaped BG (Fig. 1, insert *c-e*). No continuity or

attachment between plasma membrane and BG-like organelles was observed.

The cell bodies of LC-like cells were practically devoid of BG-like structures. Sometimes, a few contained racket-shaped organelles located in the vicinity of the nuclei (Fig. 2). The rod portion of these organelles presented two differences with respect to rod-shaped BG-like organelles (Fig. 1, insert *a-e*): the absence of the electron-dense central line and a slightly increased thickness (20–22 nm). This racket-like appearance was the most rare image of all BG-like structures observed, but also uncommon were images of tangential sections of these organelles. If such sections occurred (as they did just 3 times), they appeared as rounded or oval bodies with a maximum diameter of about 200 nm, formed by an eccentric vesicle attached to a discoid or curved portion (Fig. 3, insert), which never had a clearly evident square-lattice arrangement of small particles.

Finally, no BG-like structures were observed in the keratinocytes or in other cell type different from clear dendritic cells.

DISCUSSION

Previous studies in several avian species (Carrillo-Farga et al. 1991; Akhter et al. 1993) and in the frog (Carrillo-Farga et al. 1990) have demonstrated the presence of ATPase-positive epidermal DC, ultrastructurally similar to mammalian LC except for the lack of BG. When sequential immunofluorescence to MHC class II (Ia) antigens and ATPase enzyme histochemistry is employed, a complete overlap of these reliable LC markers is observed on the epidermal DC in the chicken (Pérez-Torres & Millán, 1994) and in the frog (Castell et al. 1999). However, until now, ATPase-positive LC with BG only has been identified in the epidermis of the turtle (Pérez-Torres et al. 1995).

The present results reveal that chicken epidermal LC-like cells also possess BG-like organelles which appear as rod-shaped, racket-shaped and flat, disc-shaped structures, depending on the plane of section. These profiles correspond to the most frequently described BG in mammalian LC. However, some differences were noted: 1) the rod-shaped BG-like organelles described in the present study had a thickness of 13–15 nm, whereas the BG are about 43 nm in mice (Kobayashi & Hoshino, 1987) and 30–35 nm in human (Elofsson et al. 1981); the significance of the thickness of BG in regard to immunological function of LC has not been analysed; 2) the BG-like organelles (the rod-shaped and the



Fig. 1. Transmission electron micrograph of chicken normal skin showing a Langerhans cell dendritic process. Several rod-shaped Birbeck granule-like organelles with typical electron-dense central lamella are denoted by letters (a-e) and magnified in the corresponding gallery of inserts. The longer organelles (inserts c-e) display a cored tubule appearance. K, keratinocytes with tonofilaments. Bar, 5 μ m (Fig. 1); bars, 100 nm (inserts a-e).

disc-shaped) were found more frequently in dendritic processes than in the cell body of chicken LC-like cells, which is opposite to the localisation of these structures in mammalian LC (Wolff, 1972), and 3) the 'atypical' aspect of the rod portion of the racket-shaped and disc-shaped organelles (increase of thickness, absence of electron-dense central line and square-lattice arrangement, respectively) probably is due to the unzipping of limiting membranes causing a disintegration of the central electron-dense lamella, a phenomenon that reflects the fusion between a BG disc and an acidic compartment like an endosomal vesicle (Bartosik, 1992). According to this proposal, several features suggest that BG derive from cell membrane invaginations (Takahashi & Hashimoto, 1985) and are involved in a specialised form of adsorptive endocytosis, transporting ligand-receptor complexes from the cell surface to primary lysosomes

(Takigawa et al. 1985; Hanau et al. 1987; Bartosik, 1992). However, for the present, the nature of the signals that trigger BG formation is still unknown, and the real significance of BG in the antigen-trapping and antigen-presenting function of LC is a controversial theme (Mommaas et al. 1994).

Recently it has been reported that only CD34+ progenitor cells from human peripheral blood that express the Lag antigen (Caux et al. 1996), a specific glycoprotein on BG (Kashihara et al. 1986), and the skin-homing receptor CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) differentiate into LC with BG (Strunk et al. 1997). These new aspects concerning the BG suggest that their presence may be related with the differentiation and maturation pathways of the LC (Mackensen et al. 1995; Strunk et al. 1996).

The results obtained in the present study are the first evidence of the presence of BG-like organelles in

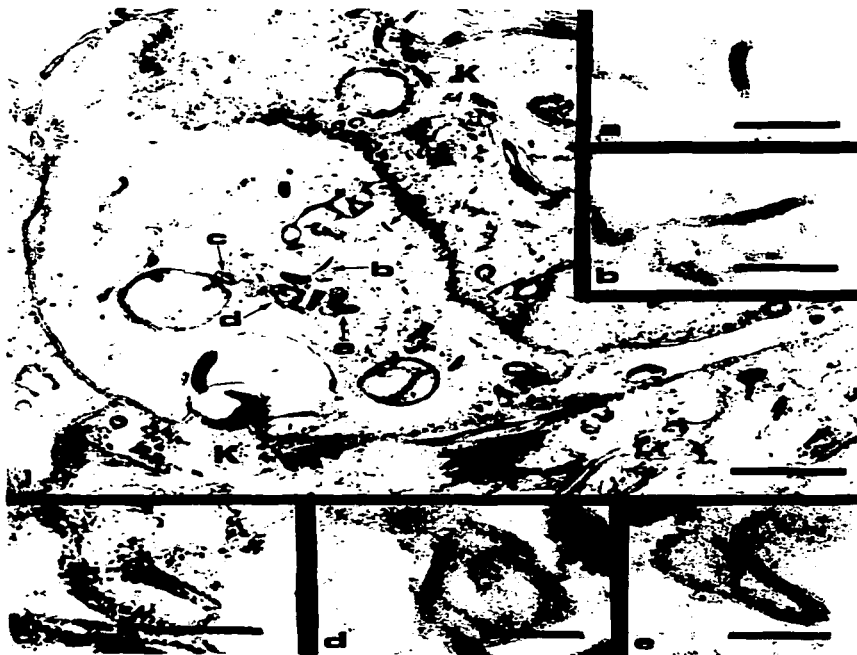


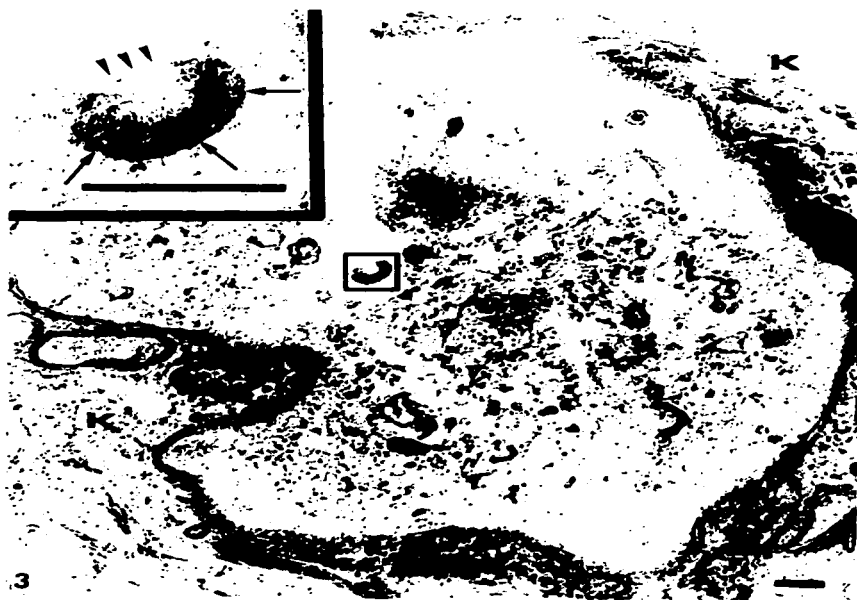


Fig. 2. Transmission electron micrograph of chicken normal skin showing an epidermal Langerhans cell in the basal layer. Note the rod (arrow) and the vesicular expansion (arrowheads) of a racket-shaped Birbeck granules-like organelle. The rod portion lacks of the electron-dense central lamella. K, basal keratinocytes. Bar, 250 nm.

Fig. 3. Transmission electron micrograph of chicken normal skin showing a large cytoplasmic process with ultrastructural features of Langerhans cells including a disc-shaped Birbeck granule-like organelle, which has been cut tangentially (frame). The insert represents a higher magnification of this structure formed by a flat disc (arrows) with an electron-lucent vesicle attached in the periphery (arrowheads). Correlate this aspect of Birbeck granule-like organelle with its cross-section that gives rise to the racket-shaped profile (Fig. 2). K, keratinocytes. Bar, 200 nm.

43-1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



43-2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Birbeck granules in chicken Langerhans cells

normal chicken skin and thus complete the identification of the LC in this animals.

ACKNOWLEDGEMENTS

We should like to express thanks to Adrián Rondán for assistance in the preparation of material for electron microscopy, Francisco Pasos for help with photography and Marcela Ramírez for revising the English version.

REFERENCES

- AKHTER N, KOBAYASHI M, HOSHINO T (1993) Avian epidermis contains ATPase- and Ia-positive Langerhans-like cells. *Cell & Tissue Research* **271**, 103-106.
- BARTOSIK J (1992) Cytoplasmic-derived Birbeck granules transport horseradish peroxidase to the endosomal compartment in the human Langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology* **99**, 53-58.
- BIRBECK MSL, BREATHNATCH 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**, 51-64.
- CARRILLO FARGA J, CASTELL RA, PEREZ TA, RONDAN A (1990) Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *Journal of Anatomy* **172**, 39-45.
- CARRILLO FARGA J, PÉREZ TA, CASTELL RA, ANTUNA BS (1991) Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). *Journal of Anatomy* **176**, 1-8.
- CASTELL RA, HERNANDEZ A, SAMPEDRO CE, HERRERA M, ALVAREZ J, RONDAN A (1999) ATPase and MHC class II molecules co-expression in *Rana pipiens* dendritic cells. *Developmental and Comparative Immunology* **23**, 473-485.
- CAUX C, VANBERVLIET B, MASSACRIER C, DEZUTTER-DAMBUYANT C, DE SAINT-VIS B, JACQUET C et al. (1996) CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF α . *Journal of Experimental Medicine* **184**, 695-706.
- ELOFSSON R, ANDERSSON A, FALCK B, SJÖBORG S (1981) Evidence for endocytic mechanisms in the epidermal Langerhans cells. *Acta Dermato-Venerologica, Suppl* **99**, 29-35.
- FITHIAN E, KUNG P, GOLDSTEIN G, RUBENFELD M, FENOGLIO C, EDELSON R (1981) Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **78**, 2541-2544.
- HANAU D, FABRE M, SCHMITT D, GARAUD JC, PAULY G, TOMGIO MM, et al. (1987) Human epidermal Langerhans cells coinernalize by receptor-mediated endocytosis 'non-classical' major histocompatibility complex class I molecules (T6 antigens) and class II molecules (HLA-DR antigens). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **84**, 2001-2005.
- KASHIHARA M, MASAMICHI U, HORIGUCHI Y, FURUKAWA F, HANAOKA M, IMAMURA S (1986) A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology* **87**, 602-607.
- KLARESKOG L, MALMNAS-TJERNLUND U, FORSUM U, PETERSON PA (1977) Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* **268**, 248-250.
- KOBAYASHI M, HOSHINO T (1987) The three-dimensional structure of cored tubules in the dermal Langerhans cells of mice. *Journal of Electron Microscopy* **36**, 411-418.
- KRIPKE ML, MUNN CG, JEEVAN A, TANG JM, BUCANA C (1990) Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *Journal of Immunology* **145**, 2833-2838.
- MACATONIA SE, KNIGHT SC, EDWARDS AJ, GRIFFITHS S, FRYER P (1987) Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *Journal of Experimental Medicine* **166**, 1654-1667.
- MACKENSEN A, HERBST B, KÖHLER G, WOLFF-VORBECK G, ROSENTHAL F, VEBELKEN H et al. (1995) Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitor cells in vitro. *Blood* **86**, 2699-2707.
- 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.
- PÉREZ-TORRES A, MILLÁN D (1994) Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis. *Journal of Anatomy* **184**, 591-596.
- PÉREZ-TORRES A, MILLÁN D, RONDÁN A (1995) Epidermal Langerhans cells in the terrestrial turtle, *Kinosternum integrum*. *Developmental and Comparative Immunology* **19**, 225-236.
- REIS E, SOUSA C, STAHL PD, AUSTYN JM (1993) Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *Journal of Experimental Medicine* **178**, 509-519.
- ROWDEN G, LEWIS MG, SULLIVAN AL (1977) Ia antigens on human epidermal Langerhans cells. *Nature* **268**, 247-248.
- SAGEBIEL RW, REED TH (1968) Serial reconstruction of the characteristic granule of the Langerhans cells. *Journal of Cell Biology* **36**, 597-602.
- SALLUSTO F, CELLA M, DANIELI C, LANZAVECCHIA A (1995) Dendritic cells use macrophocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: down-regulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 389-400.
- STEINMAN RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review of Immunology* **9**, 271-296.
- STRUNK D, RAPPERSBERGER K, EGGER C, STROBL H, KRÖMER E, ELBE A et al. (1996) Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**, 1292-1302.
- STRUNK D, EGGER C, LEITNER G, HANAU D, STINGL G (1997) A skin homing molecule defines the Langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine* **185**, 1131-1136.
- TAKIGAWA M, IWATSUKI K, YAMADA M, OKAMOTO H, IMAMURA S (1985) The Langerhans cell granule is an adsorptive endocytic organelle. *Journal of Investigative Dermatology* **85**, 12-15.
- WOLFF K (1967) The fine structure of the Langerhans cell granule. *Journal of Cell Biology* **35**, 468-473.
- WOLFF K (1972) The Langerhans Cell. *Current Problems in Dermatology* **4**, 79-145.
- WOLFF K, WINKELMANN RK (1967) Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology* **48**, 50-54.

Artículo 3. Langerhans cell-like dendritic cells in the cornea, tongue and oesophagus of the chicken (*Gallus gallus*)

Las CL son elementos constitutivos de numerosos epitelios que revisten mucosas. En el segmento anterior del ojo, en epitelio conjuntival y el de la región periférica de la córnea poseen CL, mientras que el epitelio de las regiones central y paracentral de la córnea de caracteriza por la ausencia casi total de estas células. En la mucosa oral, las CD ATPasa positivas/clase II positivas de diferentes especies de mamíferos, incluido el hombre, captan y procesan antígenos, general señales accesorias y migran a los ganglios linfáticos regionales donde funcionan eficientemente como células presentadoras de antígenos. En tracto gastrointestinal, la mayor parte del conocimiento de la respuesta inmunológica ha sido obtenida de estudios en la mucosa intestinal. Muy poco se sabe de la relevancia de la mucosa esofágica en la respuesta inmunológica.

El objetido del presente artículo fue demostrar la presencia de CL en las mucosas del pollo que entran en contacto inicial con antígenos ambientales y de la dieta. Estudiamos el segmento anterior del ojo, de la lengua y del esófago, utilizando la misma metodología empleada en la identificación de CL epidérmicas del pollo.

Los resultados demuestran que las mucosas estudiadas contiene CD ATPasa positivas y clase II positivas, parecidas a las CL. En el segmento anterior, la distribución de estas células es idéntica a la observada en diferentes especies de mamíferos y contradice resultados de otros que negaron la existencia de estas células en la córnea del pollo. Ultraestructuralmente, las CD de las mucosas estudiadas tienen todos los criterios de las CL de mamíferos y de la piel del pollo, excepto los gránulos de Birbeck.

Concluimos que las mucosas del segmento anterior, de la lengua y del esófago del pollo contiene CD equivalentes a las CL de la epidemis del mismo animal y a las CL de los mamíferos. La escasez de gránulos de Birbeck es una característica de las CL de las mucosas en mamíferos. Esto puede ser el caso también para las CD de la mucoas del pollo. Sin embargo, una búsqueda más exhaustiva podría demostrarlos en las CD de mucosas normales del pollo o después de la estimulación con la aplicación de un hapteno.

Langerhans cell-like dendritic cells in the cornea, tongue and oesophagus of the chicken (*Gallus gallus*)

Armando Pérez-Torres¹, Martha Ustarroz-Cano¹ & Diana Millán-Aklaco²

¹Departamento de Biología Celular y Tissular, Facultad de Medicina and ²Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. CP 04510

Received 30 October 2002 and in revised form 6 February 2003

Summary

Langerhans cells are dendritic leucocytes which reside mainly within stratified squamous epithelia of skin and mucosa. Their visualization requires the use of ATPase histochemistry, electron microscopy for identifying the unique trilaminar cytoplasmic organelles (the Langerhans cell granules or Birbeck granules), and the expression of major histocompatibility complex class II molecules. Following uptake of antigen, Langerhans cells migrate via the afferent lymphatics to the lymph nodes and undergo differentiation from an antigen-processing cell to an antigen-presenting cell. Using the same approach as that employed in previous studies for the identification of chicken epidermal Langerhans cells, we show here the presence of ATPase-positive and major histocompatibility complex class II-positive Langerhans cell-like dendritic cells at the mucosal surface of the eye, tongue and oesophagus of the chicken. Ultrastructurally, these cells qualified as Langerhans cells except that they lack Langerhans cell granules. Thus, as in mammalian skin and mucosa, chicken mucosa contains mucosal dendritic cells with morphological and phenotypical features for the engagement of incoming antigens within epithelium and lamina propria.

Introduction

Epidermal Langerhans cells (LC) are immature dendritic cells (DC) (Langerhans 1868). They originate in bone marrow (Katz *et al.* 1979) and are located among basal and suprabasal keratinocytes where they form a contiguous network of potent antigen-presenting cells (APC) (Stingl *et al.* 1978, Braathen & Thorsby 1980, Green *et al.* 1980). These cells are the only intraepidermal cells that constitutively possess $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent ectoenzyme ATPase (Wolff & Winkelmann 1967), class II molecules encoded by the major histocompatibility complex (MHC) (Klareskog *et al.* 1977, Rowden *et al.* 1977), and CD1a antigen (Fithian *et al.* 1981) and express receptors for IgG (Fc γ RII) and C3b (CD11b/CD18) (Stingl *et al.* 1977, Schmitt *et al.* 1990). Ultrastructurally, LC can be identified by their lobulated or indented nucleus and clear cytoplasm containing microtubules, microfilaments, lysosomes, mitochondria, but lacking tonofilaments, desmosomes and melanosomes. However, the hallmark feature for designating a cell as a LC is the presence of typical disc- or cup-shaped cytoplasmic organelles termed Langerhans cell granules (LCG) or Birbeck granules (Birbeck *et al.* 1961), which are involved in a specialized form of adsorptive endocytosis, transporting ligand-receptor complexes from the cell surface to lysosomes and/or prelysosomes (Takigawa *et al.* 1985, Hanau *et al.* 1987, Bartosik 1992, Mommasa *et al.* 1994). It is now well-established that LC are capable of take up antigens and migrate to regional lymph nodes where they present

processed antigens to naïve or memory T cells (reviewed in Banerjee & Steinman 1998).

In addition to the epidermis, LC have also been identified in stratified squamous epithelia that line mucous membranes throughout the body (reviewed by de Fraissinette *et al.* 1989). For example, the epithelia of peripheral cornea, limbus region and conjunctiva of many mammalian species including rat, mouse, guinea pig, rabbit, cattle and man contain MHC class II-positive LC (Klareskog *et al.* 1979, Rodrigues *et al.* 1981, Gillette *et al.* 1982, Chandler *et al.* 1985, Pels & van der Gaag 1985). These cells are ATPase-positive, CD1a-positive, possess Fc γ RII and C3b receptors (Rodrigues *et al.* 1981, Bhan *et al.* 1982, Hazlett *et al.* 1982, Chandler *et al.* 1985, Coulston *et al.* 1986, Treseler *et al.* 1986) and contain LCG (Böck & Hanak 1971, Rodrigues *et al.* 1981). Interestingly, the epithelium of the central cornea, in most species, is typically devoid of LC (Streit *et al.* 1979, Bergstresser *et al.* 1980a, Gillette *et al.* 1982, Baudouin *et al.* 1988, Latina *et al.* 1988). This unique circumstance seems to be one of several microanatomical factors for the immune privilege status of the eye (Streilein 1999) and for the high success rate of corneal transplantation (Rubinsamen *et al.* 1984, Williams *et al.* 1986, Ross *et al.* 1991).

The mucosal surfaces of the upper gastrointestinal tract also contain a network of LC. In the oral mucosa of mice and humans, epithelial DC exhibit a phenotype similar to that of LC, including ATPase activity, expression of high levels of MHC class II molecules and CD1a (Bergstresser *et al.* 1980a, Daniels 1984, Walsh *et al.* 1984,

1986, DiFranco *et al.* 1985, Cruchley *et al.* 1989, Van Loon *et al.* 1989, Ericksson *et al.* 1996, Desvignes *et al.* 1998) and have all the ultrastructural criteria to be considered as LC (Schroeder & Theilade 1966, Waterhouse & Squier 1967, Hutchens *et al.* 1971, Martinez 1971, Ahlfors & Larsson 1985, Takehana *et al.* 1985). Moreover, oral mucosa LC can function as efficient APC both *in vitro* (Barrett *et al.* 1993, Ericksson *et al.* 1996) and *in vivo* (Desvignes *et al.* 1998).

In addition to non-specific defense mechanisms, there is a potentially effective immunological system in normal oesophageal mucosa. Ultrastructural studies have demonstrated the occurrence of typical LC in the normal oesophagus of the mouse (Rowden 1967, Böck 1974) and man (Al Yassin & Toner 1976). In the latter, CD1a-positive, MHC class II-positive LC are mainly localized in the suprabasal layer and along the papillae of the lamina propria (Geboes *et al.* 1983, Terris & Potet 1995). A similar distribution has also been reported for oesophageal ATPase-positive LC in guinea pig (Carrillo *et al.* 1985).

The presence of ATPase-, MHC class II- and LCG-positive DC have been demonstrated in the chicken epidermis. They are, therefore, considered analogous to mammalian LC (Pérez-Torres & Millán 1994, Pérez-Torres & Ustarroz 2001). However, nothing is known about their presence and distribution in stratified squamous epithelia lining some mucosa of the chicken. Therefore, we have analysed the eye, tongue and oesophageal mucosa for the presence of LC using the same approach as that used for the identification of epidermal LC in these animals.

Materials and methods

Animals

Five 8-week-old male white Leghorn chickens were kindly provided by the Veterinary Faculty of UNAM and were maintained in conventional conditions with food and water *ad libitum*. The animals were clinically healthy at the time to be sacrificed by an overdose of ether.

Preparation of epithelial sheets and frozen sections

Cornea. Immediately after death, whole eyes were placed briefly in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature. The anterior segments were removed and divided into two equal parts with a razor blade. One part was incubated in PBS (pH 7.3) containing 20 mM EDTA (Sigma) for 60–90 min at 37 °C (Juhlin & Shelley 1977) with continuous agitation. Whole epithelial sheets of the cornea and adjacent conjunctiva were peeled off the underlying stroma using fine forceps under dissecting microscope control. They were washed in cold PBS, fixed overnight at 4 °C in 4% formaldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) containing 7% sucrose, and washed again in cold PBS to continue with ATPase histochemistry (see below). The other part of the anterior segment was cut into 1 × 10 mm² samples of peripheral

cornea and limbus region for ultrastructural analysis (see below). The remainder of the specimen was immediately frozen after embedding in OCT compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, USA, Inc.), 8- μ m-thick frozen sections were cut, mounted on slides coated with poly-L-lysine, air-dried at room temperature for 1 h, fixed in cold acetone for 20 min and processed for immunofluorescence staining of MHC class II antigen (see below).

Tongue and oesophagus. Whole tongue and the cervical part of the oesophagus were obtained and bisected with a longitudinal incision and then cross-sectioned at the apical region, body and the base of the tongue and at the proximal and distal halves of the cervical oesophagus. Some mucosal specimens of both organs, 1 × 5 mm², were separated for ultrastructural analysis (see below). Tongue mucosal samples were removed from the underlying connective tissue and oesophageal mucosa from its muscular layers with blunt dissection. After that, specimens were processed as described above for the cornea. The epithelial sheets and the frozen sections were fixed in cold acetone in preparation for MHC class II molecules immunofluorescence or in formaldehyde–cacodylate for ATPase histochemistry (epithelial sheets only).

ATPase histochemistry of epithelial sheets

A modified ATPase histochemical method (Robins & Brandon 1981) based on lead precipitation was used to identify LC in all epithelial sheets. Briefly, these specimens were washed three times in 0.2 M Tris–maleate buffer (0.2 M Tris [Sigma] plus 0.2 M maleic acid [Merck, Darmstadt, Germany]), pH 7.2, at room temperature and then were incubated for 1 h (corneal epithelium) or 30 min (tongue and oesophagus epithelia) at 37 °C, in freshly prepared medium containing 10 ml distilled water, 10 ml 0.2 M Tris–maleate buffer (pH 7.2), 2.5 ml 0.1 M MgSO₄, 2.5 ml 2% Pb(NO₃)₂, 1.5 g dextrose and 20 mg disodium salt ATP (Sigma). Finally, the epithelial sheets were washed thoroughly in distilled water and the histochemistry reaction products developed in 1% (NH₄)₂S (Merck, Darmstadt, Germany) for 30 s (tongue and oesophagus epithelia) or 1–2 min (corneal epithelium) at room temperature, and rinsed three times in distilled water. Control epithelia sheets were incubated in the same medium without the substrate. The epithelial sheets were mounted with the basal surface upwards in 1:9 v/v glycerol–PBS.

Ultrastructural ATPase histochemistry

Samples of peripheral cornea, tongue and oesophagus obtained as described above were immersed for 30 min in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) at 4 °C. The specimens were then cut manually into 8–10 fragments, and the fixation continued for 60 min in the same fixative. After three washes at 4 °C in 0.15 M cacodylate buffer (pH 7.4) containing 0.025 M sucrose and 0.05% calcium chloride, the fragments were incubated for 45 min at

Mucosal Langerhans cells of the chicken

37 °C in either Wachstein & Meisel's medium (0.83 mM ATP) as modified by Farquhar & Palade (1966) or in Robins & Brandon's (1981) medium (1.32 mM ATP). Control samples were incubated in the same medium devoid of ATP. After a wash in the same cacodylate buffer, the specimens were post-fixed with 1% OsO₄ in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 45 min at 4 °C, dehydrated in gradually increasing concentrations of ethanol, transferred to propylene oxide and embedded in Araldite 6005. Ultrathin sections, obtained with a diamond knife and contrasted with uranyl acetate and lead citrate, were examined with a Zeiss EM-10 electron microscope. Ten semi-serial sections of both control and ATP-incubated samples were analysed in order to search for organelles similar to LCG. At least 50 images of the cell body and dendritic processes of LC-like DC per animal were examined.

Indirect immunofluorescence staining for MHC class II antigen

Indirect immunofluorescence was carried out according to the method described elsewhere (Pérez-Torres & Millán 1994). Briefly, fixed epithelial sheets and frozen sections were rehydrated and blocked for non-specific antigenic sites using 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS containing 0.01% Triton X-100 (pH 7.2) for 1 h at 4 °C. They were then incubated with 1:10 diluted TaP1 monoclonal antibody (specific to B-L antigens, the MHC class II molecules of the chicken, Guillemot *et al.* 1984) overnight at 4 °C in a moist chamber. Following three washes in PBS-0.1% BSA, bound primary antibody was developed with 1:100 Fluorescein isothiocyanate-labelled conjugated goat anti-mouse IgG (FITC-F(ab)'₂) (Zymed Laboratories, San Francisco, California), incubated for 60 min in darkness at 37 °C. Control specimens were incubated with normal mouse IgG (1:100) as the primary antibody. The preparations were washed with PBS, mounted with polyvinyl alcohol (Merck, Darmstadt, Germany) and observed in an epifluorescence Olympus BH2-RFCA microscope.

Quantitative evaluation of ATPase-positive cells in epithelial sheets

Epithelial sheets stained for ATPase were examined at $\times 400$ to determine the number of positive DC, using a calibrated grid that represented $97,344 \mu\text{m}^2$. Ten to fifteen separated fields per animal were randomly chosen and the results expressed as mean \pm SEM cells/mm².

Results

ATPase histochemistry of epithelial sheets

Cornea. ATPase-positive DC were a constant finding associated with the epithelium of the peripheral corneal region (105 ± 24 cells/mm²) (Figure 1A). No ATPase-positive DC were identified in any other corneal region, which evidenced a

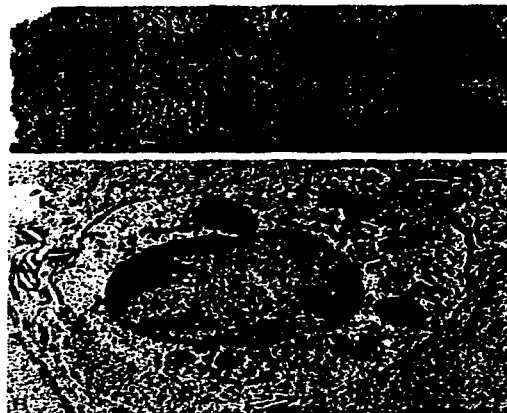


Figure 1. ATPase-positive dendritic cells (arrowheads) located in the limbus region of an epithelial sheet separated from chicken cornea (A). Note that there are no ATPase-positive Langerhans-like cells toward central region of the corneal epithelium (arrow). At the ultrastructural level (B), the electron-dense product of the ATPase reaction delimitates the plasma membrane of intraepithelial cells, lacking desmosomes, tonofilaments and melanosomes. The precipitate is also localized in the nuclear envelope and in membranous organelles (rough endoplasmic reticulum and lysosomes). k = keratinocytes. Magnification 1A: $500\times$; bar 1B = $1 \mu\text{m}$.

well-defined peripheral-central gradient of LC-like cells density. The background formed by keratinocytes was practically unstained.

Tongue. The epithelial sheets obtained from the ventral surface of the tongue contained elongated ATPase-positive cells with prominent dendrites. The cells were present in the mucosal folds (340 ± 37 cells/mm²) but absent in the interfolds epithelium (Figure 2A). In the lateral border of the tongue (Figure 2B), the ATPase-positive cells had a decreased dendricity or were almost rounded; however, their number density was similar (310 ± 48 cells/mm²) to that in the ventral surface. The keratinocytes in both tongue areas had a moderate brown colour but was clearly differentiated from the dark brown colour of the developed enzymatic product reaction (lead sulphite). Epithelial sheets from the dorsal surface of the tongue were not included because their separation was not possible, probably due to the heavy keratinization observed.

Oesophagus. The epithelial sheets from the proximal half of the cervical oesophagus were characterized by the paucity of elongated or bipolar ATPase-positive cells

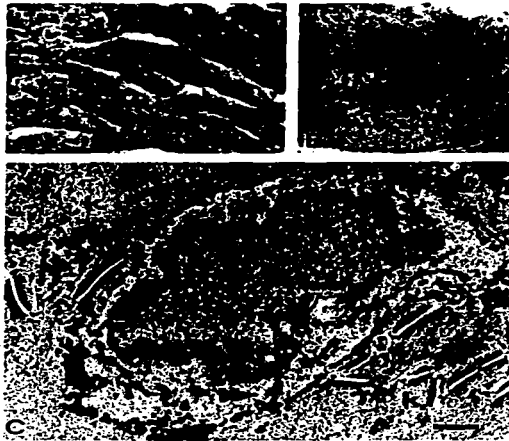


Figure 2. Epithelial sheet of ventral surface of the chicken tongue (A) showing ATPase-positive cells (arrowheads) with very long dendritic processes. These cells were found predominantly in the thinner epithelium zones and show a linear or longitudinal arrangement. The ATPase-positive dendritic cells deficient areas correspond to the thicker epithelium. In the epithelial sheet of the lateral border of the chicken tongue (B), ATPase-positive cells were long and slender or non-dendritic and polygonal in shape. Arrow points toward dorsum tongue. At the ultrastructural level (C), heavy deposits of ATPase reaction product were observed around and in the vicinity of cells characterized by indented nuclei and clear cytoplasm devoided of tonofilaments and desmosomes. Note that also perinuclear and rough endoplasmic cisternae were positive to this reaction. k = keratinocytes. Magnifications 2A,B: 200 \times ; bar 2C = 1 μ m.

(42 \pm 13 cells/mm²) (Figure 3A). In contrast, the oesophageal ATPase-positive cell of the distal half assumed a dendritic aspect and were more numerous (286 \pm 86 cells/mm²) (Figure 3B). They were distributed among the openings of the secretory ducts. The background had a faint brown colour, but the glandular structures were strongly stained.

Ultrastructural ATPase histochemistry

Electron microscopy of ATPase-stained sections of cornea (Figure 1B), tongue (Figure 2C) and oesophagus (Figure 3C) demonstrated the presence of an electron-dense precipitate in the plasma membrane, nuclear envelope and membranous organelles (probably rough endoplasmic reticulum) of basal and suprabasal clear DC which lacked tonofilaments, desmosomes and melanosomes and exhibited rounded or indented nuclei. No LCG-like organelles were observed in ATP-incubated samples or in control samples of the three specimens studied.

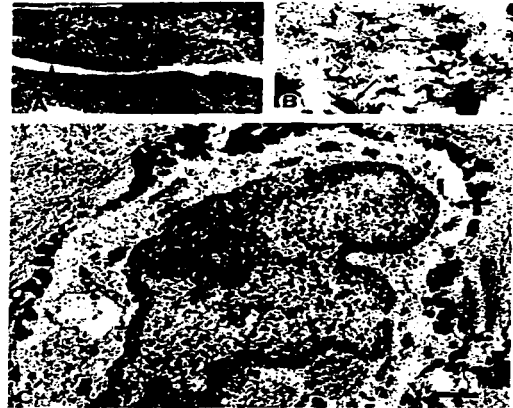


Figure 3. ATPase histochemistry of epithelial sheet of the proximal (A) and distal (B) halves of the cervical portion of the chicken oesophagus. The former has scarce elongated or bipolar ATPase-positive cells with a poorly dendritic aspect (arrowheads), mainly found at the longitudinal mucosal membrane folds. In the latter (B), ATPase-positive cells have a more dendritic morphology and an even distribution across the epithelial surface (arrowheads). A strong positivity is evident at the secretory ducts (arrows) of the esophageal glands. At the ultrastructural level (C), representative oesophageal ATPase-positive cells have an irregular indented nuclei, with a pale cytoplasm lacking of desmosomes and tonofilaments, contrasting with adjacent keratinocytes (k). Note that enzymatic reaction product is localized at the plasma membrane, the perinuclear cisternae and in ill-defined cytoplasmic organelles. Magnifications 3A,B: 200 \times ; bar 3C = 2 μ m.

Immunofluorescence for MHC class II antigens

Cornea. In the frozen sections of the ocular anterior segment, a high expression of MHC class II antigens was observed in the conjunctival epithelium and in the episcleral or buxtalimbal subepithelial conjunctival connective tissue (Figure 4A). Frequently, MHC class II-positive cells formed clusters in, or next to, epithelium. In the loose subepithelial tissue, these cells were elongated and had a perivascular distribution. Towards the limbus region, the class II positivity was identified in basal and suprabasal DC, which suddenly decreased in number and were restricted to the anterior epithelium of the peripheral (limbal) cornea (Figure 4A). Occasionally, MHC class II-positive cells were observed in anterior and posterior epithelia, but not at the stroma of the pericentral cornea.

Tongue. In the frozen sections of the ventral surface of the tongue, MHC class II-positive cells were mainly present in the basal and suprabasal layers of epithelium, showing a linear

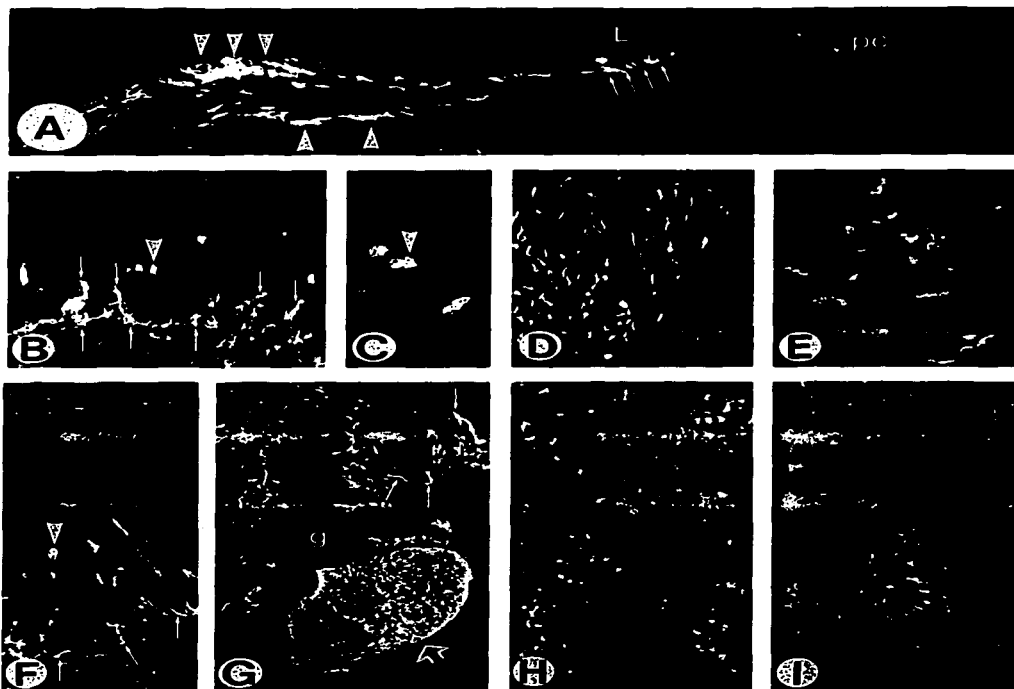


Figure 4. Immunofluorescence of chicken MHC class II-positive cells located in the epithelium and the lamina propria of conjunctiva (arrowheads). These cells are also present, but fewer in number, in the epithelium of the peripheral cornea at limbus level (L, arrows), and are very rarely seen in the pericentral cornea (pc) and absent towards the central cornea. In the frozen sections of the mucosal ventral surface of the tongue (B,C) and the proximal (F) and distal (G) halves of the cervical oesophagus, the MHC class II-positive cells are arranged along the basement membrane in a linear pattern with a tendency to cluster around tips of connective tissue papillae (arrows). However, numerous immunofluorescent cells are situated in the midzones of both epithelia and some are very near to the tongue epithelium surface (arrowheads). Noteworthy, the numerous oesophageal lymph follicles (C, open arrow) in the vicinity of the flask-shaped tubulo-alveolar glands (G, \circ) show a strong positivity to MHC class II molecules. In the epithelial sheets, bipolar or dendritic MHC class II-positive cells are present in the ventral surface of the tongue (D,E) and in the distal half of the cervical oesophagus (I), whereas rounded cells are characteristic of the oesophageal proximal half (H). Magnifications: 4B,D,F-I: 100 \times ; 4A,C: 200 \times ; 4E: 400 \times .

arrangement along the basement membrane (Figure 4B). Frequently, these cells were seen near the surface of the epithelium (Figure 4C). A constant finding was the presence of immunofluorescent DC in the connective tissue of the lamina propria, beneath the basement membrane (Figure 4B). The epithelial sheets of the ventral surface of the tongue showed a population of bipolar or elongated MHC class II-positive cells, oriented at the mucosal folds (Figure 4D). No evidence

of deficient areas of these cells was noted, but the focus of all positive cells was difficult (Figure 4E), which corresponds to their wide intraepithelial distribution observed in the frozen sections.

Oesophagus. The intraepithelial pattern of distribution of oesophageal MHC class II-positive cells was similar to that described above in the frozen sections of tongue, but

these cells were never observed near the luminal surface (Figure 4F). Moreover, the epithelium of mucosal glands and the lamina propria also contained these cellular types. A very strong immunofluorescence was observed in the abundant lymph follicles, mainly localized at the distal half of the cervical oesophagus (Figure 4G). A rounded aspect was characteristic of MHC class II-positive cells in the proximal half of the cervical oesophagus (Figure 4H), whereas more dendriform cells were observed in the distal half (Figure 4I). All control specimens were negative.

Discussion

The goal of the present study was to demonstrate the presence of LC-like DC at some mucosal membranes of the chicken and thus to extend our previous studies about epidermal LC in this species (Carrillo *et al.* 1991, Pérez-Torres & Millán 1994, Pérez-Torres & Ustarroz 2001).

Our results indicate that the peripheral but not the central cornea epithelium contain a population of ATPase-positive DC which determine a gradient of these LC-like cells as has been demonstrated in several mammalian species including rat, mouse, guinea pig, cattle, humans (Rodríguez *et al.* 1981, Guillet *et al.* 1982, Coulston *et al.* 1986) and the frog *Rana pipiens* (Castell *et al.* 1999). Our findings refute a previous report that DC were not identified by ATPase staining in the cornea of the chicken (Rodríguez *et al.* 1981). Moreover, observations of MHC class II-positive cells in the peripheral corneal epithelium of the chicken reinforce the assertion of the presence of corneal LC-like DC. Although the assumption that the normal central cornea is completely devoid of LC in human, mouse, rabbit and guinea pig (Klareskog *et al.* 1979, Bergstresser *et al.* 1980a, Rodríguez *et al.* 1981, Guillet *et al.* 1982) is widely accepted, occasional MHC class II-positive cells have been described in the normal central cornea, both in the epithelium (Guillet *et al.* 1982) and anterior stroma (Wang *et al.* 1987). Our findings are similar to these reports. However, frequently scarce MHC class II-positive cells were also observed in the pericentral epithelium of the cornea and in Descemet's membrane or in the underlying endothelium, but not in corneal stroma.

MHC class II-positive cells were also observed in conjunctival epithelium and in buxaltimbal subepithelial conjunctival connective tissue. Probably, many of these cells are endothelial cells of blood vessels and others display a perivascular location as had been observed in the human (Vantrappen *et al.* 1985, Sacks *et al.* 1986) and rat (McMenamin & Holthouse 1992). A greater density of intraepithelial MHC class II-positive DC was noted in the epibulbar conjunctiva, which is in agreement with a study carried out in humans (Sacks *et al.* 1986). Thus, the conjunctiva and the peripheral cornea of the chicken contains a very rich plexus of resident or migrating MHC class II-positive cells that probably mature as LC as had been proposed in mammalian species (McMenamin 1994).

Oral mucosal LC have been described in several mammalian species, including human (Schroeder & Theilade

1966, Waterhouse & Squier 1967, Daniels 1984), Rhesus monkey (Hutchens *et al.* 1971), mouse (Bos & Burkhardt 1980, Bergstresser *et al.* 1980a), rat (Hill 1977, Takehana *et al.* 1985), albino guinea pig (Bergstresser *et al.* 1980a, Carrillo *et al.* 1985), hamster (Bergstresser *et al.* 1980a) and cat (Saint-Andre Marchal *et al.* 1997). Functional evidence suggests that the buccal mucosa represents a compartment of mucosal-associated lymphoid tissue and that ATPase-positive/MHC class II-positive DC can generate accessory signals, process antigens and migrate to regional lymph nodes maturing to efficient APC (Ahlfors & Czerkinsky 1991, Barrett *et al.* 1993, Hasseus *et al.* 1995, Eriksson *et al.* 1996, Desvignes *et al.* 1998).

There is disagreement whether oral mucosa LC have regional differences in density and distribution, mainly related to the degree of keratinization (Barrett *et al.* 1996). Although discrepancies may be attributable to interspecies variations and to different quantitative and staining methods employed, the density of oral mucosa LC is higher in non-keratinized epithelium than in keratinized epithelium (Daniels 1984, Cruchley *et al.* 1989). Considering that regional variation in such density is a real phenomenon, the LC-like cells described in the tongue of the chicken correlate with mammalian oral mucosa LC in morphology, density, ATPase activity and MHC class II molecules expression. To our knowledge, the presence of ATPase-positive/MHC class II-positive DC in the tongue epithelium of the chicken reported here is the first demonstration of oral mucosa LC-like cells in non-mammalian species.

Oesophageal mucosa is the other site of the gastrointestinal tract to come in contact with environmental factors such as pathogenic microorganisms, chemical irritants or food additives. However, most knowledge about the presence of an effective immunological system in the digestive system comes from studies carried out in the intestinal mucosa. Moreover, it is surprising that compared with other mucosa (de Fraissinette *et al.* 1989), little work has been performed to identify the cellular types that might be relevant in the immunological defence system of the oesophagus. LC have been identified in the upper gastrointestinal tract of the sheep (Gemmell 1973), mouse (Böck 1974), bovine (Gernecke 1977), human (Al Yassin & Toner 1976) and guinea pig (Carrillo *et al.* 1985). Our findings of ATPase-positive/MHC class II-positive DC are the first evidence of the presence of LC-like cells in the oesophageal mucosa of the chicken and are equivalent to those previously reported in the epidermis of the chicken (Pérez-Torres & Millán 1994).

The variation in ATPase-positive DC density between proximal half and distal half of the oesophagus is difficult to explain. The former seems to be an area naturally deficient of LC-like cells and this suggests that it probably may be immunologically analogous to sites depleted of LC such as rodent tail skin, cornea and hamster cheek pouch (Bergstresser *et al.* 1980a,b), regarded as immunologically privileged sites, where grafts of allogeneic skin have a longer survival whereas grafts placed orthotopically are readily rejected (Barker & Billingham 1977) or do not support

Mucosal Langerhans cells of the chicken

the induction of contact hypersensitivity to dinitrofluorobenzene (Boewes *et al.* 1980). Probably, central cornea and the proximal half of the oesophagus of the chicken have similar immunological properties.

At the ultrastructural level, mucosal ATPase-positive DC of the cornea, tongue and oesophagus have all the criteria of LC except that they lacked LCG, although we carried out a similar search as employed for demonstrating that epidermal LC of the chicken possess LCG-like organelles with the typical rod-shaped and racket-shaped profiles of the LCG in mammalian LC (Pérez-Torres & Ustarroz 2001). Probably, mucosal LC-like cells of the chicken contain few LCG and a more extensive search using serial ultrathin sections or a goniometric device are required to identify a similar organelle (Andersson *et al.* 1981) and to then designate these cells as LC. This point is relevant despite the fact that the origin and function of LCG remain elusive, although recent studies have provided some insight into the nature of these organelles. Their presence may be related to differentiation and maturation pathways of the LC (Mackensen *et al.* 1995, Strunk *et al.* 1996) LCG represent subdomains of the endosomal recycling compartment, where langerin, a protein implicated in LCG biogenesis, accumulates (Mc Dermott *et al.* 2002). Because LCG are depleted when LC are activated, they could serve as a loading compartment and/or a membrane reservoir for antigens before LC maturation (Mc Dermott *et al.* 2002). In summary, we show here the existence of LC-like DC which exhibit a characteristic pleomorphic, dendriform morphology, with intense membrane ATPase activity and staining for MHC class II molecules. Ultrastructural analysis established that ATPase-positive DC located within the normal intact mucosal epithelia qualify as LC except for the absence of GCL. Our observations suggest that LC-like DC at the mucosal surfaces of the eye, tongue and oesophagus of the chicken have relevant morphological and surface phenotypic properties for engagement with incoming antigens within the epithelia and lamina propria.

Acknowledgements

We are especially grateful to Dr. Max D. Cooper (Howard Hughes Medical Institute, University of Alabama at Birmingham, USA) for the gift of the TaP1 monoclonal antibody. Also, we greatly appreciate the technical aid in electron microscopy of Adrián Rondán. We thank Francisco Pasos for help with photography and Dr. Marcela Ramirez Escoto for revising the English version.

References

Ahlfors E, Czerkinsky C (1991) Contact sensitivity in the murine oral mucosa. I. An experimental model of delayed-type hypersensitivity reactions at mucosal surfaces. *Clin Exp Immunol* 86: 449-456.
Ahlfors E, Larsson PÅ, Bergstresser PR (1985) Langerhans cells surface densities in rat oral mucosa and human buccal mucosa. *J Oral Pathol* 14: 390-397.

Al Yassin TM, Toner PG (1976) Langerhans cells in the human oesophagus. *J Anat* 122: 435-445.
Andersson A, Sjöborg S, Elofsson R, Falck B (1981) The epidermal indeterminate cell - A special cell type? *Acta Dermatol Venereol* 99: 41-48.
Banherren J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
Barker CF, Billingham RE (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25: 1-54.
Barrett AW, Cruchley AT, Williams DM (1996) Oral mucosal Langerhans cells. *Crit Rev Oral Biol Med* 7: 36-58.
Barrett AW, Ross DA, Goodacre JA (1993) Purified human oral Langerhans cells function as accessory cells *in vitro*. *Clin Exp Immunol* 92: 158-163.
Bartosk I (1992) Cytoplasmic-derived Birbeck granules transport horseradish peroxidase to endosomal compartment in the human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 99: 53-58.
Baudouin F, Fredj-Reygroblet D, Gstaup P, Lapalus P (1988) HLA DR and DQ distribution in normal ocular structures. *Curr Eye Res* 7: 903-911.
Bergstresser PR, Fletcher CR, Streilein JW (1980a) Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunologic properties. *J Invest Dermatol* 74: 77-80.
Bergstresser PR, Toews GB, Gilliam JN, Streilein JW (1980b) Unusual numbers and distribution of Langerhans cells in skin with unique properties. *J Invest Dermatol* 74: 312-314.
Bhan AK, Tujikawa LS, Foster CS (1982) T-cell subsets and Langerhans cells in normal and diseased conjunctiva. *Amer J Ophthalmol* 94: 205-212.
Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD (1961) An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37: 51-64.
Bock P (1974) Fine structure of Langerhans cells in the stratified epithelia of the oesophagus and stomach of mice. *Z Zellforsch* 147: 247-247.
Bos RP, Honek H (1971) Some remarks on the morphology of the guinea pig conjunctival epithelium. *J Submicr Cytol* 3: 1-8.
Bos RP, Honek H, Jardi A (1980) Interepithelial cells of the oral mucosa. Light and electron microscopic observations in germfree, specific pathogen-free and conventionalized mice. *J Oral Pathol* 9: 65-81.
Braathen LR, Thorsby E (1980) Studies on human epidermal Langerhans cells. Allo-activating and antigen-presenting capacity. *Scand J Immunol* 11: 401-411.
Carrillo J, Montalvo C, Carmona C (1985) Células de Langerhans en el cobayo albino. *Patología (México)* 23: 27-37.
Carrillo-Fuiga J, Pérez-Torres A, Castell RA, Antuna BS (1991) Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). *J Anat* 176: 1-8.
Cavell RA, Hernández A, Sampedro EA, Herrera MA, Alvarez SJ, Rondán A (1999) ATPase and MHC class II molecules co-expression in *Rana pipiens* dendritic cells. *Dev Comp Immunol* 23: 473-485.
Chandler JW, Cummings M, Gillette TE (1985) Presence of Langerhans cells in the central cornea of normal human infant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 113-116.
Coulston JA, Walsh LJ, Seymour GJ, Lavin MF (1986) Differential distribution of ATPase and T6-positive cells (Langerhans cells) in the limbus of Hereford and non-Hereford cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 13: 289-299.
Cruchley AT, Williams DM, Farthing PM, Lesh CA, Squier CA (1989) Regional variation in Langerhans cell distribution and density in normal human oral mucosa determined using monoclonal antibodies against CD1, HLADR, HLADQ and HLADP. *J Oral Pathol Med* 18: 510-516.
Daniels TA (1984) Human mucosal Langerhans cells: Post-mortem identification of regional variations in oral mucosa. *J Invest Dermatol* 84: 21-24.
de Fraissinette A, Schmitt D, Thivolet J (1989) Langerhans cells of human mucosa. *J Dermatol* 16: 255-262.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Desvignes C, Eséves F, Etchart N, Bella C, Czerkinsky C, Kaiserlian D (1998) The murine buccal mucosa is an inductive site for priming class I-restricted CD8⁺ effector T cells *in vivo*. *Clin Exp Immunol* 113: 386-393.
- DiFranco CF, Toto PD, Rowden G, Gargiulo AW, Keene JJ, Connolly E (1985) Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. *J Periodontol* 56: 48-54.
- Eriksson K, Ahlfors E, George-Chandy A, Kaiserlian D, Czerkinsky C (1996) Antigen presentation in the murine oral epithelium. *Immunology* 88: 147-152.
- Farquhar MG, Palade GE (1966) Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. *J Cell Biol* 30: 359-379.
- Fithian E, Kung P, Goldstein G, Rubenfeld M, Fenoglio C, Edelson R (1981) Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2541-2544.
- Geboes K, De Wolf-Peters C, Rutgeerts P, Janssens J, Vantrappen G, Desmet V (1983) Lymphocytes and Langerhans cells in the human of oesophageal epithelium. *Virehows Arch A Pathol Anat Histopathol* 401: 45-55.
- Gentzell RT (1973) Langerhans cells in the ruminal epithelium of the sheep. *J Ultrastruct Res* 43: 256-258.
- Gernecke WH (1977) Langerhans cells in the epithelium of the bovine forestomach. Their role in the primary immune response. *J South Afr Vet Assoc* 48: 187-192.
- Gillette TE, Chandler JW, Greiner JV (1982) Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmol* 89: 700-711.
- Green Y, Stingl G, Shevach EM, Katz SI (1980) Antigen presentation and allogeneic stimulation by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 75: 44-45.
- Guillemlot FP, Oliver PD, Peault BM, Le Douarin NM (1984) Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J Exp Med* 160: 1803-1819.
- Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Stampf JL, Garud JC, Bieber T, Grosshans E, Benezra C, Cazenave JP (1987) Human epidermal Langerhans cells internalize by receptor-mediated endocytosis T-6 (CD 1⁺ NA134⁺) surface antigen. Birbeck granules are involved in the intracellular traffic of the T6 antigen. *J Invest Dermatol* 89: 172-177.
- Hassus B, Dahlgren U, Bergenholtz G, Jontell M (1995) Antigen presenting capacity of Langerhans cells from rat oral epithelium. *J Oral Pathol Med* 24: 56-60.
- Hassus B, Jontell M, Bergenholtz G, Eklund C, Dahlgren UL (1999) Langerhans cells from oral epithelium are more effective in stimulating allogeneic T-cells *in vitro* than Langerhans cells from skin epithelium. *J Dent Res* 78: 751-758.
- Hazlett LD, Grevingood C, Berk RS (1982) Change with age in limbal conjunctival epithelial Langerhans cells. *Curr Exp Res* 2: 423-425.
- Hill MW (1977) Histology of Langerhans cells in neonatal rat palatal mucosa. *Archs Oral Biol* 22: 641-645.
- Hutchins LH, Sagebiel RW, Clarke MA (1971) Oral epithelial dendritic cells of the rhesus monkey-histologic demonstration, fine structure and quantitative distribution. *J Invest Dermatol* 56: 325-336.
- Juhlin L, Shelley WB (1977) New staining techniques for the Langerhans cell. *Acta Dermatol Venereol* 57: 289-296.
- Katz SI, Tamaki K, Sachs DH (1979) Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282: 324-326.
- Klareskog L, Tjernlund UM, Forsum U, Peterson PA (1977) Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268: 248-250.
- Klareskog L, Forsum U, Tjernlund UM, Rask L, Peterson PA (1979) Expression of Ia antigen-like molecules on cells in the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 310-313.
- Langerhans P (1868) Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv pathol Anat Physiol klinis Med* 44: 325-337.
- Latina M, Flotte T, Crean E, Sherwood ME, Granstein RD (1988) Immunohistochemical staining of the human anterior segment. Evidence that resident cells play a role in immunologic responses. *Archs Ophthalmol* 106: 95-99.
- Mackensen A, Herbst B, Kühler G, Wolff-Vorbek G, Rosenthal F, Veelen H, Kulmburg P, Schaefer HE, Mertelsmann R, Lindemann A (1995) Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitor cells *in vitro*. *Blood* 86: 2698-2707.
- Martinez IR (1971) The ultrastructure of the keratinizing epithelia of the incisor and molar gingivae of the albino rat: Similarities and differences. *Anat Rec* 170: 1-30.
- Mc Dermott R, Ziyian U, Spelner D, Bausinger H, Lipsker D, Mommas M, Cazenave JP, Raposo G, Goud B, de la Salle H, Salamero J, Hanau D (2002) Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates. *Mol Biol Cell* 13: 317-335.
- McMenamin PG (1994) Immunocompetent cells in the anterior segment. *Progress in Retinal and Eye Research*, Vol. 3 No. 2. Great Britain: Elsevier Science Ltd, chapter 5, pp. 555-591.
- McMenamin PG, Holthouse I (1992) Immunohistochemical characterization of dendritic cells and macrophages in the aqueous outflow pathways of the rat eye. *Exp Eye Res* 55: 315-324.
- Mommas M, Mulder A, Vermeer BJ, Koning F (1994) Functional human epidermal Langerhans cells that lack Birbeck granules. *J Invest Dermatol* 103: 807-810.
- Pels E, van der Gaag R (1985) HLA-A,B,C and HLA-DR antigens and dendritic cells in fresh and organ culture preserved corneas. *Cornea* 3: 231-239.
- Pérez-Torres A, Millán D (1994) Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in the chicken epidermis. *J Anat* 184: 591-596.
- Pérez-Torres A, Ustarroz M (2001) Demonstration of Birbeck (Langerhans cells) granules in the normal chicken epidermis. *J Anat* 199: 493-497.
- Robins PG, Brandon D (1981) A modification of the adenosine triphosphate method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Tech* 56: 87-89.
- Rodrigues MM, Rowden G, Hackett J, Bahos Y (1981) Langerhans cells in the normal conjunctiva and peripheral cornea of selected species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 759-765.
- Ross J, Callanan D, Kuntz H, Niederkorn J (1991) Evidence that the fate of class II-disparate corneal grafts is determined by the timing of class II expression. *Transplantation* 51: 532-536.
- Rowden G, Lewis MG, Sullivan AL (1977) Ia antigens on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268: 247-248.
- Sacks E, Rutgers J, Jakobiec FA, Bonetti F, Knowles DM (1986) A comparison of conjunctival and nonocular dendritic cells utilizing new monoclonal antibodies. *Ophthalmol* 93: 1089-1097.
- Saint-André Marchal I, Dezutter-Dambuyant C, Martin JP, Willett BJ, Woo JC, Moore PF, Magnol JF, Schmitt D, Marchal T (1997) Quantitative assessment of feline epidermal Langerhans cells. *Br J Dermatol* 136: 961-965.
- Schmitt DA, Bieber T, Cazenave JP, Hanau D (1990) Fc receptors of human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 94 (Suppl. 6): 15S-21S.
- Schroeder H, Theilade J (1966) Electron microscopy of normal human gingival epithelium. *J Periodontol Res* 1: 95-111.
- Stingl G, Katz SI, Clement I, Green Y, Shevach EM (1978) Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 121: 2005-2013.
- Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Oichler WJ, Gschnait F, Knapp W, Wolf K (1977) Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268: 245-246.
- Streilein JW (1999) Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Progress in Retinal and Eye Research* 18: 357-370.
- Streilein JW, Toews GB, Bergstresser PR (1979) Corneal allografts fail to express Ia antigens. *Nature* 282: 325-327.
- Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Krömer E, Elbe A, Maurer D, Stingl G (1996) Generation of human dendritic/Langerhans cells from circulating CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87: 1292-1302.
- Takehana S, Kameyama Y, Sato E, Misohata M (1985) Ultrastructural observations on Langerhans cells in the rat gingival epithelium. *J Periodontol Res* 20: 276-283.

Mucosal Langerhans cells of the chicken

- Takigawa M, Iwatsuki K, Yanada M, Okamoto H, Imamura S (1985) The Langerhans cell granule is an adsorptive endocytic organelle. *J Invest Dermatol* 85: 12-15.
- Terris B, Poiet F (1995) Structure of Langerhans' cell in the human oesophageal epithelium. *Digestion* 56(Suppl. 1): 9-14.
- Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW (1980) Langerhans cells: Sentinels of skin associated lymphoid tissue. *J Invest Dermatol* 75: 78-82.
- Treseler PA, Sanfilippo F (1986) The expression of major histocompatibility complex and leukocyte antigens by cells in the rat cornea. *Transplantation* 42: 248-252.
- Van Leen LAJ, Krieg SR, Davidson CL, Bos JD (1989) Quantification and distribution of lymphocyte subsets and Langerhans cells in normal human oral mucosa and skin. *J Oral Pathol Med* 18: 197-201.
- Vantrappen L, Geboes K, Missuilen L, Maudgal PC, Desmet V (1985) Lymphocytes and Langerhans cells in the normal human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 220-225.
- Walsh LJ, Seymour GJ, Savage NW (1986) Oral mucosal Langerhans cells express DR and DQ antigens. *J Dent Res* 65: 390-393.
- Wang H, Kaplan HJ, Chan WC, Johnson M (1987) The distribution and ontogeny of MHC antigens in murine ocular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1383-1389.
- Waterhouse JP, Squier CA (1967) The Langerhans cell in human gingival epithelium. *Archs Oral Biol* 12: 341-348.
- Wolff K, Winkelmann RK (1967) Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 48: 50-54.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Artículo 4. Diferencias sexuales posteclosión en las células de Langerhans epidérmicas del pollo doméstico (*Gallus gallus*).

En los estudios de los artículos previos se utilizaron pollos adultos y sabíamos que el número de CL ATPasa positivas era de $688 \pm 265/\text{mm}^2$. Circunstancialmente, notamos que la epidermis contenía un número evidentemente menor de CL ATPasa positivas cuando era obtenida de pollos menores a 30 días. Este hallazgo nos pareció interesante y decidimos hacer un estudio ontogénico posteclosión, cuantificando las CL epidérmicas de hembras y machos, de acuerdo a la expresión de ATPasa y de moléculas clase II. Hasta donde sabíamos, las CL de mamíferos aparecen en la epidermis durante el desarrollo embrionario o fetal. Inicialmente son ATPasa positivas, luego expresan moléculas clase II y, posnatalmente, presentan gránulos de Birbeck. Además, estaba demostrado que en ratones adultos, las hembras tiene más CL ATPasa positivas que los machos, diferencia que desaparece después de la orquidectomía.

Utilizamos pollos de 4 a 35 días de edad, sacrificados por sobredosis de eter a diferentes edades. El sexo se identificó por observación directa de las gonadas después de laparotomía. Las láminas epidérmicas se obtuvieron de la piel de las apterías pectorales. La cuantificación por mm^2 de las CL ATPasa positivas o clase II positivas, por edad y sexo, se realizó con una cámara lúcida, calibrando el área para un objetivo 40X.

Los resultados obtenidos indican que las CL aparecen a los 7 días posteclosión en ambos sexos, utilizando ambos marcadores. En los machos, las CL ATPasa positivas/clase II positivas se mantienen por debajo de $100 \text{ células}/\text{mm}^2$ durante todo el estudio, mientras que las hembras incrementan a más de $100 \text{ CL ATPasa positivas}/\text{mm}^2$ durante la segunda semana posteclosión y vuelven a incrementar este número hasta un 50% del número del adulto a los 35 días de edad. Durante las primeras 3 semanas, no hay diferencia numérica entre hembras y machos en el número de CL clase II positivas; posteriormente, sólo las hembras incrementan este número a $338/\text{mm}^2$.

Concluimos que los pollos nacen con una depleción casi absoluta de CL hasta la primera semana de vida y que luego se establece un dimorfismo sexual en el número y expresión de ATPasa y moléculas clase II, siendo las hembras las que alcanzan un número de CL cercano al 50% del número en adultos poco después del primer mes de vida, independientemente del marcador empleado para la cuantificación. Aún así, la depleción de CL sigue existiendo y podría ser empleada para comparar, sin el uso de radiación ultravioleta o corticoides, algunas respuestas inmunológicas en las que se ha involucrado a las CL, como la inducción de hipersensibilidad por contacto o de tolerancia a haptenos. La secuencia de expresión de actividad de ATPasa y de moléculas moléculas clase en las CL del pollo recuerda a la de mamíferos. La presencia del gránulo de Birbeck no fue explorada.

Diferencias sexuales posteclosión en las células de Langerhans epidérmicas del pollo doméstico (*Gallus gallus*)

Armando Pérez-Torres,* Laura Zárate-Garduño,*
Martha Ustarroz-Cano*

Abstract

The epidermis of the chicken (*Gallus gallus*) has cells with morphological, histochemical, ultrastructural and phenotypic features similar to the mammalian Langerhans cells (LC). We search in the present study the ATPase activity and the expression of the Major Histocompatibility Complex class II molecules (MHC class II) in the LC of male and female chicks since 4 days until 35 days post-hatch. The results indicate that LC are lacked during the first week post-hatch in both sexes, that the male chicks have a global significantly lower number of LC ($\leq 100/\text{mm}^2$) than female chicks, and these reach a number of LC (250 ATPase+ cells/ mm^2 ; 338 MHC class II+ cells/ mm^2) that corresponds to the 50% approximately of the adult chicken. We conclude that there is a sexual dimorphism and an initial natural depletion in the LC of the domestic chicken.

Keywords: Langerhans cells. Ontogeny. Chickens. Sexual dimorphism.

Resumen

La epidermis del pollo (*Gallus gallus*) contiene células con características morfológicas, histoquímicas, ultraestructurales y fenotípicas similares a las de las células de Langerhans (CL) de los mamíferos. En el presente estudio investigamos la actividad de ATPasa y la expresión

de moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC clase II) en las CL epidérmicas de pollos hembras y machos desde los 4 días hasta los 35 días posteclosión. Los resultados indican que estos animales prácticamente carecen de CL durante la primera semana posteclosión, que los machos tienen un número global significativamente menor de CL ($\leq 100/\text{mm}^2$) y que las hembras alcanzan un número de CL (250 células ATPasa+/ mm^2 ; 338 células MHC clase II+/ mm^2) que corresponde aproximadamente al 50% del de los pollos adultos. Concluimos que existe

* Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM

Dirección para correspondencia y solicitud de reimpresos: M. en C. Armando Pérez Torres. Departamento de Biología Celular y Tisular, Edificio A, tercer piso, Facultad de Medicina, UNAM, CP 04510, México, D.F. Correo electrónico: armandop@servidor.unam.mx

dimorfismo sexual y una depleción natural inicial en las CL del pollo doméstico.

Palabras clave: Células de Langerhans. Ontogenia. Pollos. Dimorfismo sexual.

Introducción

Las células de Langerhans epidérmicas (CL) de los mamíferos son células dendríticas (CD) inmaduras localizadas entre los queratinocitos basales y suprabasales, formando una red continua de células que captan antígenos por pinocitosis y fagocitosis. Posteriormente migran por los vasos linfáticos aferentes hacia las zonas paracorticales de los ganglios linfáticos regionales donde activan a los linfocitos T en reposo, al presentarles los antígenos procesados, ahora como CD maduras.⁽¹⁾ Las CL son las únicas células intraepidérmicas que constitutivamente expresan una ATPasa de membrana dependiente de Ca^{++}/Mg^{++} ,⁽²⁾ las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC clase II),^(3,4) el antígeno CD1a,⁽⁵⁾ el receptor tipo II para el Fc de la IgG (FcR γ II, CD32) y receptores para C3bi (CD11b-CD18).⁽⁶⁾ La característica ultraestructural cardinal de las CL es el gránulo de Birbeck o gránulo de las CL (GCL),⁽⁷⁾ organelos que representan subdominios del compartimiento endosomal reciclante involucrado en las vías intracelulares del procesamiento de antígenos.⁽⁸⁾

Las CL se originan en la médula ósea⁽⁹⁾ a partir de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ que estimuladas con GM-CSF y TNF α se diferencian a células CD1a⁺, GCL⁺, E-cadherina⁺, que expresan la molécula CLA (cutaneous leukocyte homing antigen) y que manifiestan propiedades inmunoestimuladoras similares a las de las CL aisladas de la piel.⁽¹⁰⁻¹²⁾

El estudio de las CL en vertebrados no mamíferos cuenta con muy pocos informes.⁽¹³⁾ En el caso de las aves, se ha demostrado que la epidermis del pollo doméstico contiene CL ATPasa⁺,⁽¹⁴⁾ que co-expresan MHC clase II⁽¹⁵⁾ y que poseen organelos similares al GCL.⁽¹⁶⁾ En el curso de estos estudios notamos que había una aparente diferencia en el número de CL relacionada con la edad y sexo de los animales empleados, sobre todo si estos eran menores a los 30 días. Para confirmar

si esta observación es real, iniciamos el presente trabajo cuyo objetivo principal es cuantificar las CL en pollos hembras y machos desde los 4 días posteclosión hasta los 35 días de edad y establecer que existe dimorfismo sexual en el número, morfología y expresión de la ATPasa y de MHC clase II en las CL de estas aves.

Materiales y métodos

Animales. Los pollos fueron adquiridos con un proveedor comercial dos días posteclosión; se mantuvieron en condiciones habituales de bioterio, con control permanente de temperatura y acceso al alimento y al agua *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados por sobredosis de éter a los 4, 7, 10, 15, 21, 28 y 35 días de edad. Al menos 4 animales por cada edad y por sexo fueron utilizados en el estudio. La determinación del sexo se realizó por inspección directa durante la necropsia. El desarrollo notable de la gónada izquierda identificó a las hembras mientras que gónadas bilaterales y de tamaño similar identificaron a los machos. Los casos dudosos no fueron considerados.

Obtención de láminas epidérmicas. Se obtuvieron fragmentos de piel de 0.5 cm² de ambas arterias pectorales y fueron incubados en CaCl₂ 2M durante 20 min a temperatura ambiente (TA).⁽¹⁷⁾ Las láminas epidérmicas se separaron de la dermis con la ayuda de dos jeringas hipodérmicas y se enjuagaron abundantemente en agua destilada (AD) para luego fijarlas en una solución de formaldehído-amortiguador de cacodilato de sodio (pH 7.2) durante 60 min a 4°C y realizar la histoquímica enzimática para ATPasa o fueron fijadas en acetona total durante 10 min a TA para la demostración de MHC clase II con inmunofluorescencia.

Histoquímica para ATPasa.⁽¹⁸⁾ Después de fijar en formaldehído-cacodilato, las láminas epidérmicas fueron lavadas durante 15 min en amortiguador Tris-maleato 0.2M (pH 7.2) a TA y luego fueron incubadas durante 60 min a 37°C en el siguiente medio, preparado al momento de su uso: AD, 10 mL; amortiguador Tris-maleato 0.25M (pH 7.3), 10 mL; MgSO₄ 0.1M, 2.5 mL; Pb(NO₃)₂ al 2%, 2.5 mL; dextrosa 1.5 g y ATP disódico (Sigma), 20 mg. Posteriormente, las láminas epidérmicas fueron lavadas 3 veces durante 15 min con abundante

AD y el producto de la reacción enzimática ($Pb^{2+}PO_4$) fue revelado con $(NH_4)_2S$ (Merck) al 1% en AD durante 1 min a TA. Los controles fueron especímenes incubados en el mismo medio pero sin ATP y los testigos fueron algunas láminas de animales adultos. Todas las láminas fueron montadas con el lado dérmico (de coloración café oscuro) hacia arriba utilizando gelatina glicerinada de Kaiser.

Inmunofluorescencia para MHC clase II. Después de la fijación en acetona, las láminas epidérmicas se secaron al aire durante 20 min y luego se rehidrataron y bloquearon con albúmina sérica bovina (ASB) al 1% diluida en una solución salina amortiguada de fosfatos (PBS) con tritón X-100 al 0.01%, durante 1 h a 4°C; luego fueron incubadas en el sobrenadante con el anticuerpo monoclonal TaP1 (obsequio del Dr. Max D. Cooper, University of Alabama at Birmingham) específico para las moléculas B-L del pollo, homólogas a las MHC clase II o Ia (Immune-associated) de mamíferos.⁽¹⁹⁾ Finalmente, después de lavar las láminas en PBS, fueron incubadas en un anticuerpo secundario fluoresceinado (cabra anti-IgG de ratón, ICN) diluido 1:32 en PBS-ASB al 0.1%-tritón X-100 0.01%, durante 1 h a 37°C en cámara húmeda y en oscuridad. Las láminas controles fueron incubadas con un anticuerpo primario irrelevante y del mismo isotipo. Todos los especímenes fueron montados con una resina hidrosoluble no autofluorescente (Merck).

Cuantificación de CL ATPasa*/MHC clase II*. Las CL ATPasa* fueron cuantificadas utilizando una cámara lúcida y un objetivo de 40X. Cada campo de conteo fue calibrado con un micrómetro y representó 97 344 μm^2 . Por lo menos 10 a 15 campos por animal fueron considerados para convertir los resultados en número de células/mm². Las CL MHC clase II* fueron cuantificadas en fotomicrografías cuya área correspondía a 384 800 μm^2 y el número total se expresa como células/mm².

Resultados

Histoquímica para ATPasa. Tanto en hembras como en machos, las CL ATPasa* aparecieron por primera vez alrededor del día 7 posteclosión, siendo notable la ausencia casi absoluta de estas

células al día cuarto del nacimiento (figs. 1 y 2). Entre los días 7 y 15, los machos mantuvieron un incremento lento pero sostenido en el número de CL (menos de 50/mm²) las cuales mostraron una distribución homogénea. En ese mismo lapso, las hembras incrementaron a más de 100 el número de CL/mm², con una distribución heterogénea debido a la formación de cúmulos de células ATPasa* (figs. 1 y 2). En el día 21, el aumento paulatino en el número de CL ATPasa* observado en los machos cambia y el número aumenta hasta alcanzar a las hembras. Aparecen algunos cúmulos de células positivas en los machos. Entre los días 21 y 28, ambos sexos manifiestan una disminución en las CL, coincidiendo en el número de éstas al día 28 (82/mm²). Para el día 35, los machos mantienen un número de CL ATPasa* por debajo de 100/mm² mientras que las hembras muestran un incremento muy significativo a más de 250 CL/mm² (fig. 2). Para entonces, las áreas intercúmulos en las hembras están ocupadas por estas células (fig. 1).

Desde el punto morfológico, en ambos sexos se observó que las CL ATPasa* son pleiomórficas, siendo más constante la presencia de células poliédricas o redondas. Algunas formas dendríticas se observan hasta el día 35 en las hembras.

Inmunofluorescencia para MHC clase II. Las primeras CL MHC clase II* fueron observadas el día 7 posteclosión, en ambos sexos (fig. 3). Desde esta edad y hasta el día 21, el número de células fluorescentes no mostró un incremento notable, ni diferencias entre los animales (fig. 4). Nuevamente, en las hembras las células positivas formaron cúmulos y en los machos la distribución fue homogénea. En los días subsiguientes, el cambio más notable en los machos es la formación de cúmulos de CL MHC clase II* al día 35, ya que el número máximo de éstas se observó hasta el día 28 (menos de 100 células/mm²) y luego disminuyó discretamente (figs. 3 y 4). Por su parte, las hembras presentaron un incremento sorprendente en el número de CL MHC clase II* entre el día 21 y el 35, pasando de 38 a 338 células/mm² (fig. 4). Morfológicamente, las CL MHC clase II* en ambos sexos exhibieron unas formas más dendríticas; en las hembras, desde el día 28 posteclosión, parecen ser de mayor tamaño que las de los machos (fig. 3).

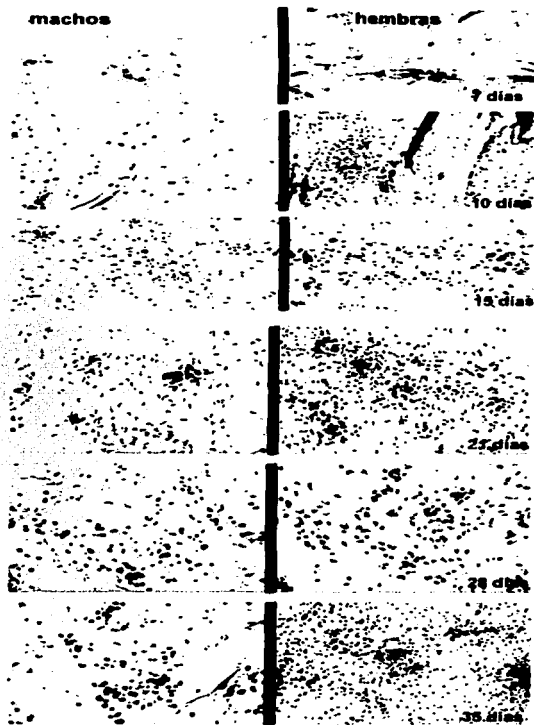


Figura 1. Células de Langerhans ATPasa positivas en láminas epidérmicas de pollos machos y hembras de diferentes edades posteclosión. Nótese la escasez de células a los 7 días posteclosión en ambos sexos y el aumento significativo y la formación de cúmulo en las hembras, sobre todo a los 35 días de edad. 90X.

Discusión

El presente estudio demuestra que en el pollo doméstico (*Gallus gallus*) existe una depleción casi absoluta de CL ATPasa⁺ y MHC clase II⁺ durante

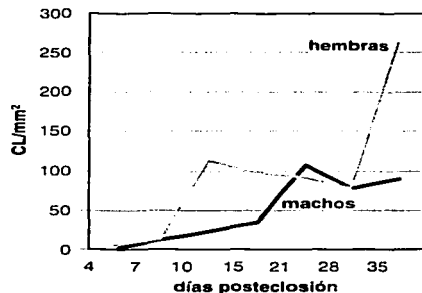


Figura 2. Cuantificación de células de Langerhans ATPasa positivas en la epidermis de pollos de ambos sexos. Se demuestra claramente que los machos poseen menor número de estas células que las hembras, estableciéndose una diferencia sexual significativa, particularmente después de los 28 días posteclosión.

los primeros 7 días posteclosión. En las hembras, el número de estas células alcanza el 50%, aproximadamente, del de los pollos adultos ($688 \pm 265/\text{mm}^2$)⁽¹⁴⁾ a los 35 días de edad. En los machos, el número máximo de CL es de alrededor de 100 CL/mm² al día 21 y no hay incrementos posteriores en el periodo estudiado. Lo anterior sugiere que existen claras diferencias sexuales en la densidad de CL durante el primer mes posteclosión en los pollos, sobre todo entre los 21 a 35 días de edad, independientemente del marcado utilizado para la identificación de estas células. Estos resultados son similares a los informados para ratones de la cepa C57BL/6 de 8 semanas de edad, en los que las hembras muestran un número significativamente mayor de CL ATPasa⁺/Ia⁺ que los machos y esta diferencia se pierde después de realizar orquiectomía pero no se modifica después de la ooforectomía.⁽²⁰⁾ Esto sugiere que las diferencias sexuales en la densidad de CL estarían relacionadas con las concentraciones mayores de testosterona o sus metabolitos en los ratones machos. En este sentido, se ha demostrado que los niveles preeclosión de testosterona en pollos no son diferentes entre ambos sexos; sin embargo, la concentración de la esta hormona es significativamente mayor en los machos en edades

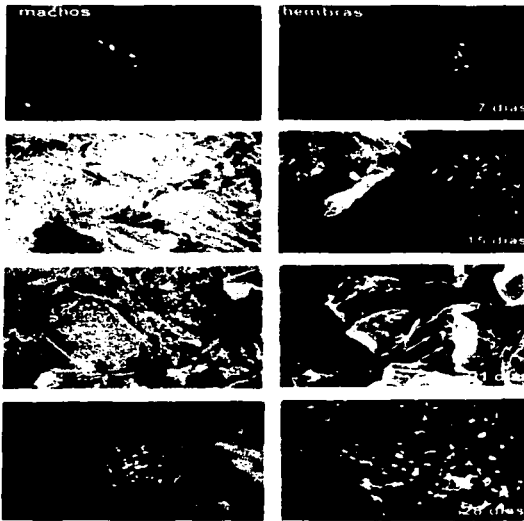


Figura 3. Inmunofluorescencia de células de Langerhans MHC clase II positivas en la epidermis de pollos de ambos sexos, en diferentes días posteclosión. Las células están prácticamente ausentes en la primera semana de edad y su incremento es muy lento entre los 15 y 21 días posteclosión en ambos sexos. Nótese que en los machos la distribución de las células de Langerhans es homogénea (cabezas de flecha) mientras que en las hembras se forman cúmulos (flechas). A partir del día 28 posteclosión las hembras poseen más células MHC clase II positivas que los machos y de morfología dendrítica. 7 y 28 días: 100X; 15 y 21 días: 40X.

posteclosión.⁽²¹⁾ Además de la posible acción de la testosterona sistémica en determinar las diferencias sexuales en el número de CL, es interesante que haya diferencias regionales y sexuales, en ratas y humanos, en la actividad de la enzima 5 α -reductasa,^(22,23) la enzima que convierte a la testosterona en 5 α -dihidrotestosterona, un potente andrógeno. En las ratas macho, la actividad de esta enzima es mayor en la piel de la cola, menor en la

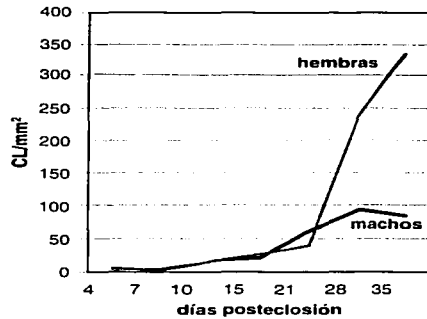


Figura 4. Cuantificación de células de Langerhans MHC clase II positivas en la epidermis de pollos de ambos sexos. El dato más importante es el mayor número de células de Langerhans en las hembras, después de los 21 a 28 días posteclosión. Nótese como los machos nunca rebasan las 100 células/mm² como ocurrió con las células de Langerhans ATPasa positivas.

de lo oreja y más baja aún en la piel del cojete plantar,⁽²²⁾ lo que guarda una relación inversa con el número de CL de esas regiones en el ratón.⁽²⁴⁾ Hasta donde sabemos, no existen estudios similares en la piel de pollos que nos permitan hacer una correlación con los resultados del presente trabajo.

Por otro lado, la administración tópica y sistémica de glucocorticoides disminuye el número y el aspecto dendrítico de las CL⁽²⁵⁻²⁶⁾ y la adrenalectomía en ratones machos y hembras incrementan significativamente la densidad de CL,⁽²⁰⁾ por lo que debe considerarse la posibilidad de que estas hormonas también pudieran influir en las diferencias sexuales de CL en los pollos estudiados.

Hasta ahora no se conocen los mecanismos íntimos que determinan las diferencias sexuales en la densidad de CL y que también pudieran estar operando en los animales estudiados en el presente trabajo. Sin embargo, podría especularse que las hormonas esteroides, en particular la testosterona, ejercerían alguno o varios de los siguientes efectos: disminución de los precursores

medulares o circulantes de las CL, modificación de los mecanismos de migración de las CL hacia o desde la epidermis y disminución de la actividad mitótica intraepidérmica de las CL. Otra posibilidad es que las CL estén presentes pero no son observadas porque la actividad de ATPasa y la expresión de moléculas clase II del MHC estarían alteradas selectivamente por el ambiente hormonal dominado por la testosterona y/o los glucocorticoides.⁽²⁵⁻²⁷⁾ Esto podría explicar, en parte, por qué los machos del presente trabajo tuvieron globalmente menos CL ATPasa* que las hembras y también menos CL MHC clase II* en las últimas dos semanas del estudio. En el caso de las hembras, podría interpretarse que las CL inicialmente son ATPasa*, luego expresan moléculas clase II del MHC y al final del estudio son positivas para los dos marcadores. En muridos se ha identificado una cinética similar de diferenciación de las CL. En el día 18 de la gestación hay 280 CL ATPasa*/mm² por 1 CL Ia*/mm².⁽²⁸⁾

En conclusión, el presente trabajo demuestra que en los pollos menores a 35 días de edad existe dimorfismo sexual en el número y expresión de marcadores de CL y que, en comparación al número de CL de los animales adultos, estos animales presentan una depleción natural de CL. Esto podría ser útil en la evaluación de los fenómenos de hipersensibilidad y tolerancia, los que han sido estudiados con depleción experimental de CL. Por otro lado, pollos de las edades estudiadas podrían constituir un modelo interesante en el estudio del dimorfismo sexual de las respuestas inmunológicas.

Referencias bibliográficas

1. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenetics. Annual Review of Immunology 1991; 9:271-96.
2. Wolff K, Winkelmann RK. Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. J Invest Dermatol 1967; 48:50-4.
3. Rowden G, Lewis AG, Sullivan AL. Ia antigens on human epidermal Langerhans cells. Nature 1977; 268:247-8.
4. Klarekog L, Malmnas-Tjrlund U, Forsum U, Peterson PA. Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. Nature 1977; 268:248-50.
5. Pithian E, Kung P, Goldstein G, Rubinfeld M, Fenoglio C, Edelson R. Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:2541-4.
6. Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Cschnait F, Knapp W, Wolff W. Nature 1977; 268:245-6.
7. 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; 37:51-64.

8. McDermott R, Ziyani U, Spelner D, Bausinger II, Lipsker D, Mommaas, Cazenave JP, Raposo G, Goud B, de la Salle H, Salamero J, Hanau D. Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates. Mol Biol Cell 2002; 317-35.
9. Katz SI, Imaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. Nature 1979; 282:324-6.
10. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. Nature 1992; 360:258-61.
11. Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Krömer E, Elbe A, Maurer D, Stingl G. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood 1996; 87:1292-302.
12. Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G. A skin homing molecule defines the Langerhans cell progenitor in human peripheral blood. J Exp Med 1997; 185:131-6.
13. Cooper EL. Comparative immunology of the integument. En: Skin Immune System, segunda edición. Ios JD, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida USA, 1997, pp 17-39.
14. Carrillo-Farga I, Pérez-Torres A, Castell RA, Antuna BS. Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). J Anat 1991; 176:1-8.
15. Pérez-Torres A, Millán D. Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis. J Anat 1994; 184: 591-6.
16. Pérez-Torres A, Ustarroz-Cano M. Demonstration of Birbeck (Langerhans cells) granules in the normal chicken epidermis. J Anat 2001; 199:493-7.
17. Riley PA. Esterase in epidermal dendritic cells of the mouse. Br J Dermatol 1966; 78:388-97.
18. Robins PG, Brandon DR. A modification of the adenosine triphosphatase method to demonstrate epidermal Langerhans cells Stain Tech 1981; 56:87-9.
19. Guillemot P, Oliver PD, Peault BM, LeDouarin NM. Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. J Exp Med 1984; 160:1803-9.
20. Koyama Y, Nagao S, Ohashi K, Takahashi H, Marunouchi T. Effect of systemic and topical application of testosterone propionate on the density of epidermal Langerhans cells in the mouse. J Invest Dermatol 1989; 92:86-90.
21. Corvier P, Dehennin L, Auchere D, Roffi J. Changes in plasma testosterone levels during the peri-hatching period in the chicken. J Steroid Biochem Mol Biol 1992; 42:773-6.
22. Dube JY, Ngo-Thi N, Tremblay RR. Testosterone 5 α -reductase in rat skin homogenates: Measurement in the skin at various anatomical sites in males and females. Endocrinology 1975; 96:235-7.
23. Wilson JD, Walker JD. The conversion of testosterone to 5 α -androstane-17 β -ol-3-one (dihydrotestosterone) by skin slices of man. J Clin Invest 1969; 48:371-9.
24. Bergstresser PR, Fletcher CR, Streilein JW. Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunologic properties. J Invest Dermatol 1980; 74:77-80.
25. Belzito DV, Flotte TJ, Lim HW, Baer RL, Thorbecke J, Gigli J. Effect of glucocorticosteroids on epidermal Langerhans cells. J Exp Med 1982; 155:291-302.
26. Berman B, France DS, Martinelli GP, Hass A. Modulation of expression of epidermal Langerhans cells properties following in situ exposure to glucocorticosteroids. J Invest Dermatol 1983; 80:168-71.
27. Pérez-Torres A, Millán Aldaco D, Rondán Zárate A. Epidermal Langerhans in the terrestrial turtle, *Kinosternum integrum*. Dev Comp Immunol 1995; 19:225-36.
28. Romani N, Schuler G, Fritsch P. Ontogeny of Ia-positive and Thy-1-positive leukocytes of murine epidermis. J Invest Dermatol 1986; 86:129-33.

61
 TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

HIPERSENSIBILIDAD POR CONTACTO AL DINITROFLUOROBENCENO Y CAMBIOS EN LAS CÉLULAS DE LANGERHANS DEL POLLO DURANTE LA FASE DE SENSIBILIZACIÓN A ESTE HAPTENO.

Introducción

La HC (revisado en Bour *et al.*, 1997) es una reacción inflamatoria mediada por células T que ocurre en los sitios de desafío con alérgenos de contacto en individuos sensibilizados. La expresión clínica en humanos, cuando los alérgenos entran por la piel, es la dermatitis de contacto alérgica, caracterizada por hiperemia, edema, vesículas cutáneas, exudación y descamación.

La HC involucra tres elementos: CL, linfocitos T hapteno-específicos y el hapteno.

El origen y la naturaleza de los haptenos es muy variada. Estos químicos son de bajo peso molecular y no son inmunogénicos por sí mismos. Para actuar como tales se unen a proteínas acarreadoras cutáneas a través de residuos lipofílicos y electrofílicos. Muchos haptenos derivan de prohaptenos que requieren de una metabolización *in vivo* dentro de la epidermis para poder hacer uniones covalentes con las proteínas cutáneas. Algunos haptenos metálicos no hacen tales uniones, sino interacciones débiles con las proteínas acarreadoras. Otros, se unen directamente y con gran afinidad a las moléculas clase II de las CPAg (Clement *et al.*, 1979, Sinigaglia 1994). Así, lo que activa a los linfocitos T activados es un péptido "haptenido", expresado en el contexto de moléculas clase I y II del CPH. Lo anterior implica que el estado metabólico del hospedero podría ser clave en determinar la susceptibilidad individual en el desarrollo de la dermatitis de contacto alérgica.

La HC consiste de dos fases (Bour *et al.*, 1997): la fase de sensibilización, también llamada aferente o de inducción, ocurre por el primer contacto del hapteno con la piel. Las CL captan el hapteno y migran a la región paracortical de los ganglios linfáticos regionales, donde lo presentan y provocan una generación de linfocitos T hapteno-específicos, que después migran a la piel. En los humanos, esta fase tarda de 10 a 15 días; en ratones de 5 a 7 días y no tiene manifestaciones clínicas. La segunda fase o fase eferente o de reto, ocurre por la activación de linfocitos hapteno-específicos dérmicos, lo que desencadena el proceso inflamatorio. Esto se observa pocas horas después del segundo contacto o desafío con el hapteno; en el humano se da a las 72 h y en el ratón a las 24 a 48 h. La reacción inflamatoria persiste unos días y luego disminuye rápidamente. Durante ese lapso, la piel manifiesta los signos clínicos referidos anteriormente.

Existen numerosos informes de la participación de las CL en la HC. La observación de linfocitos epidérmicos en aposición a CL en la piel de pacientes sensibilizados activamente y en cobayos sensibilizados pasiva y activamente es la primera evidencia de la vinculación de CL a HC; adicionalmente, se observó que las CL se incrementan dentro de los vasos linfáticos dérmicos y en los ganglios linfáticos que drenan la linfa de los sitios cutáneos con HC (Silberberg 1971, 1973, Silberberg *et al.*, 1974, 1975). Esto sugirió que las CL captarían Ag en la piel y los llevarían a los ganglios linfáticos donde los presentarían a "células inmunológicamente relevantes" (Silberberg *et al.*, 1976, 1978). La demostración de la afinidad especial de las CL por un amplio rango de haptenos de contacto (aldehídos, metales y aminas) reforzó esta hipótesis (Shelley & Juhlin 1976, 1977).

Otras evidencias menos circunstanciales se aportaron posteriormente. Los animales tratados epicutáneamente con un hapteno en un sitio de piel con depleción natural o experimental de CL, son incapaces de desarrollar una respuesta de HC; por el contrario, se induce un estado de tolerancia inmunológica específica a dicho hapteno (Toews *et al.*, 1981, Lynch *et al.*, 1981, Halliday & Muller 1986). Por otro lado, la sensibilización de ratones puede inducirse con la inyección de una suspensión de células epidérmicas, de CL o de la línea celular de CD FSCD, cuando son haptenizadas *in vitro* (Ptak *et al.*, 1980, Tamaki *et al.*, 1981, Sullivan *et al.*, 1984, Girolomoni *et al.*, 1995). Por el contrario, el empleo de suspensiones de células epidérmicas depletadas de CL antes de la haptenización, es ineficiente en la inducción de la sensibilización y también induce tolerancia al hapteno.

El empleo de FITC como hapteno ha permitido observar más directamente la participación de las CL en la captación de un hapteno, la migración a través de los vasos linfáticos y la presentación de aquel a los linfocitos T de las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos (Macatonia *et al.*, 1986, 1987). Otra evidencia aún más convincente del papel básico de las CL en el desarrollo de HC se obtuvo poco después en ratones desnudos sensibilizados con FITC a través de un injerto de piel alogénica. Las CD "cargadas" con el hapteno y obtenidas de los ganglios linfáticos del ratón desnudo, fueron capaces de inducir una sensibilización a FITC después de la inyección a ratones vírgenes del mismo haplotipo del donador del injerto cutáneo, lo que significaba que dichas células eran CL (además de poseer GCL) presentes en el injerto y que dentro de éste se habían "cargado" del hapteno (Kripke *et al.*, 1990).

Los efectos de los hapténeos por contacto sobre las CL son dependientes de la dosis y del tiempo. A las 24 h de aplicado un hapteno ocurre una disminución de hasta un 40% en el número de CL (Weinlich *et al.*, 1989) o aún puede ser más pronunciada a las 12 h, cambiando de $770 \pm 190/\text{mm}^2$ a $20 \pm 20/\text{mm}^2$, cuando se aplica una dosis de sensibilización en la piel abdominal de ratón (Bergstresser *et al.*, 1980).

Otras modificaciones observadas en las CL inducidas por una dosis de un hapteno son la pérdida de las prolongaciones dendríticas (Bergstresser *et al.*, 1980), el incremento en el RER y de la expresión de CPH clase II (Picus *et al.*, 1987), disminución o pérdida de la actividad de ATPasa (Hanau *et al.*, 1989) e incremento en organelos involucrados en la endocitosis mediada por receptor, incluido el GCL (Kolde *et al.*, 1987, Hanau *et al.*, 1989).

En los pollos se ha logrado inducir HC a oxazolona, a ácido pícrico y a DNFB (Maguirre *et al.*, 1976), siguiendo una metodología similar a las utilizadas en los modelos de HC en mamíferos. Más aún, los cambios en la piel de las barbas retadas de los pollos Lerghorn y el comportamiento de la respuesta inflamatoria en el tiempo, son muy similares a lo observado en mamíferos.

El objetivo de esta parte del presente trabajo de tesis, es reproducir el experimento de inducción de HC al hapteno DNFB en pollos (Maguirre *et al.*, 1976), con algunas adaptaciones tomadas del modelo de mamíferos (Bergstresser *et al.*, 1980, Toews *et al.* 1981) para analizar la posible participación de las CL, a diferentes tiempos, durante la fase de sensibilización de HC al DNFB.

Materiales y Métodos

Animales. Utilizamos pollos machos adultos Leghorn, de plumaje blanco, con barbas mayores de 1 cm de diámetro, proporcionados por el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los animales fueron mantenidos en condiciones habituales de bioterio, 2 por jaula, y con acceso libre a alimento comercial para aves y a agua corriente.

Sensibilización y reto con DNFB. La sensibilización al DNFB se produjo con la aplicación de 50 μL de DNFB al 0.5% diluido en acetona/aceite de oliva (4:1), en una superficie de 1.5 cm^2 de la apteria pectoral derecha ($n= 8$). Siete días después, los animales fueron retados con 50 μL de DNFB al 0.25%, diluido en el mismo vehículo, aplicado en la cara lateral de la barba derecha. La barba izquierda de cada animal se utilizó como testigo y sólo se aplicó el vehículo.

Los animales controles ($n= 2$) fueron "sensibilizados" con el vehículo en la apteria pectoral derecha y retados siete después con 50 μL de DNFB al 0.25 % en la cara externa de la barba derecha. A barba izquierda de cada animal se le aplicó sólo el vehículo para comparar la respuesta con la barba derecha.

Cuantificación de la respuesta de la HC. El grosor de las barbas de cada animal se realizó antes del reto y a las 24, 48, 72 y 96 h, después de aplicada la dosis de reto o del vehículo, según el caso. Dos personas efectuaron 5 mediciones de las barbas con un calibrador micrométrico (Mitutoya[®]) y se obtuvo un promedio de grosor para cada tiempo y en cada uno de los animales.

Clínicamente, la HC fue identificada entre las 24 a 96 h después de la aplicación del hapteno, por la presencia una lesión eritematosa y edematizada, de bordes irregulares, seguido de la aparición de pápulas, de pequeñas vesículas, de exudado y de descamación.

Sensibilización al DNFB y cambios en las CL. La sensibilización al DNFB se realizó en 3 animales como se mencionó arriba. A los 30 y 60 min y a las 4 h, se obtuvieron biopsias de piel de 4 mm de diámetro de la hapteria pectoral derecha tratada. Algunas muestras fueron fijadas durante 24 h en formaldehído al 10 % amortiguado y procesadas para realizar cortes en parafina y tinción con H-E. Otras biopsias fueron incubadas en CaCl_2 2M para separar láminas epidérmicas. Las dermis correspondientes fueron incluidas en OCT y congeladas inmediatamente en REVCO a -70 °C, hasta la realización de cortes por congelación de 60 a 100 μm grosor, tangenciales a la superficie de la unión dermoepidérmica; ambas preparaciones, láminas y cortes por congelación, fueron procesadas para la demostración de células CPH clase II positivas por inmunofluorescencia indirecta, siguiendo la técnica descrita previamente (Pérez-Torres & Millán 1994).

Para el estudio ultraestructural de las CL y de la piel tratada con DNFB en los diferentes tiempos, procesamos algunos fragmento de 1 mm^3 de piel de la misma manera como se describió con anterioridad (Pérez-Torres & Ustarroz-Cano, 2001).

Decidimos utilizar animales diferentes como controles (sólo recibieron el vehículo) debido a que los animales frecuentemente exploran con el pico, la parte interna de las alas y ambas hapterias pectorales, de modo que aún la hapteria no tratada con DNFB o con el vehículo, recibe algo de la dosis aplicada por nosotros. Las biopsias de piel de

los animales controles fueron procesados de la misma manera que los tratados con DNFB.

Cuantificación de las CL epidérmicas CPH clase II positivas en láminas epidérmicas. Las CL epidérmicas CPH clase II positivas fueron cuantificadas en fotomicrografías obtenidas con el objetivo de 40X, cuyo campo fotográfico calibrado es de $96\ 500\ \mu\text{m}^2$. Los campos cuantificados (45 por cada animal) representan el número de CL en las áreas intercúmulos y se expresa como el número de células $\pm\ \text{DS}/\text{mm}^2$.

Resultados

Hipersensibilidad por contacto al DNFB en pollos adultos Leghorn. Clínicamente, todos los animales sensibilizados y retados con DNFB presentaron hiperemia, edema, vesículas, exudación y descamación. En el primer grupo de animales (gráfica 1), el grosor pre-reto fue un poco menor a 2 mm, notándose un incremento a las 24 h en todos los animales, siendo muy importante en dos de ellos. El grosor se mantuvo por arriba del valor pre-reto hasta las 48 a 72 h. Tres de los 4 animales mostraron una disminución en el grosor de la barba a las 96 h, siendo este valor parecido al grosor pre-reto. Uno de los animales (línea amarilla, gráfica 1) mostró numerosas vesículas, exudado abundante, descamación gruesa y ulceración, lo cual podría explicar la disminución del grosor de la barba, incluso menor al grosor pre-reto, observada desde las 48 h y hasta las 96 h, luego de un discreto aumento a las 24 h.

En el segundo grupo (gráfica 2), en grosor pre-reto de las barbas fue de 1 a 2 mm, aproximadamente. Tres de 4 animales incrementaron el grosor a las 24 h y otro lo hizo hasta las 48 h. Dos animales mantuvieron el incremento del grosor de la barba aún a las 96 h; los otros dos lo disminuyeron después de las 24 h hasta alcanzar valores del grosor pre-reto a las 96 h.

Las barbas izquierdas, que recibieron una dosis de "reto" con el vehículo no mostraron cambios macroscópicos ni de grosor (datos no mostrados).

Los animales controles (gráficas 1 y 2, flechas) prácticamente no mostraron cambios en todos los tiempos evaluados. Sin embargo, se puede observar un ligero incremento del grosor de la barba derecha a las 24 h, mismo que disminuye después, hasta regresar a los valores pre-reto a las 96 h. La barba izquierda (que recibió sólo el vehículo) presentó cambios similares a la barba derecha. Clínicamente, estos animales sólo mostraron una discreta coloración amarillenta de la zona retada con DNFB.

Sensibilización al DNFB. Estudio histopatológico. Los cortes de piel (figura 1) demostraron un incremento en la celularidad en la dermis reticular, en forma dispersa y en cúmulos, a los 30 min después de la aplicación de la dosis de sensibilización al DNFB. A los 60 min esto fue observado más ampliamente en toda la dermis, incluyendo a la dermis papilar. A las 4 h, el infiltrado celular es más notable, sobre todo por la presencia de cúmulos celulares subepidérmicos, cercanos a la lámina basal. Un hallazgo destacable fue la presencia de cúmulos longitudinales de células, similares a "cordones", tanto en la dermis superficial como en la dermis profunda.

Los animales controles (sólo recibieron el vehiculo como dosis de sensibilización) no mostraron ninguno de los cambios descritos anteriormente y la piel presentó un aspecto más plgado que la tratada con DNFB (figura 2a).

Sensibilización al DNFB. Inmunofluorescencia para moléculas clase II del CPH en láminas epidérmicas y en cortes tangenciales de la dermis subyacente. En las láminas epidérmicas de los animales controles no se identificaron cambios en el número y distribución de las CL CPH clase II positivas (figura 3b), parámetros que fueron muy similares a los observados en las láminas epidérmicas procesadas para la demostración de ATPasa (figura 3a). Nótese el alto porcentaje de imbricación en la distribución y número de las CL ATPasa positivas ($830 \pm 134/\text{mm}^2$) y las CL CPH clase II positivas ($783 \pm 102/\text{mm}^2$) (figura 3a y b). De hecho, las imágenes observadas en los tres tiempos estudiados, son semejantes a las de láminas epidérmicas obtenidas de una piel normal y sin ningún tratamiento. Los cortes tangenciales de la dermis en los animales controles mostraron muy escasas CD CPH clase II positivas (figura 2b).

A los 30 min de aplicar el DNFB, se observan cambios notables en en número y morfología de las CL CPH clase II positivas (figura 4a-c). El número ha disminuido a $307 \pm 84 \text{ CL}/\text{mm}^2$, pero algunas células son de mayor tamaño y muestran una fluorescencia más intensa (figura 4a); la distribución en cúmulos y entre cúmulos parece normal en algunas zonas de piel aunque hay grandes áreas de depleción (figura 4b) y sólo se observan cúmulos con menor densidad celular y escasas células vecinas (figura 4c). La dermis subyacente a estas láminas epidérmicas también muestra cambios evidentes. La presencia de CD CPH clase II positivas se ha incrementado notablemente, formando cúmulos (figura 5a) o distribuyéndose más homogéneamente en el tejido conjuntivo (figura 5b). Sin embargo, el cambio más llamativo es la presencia de estructuras tubulares o "cordones", con numerosas células inmunofluorescentes asociadas a la pared (figuras 5 b-c). En algunos cortes fue posible identificar la presencia de una luz en estos "cordones" o vasos de la dermis (figura 5d).

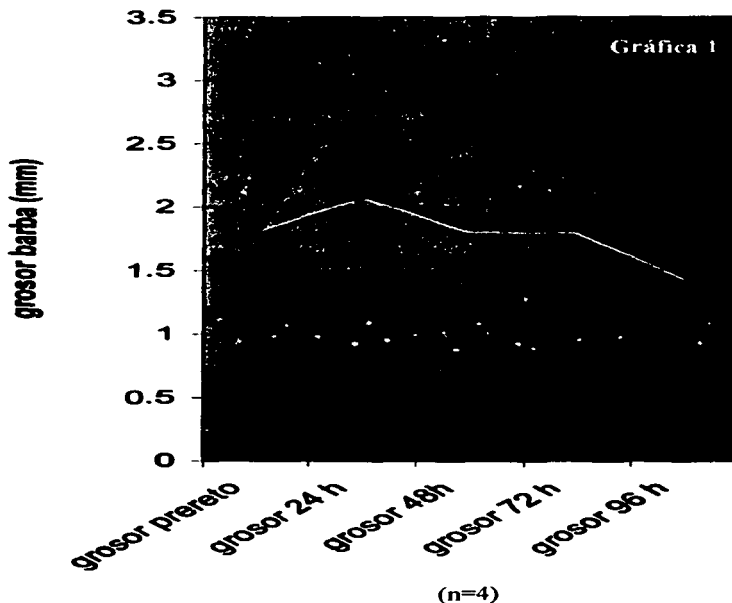
Una hora después de la aplicación del DNFB, las CL presentan una distribución similar a la normal pero con una evidente disminución en el número ($525 \pm 92/\text{mm}^2$). Los cúmulos presentan células más dendríticas y de mayor tamaño que a los 30 min y son más fluorescentes que las CL de las áreas intercúmulos (figuras 6a-b). En la dermis subyacente, los cordones o estructuras tubulares aparecen de mayor calibre, tal vez por el mayor número de células CPH clase II positivas, ahora de aspecto redondeado, asociadas a la pared (figuras 7a-c) y dentro de la luz (figuras 7b y c, flechas).

A las 4 h de aplicada la dosis de sensibilización con DNFB, el número ($316 \pm 76/\text{mm}^2$), morfología y distribución de las CL CPH clase II positivas es muy similar a lo observado a los 30 min. Existen áreas de depleción de CL (figura 8b); las CL de los cúmulos no muestran dendritas y los cuerpos celulares son muy fluorescentes (figuras 8a-c). Algunas imágenes de CL son sugestivas de actividad mitótica (figura 8b, flecha). En la dermis, los cordones de células fluorescentes son más largos (figura 9b) y algunos presentan un gran densidad celular (figura 9c). Las células CPH clase II positivas parecen más numerosas y con distribución más homogénea que a los 30 y 60 min, aunque la mayoría son redondas y casi no se observan CD (figura 9a).

Sensibilización al DNFB. Estudio ultraestructural. Prácticamente no se observaron cambios ultraestructurales en la piel y en las CL después de 30 min de aplicado el DNFB. A los 60 min, las CL basales y suprabasales mostraron un incremento de hoyos y vesículas cubiertas, de vesículas citoplásmicas lisas, de cuerpos multivesiculares y de estructuras tubulares similares al sistema endosomal (figura 10a-b). Las CL basales presentaron prolongaciones citoplásmicas dirigidas hacia la unión dermoepidérmica (figura 10c-e), con GCL atípicos (figura 10c-d, flechas). No se observó pérdida de continuidad de la lámina basal por el paso de células como las descritas anteriormente. En la dermis superficial no observamos células parecidas a CL. Identificamos algunas estructuras vasculares cuyas paredes están formadas por células endoteliales de grosor irregular, carentes de lámina basal, con algunas zonas muy delgadas y sin evidencia de la presencia de uniones ocluyentes. Nunca se observaron eritrocitos en el interior de estas estructuras vasculares (figura 10f). Los queratinocitos no mostraron cambios evidentes.

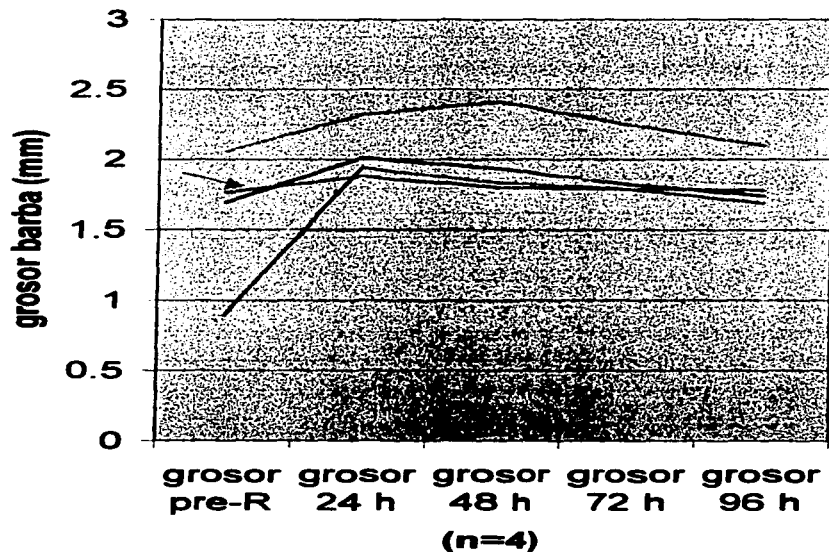
A las 4 h de tratamiento con DNFB, todas la células con características de CL se localizan en estrato basal de la epidermis, muy cercanas o en contacto con la lámina basal, y con numerosas vesículas claras (figura 11a-c, flechas). Frecuentemente contenían un citocentro bien organizado, con más mitocondrias y lisosomas (figura 11a). En la dermis superficial, se observó que células con prolongaciones largas (figura 12a-d, flechas) rodean a otras con características similares a las CL basales pero con un mayor contenido de organelos como mitocondrias, vesículas, endosomas, RER y estructuras parecidas a GCL (figura 12c, cabeza de flecha) y un notable citoesqueleto de filamentos delgados. Células como las descritas, con algunos velos citoplásmicos, también fueron observadas dentro de espacios limitados por delgadas prolongaciones citoplásmicas que dejaban entre sí grandes espacios o hendiduras, comunicadas directamente con el tejido conectivo vecino (figura 13 a-d, flechas). Muchos queratinocitos basales presentaron núcleos con abundante eucromatina y algunos con 1 ó 2 nucleolos prominentes.

Hipersensibilidad por contacto a DNFB en pollos adultos Leghorn



Cuantificación de la respuesta de hipersensibilidad por contacto en pollos al hapteno dinitrofluorobenceno (DNFB). La sensibilización de los animales se realizó con 50 μ L de DNFB al 0.5% en acetona:aceite de oliva aplicado epicutáneamente en la apteria pectoral (1.5 cm²) y la dosis de reto fue 50 μ L de DNFB al 0.25% aplicado en alguna de las barbas. Se empleó un calibrador micrométrico (Mitutoya[®]) para realizar las mediciones de grosor de la barba antes y después del reto, en los tiempos especificados. Los animales tratados mostraron un incremento en el grosor de la barba 24 h después del reto y hasta las 72 h. En dos animales (azul y negro) esto fue muy notable; uno de los animales presentó vesículas cutáneas y descamación gruesa después de 48 h de reto y por ello el grosor de la barba disminuyó (amarillo). Las mediciones del animal control (retado sólo con el vehículo) están señaladas con la flecha.

Hipersensibilidad por contacto a DNFB en pollos Leghorn adultos



Respuesta de hipersensibilidad por contacto al dinitrofluorobenceno (DNFB) en pollos. Los animales fueron sensibilizados con 50 μ L de DNFB al 0.5% en acetona:aceite de oliva aplicado en la piel de la apteria pectoral (1.5 cm²) y 7 días después fueron retados con 50 μ L de DNFB al 0.25% en alguna de las barbas. El grosor de éstas se midió antes y después de la dosis de reto con un calibrador micrométrico (Mitutoya®). Los animales control fueron retados sólo con el vehículo. El incremento de grosor de las barbas de los animales tratados alcanzó un máximo entre las 24h a 48h y dos de ellos (amarillo y azul) lo mantuvieron hasta las 96 h. El animal control (flecha) prácticamente no muestra cambios.

30 MIN

60 MIN

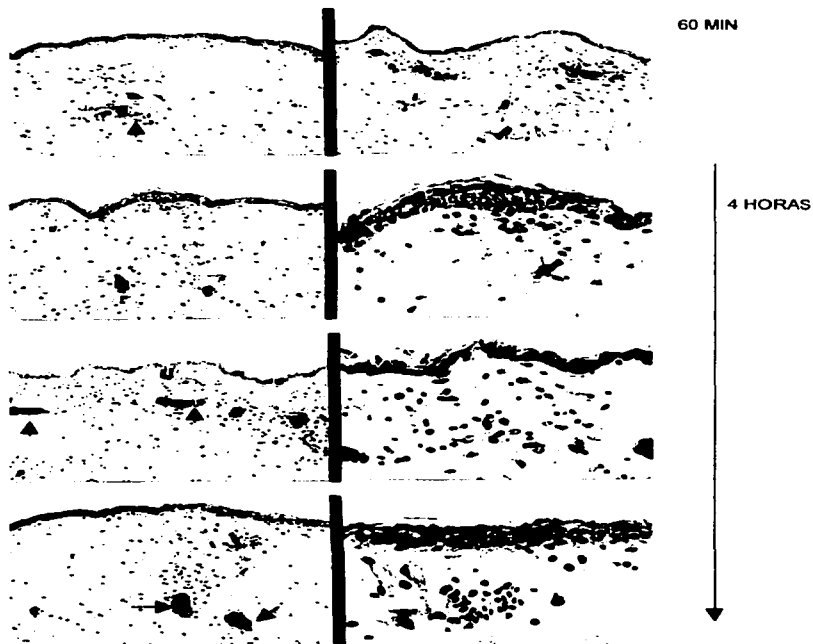


Figura 1. Fotomicrografías de piel de pollo adulto tratada con dinitrofluorobenceno al 0.5% como dosis de sensibilización al hapteno. A los 30 min se observa mayor celularidad en la dermis reticular (profunda) y a los 60 min hay un incremento de células en la dermis papilar (superficial). A las 4 h es más evidente la presencia de cúmulos celulares en la dermis, muy cerca de la membrana basal. Otra observación destacable es la formación de "cordones" celulares densos, probablemente asociados a estructuras vasculares sanguíneas o linfáticas (flechas). 30 min, 60 min y 4 h izquierda: 320X; 4 h derecha 800X. Hematoxilina-eosina.

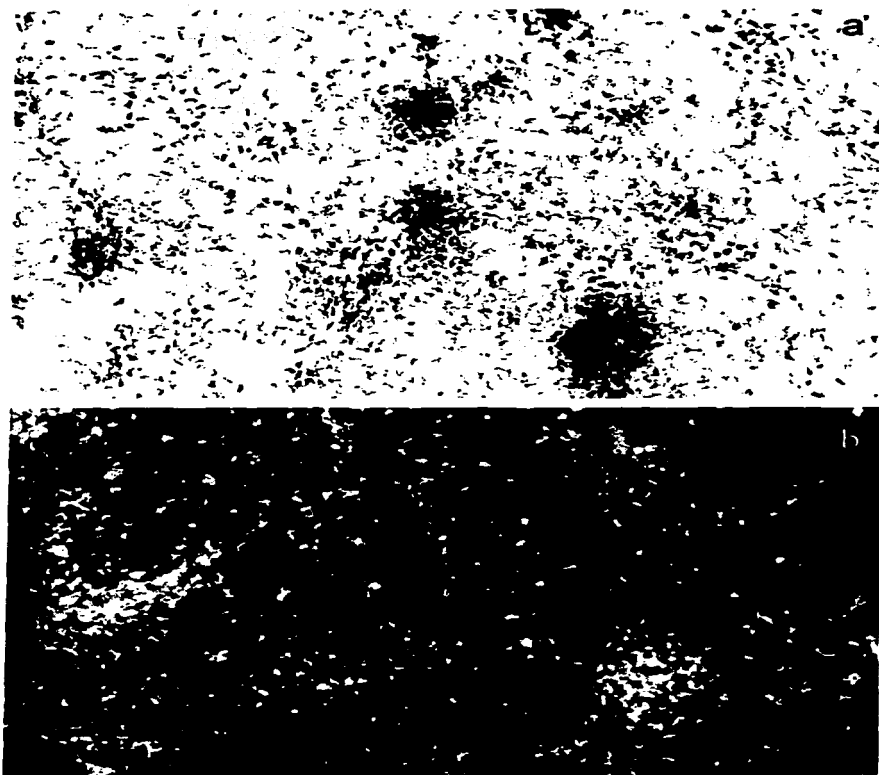


Figura 2. Células de Langerhans ATPasa positivas (a; $830\pm 134/\text{mm}^2$) y moléculas clase II positivas (b; $783\pm 102/\text{mm}^2$) de láminas epidérmicas de pollos, separadas de la dermis 1 h después de la aplicación del vehículo acetona/aceite de oliva (4:1), en la apteria pectoral. La distribución, morfología y número de las CL son similares a la de una epidermis normal o no tratada y a las de epidermis obtenida a los 30 min y a las 4 h de aplicado el vehículo. Son característicos los cúmulos densos y la distribución más homogénea intercúmulos de las CL. Ambas imágenes a 100X.

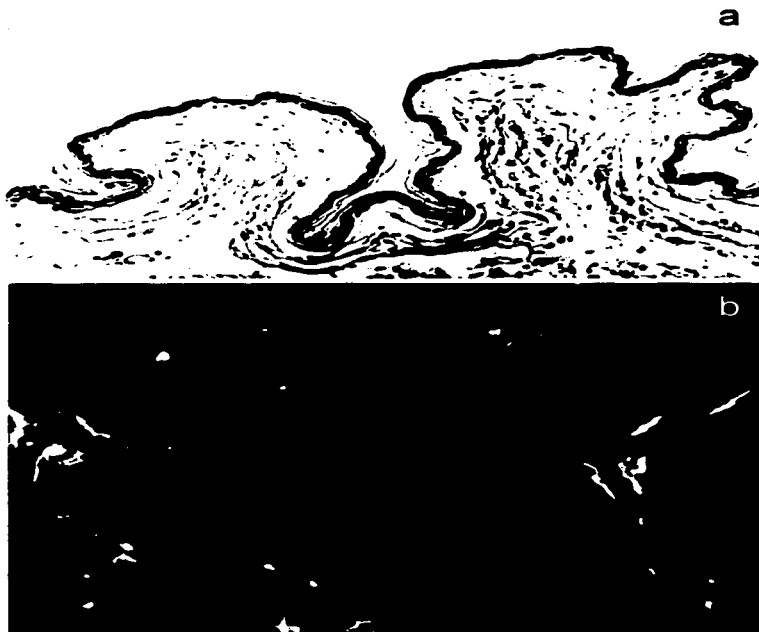


Figura 3. Imagen histológica de piel de pollo (a) tratada con el vehículo acetona:aceite de oliva (4:1). Se observan plegamientos de la piel que son similares a los de una piel normal y en la dermis no se aprecian los cúmulos de células como los observados después de aplicación de DNFB al 0.5% diluido en el mismo vehículo. En la inmunofluorescencia para moléculas clase II del CPH de los cortes tangenciales de la dermis, 1 h después de la aplicación del vehículo, se observan algunas células positivas asociadas a estructuras longitudinales y ramificadas, poco visibles. (b, flechas). A= 630X; b= 200X.

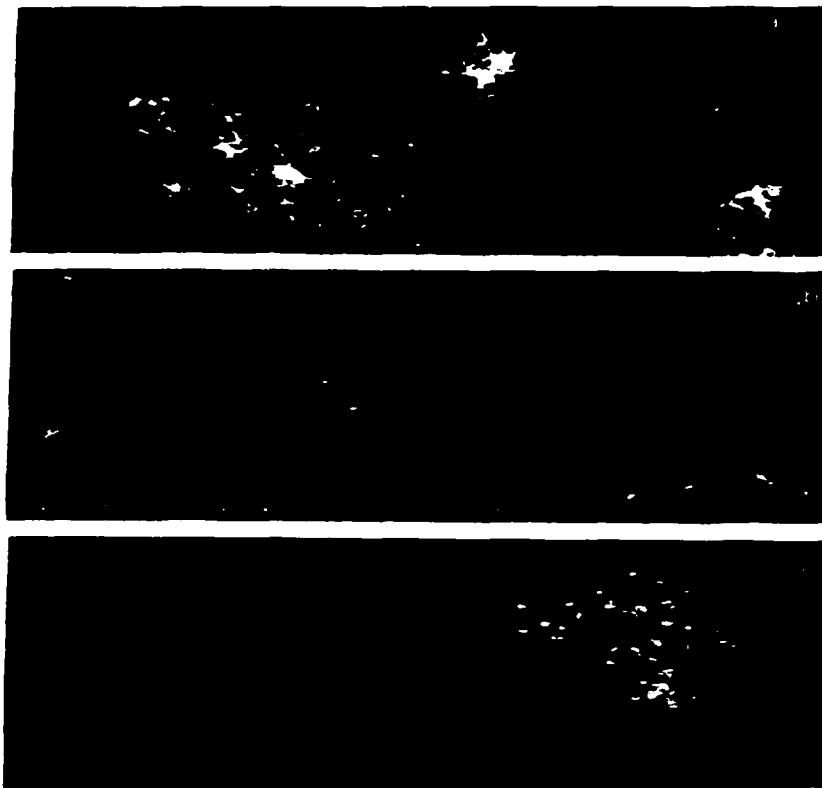


Figura 4. Células de Langerhans moléculas clase II positivas en láminas epidérmicas de pollos adultos separadas de la dermis 30 min después de la aplicación epicutánea de dinitrofluorobenceno al 0.5%. Algunas zonas muestran una distribución de CL normal aunque con menor número de células (a); sin embargo, es frecuente observar grandes zonas con depleción de CL (b) y en otras sólo se conservan en los cúmulos (c). El número de CL es de $307 \pm 84/\text{mm}^2$. a=200X; b y c=100X. Inmunofluorescencia indirecta.

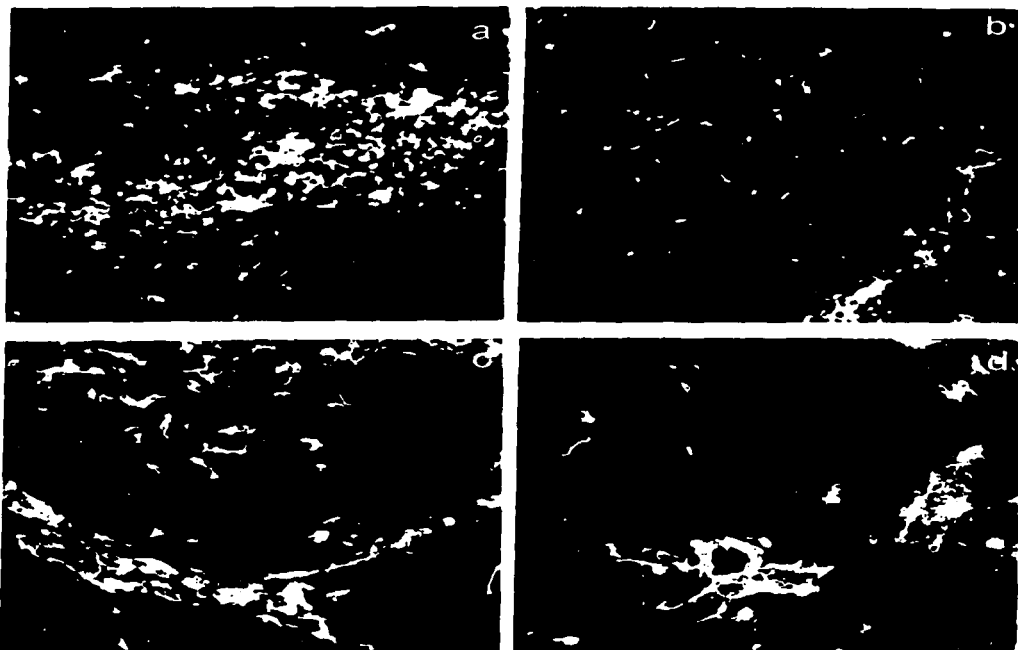


Figura 5. Inmunofluorescencia indirecta para moléculas clase II del CPH de pollos, en cortes gruesos (10 μ m) de la dermis subyacente a la epidermis tratada con DNFB al 0.5% de la figura 4 (30 min). Las células fluorescentes (redondas, alargadas y dendríticas) se encuentran en cúmulos (a) o dispersas en el tejido conjuntivo de la dermis (b). Es notable la formación de "cordones" de células CPH clase II positivas debido a su relación con estructuras probablemente vasculares (flechas). a y b= 100X; c y d=200X.

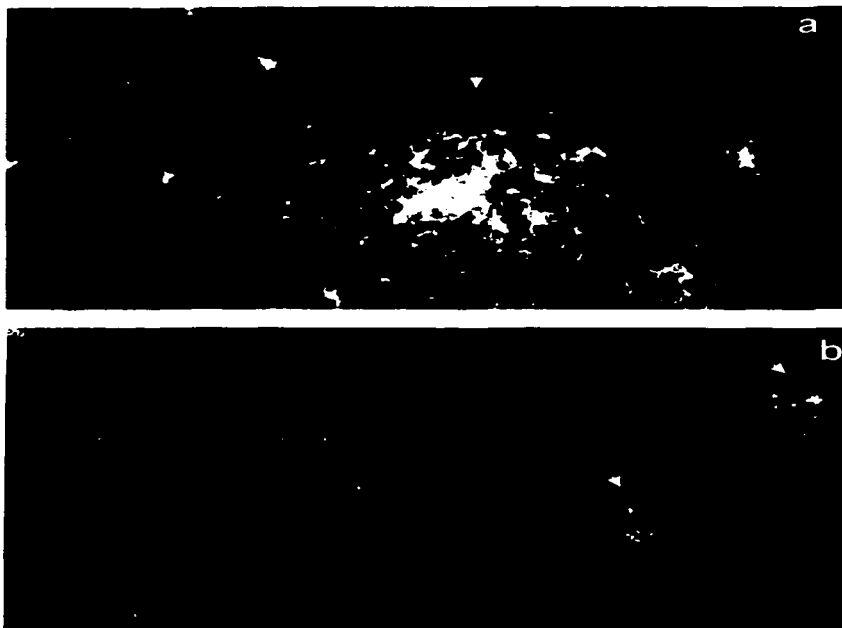


Figura 6. Inmunofluorescencia indirecta para demostrar células de Langerhans (CL) moléculas clase II positivas en láminas epidérmicas obtenidas del la apteria pectoral, 1 h después del tratamiento con dinitrofluorobenceno al 0.5%. Las CL asociadas a cúmulos (a y b, flechas) se observan más dendríticas que las células de la figura 4 y aparentemente son más fluorescentes. En las zonas epidérmicas entre los cúmulos, el número de CL es ligeramente menor al de una lámina control, pero es mayor ($525 \pm 92/\text{mm}^2$) que a los 30 min de la aplicación del hapteno. a=200X; b=100X.

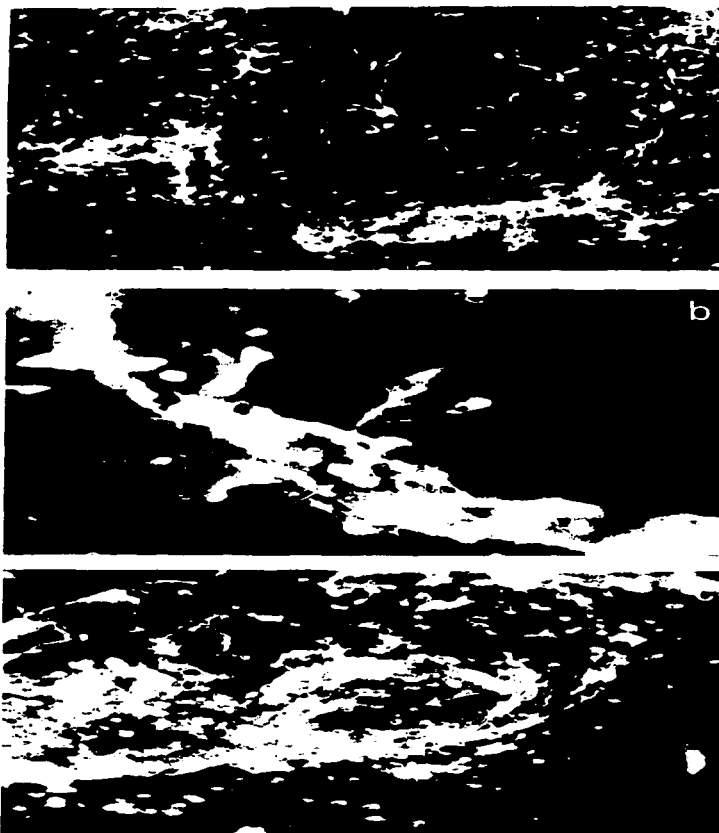


Figura 7. Células moléculas clase II positivas del pollo en la dermis de la apteria pectoral, después de 1 h de tratamiento con dinitrofluorobenceno al 0.5%. Las células fluorescentes están más relacionadas con las estructuras vasculares, haciendo que los "cordones" se observen más grueso y con una mayor densidad celular (a y c). Algunas células CPH clase II positivas se observan en la luz de estos vasos dérmicos (b y c, flechas). a y c= 200X; b= 400X.

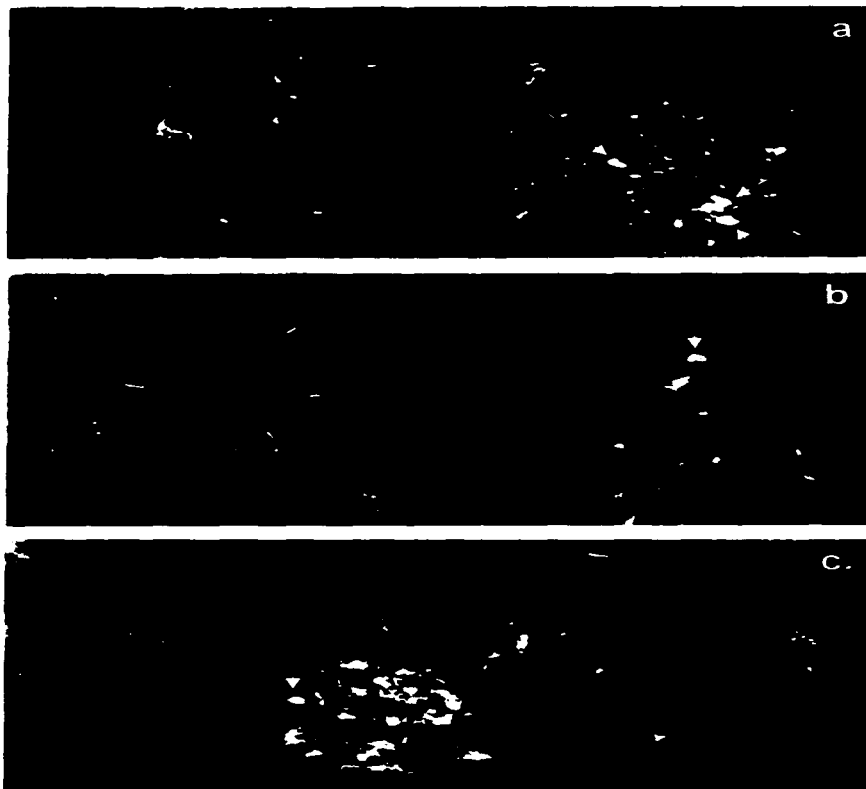


Figura 8. Láminas epidérmicas del pollo separadas de la dermis, luego de 4 h de la aplicación epicutánea del hapteno dinitrofluorobenceno al 0.5%. La distribución, morfología y número ($316 \pm 76/\text{mm}^2$) de las células de Langerhans (CL) es muy similar a lo observado a los 30 min (Figura 4). Casi no se observan las dendritas y los cuerpos de las CL de los cúmulos parecen ser más fluorescentes (a y c, flechas). Algunas imágenes como la señalada en la figura b (flecha) podrían interpretarse como mitosis intraepidérmica de las CL. a, b y c=200X. Inmunofluorescencia indirecta.

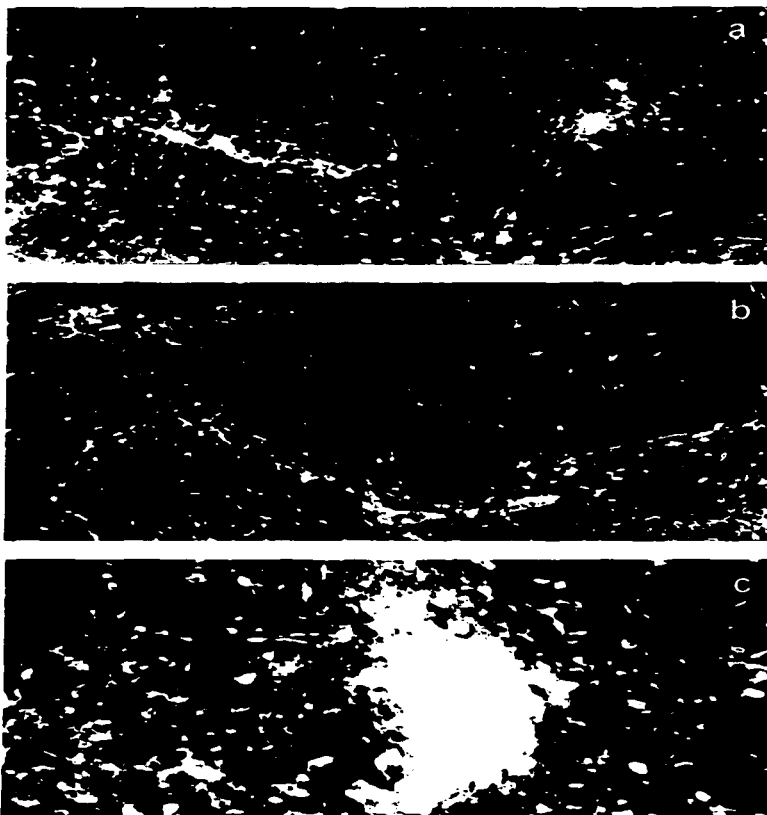


Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta para moléculas clase II del CPH en células de la dermis del pollo, después de 4 h de la aplicación del hapteno dinitrofluorobenceno al 0.5% en la piel de la hapteria pectoral. La distribución de las células fluorescentes es más homogénea que en los tiempos anteriores (30 y 60 min), la mayoría son redondas y sólo se observan algunas células dendríticas. El patrón de "cordones" se mantiene (a y b) y algunos muestran una fluorescencia intensa debido a la alta densidad de células clase II positivas asociadas a los mismos (c). a, b, c= 100X.

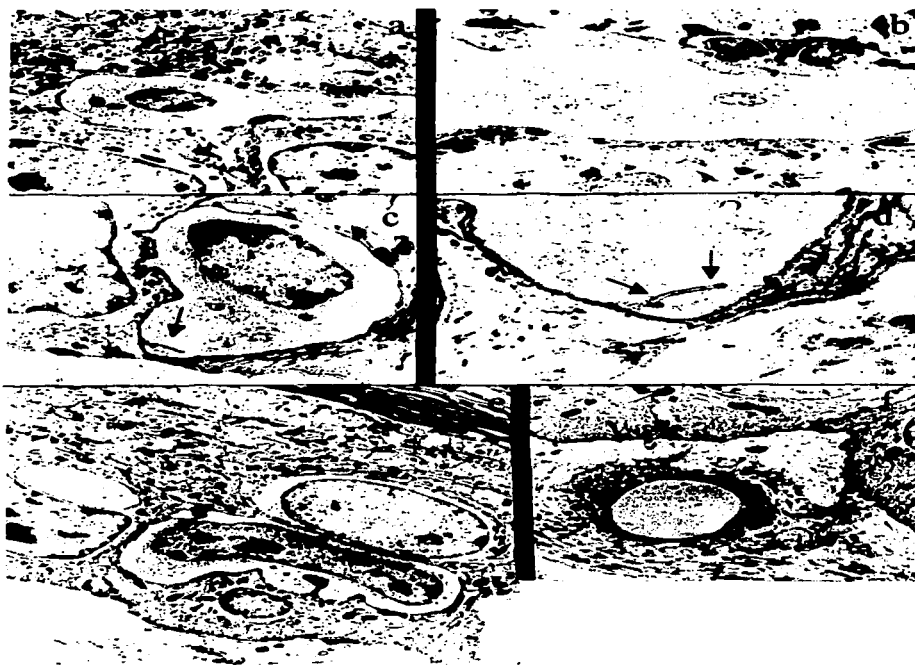


Figura 10. Micrografía electrónica de piel de pollo adulto una hora después de la aplicación epicutánea de dinitrofluorobenceno al 0.5%. Las células dendríticas de la epidermis (CL) del pollo muestran algunas vesículas, cuerpos multivesiculares y estructuras membranosas de apariencia tubular cercanas a la membrana plasmática que semejan algunos gránulos de Birbeck atípicos (flechas) observados en CL de mamífero que realizan endocitosis *in vitro*. La mayoría de las CL epidérmicas de la piel tratada presentan prolongaciones citoplásmicas dirigidas hacia la dermis y en ésta se observan elementos vasculares que podrían corresponder a capilares linfáticos. No se observaron CL a través de la unión dermoepidérmica ni células similares en la dermis superficial. Barra= 2µm.

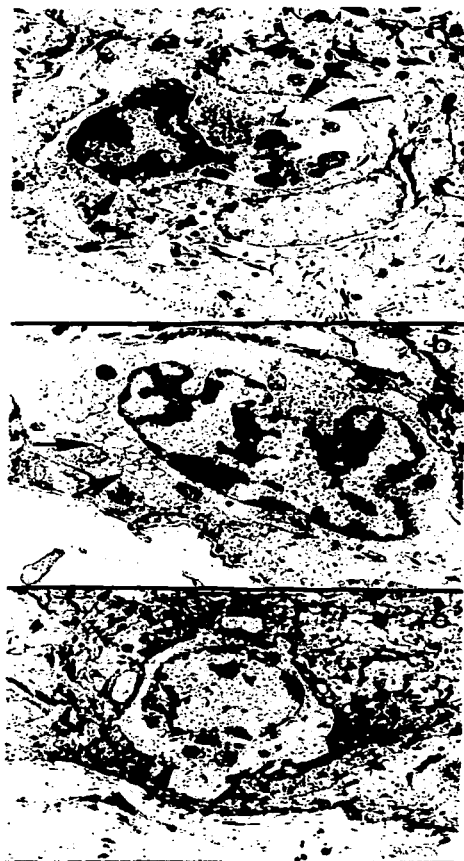


Figura 11. Micrografías electrónicas de piel de pollo adulto, 4 horas después de la aplicación epicutánea de dinitrofluorobenceno al 0.5%. Algunas células basales con características similares a las células de Langerhans presentan numerosas vesículas claras (a, b, c, flechas), probablemente endocíticas, y prolongaciones dirigidas hacia la dermis. Barras= 5 μ m

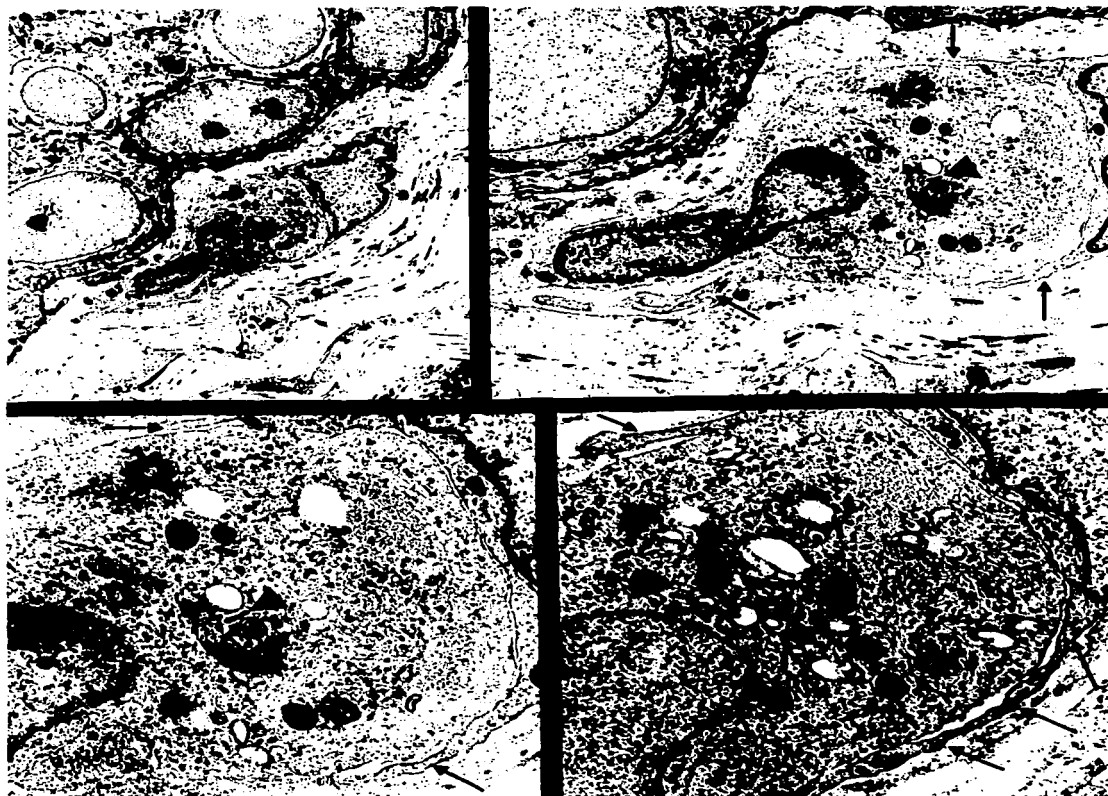


Figura 12. Micrografías electrónicas de la piel de pollo adulto 4 h después de la aplicación epicutánea de dinitrofluorobenceno al 0.5% (dosis de sensibilización). En la dermis papilar se observa una célula ultraestructuralmente similar a las descritas en la figura 11 rodeada por prolongaciones citoplásmicas largas de espesor variable (flechas) que pertenecen a otra célula que carece de lámina basal. Aparentemente, la primera, con un citoplasma rico en filamentos delgados, vesículas claras y organelos parecidos a GCL (cabeza de flecha), ocupa un espacio formado por la segunda. Barras= 2 μ m

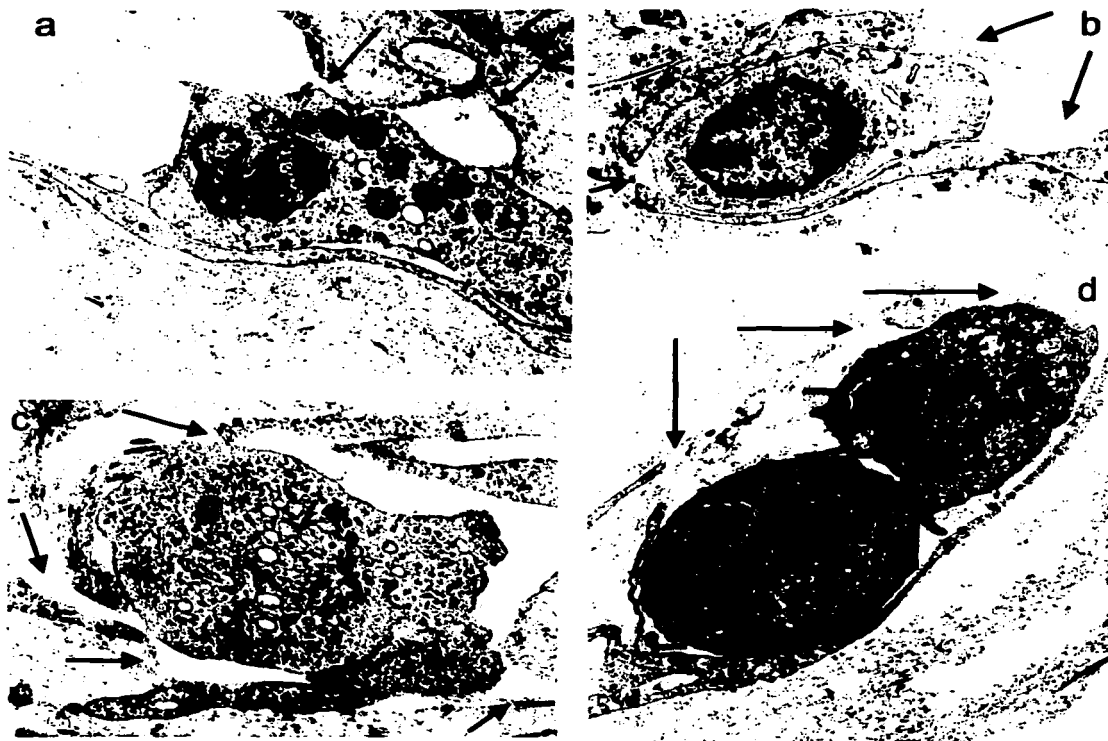


Figura 13. Micrografías electrónicas de la dermis del pollo 4 h después de la aplicación de dinitrofluorobenceno al 0.5% sobre la epidermis. En la dermis superficial (a y b) y en la dermis profunda (c y d) se observan células parecidas a CL (a y c) y de aspecto linfóide (b) dentro de espacios que probablemente corresponden a vasos linfáticos ya que presentan un contorno de grosor irregular de las células endoteliales, no existe una lámina basal y ni presentan pericitos. Es notable la presencia de grandes hendiduras o discontinuidades (flechas) en la pared de estos vasos, lo cual facilitaría el paso de células y de líquido tisular hacia la luz. La mayoría de las células "intravasculares" presentan numerosas vesículas claras, lisosomas y otras estructuras tubulares que pueden corresponder al sistema endosomal (a, c, d). En algunas es posible identificar algunos velos citoplásmicos (d). Barras= 2 μ m.

Discusión

En el presente trabajo se comprobó que los pollos responden a la sensibilización y al reto con el hapteno DNFB desarrollando un cuadro clínico compatible con una dermatitis por contacto. En la mayoría de los animales sensibilizados, los datos clínicos cutáneos correlacionaron con el aumento de grosor de la barba retada, mientras que la desaparición paulatina de la hiperemia, el edema y la exudación, acompañó a la restauración del grosor previo a la aplicación de la dosis de reto. Por el contrario, la ausencia de cambios macroscópicos en los animales controles y en las barbas contralaterales de los animales sensibilizados, estuvo asociada a un mínimo o casi nulo incremento en el grosor de las barbas. Estos resultados coinciden con los de un trabajo en el que utilizan oxazolona como hapteno (Maguire *et al.*, 1976).

De acuerdo al tiempo que requiere la fase de sensibilización y al tiempo en que los cambios clínicos y de grosor de la piel son máximos en la piel retada (Bour *et al.*, 1997), la HC en los pollos es similar a la de los ratones. En estos animales, la dosis de reto frecuentemente se aplica en el dorso de la oreja y la respuesta se evalúa de acuerdo al incremento del grosor a las 16, 24 y 48 h (Phanuphak *et al.*, 1974; Bergstresser *et al.*, 1980; Toews *et al.*, 1980; Knight *et al.*, 1985; Macatonia *et al.*, 1986; Sato *et al.*, 1998; Weinlich *et al.*, 1998; Antonopoulos *et al.*, 2001), independientemente del tipo de hapteno empleado, confirmando que la respuesta pico se da entre las 24 y 48 h. Por lo anterior, concluimos que la respuesta observada y medida en los pollos es reflejo de un régimen eficiente de inmunización con DNFB, lo cual nos permitiría analizar la respuesta de las CL a la dosis de sensibilización de este hapteno.

El aumento de la celularidad en la dérmis superficial y profunda, observada a los 30, 60, y sobre todo, a las 4 h de la aplicación epicutánea del DNFB permite especular que tal infiltrado podría estar formado por células que salen de la circulación sanguínea hacia la dermis y/o por CL que han captado el hapteno y han iniciado su emigración hacia vasos linfáticos, pasando por la lámina basal y la dermis. En estudios realizados en mamíferos, se sabe que después de la aplicación epicutánea de un hapteno por contacto, el número de CL epidérmicas disminuye entre un 40% a 72% (Bergstresser *et al.*, 1980; Bothan *et al.*, 1987; van Wilsem EJJ *et al.*, 1994; Weinlich *et al.*, 1998; Antonopoulos *et al.*, 2001; Stoitzner *et al.*, 2003). Concomitantemente, se observa un incremento de CL CD1a positiva en la dermis (Groves *et al.*, 1995) y de células veladas, como se llama a las CL dentro de los vasos linfáticos eferentes de la dermis, 2 h después de aplicado el hapteno (Silberberg-Sinakin *et al.*, 1976; Lenz *et al.*, 1993) y en los ganglios linfáticos regionales, entre las 4 h y 24 h del contacto con el hapteno (Silberberg-Sinakin *et al.*, 1976; Knight *et al.*, 1985; Macatonia *et al.*, 1986; 1987; Kinnaird *et al.*, 1989; Kimber *et al.*, 1990; Cumberbatch & Kimber 1990). Por lo anterior, es muy probable que las CL migratorias estimuladas por el DNFB sean las responsables de la celularidad dérmica observada en el presente trabajo. Sin embargo, no puede descartarse la participación de otras células como macrófagos y CD dérmicas, aún no caracterizadas en pollos, en dicho infiltrado, ya que se les ha asignado un papel en la inducción de la HC (Streilein, 1989; Kurimoto *et al.*, 1995; Bacci *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1998).

Interesantemente, también observamos que la aplicación epicutánea del DNFB provocó una disminución en el número de CL clase II positivas, de hasta un 65 % a los 30 min y 4 h, que se acompañó de un incremento de CL clase II positiva en la dermis subyacente a la epidermis tratada con dicho hapteno. Una observación importante relacionada con lo

anterior, fue la identificación de estructuras vasculares o en forma de "cordones" a los que se asociaban CD y otras más redondeadas, que expresaban moléculas clase II del CPH. La presencia de estas células y el calibre de los "cordones" fue más notable 4 h después de la aplicación de la dosis de sensibilización del DNFB. Estas estructuras cordonaes han sido descritas en la dermis de ratón en un modelo de cultivo de órgano para estudiar la migración espontánea de CL en trasplantes y explantes de piel (Larsen *et al.*, 1990). En este estudio se demostró que las CL salen de la epidermis entre las 4 y 24 h de cultivo y a los 3 días forman arreglos en hileras no azarosas en los linfáticos dérmicos antes de salir de la piel hacia el medio. Posteriormente, se observó lo mismo en cultivos de piel humana, demostrándose que más del 50% de las CD con una alta expresión de moléculas clase II del CPH asociadas a los "cordones" también eran positivas para el antígeno Lag, específico para el GCL. Asimismo, se demostró ultraestructuralmente que los "cordones" eran vasos linfáticos y que carecían de marcadores del endotelio vascular sanguíneo como el Ag relacionado al factor VIII y la positividad al AcMo PAL-E (Lukas *et al.*, 1996). En un estudio más detallado de cultivo de piel de ratón sensibilizada a trinitroclorobenceno, quedó claro que estos "cordones" pueden formarse *in vivo*, que son CD54/ICAM-1 negativos, que poseen todas las características de vasos linfáticos y que a través de ellos migran CL y CD dérmicas con signos estructurales de maduración, como son las vesículas endocíticas, menor número de GCL y un citoesqueleto prominente (Weinlich *et al.*, 1998). Estas células entran a la luz de los vasos linfáticos través de grandes espacios intercelulares dejados por las delgadas células endoteliales, las cuales carecen de lámina basal y de uniones estrechas (Stoitzner *et al.*, 2002). Dos trabajos más recientes confirman plenamente los conceptos anteriores, definiendo más aún que las CL que entran a los vasos linfáticos dérmicos son Langerina positivas, clase II positivas y que expresan marcadores de maduración como 2A1 y moléculas coestimuladoras como CD40 y CD86 (Ratzinger *et al.*, 2002; Stoitzner *et al.*, 2003).

Otros hallazgos interesantes debido a la aplicación de DNFB, son los cambios morfológicos y en el fenotípico de las CL que permanecen en la epidermis y que tal vez también ocurrieron en las que migraron a la dermis. Muchas de las CL, sobre todo las localizadas en los cúmulos, tienen un aspecto más dendrítico, son más grandes y la inmunofluorescencia parece ser más intensa. Estas características han sido consideradas como datos de maduración de la CL en mamíferos (Aiba & Katz 1990; Cumberbatch *et al.*, 1991; 1992; Ratzinger *et al.*, 2002) y también ocurren, como en el pollo, dentro de las primeras 4 h después de aplicado el DNFB (Antonopoulos *et al.*, 2001). La relevancia de estos cambios es que está plenamente aceptado que la hiperregulación de las moléculas clase II del CPH, entre otros parámetros, acompaña a la transformación de las CL en una célula con gran eficiencia en la inducción de respuestas T específicas (Aiba & Katz 1990), lo cual también es observado cuando las CL son cultivadas por periodos cortos de tiempo que van de 24 a 72 h (Schuler & Steinman 1985; Shimada *et al.*, 1987).

Los hallazgos de microscopia electrónica del presente trabajo aportan evidencia adicional de que las CL de pollo responden de manera similar a las de los mamíferos ante la estimulación con un hapteno de contacto. A los 30 min después de la aplicación epicutánea de DNFB, las CL suprabasales presentaron hoyos y vesículas cubiertas, cuerpos multivesiculares y algunas vesículas citoplásmicas probablemente endocíticas; a los 60 min, las CL tienen prolongaciones citoplásmicas dirigidas hacia la lámina basal, poseen las estructuras endocíticas observadas a los 30 min y algunos organelos tubulares similares a GCL atípicos, localizados en la vecindad de la membrana plasmática. A las 4

h, la mayoría de las CL son de mayor tamaño, cercanas a la lámina basal, contienen más mitocondrias y vesículas claras; en la dermis superficial y profunda, las CL se localizan dentro de espacios limitados por células endoteliales, cuyas características recuerdan a los vasos linfáticos descritos en la piel (Skobe & Detmar, 2000). Es notable que estos hallazgos ultraestructurales sean muy parecidos a los encontrados en las CL de cobayos, a los mismos tiempos posteriores a la aplicación epicutánea de una dosis de sensibilización de DNFB (Hanau *et al.*, 1989).

Las CL de humanos y murinos endocitan moléculas propias expresadas en la membrana como las del CPH y el Ag CD1a, así como moléculas externas unidas a su superficie como Ac o proteínas de la cubierta del VIH (Hanau *et al.*, 1987; Girolomoni *et al.*, 1990). Los haptenos incrementan marcadamente este proceso (Becker *et al.*, 1992a, b), tanto *in vivo* (Kolde & Knop, 1987) como *in vitro* (Becker *et al.*, 1994). La inducción de numerosas estructuras endocíticas en las CL "haptinizadas" parece ser selectiva o específica ya que los compuestos análogos a los haptenos más potentes o los compuestos no haptenos o tolerogénicos, prácticamente no producen cambios ultraestructurales y los irritantes provocan daño celular irreversible y no activación endocítica (Kolde & Knop, 1987; Becker *et al.*, 1994). En este sentido, la pérdida del aspecto dendrítico de numerosas CL después de la aplicación de DNFB podría estar relacionada con la internalización de moléculas clase II del CPH para el ensamblaje intracelular del complejo hapteno-péptido-moléculas clase II. Sin embargo, como ya mencionamos anteriormente, también observamos CL más dendríticas y con mayor intensidad de la inmunofluorescencia. Por ello, y a reserva de emplear otra metodología posteriormente, los cambios morfológicos y en el fenotipo de las CL descritas aquí, sugieren que estas células hiperregulan moléculas clase II del CPH y luego las endocitan en las primeras 4 h después de la aplicación epicutánea de DNFB, como ocurre con las CL de mamíferos.

Es importante señalar que los haptenos provocan hiperregulación de E-cadherina en las CL y en los queratinocitos con la consecuente pérdida de la adhesión entre estas células y la pérdida del aspecto dendrítico de las CL, lo cual es uno de los muchos eventos preparatorios para la emigración de las CL. (Tang *et al.*, 1993; Borkowski *et al.*, 1994; Blauvelt *et al.*, 1995; Cumberbatch *et al.*, 1996). Si esta activación y migración de las CL del pollo son ciertas y tiene la relevancia funcional conocida para las CL de mamíferos, los queratinocitos del pollo también deben jugar un papel importante en los cambios de las CL. Los queratinocitos son la principal subpoblación de células epidérmicas. Desde hace tiempo, se sabe que sintetizan y liberan diversos factores de crecimiento y citocinas (Chu & Morris, 1997). Con técnicas de RT-PCR en combinación con hibridación líquida, se ha demostrado que en la piel se hiperregulan, a nivel de RNAm, IL-1 α , IL-1 β , MIP-2, IP-10 e I-A α , esta última precede a la identificación de moléculas clase II del CPH, después de la aplicación epicutánea del hapteno dinitroclorobenceno. La aplicación de irritantes o tolerógenos hiperregulan IFN- γ , TNF- α y GM-CSF (Enk & Katz, 1992). El RNAm de IL-1 β se incrementa a los 15 min y el de TNF- α a los 30 min, después de aplicado el hapteno, y alcanzan un pico a las 2 a 4 h. Las CL son el origen de IL-1 β y de I-A α , mientras que los queratinocitos lo son de IL-1 α , TNF- α , IP-10 y MIP2 y los linfocitos originan el IFN- γ (Enk & Katz, 1992). Esta secuencia rápida de eventos moleculares (de 15 min a 4 h), identificadas en los mamíferos, podría también ocurrir en los pollos y explicar el establecimiento de los diversos cambios morfológicos y de fenotipo relacionados con la activación-maduración-migración de CL de estos animales, inducido por DNFB. El papel

de IL-1 β como la primera señal, en tiempo y en la inducción de TNF- α , está claramente demostrado ya que la inyección cutánea de esta citocina mimetiza exactamente los cambios celulares y moleculares inducidos por alérgenos (Enk *et al.*, 1993). Así, aunque el abordaje presentado aquí para explorar la funcionalidad de las CL epidérmicas del pollo, teniendo como modelo la inducción de HC a un hapteno por contacto, es básicamente morfológico, los resultados obtenidos son muy alentadores porque sugieren que la reactividad de las CL de pollos comparte o tiene una gran similitud con la de los mamíferos. Sin embargo, una primera gran diferencia entre la migración de CL de mamíferos y las de pollo es que aquellas migran hacia ganglios linfáticos y las aves, excepto los patos y algunas especies marinas, no presentan estos órganos linfoides secundarios bien organizados, sino como nódulos linfoides murales (White, 1981). Sin embargo, este asunto es aún controversial ya que algunos autores han aportado evidencia de la existencia de verdaderos ganglios linfáticos en los pollos (Biggs, 1957; McCorkle *et al.*, 1979; Olah & Glick, 1983, 1984). Esta circunstancia obliga a definir el sitio donde se llevarían a cabo las respuestas inmunológicas primarias inducidas por las CL epidérmicas del pollo. Un buen candidato es el bazo, en el cual se han identificado CD (Gallego *et al.*, 1992, 1993) que podrían tener una relación ontogénica y funcional con las CL epidérmicas.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Las células dendríticas epidérmicas ATPasa positivas/clase II positivas, de citoplasma claro, sin desmosomas, tonofilamentos y melanosomas y con GCL son las CL epidérmicas de los pollos.
2. Las CL del pollo responden rápidamente a la aplicación epicutánea del hapteno por contacto dinitrofluorobenceno, aumentado las estructuras endocíticas, la expresión de moléculas clase II de CPH y migrando de la epidermis a la dermis y a los vasos linfáticos. Así, desde el punto de vista funcional, existe una gran homología entre las CL de la epidermis de pollos y las de los mamíferos.
3. Los epitelios de la córnea, conjuntiva, lengua y esófago del pollo, poseen CD ATPasa positivas, clase II positivas y con los criterios ultraestructurales suficientes para se consideradas equivalentes a las CL de la epidermis.
4. En el periodo de 35 días posteclosión hay una depleción natural de CL en la epidermis del pollo. Durante este periodo, las diferencias sexuales en el número CL y en la dinámica de expresión de la ATPasa y de las moléculas clase II del CPH, sugieren la existencia de un dimorfismo sexual en las CL del pollo.

PERSPECTIVAS

1. La depleción natural de CL epidérmicas en el pollo durante los primeros 35 días posteclosión podría ser aprovechada para saber si en esas condiciones se induce tolerancia inmunológica y no HC a un hapteno, como ocurre en los mamíferos que reciben la dosis de sensibilización en una zona naturalmente depletada de CL o por tratamiento con radiación ultravioleta o con corticoides.

2. En este orden de ideas, también podría explorarse la sobrevivencia, tolerancia y rechazo de aloinjertos cutáneos, en diferentes edades del pollo hasta que se alcanza el número de CL del adulto.

3. En la vida postnatal de los mamíferos, los sitios naturalmente depletados de CL permanecen con esa disminución durante toda la vida. La piel de los pollos durante los primeros 35 días posteclosión podría ser un modelo adecuado y de fácil acceso para estudiar los eventos moleculares necesarios para la llegada de los precursores de las CL a la piel. También podría evaluarse la participación de la división celular *in situ* en la población de CL epidérmicas.

4. La primera forma de organización morfológica intraepidérmica de las CL es la formación de cúmulos de células ATPasa positivas/moléculas clase II positivas. Los cambios morfológicos y de fenotipo de las CL presente en estos cúmulos son muy llamativos en la inducción de HC. Tenemos evidencia de que en dichas estructuras coexisten CL y linfocitos CT4 (CD4) y CT8 (CD8) positivos. Aún no hemos descrito las relaciones estructurales intraepiteliales de estas poblaciones celulares y cuál es su comportamiento ontogénico o funcional, por ejemplo, en la HC. Creemos que esta característica particular de los pollos podría dar más información de las relaciones funcionales intraepidérmicas entre una célula que presenta antígenos y otra que responde. La ausencia de ganglio linfáticos regionales en el pollo podría tener relación directa con la presencia de estos cúmulos intraepiteliales de CL y linfocitos.

5. Hasta ahora no se conoce el destino de las CL pollo que migran a la dermis y a los vasos linfáticos. Resulta atractivo pensar que es el bazo el órgano linfóide a donde llegarían las CL epidérmicas después de la aplicación epicutánea una dosis de DNFB. Dos alternativas podrían responder esta interrogante. Identificar CL con GCL en la vaina periarteriolar del bazo después de la estimulación cutánea con DNFB o utilizar un hapteno fluorescente como FITC o TRICT, el cual, al ser captado, podría facilitar la identificación de las CL que hubieran migrado al bazo. Esta misma estrategia podría emplearse para buscar CL en los escasos nódulos linfoides identificados sobre algunas venas de las patas y las alas.

Ya que se ha demostrado que FITC puede difundir hasta los vasos sanguíneos después de su aplicación epicutánea, haríamos una comparación de resultados utilizando una piel con número alto de CL como en las aplanas, contra una con disminución casi total de CL, como la piel de las patas. La piel depletada naturalmente durante el periodo posteclosión también podría ser tratada para este fin.

6. La inducción eficiente de respuestas inmunológicas asociadas a la piel requiere de la presencia morfológica y funcional de ganglios linfáticos regionales. Si el bazo de los pollos tuviera la importancia de los ganglios linfáticos regionales de la piel, la esplenectomía experimental en pollos disminuiría o aboliría la inducción de respuestas inmunológicas a través de la piel, como es el caso de la HC.

7. Creemos que es importante trabajar con CL aisladas para buscar la presencia de receptores Fc para Igs. Algunos resultados nuestros muy preliminares sugieren que las CL del pollo son capaces de formar rosetas de eritrocitos de carnero "cubiertos" con un suero hiperinmune de pollos diluido 1:160, inactivado por calor y obtenido después de inyectar varias veces a los pollos con dichos eritrocitos.

8. EL empleo de CL aisladas permitiría estudiar con mayor acuciosidad cuál es su capacidad fagocítica y endocítica, en condiciones normales y luego de la estimulación con haptenos o como se induce en macrófagos. Suponemos que la actividad endocítica de las CL del pollo es similar a la de las CL de mamíferos, mientras que su capacidad fagocítica será más importante. En este sentido, sería interesante estudiar si las CL del pollo endocitan moléculas clase II en asociación a la formación de los gránulos de Birbeck.

9. Asimismo, contar con CL aisladas nos permitiría diseñar experimentos de presentación de antígenos, similares a los que se emplearon para definir el papel de las CL en la activación de linfocitos T.

10. Hasta ahora sabemos que la piel y algunas mucosas del pollo contienen CL. Sin embargo, los conceptos de SALT (skin-associated lymphoid tissue) o SIS (skin immune system) y MALT (mucosae-associated lymphoid tissue), incluye a otras células y a diversas citoquinas y factores de crecimiento. En nuestro laboratorio hemos identificado con inmunofluorescencia, la presencia de linfocitos CT4, CT8, CT3, TCR1 y TCR2 positivos en la piel y mucosas del pollo. La intención inicial es contribuir en la integración de los conceptos de SALT y MALT para las mucosas estudiadas y otras en el pollo. Una aportación del presente trabajo, junto con la ya conocida presencia de CD en timo, bolsa de Fabricio, tonsila cecal y bazo, es que los pollos poseen un sistema de células dendríticas, posiblemente homólogo al de los mamíferos.

11. Ampliar el estudio de las CL del pollo con histoquímica para la demostración de la captación de haptenos como metales, aminas y aldehídos, aportaría elementos funcionales para completar la homología de las CL del pollo con la de los mamíferos.

12. La piel del pollo es más simple estructuralmente que las de cualquier mamífero. La epidermis prácticamente sólo está formada por los estratos germinativo o basal y el estrato córneo, no contiene melanocitos, excepto en el cañon de las plumas y el la dermis. Como la gran mayoría de las aves, la piel carece de glándulas sebáceas y sudoríparas. Lo anterior hace que la piel de las aves sea un modelo más simple, aparentemente, para estudiar la biología de las CL y ciertos aspectos filogenéticos o evolutivos del sistema inmunológico de la piel (SIS) o del tejido linfoide asociado a la piel (SALT).

13. Circunstantialmente hemos observado que las CL ATPasa positivas de los pollos son más dendríticas y hacen cúmulos de mayor tamaño en los sitios cutáneos con ectoparásitos. Queremos aprovechar esta situación para estudiar la CL con inmunofluorescencia para moléculas clase II y microscopía electrónica, conjuntamente con el estudio de subpoblaciones de linfocitos T epidérmicos. El objetivo de este estudio es valorar si podría ser un modelo natural de activación de CL y de presentación de antígenos y activación *in situ* de linfocitos T.

14. El concepto de las CL ha evolucionado. Actualmente son consideradas adjuvantes naturales del sistema inmunológico, junto con las CD, útiles en el diseño de nuevas estrategias de inmunización y de tratamiento contra neoplasias. Con la idea de trabajar en estos tópicos, esperamos establecer investigaciones en colaboración con interesados en el tema, en producción animal y en patología de aves.

REFERENCIAS

- Aberer W, Stingl G, Stingl-Gazze LA, Wolff K: Langerhans cells as stimulator cells in the murine primary epidermal cell-lymphocyte reaction, alteration by UV-B irradiation. *J Invest Dermatol* 79:129-135, 1982.
- Aberer W, Kruisbeek AM, Shimada S, Katz SI: *In vivo* treatment with anti-I-A antibodies: differential effects of Ia antigens and antigen-presenting cell function of spleen cells and epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 136:830-836, 1986.
- Aiba S, Katz SI: Phenotypic and functional characteristics of *in vivo* activated Langerhans cells. *J Immunol* 145:2791-2797, 1990.
- Aiba S, Nakagawa S, Ozawa H, Miyake K, Yagita H, Tagami H: Up-regulation of $\alpha 4$ integrin on activated Langerhans cells relating to their migration from skin to draining lymph nodes. *J Invest Dermatol* 100:143-147, 1993.
- Akhter N, Kobayashi M, Hoshino T: Avian epidermis contains ATPase-and Ia-positive Langerhans-like cells. *Cell Tissue Res* 271:103-106, 1993.
- Al Yassin TM, Toner PG: Langerhans cells in the human oesophagus. *J Anat* 122:435-445, 1976.
- Antonopoulos C, Cumberbatch M, Dearman RJ, Daniel RJ, Kimber I, Groves RW: Functional caspase-1 is required for Langerhans cell migration and optimal contact sensitization in mice. *J Immunol* 166:3672-3677, 2001.
- Ardavin C, Martínez del Hoyo G, Martín P, Anjuère F, Arias CF, Marín AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernández H: Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends in Immunology* 22:691-700, 2001.
- Asahina A, Hosoi J, Grabbe S, Granstein RD: Modulation of Langerhans cells function by epidermal nerves. *J Allergy Clin Immunol* 96 (6 Pt 2):1178-1182, 1995.
- Ashworth J, Turbitt ML, Mackie R: The distribution and quantification of Langerhans cell in normal human epidermis. *Clin Exp Dermatol* 11:153-158, 1986.
- Ashworth J, Booker J, Breathnach SM: Effect of topical corticosteroid therapy on Langerhans cell function in human skin. *Br J Dermatol* 118:457-469, 1988.
- Austyn JM, Larsen CP: Migration pattern of dendritic leukocytes: implication for transplantation. *Transplantation* 49:1-7, 1990.
- Bacci S, Alard P, Dai R, Nakamura T, Streilein JW: High and low doses of haptens dictate whether dermal or epidermal antigen-presenting cells promote contact hypersensitivity. *Eur J Immunol* 27:442-448, 1997.
- Bagot M, Hestian M, Dubertret L, Roujeau JC, Touraine R, Levy JP: Antigen-presenting properties of human epidermal cells compared with peripheral blood mononuclear cells. *Br J Dermatol* 113(suppl. 28):55-60, 1985.
- Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252, 1998.
- Bartosik J: Cytomembrane-derived Birbeck granules transport horseradish peroxidase to the endosomal compartment in the human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 99:53-58, 1992.
- Basset F, Turiaf J: Identification par la microscopie électronique de particules de nature probablement viral dans le liaisons granulémateuses d'une histiocytosis « X » pulmonaire. *CR Acad Sci* 261 :3701-3703, 1965.
- Beelen RHJ, Van't Veer MB, Fluitsma DM, Hoefsmit ECM: Identification of different peroxidatic activity patterns in human macrophages *in vivo* and *in vitro*. *J Reticuloendothel Soc* 24:351-362, 1978.
- Becker D, Neib U, Neis S, Reske K, Knop J: Contact allergens modulate the expression of CPH class II molecules on murine epidermal Langerhans cells by endocytotic mechanisms. *J Invest Dermatol* 98:700-705, 1992a.
- Becker D, Mohamadzadeh M, Reske K, Knop J: Increased level of intracellular CPH class II molecules in murine Langerhans cells following *in vivo* and *in vitro* administration of contact allergens. *J Invest Dermatol* 99:545-549, 1992b.
- Becker D, Kolde G, Reske K, Knop J: *An in vitro* test for endocytotic activation of murine epidermal Langerhans cells under the influence of contact allergens. *J Immunol Methods* 169:195-204, 1994.
- Belsito DV, Flotte TJ, Limm HW, Baer RL, Thorbecke J, Gigli I: Effect of glucocorticosteroids on epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 155:291-302, 1982.
- Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, Rajewsky J, Muller W, Davidson NJ, Rennick D: Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* 182:99-108, 1995.
- Bergstresser PR, Fletcher CR, Streilein W: Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunological properties. *J Invest Dermatol* 74:77-80, 1980.
- Bergstresser PR, Toews GB, Gilliam JN, Streilein JW: Unusual numbers and distributions of Langerhans cells in skin with unique immunologic properties. *J Invest Dermatol* 74:312-314 1980.
- Bergstresser PR, Toews GB, Streilein JW: Natural and perturbed distribution of Langerhans cells: responses to ultraviolet light, heterotopic skin grafting, and dinitrofluorobenzene sensitization. *J Invest Dermatol* 75:73-77, 1980.
- Berman B, Gigli I: Complement receptors on guinea pig epidermal Langerhans cells. *Clin Res* 27:522A, 1979.
- Bermann B, Chen VL, France DS, Dotz DL, Petroni G: Anatomical mapping of epidermal Langerhans densities in adults. *Br J Dermatol* 109:553-558, 1983.
- Berman B, France DS, Martinelli GP, Hass A: Modulation of expression of epidermal Langerhans cell properties following *in situ* exposure to glucocorticosteroids. *J Invest Dermatol* 80:168-171, 1983.
- 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* 118:385-392, 1988.
- Bieber T, Ring J: *In vivo* modulation of the high-affinity receptor for IgE (Fc ϵ R1) on human epidermal Langerhans cells. *Int Arch Allergy Immunol* 99:204-210, 1992.

- Bierber T, de la Salle H, de la Salle C, Hanau D, Wollenberg A: Expression of high affinity receptor for IgE (Fcε-RI) on human Langerhans cells: The end of a dogma. *J Invest Dermatol* 92:10S-11S, 1992.
- Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakim 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: 1285-1290, 1992.
- Biggs PM: The association of lymphoid tissue with the lymph vessels in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Acta Anat* 29:36-47, 1957.
- Billinham RF, Medawar PB: A study of the branched cells of the mammalian epidermis with special reference to the fate their division products. *Phyl Trans Roy Soc B*, 237: 151-169, 1953.
- 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* 37:51-64, 1961.
- Bjerkce S, Elgo J, Braathen L, Thorsby E: Enriched epidermal Langerhans cells are potent antigen-presenting cells for T cell. *J Invest Dermatol* 83:286-289, 1984.
- Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Rollinghoff M, Moll H: Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* 167:418-425, 1992.
- Blauvelt A, Katz SI, Udey MC: Human Langerhans cells express E-cadherin. *J Invest Dermatol* 104:293-296, 1995.
- Blauvelt A, Asada H, Klaus-Kovtum V, Altman DJ, Lucey DR, Katz SI: Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes, Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol* 106:1047-1052, 1996.
- Bock P, Hanak H: Some remarks on the morphology of the guinea pig conjunctival epithelium. *J Submicrosc Cytol* 3:1-10, 1971.
- Bodel PT, Nichols BA, Baiton DE: Appearance of peroxidase reactivity within the rough endoplasmic reticulum of blood monocytes after surface adherence. *J Exp Med* 145:264-274, 1977.
- Borkowski TA, van Dyke BJ, Schwarzenberger K, McFarland VW, Farr AG, Udey MC: Expression of E-cadherin by murine dendritic cells. E-cadherin as a dendritic cell differentiation antigen characteristic of epidermal Langerhans cells and related cells. *Eur J Immunol* 24:2767-2774, 1994.
- Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, Udey MC: A role for transforming growth factor β1 in Langerhans cell biology: The skin of transforming growth factor β1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 184:2417-2422, 1996.
- Borkowski TA, Letterio JJ, Mackall CL, Saitoh A, Wang XJ, Roop DR, Gress RE, Udey MC: A role of TGF β1 in Langerhans cell biology. *J Clin Invest* 100:575-581, 1997.
- Bos JD, Kapsenberg ML: The skin immune system. Its cellular constituents and their interactions. *Immunol today* 7:335-341, 1986.
- Botham PA, Rattray NJ, Walsh ST, Riley EJ: Control of the immune response to contact sensitizing chemicals by cutaneous antigen-presenting cells. *Br J Dermatol* 117:1-9, 1987.
- Bourlond A, Wolff K, Winkelmann RK: Cholinesterase in melanocytes of the bat. *Nature* 214:816-817, 1962.
- Braathen LR, Thorsby E: Studies on human epidermal Langerhans cells. I. Allo-activating and antigen-presenting capacity. *Scan J Immunol* 11:401, 1980.
- Braathen LR et al.: Studies on human epidermal Langerhans cells. II. Activation of human T lymphocytes to herpes simplex virus. *Acta Dermatovener* 60:381-408, 1980.
- Braathen LR: Studies on human epidermal Langerhans cells. III. Induction of T lymphocyte response to nickel sulphate in sensitized individuals. *Br J Dermatol* 103:517-526, 1980.
- Braathen LR, Kaaman T: Human epidermal Langerhans cells induce cellular immune response to trichophylin in dermatophytosis. *Br J Dermatol* 109:295-300, 1983.
- 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.
- Bradshaw M, Wachstein M, Spence J, Elias J: Adenosine triphosphatase activity in melanocytes and epidermal cells of human skin. *J Histochem Cytochem* 11:465-473, 1963.
- Brasel K, De Smedt T, Smith JL, Maliszewski CR: Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone-marrow cultures. *Blood* 96:3029-3039, 2000.
- Breathnach AS: The distribution of Langerhans cells within the human hair follicle and some observations on its staining properties with gold chloride. *J Anat* 97:73-80, 1963.
- Breathnach AS: Observations on cytoplasmic organelles in Langerhans cells in human epidermis. *J Anat* 98:265-270, 1964.
- Breathnach AS, Willie LM: Electron microscopy of melanocytes and Langerhans cells in human fetal epidermis of fourteen weeks. *J Invest Dermatol* 44:51-61, 1965.
- Breathnach AS, Poyntz SV: Electron microscopy of pigment cells in tail skin of *Lacerta vivipara*. *J Anat* 100:549-569, 1966.
- Breathnach AS, Silver WK, Smith S, Heyner S: Langerhans cells in mouse skin experimentally deprived of its neural crest components. *J Invest Dermatol* 50:147-160, 1968.
- Breathnach AS: Electron micrographs from a collection. *Clin Exp Dermatol* 2:1-16, 1977.
- Breathnach AS: Development and differentiation of dermal cells in man. *J Invest Dermatol* 71:2-8, 1978.
- Breathnach AS: Branched cells in the epidermis: an overview. *J Invest Dermatol* 75:6-11, 1983.

- Bronstein BR, Murphy GF, Harrist TJ, Ruiter DJ, Mihm Jr. MC, Khan AK: Location of HLA-A, B, C, antigens on dendritic cells of normal human skin : an immunoelectron microscopic study. *J Invest Dermatol* 80:481-484, 1983.
- Brown J, Winkelmann RK, Wolff K: Langerhans cells in vitiligo: a quantitative study. *J Invest Dermatol* 49:386-390, 1967.
- Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D: Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373:531-536, 1995.
- Calabi F, Milstein C: A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. *Nature* 323:540-543, 1986.
- Campo-Aasen I, Pearse AGE: Enzimología de las células de Langerhans. *Medicina Cutánea* 1:35-44, 1966.
- Cancilla PA: Demonstration of the Langerhans granule by lanthanum. *J Cell Biol* 38:248-252, 1968.
- Caputo R, Peluchetti D, Monti M: Freeze-fracture of Langerhans granules. A comparative study. *J Invest Dermatol* 66:297-301, 1976.
- Carrillo J, Castell A, Pérez A, Rondán A: Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *J Anat* 172:39-45, 1990.
- Carrillo J, Pérez A, Castell A, Antuna S: Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). *J Anat* 176:1-8, 1991.
- Castell A, Hernández A, Sanpedro E, Herrera M, Alvarez J, Rondán A: ATPase and CPH class II molecules co-expression in *Rana pipiens* dendritic cells. *Dev Comp Immunol* 23:473-485, 1999.
- Castell A, Sampedro E, Herrera M, Rondán A: Non-specific esterase-positive dendritic cells in epithelia of the frog *Rana pipiens*. *Histochem J* 33:311-316, 2001.
- Cattoreti G: CD1a positive dendritic cells: ontogeny and tissue distribution in human. *Tissue Antigens* 33:67A, 1989.
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J: GM-CSF and TNF α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261, 1992.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J: CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF α . *J Exp Med* 184:695-706, 1996.
- Celluzzi CM, Falo Jr LD: Epidermal dendritic cells induce potent antigen-specific CTL-mediated immunity. *J Invest Dermatol* 108:716-720, 1997.
- Claesson-Welsh L, Scheynius A, Tjernlund U, Peterson PA: Cell surface expression of invariant gamma-chain of class II histocompatibility antigens in human skin. *J Immunol* 136:484-490, 1986.
- Clement LT, Shevach EM: Characterization of CPH antigens on TNP-modified cells. *Mol Immunol* 16:67, 1979.
- Concha M, Figueroa CD, Caorsi I: Ultrastructural characteristics of the contact zones between Langerhans cells and lymphocytes. *J Pathol* 156:29-33, 1988.
- Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo Jr LD: DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nat Med* 2:1122-1128, 1996.
- Cooper KD, Breathnach SM, Caughman SW, Palini AG, Waxdal MJ, Katz SI: Fluorescence microscopic and flow cytometric analysis of bone marrow-derived cells in human epidermis: a search for the human analogue of the murine dendritic Thy-1+ epidermal cell. *J Invest Dermatol* 85:546-552, 1985.
- Cooper EL: Comparative immunology of the integument. In: *Skin Immune System (SIS)*. Cutaneous immunology and clinical immunodermatology. Ed. Jan D. Bos. CRC Press/LLC, Second edition. Boca Raton, Florida, USA. Chapter 3, pp 18-39, 1997.
- Cumberbatch M, Gould SJ, Peters SW, Kimber I: CPH class II expression by Langerhans cells and lymph node dendritic cells: possible evidence for maturation of Langerhans cells following contact sensitization. *Immunology* 74:414-419, 1991.
- Cumberbatch M, Kimber I: Dermal TNF- α induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans cell migration. *Immunology* 75:257-263, 1992.
- Cumberbatch M, Peters SW, Gould SJ, Kimber I: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by lymph node dendritic cells: comparison with epidermal Langerhans cells. *Immunol Lett* 32:105-110, 1992.
- Cumberbatch M, Fielding I, Kimber I: Modulation of epidermal Langerhans cell frequency by TNF- α . *Immunology* 81:395-401, 1994.
- Cumberbatch M, Kimber I: Tumor necrosis factor- α is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology* 84:31-35, 1995.
- Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I: Adhesion molecule expression by epidermal Langerhans cells and lymph node dendritic cells: a comparison. *Arch Dermatol Res* 288:739-744, 1996.
- Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I: Interleukin-1 β and the stimulation of Langerhans cell migration: Comparison with TNF alpha. *Arch Dermatol Res* 289:277-284, 1997.
- Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I: Langerhans cells require signals from both tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β for migration. *Immunology* 92:388-395, 1997.
- Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I: Characteristics and regulation of the expression of interleukin 1 receptors by murine Langerhans cells and keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 290:688-695, 1998.
- Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I: Langerhans cells migration in mice requires type 1 interleukin 1 receptor (IL-1R1) function. *Arch Dermatol Res* 291:357-361, 1999.
- Cumberbatch M, Griffiths CEM, Tucker SC, Dearman RJ, Kimber I: Tumor necrosis factor- α induces Langerhans cell migration in humans. *Br J Dermatol* 141:192-200, 1999.

- Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I: Induction by tumor necrosis factor- α of dose-related changes in Langerhans cell frequency in mice. *Arch Dermatol Res* 291:453-458, 1999.
- Curti A, Flogi M, Ratta M, Tura S, Lemoli RM: Stem cell factor and flt3 ligand are strictly required to sustain the long-term expansion of primitive CD34+DR- dendritic cell precursors. *J Immunol* 166:848-854, 2001.
- Chan VW, Kothakota S, Rohan MC, Kothakota S, Rohan MC, Panganiban-Lustan L, Gardner JP, Wachowicz MS, Winter JA, Williams LT: Secondary lymphoid-tissue chemokine (SCL) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 93:3610-3616, 1999.
- Chang C-H, Furue M, Tamaki K: B7-1 expression of Langerhans cells is up-regulated by proinflammatory cytokines, and is downregulated by interferon-gamma α or by interleukin-10. *Eur J Immunol* 25:395-398, 1995.
- Chapman HA: Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 9:714-724, 1997.
- Charbonnier SA, Kohrgruber N, Kriehuber E, Stingl G, Rot A, Maurer D: Macrophage inflammatory protein 3 is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med* 190:1755-1767, 1999.
- Chen HD, Silvers WK: Influence of Langerhans cells on the survival of H-Y-incompatible skin graft in rats. *J Invest Dermatol* 81:20-23, 1983.
- Chen H, Yuan J, Wang Y, Silvers WK: Distribution of ATPase-positive Langerhans cells y normal adult human skin. *Br J Dermatol* 113:707-711, 1985.
- Chu A, Eisinger M, Lee JS, Takezaki S, Kung PC, Edelson RL: Immunoelectron microscopic identification of Langerhans cells using a new antigenic marker. *J Invest Dermatol* 78:177-180, 1982.
- Chu AC, Morris JF: The keratinocyte. In: *Skin Immune System. Cutaneous immunology and clinical immunodermatology*. Ed. Bos JD, Second edition. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA. Chapter 4, pp43-57, 1997.
- De Fraissinette A, Schmitt D, Thivolet J: Langerhans cells of human mucosa. *J Dermatol* 16:255-262, 1989.
- de la Salle C, Esposito-Farece ME, Bieber T, Moncuit J, Morales M, Wollenberg A, de la Salle H, Fridman WH, Cazenave JP, Teillaud JL: Release of soluble Fc gamma RII (CD32 molecules by human Langerhans cells: a subtle balance between shedding and secretion? *J Invest Dermatol* 99:155-17S, 1992.
- Delo VA, Dawes L, Jackson R: Density of Langerhans cells (LC) in normal vs. chronic actinically damaged skin (CADS) of human (abstr). *J Invest Dermatol* 76:330, 1981.
- Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Faure M, Cordier G, Thivolet J: Detection of OKT6-positive cells (without visible Birbeck granules) in normal peripheral blood. *Immunol Lett* 8:121-126, 1984.
- 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.
- Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Faure M, Horisberger M, Thivolet J: Immunogold technique applied to simultaneous identification of T6 and HLA-DR antigens on Langerhans cells by electron microscopy. *J Invest Dermatol* 84:465-468, 1985.
- Di Virgilio F: The P2Z purinoreceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 16:524-528, 1995.
- Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C: Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188:373-386, 1998.
- Dieu-Nosjean MC, Vicari A, Lebecque S, Caux C: Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 66:252-262, 1999.
- Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Horney B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Zlotnik A, Caux C: Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 192:705-718, 2000.
- Du Pasquier L, Flajnik M: Expression of CPH class II antigens during *Xenopus* development. *Dev Immunol* 1:85-95, 1990.
- 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.
- Dubertret L, Breton-Gorius J, Fosse M, Touraine R: A cytochemical marker for epidermal differentiation Langerhans cells, skin resident macrophages, and mitochondria. *Br J Dermatol* 102 (suppl 23):96-100, 1982.
- Elbe A, Tschachler E, Steiner G, Binber A, Wolff K, Stingl G: Maturation steps of bone marrow-derived dendritic murine epidermal cells. Phenotypic and functional studies on Langerhans cells and Thy-1+ dendritic epidermal cells in the perinatal period. *J Immunol* 143:431-438, 1989.
- Ellerler M: Activity of alfa-D-mannosidase in human Langerhans epidermal cells. *Virchows Arch B Cell Path* 19:93-96, 1975.
- Elmets CA, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Wood PJ, Streilein JW: Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low-dose ultraviolet irradiation. *J Exp Med* 158:781-794, 1983.
- Elofsson R, Andersson A, Falck B, Sjöborg S: Evidence for endocytotic mechanism in the epidermal Langerhans cells. *Acta Dermatol Venereol Suppl* 99:29-35, 1981.
- Enk AH, Katz SI: Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1398-1402, 1992.
- Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI: An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 β in the induction of primary

- immune responses in skin. *J Immunol* 150:3698-3704, 1993.
- Enk AH, Saloga J, Becker D, Mohamadzadeh M, Knop J: Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 *in vivo*. *J Exp Med* 179:1397-1402, 1994.
- Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J: Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73:309-316, 1997.
- Ezekowitz RAB, Sastry K, Bailly P, Warner A: Molecular characterization of a human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 172:1785-1594, 1990.
- Farquhar M, Palade G: Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. *J Cell Biol* 30:359-379, 1966.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F: Extracellular ATP triggers IL-1 β release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 159:1451-1458, 1997.
- Ferrero E, Vettoretto K, Bondanza A, Villa A, Resnati M, Poggi A, Zocchi MR: uPA/uPAR system is active in immature dendritic cells derived from CD14⁺CD43⁺ precursors and is down-regulated upon maturation. *J Immunol* 164:712-718, 2000.
- Figueroa CD, Caorsi: Ultrastructural and morphometric study of the Langerhans cells in the normal human exocervix. *J Anat* 131:669-682, 1980.
- Fithian F, Kung P, Goldstein G, Rubenfeld M, Fenoglio C, Edelson R: Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2541-2544, 1981.
- Flotte TJ, Murphy GF, Bhan AK: Demonstration of T200 on human Langerhans cell surface membranes. *J Invest Dermatol* 82:535-537, 1984.
- Forster R, Schubel A, Breiffeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M: CCR7 coordinates the primary immune response by stabilizing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33, 1999.
- 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* 86:240-243, 1986.
- Frelinger JG, Hood L, Hill S, Frelinger JA: Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* 282:321-323, 1979.
- Friedmann PS: Disappearance of epidermal Langerhans cells during PUVA therapy. *Br J Dermatol* 105:219-221, 1931.
- Furue M, Chang CH, Tamaki K: Interleukin-1 but not tumor necrosis factor alpha synergistically upregulates the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced B7-1 expression of murine Langerhans cells. *Br J Dermatol* 135:194-198, 1996.
- Gairns FW: A modified gold chloride method for demonstration of nerve ending. *Quart J Micr Sci* 74:151-154, 1930.
- Gallego M, del Cacho E, Arnal C, Felices C, Iloret E, Bascuas JA: Immunocytochemical detection of dendritic cells by S-100 protein in the chicken. *Eur J Histochem* 36:205-213, 1992.
- Gallego M, Olah I, del Cacho E, Glick B: Anti-S-100 antibody recognizes ellipsoid-associated cells and other dendritic cells in the chicken spleen. *Dev Comp Immunol* 17:77-83, 1993.
- Ganassin RC, Bols NC: Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells. *Fish & Shellfish Immunol* 6:17-34, 1996.
- Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O: Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 187:961-966, 1998.
- Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, Molnar A, Wu P, Winandy S, Sharpe A: The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79:143-156, 1994.
- Giacometti L, Montagna W: Langerhans cells: Uptake of tritiated thymidine. *Science* 157:439-440, 1967.
- Gielen V, Schmitt D, Thiviolet 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* 280:131-136, 1988.
- Gilchrist B, Szabo G, Flynn E, Goldwyn RM: Chronologic and actinically induced aging in human facial skin. *J Invest Dermatol* 80(suppl):81s-85s, 1983.
- Girolomoni G, Cruz Jr PD, Bergstresser PR: Internalization and acidification of surface HLA-DR molecules by epidermal Langerhans cells: A paradigm of antigen processing. *J Invest Dermatol* 94:753-756, 1990.
- Girolomoni G, Santantonio ML, Pastore S, Bergstresser PR, Giannetti A, Cruz PD Jr: Epidermal Langerhans cells are resistant to the permeabilizing effects of extracellular ATP: *in vitro* evidence supporting a protective role of membrane ATPase. *J Invest Dermatol* 100:282-287, 1993.
- Gotheil 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. *Human Immunol* 15:164-174, 1986.
- Gotheil Y, Hanau D, Tsur H, Sharon N, Sahar E, Cazenave JP, Gazit E: T6 positive cells in the peripheral blood of burns patients: are they Langerhans cells precursors? *J Invest Dermatol* 90:142-148, 1988.
- Grabbe S, Bruvers S, Gallo RL, Knisely TL, Nazareno R, Granstein RD: Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J Immunol* 146:3656-3661, 1991.
- Griffiths RJ, Stam EJ, Downs JT, Otterness: ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells *in vivo*. *J Immunol* 154:2821-2828, 1995.

- Groves RW, Alien MH, Ross EL, Barkar JN, MacDonald DM: Tumor necrosis factor α is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br J Dermatol* 132:345-352, 1995.
- Gschnait F, Brenner W: Kinetics of epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 73:566-569, 1979.
- Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT: A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naïve T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:258-263, 1998.
- Gunn MD, Kyuwu S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H: Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189:451-460, 1999.
- Guo M, Gong S, Maric S, Misulovin Z, Park M, Mahnke K, Nussenzweig MC, Steinman RM: A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Hum Immunol* 61:729-738, 2000.
- Gurish MF, Lynch DH, Yowell R, Daynes RA: Abrogation of epidermal antigen-presenting cell function by ultraviolet radiation administered in vivo. *Transplantation* 36:304-309, 1983.
- Hackemann M, Grubb C, Hill KR: The ultrastructure of normal squamous epithelium of the human cervix uteri. *J Ultrastruct Res* 22:443-457, 1968.
- Haines KA, Flotte TJ, Springer TA, Gigli I, Thorbecke GJ: Staining of Langerhans cells with monoclonal antibodies to macrophages and lymphoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3448-3451, 1983.
- Hala K, Wick G, Boyd RL, Wolf H, Bock G, Ewert DL: The B-L (Ia-like) antigens of the chicken. Lymphocytes plasma membrane distribution and tissue localization. *Dev Comp Immunol* 8:673-682, 1984.
- Halliday GM, Muller K: Induction of tolerance via skin depleted of Langerhans cells by a chemical carcinogen. *Cell Immunol* 99:220-227, 1986.
- Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Stampf JL, Garaud JC, Bieber T, Grosshans E, Benezra C, Cazenave JP: Human epidermal Langerhans cells internalize by receptor-mediated endocytosis T6 (CD11"NA17/34") surface antigen. Birbeck granules are involved in the intracellular traffic of the T6 antigen. *J Invest Dermatol* 89:172-177, 1987.
- Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Garaud JC, Pauly G, Tomgio MM, Mayer S, Cazenave JP: Human epidermal Langerhans cells coinitalize 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* 84:2001-2005, 1987.
- Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Garaud JC, Pauly G, Cazenave JP: Appearance of Birbeck granule-like structures in anti-T6-antibody-treated human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 90:298-304, 1988.
- Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Lepoittevin JP, Stamp JL, Grosshans E, Benezra C, Cazenave JP: ATPase and morphologic changes in Langerhans cells induced by epicutaneous application sensitizing dose of DNFB. *J Invest Dermatol* 92:689-694, 1989.
- Hashimoto K, Tarnowski WM: Some new aspects of the Langerhans cell. *Arch Dermatol* 97:450-464, 1968.
- Hashimoto K: Lanthanum staining of Langerhans cell. Communication of Langerhans cell granules with extracellular space. *Arch Dermatol* 102:280-290, 1970.
- 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.
- Hauser C: Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity. *J Invest Dermatol* 95:436-440, 1990.
- Hayward AR: Development of lymphocyte responses and interactions in the human fetus and newborn. *Immunol Rev* 57:39-60, 1981.
- Heuflier C, Koch 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.
- Heuflier C, Topar G, Koch F, Trockenbacher B, Kampgen A, Romani N, Schuler G: Cytokine gene expression in murine epidermal cell suspension: interleukin 1 beta and macrophage inflammatory protein 1 alpha are selectively expressed in Langerhans cells but are differentially regulated in culture. *J Exp Med* 176:1221-1226, 1992.
- Hoefsmiit ECM: Macrophages, Langerhans cells, interdigitating and dendritic accessory cells: A summary. *Adv Exp Med Biol* 149:463-468, 1982.
- Hollis DE, Lyne AG: Acetylcholinesterase-positive Langerhans cells in the epidermis and wool follicles of the sheep. *J Invest Dermatol* 58:211-217, 1972.
- Holden CA, Kerdel FA, MacDonald DM: Lack of lysozyme, alpha-1-antitrypsin and alpha-1-antichymotripsin in normal Langerhans cells: Differentiation from cells of the monocyte-histiocyte-macrophage serie. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 62:513-514, 1982.
- Hopwood D, Logan KR, Bouchier IAD: The electron microscopy of normal human oesophageal epithelium. *Virch Arch B (Cell Pathol)* 26:345-358, 1978.
- Horton JJ, Allen MH, MacDonald DM: An assessment of Langerhans cell quantification in tissue sections *J Am Acad Dermatol* 11:591-593, 1984.
- Hoshino T, Kukita A, Sato S: Cells containing Birbeck granules (Langerhans cells granules) in the human thymus. *J Electron Microscop* 19:271-273, 1970.
- Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD: Regulation of Langerhans cell function

- by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 363:159-163, 1993.
- Hsiao L, Takeya M, Arao T, Takahashi K: 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* 93:780-786, 1989.
- Hutchens LH, Sagebiel RW, Clarke MA: Oral epithelial dendritic cells of the rhesus monkey-histologic demonstration, fine structure and quantitative distribution. *J Invest Dermatol* 56:325-336, 1971.
- Hynes RO: Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25, 1992.
- Inaba K, Schuler G, Witmer MD, Valiasky J, Atassi B, Steinman RM: Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J Exp Med* 164:605-613, 1986.
- Inaba K, Steinman RM, Witmer-Pack, 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, 1992a.
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM: 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, 1992b.
- Ishii M, Terao Y, Kitajima J, Hamada T: Sequential production of Birbeck granules through adsorptive pinocytosis. *J Invest Dermatol* 82:28-29, 1984.
- Ito K, Kawada A, Sato S, Kukita A: Langerhans cells in human apocrine ducts. *Arch Dermatol Res* 256:291-295, 1976.
- Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeu J, Saeland S, Fukuhara S, Ikehara S: CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 163:1409-1419, 1999.
- Jahnke V: Elektron Mikroskopische Befunde am Normalem Menschlichen Nasenrachenepithel. *Laryngol Rhinol Otol* 53:290-300, 1974.
- Jakob T, Udey MC: Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *J Immunol* 160:4067-4073, 1998.
- Jaksits S, Kriehuber E, Charbonnier AS, Rappersberger K, Stingl G, Maurer D: CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta1-dependent manner. *J Immunol* 163:4869-4877, 1999.
- 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: Histiocyte X positivity for nonspecific esterase. *J Histochem Cytochem* 28:45-46, 1980.
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman R, Nussenzweig MC: The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151-155, 1995.
- Jimbow K, Sato S, Kukita A: Cells containing Langerhans granules in human lymph nodes of dermatopathic lymphadenopathy. *J Invest Dermatol* 53:295-299, 1969.
- Jimbow K, Sato S, Kukita A: Langerhans cells of the normal human pilosebaceous system. An electron microscopic investigation. *J Invest Dermatol* 52:177-180, 1969.
- Kang K, Kubin M, Cooper KD, Lessin SR, Trinchieri G, Rook AH: IL-12 synthesis by human Langerhans cells. *J Immunol* 156:1402-1407, 1996.
- Kaplan G, Nusrat A, Witmer MD, Nath I, Cohn Z: Distribution and turnover of Langerhans cells during delayed immune responses in human skin. *J Exp Med* 165:763-766, 1987.
- Kapsenberg ML, Res P, Bos JD, Schootemiser A, Teunissen MB, Van Schooten W: Nickel-specific T lymphocytes 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.
- Kato M, Neil TK, Clark GJ, Morris CM, Sorg RV, Hart DN: cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells. *Immunogenetics* 47:442-450, 1998.
- Katz SI, Tamaki K, Sachs DH: Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282:324-326, 1979.
- Kaufman JF, Aufray C, Korman AJ, Shakelford DA, Strominger J: The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 36:1-13, 1984.
- Kellermann SA, Hudak S, Oldham ER, Liu YJ, McEvoy LM: The CC chemokine receptor-7 ligands 6CKine and macrophage inflammatory protein-3β are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol* 162:3859-3864, 1999.
- Khalil HM, Nitiuthai S, Allen J: Alkaline phosphatase-positive Langerhans cells in the epidermis of cattle. *J Invest Dermatol* 79:45-51, 1982.
- Kimber I, Kinnaird A, Peters SW, Mitchell JA: Correlation between lymphocyte proliferative responses and dendritic cell migration in regional lymph nodes following skin painting with contact-sensitizing agents. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 93:47-53, 1990.
- Kimber I, Cumberbatch M: Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor α (TNF-α). *J Invest Dermatol* 99:48s-50s, 1992.
- Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Bhushan M, Griffiths CEM: Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization. *Br J Dermatol* 142:401-412, 2000.

- Klareskog L, Malmnas-Tjerlund U, Forsum U, Peterson PA: Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268:248-250, 1977.
- Knight SC, Krejci J, Malkovsky M, Colizzi V, Gautman A, Asherson GL: The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizers. I. *In vivo exposure to antigen*. *Cell Immunol* 94:427-434, 1985.
- Kobayashi M, Hashimoto K: Occurrence of Birbeck granules in the macrophage of mouse lymph nodes. *J Electron Microsc* 25:248-250, 1977.
- Kobayashi Y, Staquet MJ, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D: Development of motility of Langerhans cells through extracellular matrix by *in vitro* hapten contact. *Eur J Immunol* 24:2254-2257, 1994.
- Kobayashi Y, Matsumoto M, Kotani M, Makino T: Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation. *J Immunol* 163:5989-5993, 1999.
- Koch F, Heuffler C, Kampgen E, Schneeweiss D, Bock G, Schuler G: Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, does not induce their functional maturation. *J Exp Med* 171:159-172, 1990.
- Kolde G, Knop J: Different cellular reaction after application of contact sensitizing, toxic, and tolerogenic compounds. A comparative ultrastructural and morphometric time-course. *Analysis*. *J Invest Dermatol* 89:19-23, 1987.
- Kondo Y: Macrophages containing Langerhans cells granules in normal lymph nodes of rabbit. *Z Zellforsch Mikr Anat* 98:506-511, 1969.
- Konecny P, Stagg AJ, Jebbari H, English N, Davidson RN, Knight SC: Murine dendritic cells internalize *Leishmania* major promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation *in vitro*. *Eur J Immunol* 29:1803-1811, 1999.
- Koyama Y, Nagao S, Ahashi K, Takahashi H, Marunouchi T: Sex differences in the densities of epidermal Langerhans cells of the mouse. *J Invest Dermatol* 88:541-544, 1987.
- Koyama Y, Nagao S, Ohashi K, Takahashi H, Marunouchi T: Effect of systemic and topical application of testosterone propionate on the density of epidermal Langerhans cells in the mouse. *J Invest Dermatol* 92:86-90, 1989.
- Kraal G, Breeil M, Janse M, Bruin G: Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163:981-987, 1986.
- Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C: Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 145:2833-2838, 1990.
- Kurimoto I, Grammer SF, Shimizu T, Nakamura T, Streilein JW: Role of F4/80+ cells during induction of hapten-specific contact hypersensitivity. *Immunology* 85:621-626, 1995.
- Langerhans P: Ueber die Nerven der Menschlichen Haut. *Archiv Pathol Anat Physiol Klin Med* 44:325-337, 1868.
- Larregina AT, Morelli AE, Kolkowski E, Fainboim L: Flow cytometric analysis of cytokine receptors on human Langerhans cells. Changes observed after short term culture. *Immunology* 87:317-325, 1996.
- Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM: Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 172:1483-1493, 1990.
- Le Varlet B, Dezutter-Dambuyant C, Staquet MJ, Delorme P, Schmitt S: Human epidermal Langerhans cells express integrins of the $\beta 1$ subfamily. *J Invest Dermatol* 96:518-522, 1991.
- Lebre MC, Kalinski P, Das PK, Everts V: Inhibition of contact sensitizer-induced migration of human Langerhans cells by matrix metalloproteinase inhibitors. *Arch Dermatol Res* 291:447-452, 1999.
- Leibl H, Hutterer J, Jorschan H, Schuler G, Tani M, Tschachler E, Romani N, Wolff K, Stingl G: Expression of the Ly-5 alloantigen system on epidermal cells. *J Invest Dermatol* 84:91-95, 1985.
- Lellouch-Tubiana A, Simon MT, Pfister A, Da Lange C: Aspects ultrastructuraux du trigone vésical humain. *Bull Ass Anat* 70:9-14, 1986.
- Lenz A, Heuffler C, Rammenssee HG, Glassl H, Koch F, Romani N, Schuler G: Murine epidermal Langerhans cells express significant amounts of class I major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7527-7531, 1989.
- Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N: Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest* 92:2587-2596, 1993.
- Lisi P: Investigation on Langerhans cells in pathological human skin. *Acta Derm Venereol* 53:425-428, 1973.
- Liu HH, Schroeter AL, Muller SA: OKT-6 is not superior to HLA-DR or ATPase as a marker for Langerhans cells in normal human epidermis. *Clin Exp Dermatol* 11:229-237, 1986.
- Lukas M, Stossel H, Hefel L, Imamura S, Fritsch P, Sepp NT, Schuler G, Romani N: Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessel in a skin organ-culture model. *J Invest Dermatol* 106:1293-1299, 1996.
- 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.
- Lyne AG, Chase HB: Branched cells in the epidermis of the sheep. *Nature* 209:1357-1358, 1966.
- Ma J, Wang JH, Guo YJ, Sy MS, Bigby M: *In vivo* treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 antibodies inhibits contact sensitization-induced migration of epidermal Langerhans cells to regional lymph nodes. *Cell Immunol* 158:389-399, 1994.
- Macatonia SE, Edwards AJ, Knight SC: Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 59:509-514, 1986.
- Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P: Localization of antigen on lymph node dendritic cells after

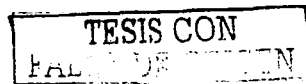
- exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med* 166:1654-1667, 1987.
- Mackenzen A, Herbst B, Köhler G, Wolff-Vorbeck G, Rosenthal F, Veelken H: Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitor cells in vitro. *Blood* 86:2699-2707, 1995.
- Mackenzie IC: Labelling of murine epidermal Langerhans cells with H_3 -thymidine. *Am J Anat* 144:127-136, 1975.
- 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.
- 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.
- Mackenzie IC, Bickenbach JR: Label-retaining keratinocytes and Langerhans cells in mouse epithelia. *Cell Tissue Res* 242:551-556, 1985.
- Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM: The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen-presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151:673-683, 2000.
- Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ: Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: Multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 184:1953-1962, 1996.
- Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, Caron D, Lebsack ME, McKenna HJ: *In vivo* generation of human dendritic cell subsets. *Blood* 96:878-884, 2000.
- Maryama T, Uda H, Yokoyama M: Localization of nonspecific esterase and endogenous peroxidase in the murine epidermis Langerhans cells. *Br J Dermatol* 103:61-66, 1980.
- Masson P: Pigment cells in man. In: *The Biology of melanosomes*. Ed. M. Gordon. Spec Publ NY Acad Sci 4:15-51, 1948.
- Maurer D, Stingl G: Dendritic cells in the context of skin immunity. In: Lotze MT, Thompson AW (eds). *Dendritic cells: Biology and Clinical Applications*. San Diego: Academic Press, pp11-122, 1999.
- McCorkle FM, Stinson RS, Olah I, Gluck B: The chicken's femoral-lymph nodes: T and B cells and the immune response. *J Immunol* 123:667-669, 1979.
- Miller Y: Ontogenesis of immunity of the human fetus. In: *The immunity of the human foetus and newborn infant*. Martinus Nijhoff, The Hague/Boston/London. pp12, 1983.
- Mizoguchi S, Takahashi K, Takeya M, Naito M, Morioka T: Development, differentiation, and proliferation of epidermal Langerhans cells in rat ontogeny studies by a novel monoclonal antibody against epidermal Langerhans cells, RED-1. *J Leukoc Biol* 52:52-61, 1992.
- Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M: Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 23:1595-1601.
- Mommaas AM, Mulder AA, Jordens R, Out C, Tan MC, Cresswell P, Kluin PM, Koning F: Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol* 29:571-580, 1999.
- Montagna W, Ellis RA: *The skin of primates. I. The skin of the potto (Periodicticus potto)*. *Am J Phys Antrop* 17:137-162, 1959.
- Montagna W, Yun JS: *The skin of primates. VII. The skin of the great bushbaby (Galago crassicaudatus)*. *Am J Phys Antrop* 20:149-166, 1962.
- Monti M: T6 and Ia-positive dendritic cells in 2nd trimester foetal skin (abstr). *J Invest Dermatol* 84:422, 1985.
- Moodycliffe AM, Kimber I, Norval M: Role of tumor necrosis factor- α in ultraviolet B light-induced dendritic cell migration and suppression of contact hypersensitivity. *Immunology* 81:79-84, 1992.
- Mooz W, Schondorf J, Mausie-Homburg E: Langerhans-Zellen im Tonsillenepithel. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd* 199:604-609, 1971.
- Morelli A, Larregina A, Chuluyan E, Kolkowski E, Fainboim L: Expression and modulation of CD88 on skin dendritic cells. Chemotactic effect of CD5a on skin migratory dendritic cells. *Immunology* 8:126-134, 1996.
- Murayama M, Yasuda H, Nishimura Y, Asahi M: Suppression of mouse contact hypersensitivity after treatment with antibodies to leukocyte function-associated antigen-1 and intercellular adhesion molecule-1. *Arch Dermatol Res* 289:98-103, 1997.
- Murphy GF, Bhan AK, Sato S, Harrist TJ, Mihm MC Jr: Characterization of Langerhans cells by the use of monoclonal antibodies. *Lab Invest* 45:465-468, 1981.
- Murphy GF, Bhan AK, Harrist TJ, Mihm MC Jr: In situ identification of T6 positive cells in normal human dermis by immunoelectron microscopy. *Br J Dermatol* 108:423-431, 1983.
- Mustakallio K: Adenosine triphosphatase activity in neural elements of human epidermis. *Exp Cell Res* 28:449-451, 1962.
- Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ: Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 151:6535-6540, 1993.
- Ngo VN, Tang HL, Cyster JG: Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* 188:181-191, 1998.

- Niebauer G, Krawczyk WS, Kidd RL, Wilgramm GF: Osmium Zinc Iodide reactive sites in the epidermal Langerhans cells. *J Cell Biol* 43:80-89, 1969.
- Niizeki H, Strelling JW: Hapten-specific tolerance induced by acute, low dose ultraviolet B radiation of skin is mediated via interleukin-10. *J Invest Dermatol* 109:25-30, 1997.
- Okamoto H, Kripke ML: Effector and suppressor circuits of the immune response are activated *in vivo* by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3841-3845, 1987.
- Olah I, Glick B: Avian lymph node: light and electron microscopic study. *Anat Rec* 205:287-299, 1983.
- Olah I, Glick B: Lymphocyte migration through the lymphatic sinuses of the chicken's lymph node. *Poult Sci* 64:159-168, 1985.
- Osada A, Nakashima H, Furue M, Tamaki K: Up-regulation of CD44 expression by tumor necrosis factor- α is neutralized by interleukin-10 in Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 105:124-127, 1995.
- Ozawa H, Nakagawa S, Tagami H, Aiba S: Interleukin-1 β and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediate Langerhans cell maturation differently. *J Invest Dermatol* 106:441-445, 1996.
- Ozawa H, Aiba S, Nakagawa S, Tagami H: Interferon-gamma and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur J Immunol* 26:648-652, 1996.
- Peguet-Navarro J, Moulon C, Caux C, Dalbiez-Gauthier C, Banchereau J, Schmitt D: Interleukin 10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 24:884-891, 1994.
- Peleteiro MC & Richards RH: Identification of lymphocytes in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 8:161-162, 1985.
- Pérez-Torres A, Millán Aldaco D: Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis. *J Anat* 184:591-596, 1994.
- Pérez-Torres A, Millán D, Rondán A: Epidermal Langerhans cells in the terrestrial turtle, *Kinosternum integrum*. *Dev Com Immunol* 19:225-236, 1995.
- Pérez-Torres A, Ustarroz-Cano M: Demonstration of Birbeck (Langerhans cells) granules in the normal chicken epidermis. *J Anat* 199:493-497, 2001.
- Pérez-Torres A, Zárate-Garduño Laura, Ustarroz-Cano M: Diferencias sexuales posteclosión en las células de Langerhans epidérmicas del pollo doméstico (*Gallus gallus*). *Lab-acta* 14:107-111, 2002.
- Pérez-Torres A, Ustarroz-Cano, Millán-Aldaco D: Langerhans cells-like dendritic cells in the cornea, tongue and oesophagus of the chicken (*Gallus gallus*). *Accepted Histochem J*, 2003.
- Perregaux D, Gabel CA: Interleukin-1 β maturation and release in response to ATP and nigericin. *J Biol Chem* 269:15195-15203, 1994.
- Phanuphak P, Moorhead JW, Claman HN: Tolerance and contact hypersensitivity to DNFB in mice. I. *In vivo* detection by ear swelling and correlation with *in vitro* cell stimulation. *J Immunol* 112: 115-123, 1974.
- 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.
- Picut CA, Lee CS, Dougherty EP, Anderson KL, Lewis RM: Immunostimulatory capabilities of highly enriched Langerhans cells *in vitro*. *J Invest Dermatol* 90:201-206, 1988.
- Pope M, Betjes MG, Hirmand H, Hoffman N, Steinman RM: Both dendritic cells and memory T lymphocytes emigrate from organ cultures of human skin and form distinctive dendritic-T-cell conjugates. *J Invest Dermatol* 104:11-17, 1995.
- Porcelli SA, Modlin RL: The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17:297-329, 1999.
- Price AA, Cumberbatch M, Kimber I, Ager A: $\alpha 6$ integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J Exp Med* 186:1725-1735, 1997.
- Prigozy TI, Sieling PA, Clemens D, Steward PL, Behar SM, Porcelli SA, Brenner MB, Modlin RL, Kronenberg M: The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* 6:187-297, 1997.
- Progador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN: Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8 $^{+}$ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 188:1075-1082, 1998.
- Pruneiras M: Interactions between keratinocytes and dendritic cells. *J Invest Dermatol* 52:1-17, 1969.
- Ptak W, Rozycka D, Askenase PW, Gershon RK: Role of antigen-presenting cells in the development and persistence of contact hypersensitivity. *J Exp Med* 151:362-375, 1980.
- Rambukkana A, Bos JD, Irik D, Menko WJ, Kapsenberg ML, Das PK: *In situ* behavior of human Langerhans cells in skin organ culture. *Lab Invest* 73:521-531, 1995.
- Rambukkana A, Pistor FH, Bos JD, Kapsenberg ML, Das PK: Effects of contact allergens on human Langerhans cells in skin organ culture, migration, modulation of cell surface molecules, and early expression of interleukin-1 β protein. *Lab Invest* 74:422-436, 1996.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M, Sugawara I, Hoffman L, Steinman RM, Muller WA: A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from the skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6924-6929, 1998.
- Rasanen L, Lehto M, Jansen C, Reunala A, Leinikki P: Human epidermal Langerhans cells and peripheral blood monocytes. Accessory cell function, autoactivating and alloactivating capacity and ETAF/IL-1 production. *Scan J*

- Immunol 24:503-508, 1986.
- Ratzinger G, Stoitzner P, Lutz MB, Schuler G, Senior RM, Shipley JM, Fritsch P, Romani N: Effect of matrix metalloproteinases on migration of murine cutaneous dendritic cells (abstract). Arch Dermatol Res 292:74, 2000.
- Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, Lutz MB, Layton GT, Rainer C, Senior RM, Shipley JM, Fritsch P, Schuler G, Romani N: Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. J Immunol 168:4361-4371, 2002.
- Rausch E, Kaiserling E, Goots M: Langerhans cells and interdigitating reticulum cells in the thymus-dependent region in human dermatopathic lymphadenitis. Virch Arch B (Cell Pathol) 25:327-343, 1977.
- Rawles ME: Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. Physiol Zool 20:248-266, 1948.
- Reams WM, Tompkins SP: A developmental study of murine epidermal Langerhans cells. Dev Biol 31:114-123, 1973
- Res P, Kapsenberg ML, Bos JD, Stiekema F: The crucial role of human dendritic antigen-presenting cell subsets in nickel-specific T-cell proliferation. J Invest Dermatol 88:550-554, 1987.
- Richard S, Barbey S, Pfister A, Scheinmann P, Jaubert F, Nezelof C: Mise en évidence de cellules de Langerhans dans l'épithélium bronchique humain. CR Acad Sci Paris 305:35-39, 1987.
- Richters CD, Hoekstra MJ, Vaan Baane J, Du Pont JS, Hoefsmid EC, Kamperdijk EW: Migratory properties and functional capacities of human skin dendritic cells. Br J Dermatol 133:721-727, 1995.
- Rieger A, Binghe W, Kilgus O, Ochiai K, Mauere D, Fodinger D, Kinet SP, Stingl G: Fc epsilon RI mediates IgE binding to Langerhans cells. J Invest Dermatol 99:30s-32s, 1992.
- 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.
- Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM: Systemic lipopolysaccharide recruits dendritic cell progenitors to nonlymphoid tissues. Transplantation 59:1319-1324, 1995.
- Rodríguez EM, Caorli I: A second look at the ultrastructure of the Langerhans cell of the human epidermis. J Ultrastruct Res 65:279-295, 1978.
- Romani N, Stingl G, Tschachler E, Witmer 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 161:1368-1383, 1985.
- Romani N, Schuler G, Fritsch P: Ontogeny of Ia-positive and Thy-1-positive leukocytes of murine epidermis. J Invest Dermatol 86:129-133, 1986.
- Romani N, Lenz A, Glassl H, Stössel H, Stanzl U, Majdic O, Fritsch P, Schuler G: Culture Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. J Invest Dermatol 93:600-609, 1989.
- Romani N, Schuler G, Fritsch P: Identification and phenotype of epidermal Langerhans cells. In: Schuler G (Ed). Epidermal Langerhans cells. Boca Raton. CRC Press, capítulo 3, pp 49-86, 1991.
- Rowden G: Ultrastructural studies of keratinized epithelia of the mouse. I. Combined EM and cytochemical studies of lysosomes in mouse epidermis and esophageal epithelium. J Invest Dermatol 49:181-187, 1967.
- Rowden G, Lewis MG, Sullivan AL: Ia antigens on human epidermal Langerhans cells. Nature 268:2470-248, 1977.
- Rowden G: The Langerhans cell. CRC Critical Reviews in Immunology 3:95-180, 1981.
- Runge W, Younger B, Zelickson AS: Optical transforms of epidermal Langerhans cell granules. J Invest Dermatol 77:421-429, 1981.
- Ryffel B, Brockhaus M, Greiner B, Mihatsch MJ, Gudat F: Tumor necrosis factor receptor distribution in human lymphoid tissue. Immunology 74:446-452, 1991.
- Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST: Cutting edge: Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. J Immunol 162:2472-2475, 1999.
- Sagebiel RW, Reed TM: Serial reconstruction of the characteristic granules of the Langerhans cell. J cell Biol 36:595-602, 1968.
- Sallusto F, Scharnel P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A: Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. Eur J Immunol 28:2727-2760, 1998.
- Sallusto F, Lanzavecchia A: Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. J Exp Med 189:611-614, 1999.
- Santiago-Schwartz F, Belilos E, Diamond B, Carsons SE: TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. J Leukoc Biol 52:274-281, 1992.
- Sato K, Imai Y, Irimura T: Contribution of dermal macrophage trafficking in the sensitization phase of contact hypersensitivity. J Immunol 161:6835-6844, 1998.
- Sato N, Ahuja SK, Quinones M, Kosteki V, Reddick RL, Melby PC, Kuziel WA, Ahuja SS: CC chemokine receptor (CCR) 2 is required for Langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells: Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, B cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. J Exp Med 192:205-218, 2000.
- Saunders D, Lukas K, Ismaili J, Wu L, Maraskovsky E, Dunn A, Shortman K: Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med 184:2185-2196, 1996.
- Scheibner A, McCarthy WU, Milton GW, Nordlund JJ: Langerhans cell and melanocyte distribution in "normal" human epidermis: preliminary report. Aust J Dermatol 24:9-16, 1983

- Schmitt DA, Dezutter-Dambuyant C, Brochier J, Thivolet J: Subclustering of CD1 monoclonal antibodies based on the reactivity on human Langerhans cells. *Immunol Letters* 12:231-235, 1986.
- Schmitt DA, Bierber T, Cazenave JP, Hanau D: Fc receptors of human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 94 (Suppl): 15s-21s, 1990.
- Schreiber S, Kilgus O, Payer E, Kutlil R, Elbe A, Mueller C, Stingl G: Cytokine pattern of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures. *J Immunol* 149:3524-3534, 1992.
- Schwarzenberger K, Udey MC: Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ. *J Invest Dermatol* 106:553-558, 1996.
- Schwesler J, Marks F: A developmental study of the distribution and frequency of Langerhans cells in relation to formation of patterning in mouse tail epidermis. *J Invest Dermatol* 69:198-204, 1977.
- Schwesler J: Langerhans cell-free regions in orthokeratinizing sole-of-foot epidermis of the adult mouse. *Arch Dermatol Res* 268:157-166, 1980.
- Shapiro SD: Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: Biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 10:602-608, 1998.
- Shelley WB, Juhlil L: Selective uptake of contact allergens by the Langerhans cells. *Arch Dermatol* 113: 187, 1977.
- Shelley WB, Juhlil L: Langerhans cells form a reticuloepithelial trap for external contact antigens. *Nature* 261:46-47, 1978.
- Shelley WB, Juhlil L: The Langerhans cells. Its origin, nature, and function. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. Suppl 79:7-22, 1978.
- Shimada S, Katz SI: TNP-specific Lyt-2+ cytolytic T cell clones preferentially respond to TNP-conjugated epidermal cells. *J Immunol* 135:1558-1563, 1985.
- Shornick LP, De Togni P, Mariathasan S, Goellner J, Strauss-Schoenberger J, Karr RW, Ferguson TA, Chaplin DD: Mice deficient in IL-1 β manifest impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene. *J Exp Med* 183:1427-1436, 1996.
- Schulter G, Steinman RM: Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 161:526-546, 1985.
- Silberberg I: Ultrastructural studies of Langerhans cells in contact sensitive and primary irritant reactions to mercuric chloride. *Clin Res* 19:715 (Abst), 1971.
- Silberberg I: Apposition of the mononuclear cells to Langerhans cells in contact allergic reactions. An ultrastructural study. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 53:1-12, 1973.
- Silberberg I, Baer RL, Rosenthal SA: Circulating Langerhans cells in dermal blood cells. *Acta Derm Venereol (Stockholm)* 54:81-86, 1974.
- Silberberg I, Baer RL, Rosenthal SA, Thorbecke GJ, Berezowsky V: Dermal and intravascular Langerhans cells at sites of passively induced allergic contact sensitivity. *Cell Immunol* 18:435-453, 1975.
- Silberberg I, Thorbecke GJ, Baer RL, Rosenthal SA, Berezowsky V: Antigen-bearing Langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes. *Cell Immunol* 25:137-151, 1976.
- Silberberg I, Baer RL, Rosenthal SA: The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and the guinea pigs. *J Invest Dermatol* 66:210-217, 1976.
- Silberberg-Sinakin I, Baer RL, Thorbecke GJ: Langerhans cells. A review of their nature with emphasis on their immunologic functions. *Prog Allergy* 24:268-294, 1978.
- Silvers WK: A histological and experimental approach to determine the relationship between gold-impregnated dendritic cells and the melanocytes. *Am J Anat* 100:225-240, 1957.
- Sinigaglia F: The molecular basis of metal recognition by T cells. *J Invest Dermatol* 102:308, 1994.
- Skobe M, Detmar M: Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Invest Dermatol*, Symposium Proceeding 5:14-19, 2000.
- Sontheimer RD, Stasny P, Nunez G: HLA-D region antigen expression by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 87:707-710, 1986.
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonocchi R, Mantovani A: Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161:1083-1086, 1998.
- Steinbrink K, Wolff M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH: Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159:4772-4780, 1997.
- Steiner G, Wolff K, Pehamberger H, Stingl G: Epidermal cells as accessory cells in the generation of allo-reactive and hapten-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. *J Immunol* 134:738-741, 1985.
- Steinman RM, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-1161, 1973.
- Sterry W, Steigleder GK: Acid nonspecific esterase in human Langerhans cells. *J Cutan Pathol* 6:476-478, 1979.
- Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Gschnait F, Knapp W, Wolff K: Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268:245-246, 1977.
- Stingl G, Katz SI, Clement L, Green I, Shevach EM: Immunologic Functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 121:2005-2013, 1978.
- 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* 127:1707-1713, 1981.
- Stoitzner P, Koch F, Janke K, Romani N: Differential effects of TNF- α in the migration of murine Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 109:265 (abstract), 1997.
- Stoitzner P, Ratzinger G, Koch F, Janke K, Schöller T, Kaser A, Tilg H, Cruikshank WW, Fritsch P, Romani N: Interleukin-16 supports the migration of Langerhans cells, partly in a CD4-independent way. *J Invest Dermatol* 116:641-649, 2001.
- Stoitzner P, Pfaller K, Stössel H, Romani N: A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol* 118:117-125, 2002.
- Stoitzner P, Holzmann S, McLellan AD, Ivarsson L, Stössel H, Kapp M, Kämmerer U, Douillard P, Kämpgen E, Koch F, Saeland S, Romani N: Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin (CD 207). *J Invest Dermatol* 120:266-274, 2003.
- Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Müller G, Yamauchi H, Kurimoto M, Knop J, Enk AH: Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol* 28:3231-3239, 1998.
- Streilein JW: Skin-associated lymphoid tissue (SALT): Origin and function. *J Invest Dermatol* 80:125-130, 1983.
- Streilein JW, Wood PJ, Lonsberry LV, Bergstresser PR: Hapten-derivatized skin grafts induce H-2 restricted contact hypersensitivity. Evidence that the immunological signal includes H-2 determinants derived from skin. *Transplantation* 37:195-201, 1984.
- Streilein JW: Antigen-presenting cells in the induction of contact hypersensitivity in mice: evidence that Langerhans cells are sufficient but not required. *J Invest Dermatol* 93:443-449, 1989.
- Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Kromer E, Eibe A, Maurer D, Stingl G: Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87:1292-1302, 1996.
- Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G: A skin homing molecule defines the Langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 185:1131-1136, 1997.
- Sullivan S, Streilein JW, Bergstresser PR, Tigelaar RE: Hapten-derivatized, purified epidermal Langerhans cells induce hypersensitivity without downregulation. *J Invest Dermatol* 82:440, 1984.
- Sullivan S, Bergstresser PR, Streilein W: Intravenously injected, TNP-derivatized, Langerhans cell-enriched epidermal cells induce contact hypersensitivity in Syrian hamsters. *J Invest Dermatol* 84:249-252, 1985.
- Sullivan S, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Streilein JW: Induction and regulation of contact hypersensitivity by resident, bone marrow-derived, dendritic epidermal cells: Langerhans cells and Thy-1+ epidermal cells. *J Immunol* 137:2460-2467, 1986.
- Swiggard WJ, Mirza A, Nussenzweig MC, Steinman RM: DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cell Immunol* 165:302-311, 1995.
- Takahashi S, Hashimoto K: Derivation of Langerhans cell granules from cytomembrane. *J Invest dermatol* 80:345A, 1986.
- Takayama K, Yokozeki H, Ghoreishi Msatoh T, Katayama I, Umeda T, Nishioka K: IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through downregulation of TNF receptor II expression. *J Invest Dermatol* 113:541-546, 1999.
- 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.
- Tamaki K, Stingl G, Gullino M, Sachs DH, Katz SI: Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cells. *J Immunol* 123:784-787, 1979.
- Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC: Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361:82-85, 1993.
- Tarnowski WM, Hashimoto K: Langerhans cells granules in histiocytosis X. *Arch Dermatol* 96:298-304, 1967.
- Thiers BH, Maize JC, Spicer SS, Cantor AB: The effect of aging and chronic sun exposure on human Langerhans cell population. *J Invest Dermatol* 82:223-226, 1984.
- Thomas WR, Edwards AJ, Watkins MC, Asherson GL: Distribution of immunogenic cells after painting with the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate and oxazolone. Different sensitizers form immunogenic complexes with different cell populations. *Immunology* 39:21, 1980.
- Thomas JA, Biggerstaff M, Sloane JP, Easton DF: Immunological and histochemical analysis of regional variations of epidermal Langerhans cells in normal human skin. *Histochem J* 16:507-519, 1984.
- Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW: Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* 124:445-453, 1980.
- Uchi H, Imayama S, Kobayashi Y, Furue M: Langerhans cells express matrix metalloproteinase-9 in the human epidermis. *J Invest Dermatol* 111:1232-1233, 1998.
- Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin JJ, Dezutter-Dambuyant C, Vincent C, Massacrier C, Vincent J, Yoneda K, Banchereau J, Caux C, Davoust J, Saeland S: The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* 29:2695-2704, 1999.
- Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecqec S, Saeland S: Langerin is a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12:71-81, 2000



- Van de Rijn M, Lerch PG, Bronstein BR, Knowles RW, Bhan AK, Terhorst C: Human cutaneous dendritic cells express two glycoproteins T6 and M241, which are biochemically identical to those found on cortical thymocytes. *Human Immunol* 9:201-210, 1984.
- Van Wilsem EUG, Brevé J, Kleijmeer M, Kraal G: Antigen-bearing Langerhans cells in skin draining lymph nodes: Phenotype and kinetics of migration. *J Invest Dermatol* 103:217-220, 1994.
- Vantrappen L, Geboes K, Missotten L, Maudgal PC, Desmet V: Lymphocytes and Langerhans cells in normal human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:320-325, 1985.
- Vermeer M, Streilein JW: Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans cells mediated in part by tumor necrosis factor-alpha. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 7:258-265, 1990.
- Vernon ML, Fountain L, Krebs HM, Horta-Barbosa L, Fuccillo DA, Sever JL: Birbeck granules (Langerhans cell granules) in human lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 60:771-779, 1973.
- Volc-Platzer B, Stingl G, Wolff K, Hintenberg W, Schnedern W: Cytogenetic identification of allogeneic epidermal Langerhans cells in bone marrow graft recipient. *N Eng J Med* 310:1123-1124, 1984.
- Wang BH, Kondo S, Shivji GM, Fujisawa H, Mak TW, Sauder DN: Tumor necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans' cells. *Immunology* 88:284-288, 1996.
- Wang BH, Fujisawa H, Zhuang LH, Kondo S, Shivji GM, Kim CS, Mak TW, Sauder DN: Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *J Immunol* 159:6148-6155, 1997.
- Wang B, Zhuang L, Fujisawa H, Shinder GA, Feliciani C, Shivji GM, Susuki H, Amerio P, Toto P, Sauder DN: Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. *J Immunol* 162:277-283, 1999.
- Wang M, Qin X, Mudgett JS, Ferguson TA, Senior RM, Welgus HG: Matrix metalloproteinase deficiencies affect contact hypersensitivity: stromelysin-1 deficiency prevents the response and gelatinase B deficiency prolongs the response. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6885-6889, 1999.
- Warchol JB, Brelinska R, Jaroszewski J: Granules of Langerhans cells in the thymus contain gold. *Experientia* 40:75-76, 1984.
- Waterhouse JP, Squier CA: The Langerhans cell in human gingival epithelium. *Arch Oral Biol* 12:341-348, 1967.
- Watts C: Capture and processing of exogenous antigens for presentation on CPH molecules. *Annu Rev Immunol* 15:821-850, 1997.
- Weinlich G, Sepp N, Koch F, Schuler G, Romani N: Evidence that Langerhans cells rapidly disappear from the epidermis in response to contact sensitizers but not to tolerogen/nonsensitizers. *Arch Dermatol Res* 281:556A, 1989.
- Weinlich G, Heine M, Stössel H, Zanella M, Stoitzner P, Ortner U, Smolle J, Koch F, Sepp NT, Schuler G, Romani N: Entry into afferent lymphatics and maturation *in situ* of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J Invest Dermatol* 110:441-448, 1998.
- Weiss LW, Zelickson AS: Embryology of the epidermis: ultrastructural aspects. III. Maturation and primary appearance of dendritic cells in the mouse with mammalian comparisons. *Acta Derm Venereol (stockholm)* 55:431, 1975.
- Weiss JM, Sleeman J, Renkl AC, Dittmar H, Termeer CC, Taxis S, Howells N, Hoffman M, Kohler G, Schopf E, Ponta H, Herrlich P, Simon JC: An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. *J Cell Biol* 137:1137-1147, 1997.
- Weiss JM, Renkl AC, Sleeman J, Dittmar H, Termeer CC, Taxis S, Howells N, Schopf E, Ponta H, Herrlich P, Simon JC: CD44 variant isoforms are essential for the function of epidermal Langerhans cells and dendritic cells. *Cell Adhesion Comm* 6:157-160, 1998.
- White RG: The structural organisation of avian lymphoid tissues. In: *Avian Immunology*, Ed. Rose ME, Payne LN, Freeman BM. Edinburgh, British Pultry Science Ltd. pp 21-46, 1981.
- Wick G, Hala K, Wolf H, Boyd RL, Schavenstein K: Distribution and functional analysis of B-L/la-positive cells in the chicken: expression of B-L/la antigens on thyroid epithelial cells in spontaneous autoimmune thyroiditis. *Mol Immunol* 21:1259-1265, 1984.
- Witmer-Pack MD, Olivier W, Valinsky J et al.: Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 166: 1484-1498, 1987.
- Witmer-Pack MD, Valinsky J, Olivier W, Steinman RM: Quantification of surface antigens on culture murine epidermal Langerhans cells: rapid and selective increase in the level of surface CPH products. *J Invest Dermatol* 90:387-394, 1988.
- Wolff K: Zur Enzymaktivität in den Langerhansschen zellen. *Arch Klin Exp* 218:446, 1964.
- Wolff K: The fine structure of the Langerhans cell granule. *J Cell Biol* 35:468-473, 1967.
- Wolff K, Winkelmann RK: Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 48:50-54, 1967.
- Wolff K, Winkelmann RK: Quantitative studies on the Langerhans cell population of guinea pig epidermis. *J Invest Dermatol* 48:504-513, 1967.
- Wolff K: The Langerhans cell. *Curr Probl Dermatol* 4:79-145, 1972.
- Wolff K, Konrad K: Phagocytosis of latex beads by epidermal keratinocytes *in vivo*. *J Ultrastruct Res* 39:262-280, 1972.
- Wood J, O'Mahony JB, Falder SB, Rodrick ML, D'Eon P, Mannic KJA: Circulating T6 antigen positive cells. *J Invest Dermatol* 82:387-388, 1984.

- Wood GS, Morhehn VB, Butcher EC, Kosek J: Langerhans cells react with pan-leukocyte monoclonal antibody: ultrastructural documentation using a live cell suspension immunoperoxidase technique. *J Invest Dermatol* 82:322-325, 1984.
- Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, Georgopoulos K: Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 7:483-492, 1997.
- Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H, Yamaguchi Y: EB1/C9orf7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* 161:3096-3102, 1998.
- Yasuda K, Aoki T, Montagna W: The skin of primates. IV. The skin of the lesser bushbaby (*Galago senegalensis*). *Am J Phys Antrop* 19:23-34, 1961.
- Younes MS, Robertson EM, Bencosme SA: Electron microscope observations on Langerhans cells in the cervix. *Am J Obstet Gynecol* 102:397-403, 1968.
- York IA, Rock KL: Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-396, 1996.
- skin capillaries. *J Am Acad Dermatol* 1:265-266, 1979.
- Zelickson AS: The Langerhans cell. *J Invest Dermatol* 44:201-210, 1965.
- Zelickson AS: Langerhans cells in normal human skin capillaries. *J Am Acad Dermatol* 1:265-266, 1979.
- Zeng AH, Castano AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA: Crystal structure of mouse CD1: An CPH-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 277:339-345, 1997.
- Zhang Y, Harada A, Wang JB, Zhang YY, Hashimoto S, Naito M, Matsushima K: Bifurcated dendritic cell differentiation *in vivo* from murine lineage phenotype-negative c-kit⁺ bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 92:118-126, 1998.
- Zlotnik A, Yoshie O: Chemokines: A new classification and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127, 2000.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN