

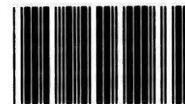
DEMOSTRACION DE PROTEINA S-100 EN CELULAS DEL EPITELIO  
GINGIVAL Y SU UTILIZACION COMO MARCADOR  
CELULAR

por

C.D.M.O. Filiberto Enriquez Habib

**ENRIQUEZ  
HABIB  
FILIBERTO  
1985**

**TESIS**



**K(1) UNAM**

TESIS



Facultad de Odontología  
Div. de Est. de Posgrado e Investigación  
Biblioteca "Barnet M. Levy"

Presentada como requisito para obtener el Grado de  
Doctorado en Ciencias Odontológicas  
(Oclusión)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Febrero 1985



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Cualquier tesis no publicada postulando para el grado de Doctorado y depositada en la biblioteca de la Universidad, Facultad de Odontología, queda abierta para inspección, y solo podrá ser usada con la debida autorización del autor. Las referencias bibliográficas pueden ser tomadas, pero ser copiadas solo con el permiso del autor, y el crédito se da posteriormente a la escritura y publicación del trabajo.

Esta tesis ha sido utilizada por las siguientes personas, que firman y aceptan las restricciones señaladas.

La biblioteca que presta esta tesis debe asegurarse de recoger, la firma de cada persona que la utilice.

Nombre y Dirección:

---

---

---

---

---

---

---

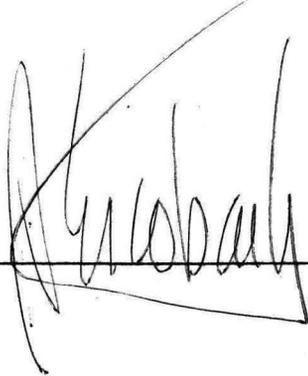
---

---

---

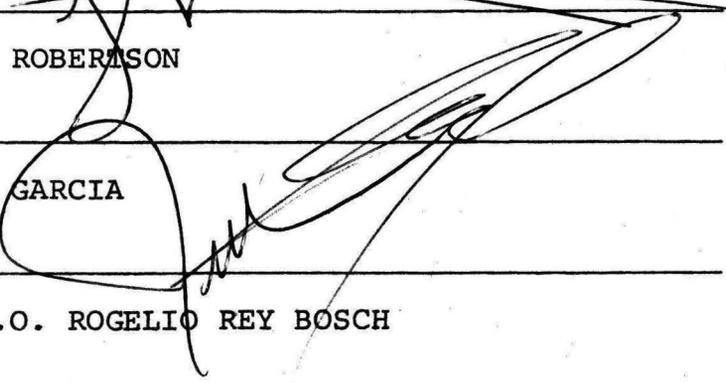
DEMOSTRACION DE PROTEINA S-100 EN CELULAS DEL EPITELIO  
GINGIVAL Y SU UTILIZACION COMO MARCADOR  
CELULAR

Aprobada por:

\_\_\_\_\_   
Dr. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIERREZ

\_\_\_\_\_   
D.C.O. JAIME OSTRIA GONZALEZ

\_\_\_\_\_   
D.C.O. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

\_\_\_\_\_   
D.C.O. MANUEL SAAVEDRA GARCIA

\_\_\_\_\_   
Director de Tesis: D.C.O. ROGELIO REY BOSCH

## RECONOCIMIENTOS

A mis padres:

Filiberto Enriquez F.

Nayma H. de Enriquez

A mis hermanos:

A mi esposa:

Ma. Guadalupe Marín de Enriquez

Al Dr. Manuel Rey García

Dr. Rogelio Rey Bosch

Dr. Rogelio Herrera Echauri

Dr. Alejandro Escobar G.

Dr. Antonio Alvarez M.

A la U.N.A.M.

## I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LA LITERATURA.....	6
MATERIALES Y METODOS.....	22
RESULTADOS.....	29
DISCUSION.....	42
CONCLUSIONES.....	46
RESUMEN.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	49
CURRICULUM VITAE.....	65

## I N T R O D U C C I O N

El tejido periodontal enfermo muestra como una característica constante, la presencia de un infiltrado inflamatorio denso - compuesto por células inmunocompetentes que pueden ser activadas desde etapas tempranas del padecimiento (1-3).

Las interacciones que ocurren entre estas células y los productos de los microorganismos que forman la placa bacteriana, dan como resultado el establecimiento de mecanismos efectores inmunológicos y otros de origen no específico que actúan como mediadores del daño que sufre el periodonto (4-8).

Los efectos potenciales que se derivan de la activación de estos diferentes sistemas que pueden participar en las enfermedades periodontales (E.P.) han sido estudiados en forma amplia (9-12), sin embargo, el conocimiento que se tiene no permite establecer la importancia de la participación relativa de cada uno de ellos.

La dificultad que ha representado la identificación y la naturaleza de los componentes celulares inmunocompetentes que están presentes en diversos procesos, ha ocasionado que el conocimiento que se tiene de esto resulta poco profundo y básicamente permanece a un nivel de identificación morfológica.

Actualmente estas limitaciones se han ido superando a medida que se han logrado utilizar diferentes marcadores celulares para la identificación de poblaciones celulares inmunocompetentes con propiedades funcionales definidas (13-15). De esta manera, la investigación en áreas donde confluyen la inmunología y la biología celular ha logrado grandes avances.

Una gran parte de este desarrollo se ha debido a la repercusión de los trabajos de Köhler y Milstein (1975). Estos investigadores lograron demostrar por medio de la fusión de células de mieloma de ratón con células linfoides de bazo de ratones inmunizados, que los híbridos resultantes originan clonas que secretan anticuerpos mono-específicos para cada uno de los antígenos empleados en la inmunización (16-17).

Los híbridos celulares obtenidos por este procedimiento pueden ser separados y mantenidos indefinidamente en cultivo (18) disponiendo con ello de una fuente prácticamente inagotable de anticuerpos monoclonales (AcMc) de especificidad conocida dirigida hacia un solo determinante antigénico.

La tecnología de los AcMc ha tenido una gran penetración resultando de particular importancia en campos relacionados al inmuno diagnóstico, la purificación de antígenos y la identificación de determinantes antigénicos presentes en las membranas-

de células humanas, animales y bacterianas (19-22).

Los adelantos obtenidos en relación al análisis y separación de poblaciones celulares por medio de la identificación de marcadores antigénicos de membrana exclusivos para cada estirpe celular, han permitido conocer con mayor profundidad el comportamiento en la respuesta inmunológica (RI) de cada uno de los elementos que participan (23-25).

Algunas de estas células del sistema inmunológico, como los linfocitos T, se han ido subdividiendo de acuerdo con algunas de sus características funcionales identificadas por la expresión de diferentes moléculas de superficie que resultan exclusivas para cada subpoblación (26-28). Otras células, como las de Langerhans presentes en los epitelios y otros tejidos, pueden ser ahora identificadas mediante antisueros que proporcionan un elevado grado de confiabilidad (29-31).

Las células de Langerhans (C.L.), que durante mucho tiempo permanecieron sin que fueran conocidas sus funciones, son consideradas ahora como un componente importante del sistema inmunológico con la capacidad para presentar antígenos (32) y controlar el paso de linfocitos T en epitelios (33).

Esta capacidad para actuar en epitelios como un análogo funcio-

nal de los macrófagos en la captación de antígenos, representa una nueva área de investigación que seguramente permitirá comprender con mayor claridad los mecanismos de expresión local de la respuesta inmunológica.

Recientemente, se han conocido marcadores específicos que son utilizados para la identificación de las C.L., entre los cuales se encuentran:

- 1) El anticuerpo monoclonal anti-T-6 (OKT-6, Ortho Pharmaceutical), con especificidad para antígenos presentes en las membranas de células tímicas normales, pero que también reconocen a un antígeno similar de la membrana plasmática de las C.L.
  
- 2) Los anticuerpos monoclonales con especificidad para moléculas DR (HLA tipo II) que están presentes en células inmunocompetentes. En relación a los epitelios las células de Langerhans parecen ser las únicas células residentes que expresan este antígeno, por lo cual el empleo de este marcador es altamente específico.
  
- 3) La proteína S-100, presente en el citoplasma de algunas células normales y tumorales.- Esta proteína se consideró inicialmente como exclusiva para células del sistema nervioso central,

sin embargo, se han acumulado evidencias de que puede estar presente en otras células no relacionadas, como ocurre con los melanocitos y células de Langerhans en la piel-(34-36).

Dentro de los objetivos fijados en el presente trabajo se encuentra, la demostración preliminar por medio de técnicas inmunohistoquímicas de la existencia de protefán S-100 en células del epitelio gingival, así como la posibilidad de utilizar una doble reacción tintoreal para diferenciar en un mismo campo de una muestra de epitelio: queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans.

De igual forma se intenta realizar un análisis del valor de la proteína S-100 para ser utilizado como una ayuda en el diagnóstico de diferentes patologías y en el desarrollo de modelos de experimentación.

## REVISION DE LA LITERATURA

Se realizó una revisión bibliográfica, con el objeto de proporcionar un marco teórico elemental en relación a los campos de investigación citados en este trabajo.

Los tópicos generales que enmarcan este capítulo se describen en los siguientes incisos: 1) Células de Langerhans. 2) Anticuerpos monoclonales y 3) Proteína S-100.

### CELULAS DE LANGERHANS

En 1968 Paul Langerhans describió una célula dendrítica que se encuentra presente en la epidermis y que se pensó era un elemento sensorial con receptores extra-cutáneos para el sistema nervios (37). Estas células han sido poco estudiadas debido a su dificultad para ser analizadas por métodos convencionales.

EN los mamíferos, las C.L., son encontradas en la mayoría de los epitelios escamosos incluyendo la piel (38), mucosa oral (39) esófago, vagina y mucosa del recto (40). Las C.L., son actualmente consideradas como residentes normales de la epidermis de mamíferos, sin embargo, han sido observadas en otras estructuras como los ganglios linfáticos (41), conductos de --

glándulas sebáceas (42), y conductos de glándulas apócrinas - (43), entre otras.

Esta estirpe celular representa una población menor de los epitelios escamosos y epidermis humana, en donde son observadas en porcentaje de 2-6% del número total de células epidérmicas (44).

En la piel, las C.L., aparecen principalmente en la porción media de la epidermis en donde reciben el nombre de C.L. tipo I, debido a su gran número de dendritas, su citoplasma electrodenso y los numerosos gránulos de Birbeck. Las C.L. tipo II, aparecen en la capa basal de la epidermis conteniendo pocas dendritas y gránulos de Birbeck (45).

En 1961 Birbeck y Cols. (46) describieron este gránulo distintivo que se presenta en el citoplasma y que ha sido utilizado como un marcador celular para la identificación en microscopía electrónica (47), no habiéndose conocido a la fecha su origen y función.

El conocimiento del tejido que dá origen a las C.L., parece estar siendo establecido recientemente. Una serie de descubrimientos han mostrado que estas células no encuentran su origen en la cresta-neural (48). Silvers y Cols. (49) demos-

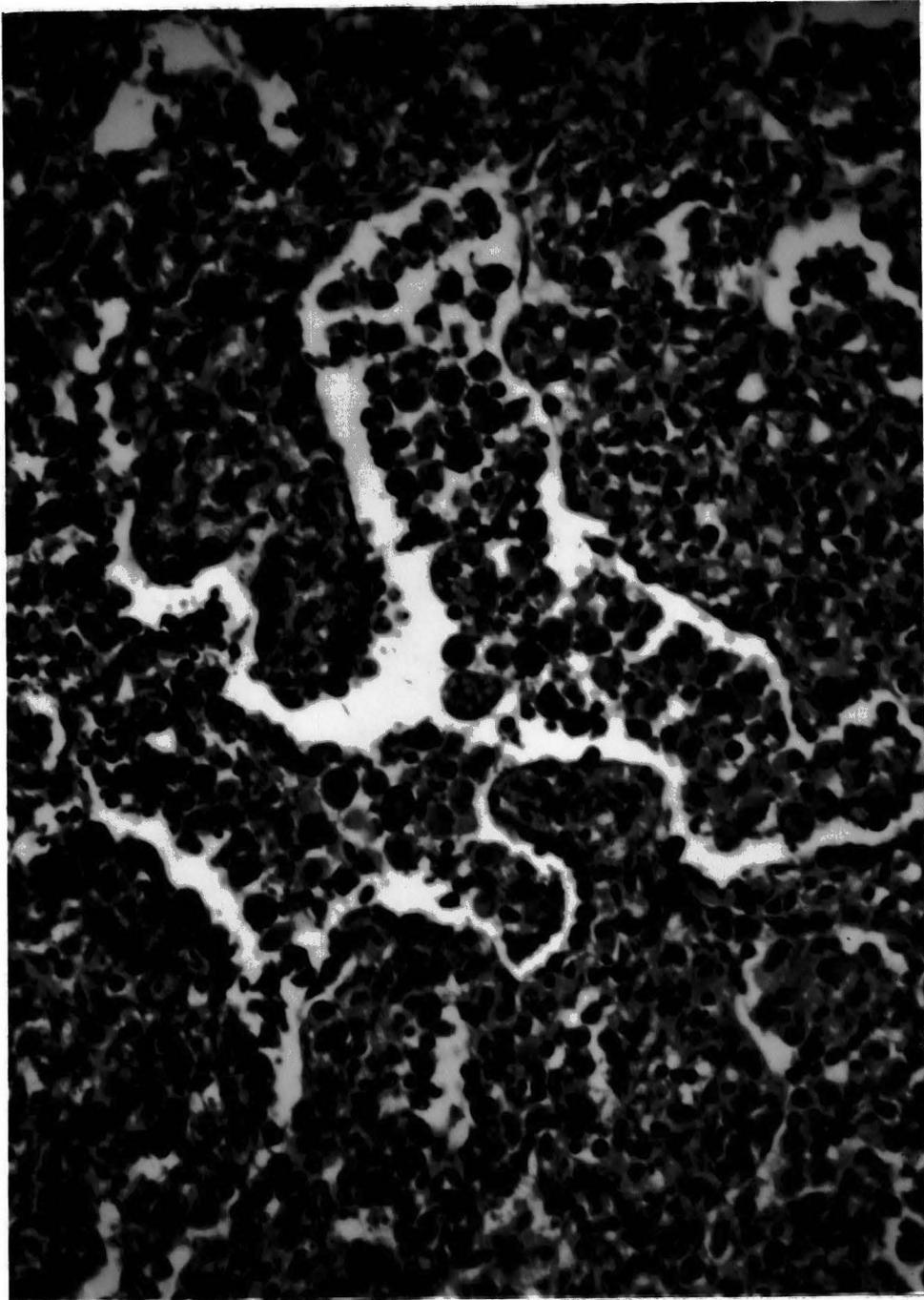
traron que la piel de ratones carentes de estos elementos de la cresta-neural pueden desarrollar células de Langerhans pero no melanocitos y células de Schwann.

Actualmente las evidencias se han ido acumulando para indicar que las C.L. tienen un origen mesenquimal (50). En relación a ello, ha resultado un hallazgo importante el hecho de que las células presentes en la histiocitosis X (Fig. 1) semejan morfológicamente a las C.L., además de contener igualmente gránulos de Birbeck (51), esto parece sugerir que las C.L. pueden pertenecer a la línea celular macrófago-monocito.

La foto 1 muestra un corte histológico de una caso de histiocitosis X pulmonar; se observa un espacio alveolar el cual contiene un número importante de células con caracter histiocítico. En el intersticio, también se observan en menor cantidad este tipo de células. El citoplasma presenta una coloración rojiza como resultado de la positividad de la proteína S-100 (ver Resultados).

La visualización de las C.L. en los tejidos ha representado un problema importante para su estudio, debido a la poca especificidad de las técnicas disponibles y a la dificultad en su manejo. Habitualmente han sido utilizadas para su demostración una gran variedad de métodos, entre los cuales desta-

Fig. No. 1



HISTIOCITOSIS X (PULMON).- SE MUESTRA LA IMAGEN DE UNA REACCION DE INMUNOPEROXIDASA (PAP) UTILIZANDO COMO ANTICUERPO PRIMARIO UN ANTISUERO ANTIPROTEINA S-100. ANTERIORMENTE A ESTE ANALISIS SE OBSERVO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA (95) LA PRESENCIA DE GRANULOS RAQUETOIDES DE BIRBECK

can impregnaciones con sales de oro tinciones supravitales, histofluorescencia con DOPA, sistemas enzimáticos como la ATPasa-sulfidrilo, o bien su reconocimiento a nivel ultraestructural (52).

Recientemente el estudio de la C.L. ha sido facilitado debido a la incorporación de metodología para demostrar marcadores celulares de superficie como las moléculas Ia en ratón o HLA-DR en humanos, mediante anticuerpos monoclonales conocidos como OKT-6 y por la existencia de otros marcadores citoplásmicos como la proteína S-100.

Durante más de 100 años, las funciones de las células de Langerhans permanecieron oscuras, sin embargo, el trabajo experimental realizado en la última década ha ocasionado que estas células sean consideradas en la actualidad por su capacidad inmunocompetente para captar y presentar antígenos en la inducción de la respuesta inmunológica. La función de las C.L. parece tener una expresión local en diversos epitelios (53-55)

Stingl y Cols. (56) demostraron mediante rosetas con eritrocitos de carnero cubiertas con IgM o IgG que las C.L. de epitelios humanos son capaces de unir el fragmento Fc de la Ig, además de tener receptores para el componente C<sub>3</sub> del complemento. En adición, las C.L. de humano y ratón unen antígenos de histocompatibilidad de las especificidades D/DR (57) e I-A e I-E/C

(58) respectivamente. Las C.L. representan la única población celular de la epidermis que expresa estos antígenos de histocompatibilidad tipo II.

Actualmente es conocido que los genes del complejo principal del complejo HLA codifican para un gran número de funciones del sistema inmunológico (59-61). La regulación de la capacidad de respuesta timo-dependiente, depende de un grupo específico de estos genes al cual se denomina como genes Ir; -- estos genes son a su vez responsables de la expresión de glucoproteínas en la membrana plasmática de células inmunocompetentes y reciben el nombre de antígenos Ia en células de ratón o bien, antígenos DR en el humano (62).

Basándose en el hecho de que la gran mayoría de los estudios referentes a la participación de células con capacidad para presentar antígenos están realizados en macrófagos, es necesario relacionar algunos conocimientos obtenidos sobre la -- función de estas células con las células de Langerhans:

Los macrófagos considerados desde hace muchos años como células fundamentales para la expresión de la respuesta inmunológica en donde desempeñan un papel crítico en la regulación -- de la activación y proliferación de linfocitos (63-66), parecen poseer diversas analogías con las C.L. En la actualidad

se han acumulado muchas evidencias que apoyan la hipótesis de que la membrana plasmática del macrófago es el substrato para el reconocimiento de antígeno por medio de subpoblaciones de linfocitos T (67). Por otro lado, existen también datos que demuestran que las interacciones entre las células presentadoras de antígenos con linfocitos son mediadas a través de moléculas Ia. Esto representa la expresión funcional de los genes Ir en células como los macrófagos o en las C.L. que son - su equivalente funcional en la epidermis (68).

Las variaciones en la expresión de moléculas Ia en los macrófagos se correlacionan con cambios en su capacidad para presentar antígenos (69). En cobayos se ha visto que únicamente 15 a 20% de los macrófagos obtenidos a partir de exudado peritoneal poseen antígenos Ia. Aparentemente esta subpoblación de macrófagos está determinada para realizar una función fundamental en la activación de células T (70) aún más, la pérdida de moléculas Ia de los macrófagos durante cultivos resulta en una disminución proporcional de su capacidad para la presentación antigénica, mientras que la adquisición de las mismas mediante exposición a linfocitos da por resultado un incremento en su actividad como célula accesoria (71).

Estos resultados demuestran una función para las células de Langerhans, siendo consideradas actualmente como células acce-

sorias con capacidad para captar y presentar antígenos, desde el momento en que los hallazgos citados en relación a los macrófagos han sido corroborados funcionalmente en las células de Langerhans.

El conocimiento de las diferentes analogías entre macrófagos y células de Langerhans ha proporcionado un nuevo campo de investigación que intenta conocer la función de las C.L. en las respuestas inmunológicas que ocurren localmente en epitelios.

#### ANTICUERPOS MONOCLONALES

En 1975 Kohler y Milstein proporcionaron una de las mayores aportaciones en el campo de la investigación biológica. Estos autores lograron obtener células híbridas mediante la fusión de una célula productora de anticuerpos, tomada de bazo de ratón y una célula de mieloma de la misma especie (16-17). El resultado es una célula que produce anticuerpos con capacidad ilimitada de proliferación. (Hibridoma).

Las células empleadas en este primer sistema experimental fueron todas provenientes de cepas de ratones singénicos BALB/C y las clonas híbridas que se obtuvieron demostraron su capacidad para inducir tumores al ser inoculadas en ratones de la misma cepa, o bien, la posibilidad de reproducirse in vitro -

en cultivos celulares, proporcionando así grandes cantidades de anticuerpos específicos conocidos como anticuerpos monoclonales (AcMc).

Uno de los beneficios más importantes que se obtuvieron al disponer de AcMc es la posibilidad de identificar, marcar y purificar antígenos presentes en células que no habían podido ser purificadas por los métodos convencionales y que por lo mismo eran totalmente desconocidas (23-25).

Los anticuerpos obtenidos por inmunización deliberada de diferentes especies animales carecen de reproducibilidad y manifiestan una gran heteroespecificidad que corresponde a los múltiples determinantes antigénicos que pueden estar presentes (72).

En la producción de los híbridos de células somáticas, el primer paso importante es lograr la fusión de las células. Esto ha sido posible mediante la utilización de agentes como el virus de Sendai inactivado y más recientemente con agentes como es el polietilenglicol (PEG). (73-74).

La introducción del PEG para la fusión celular es una de las modificaciones realizadas a la descripción original de la técnica, con lo cual, se ha conseguido simplificar notablemente

el procedimiento (75). Es importante señalar que únicamente en un porcentaje pequeño de las células fusionadas se puede - lograr la fusión del núcleo, para que con ello exista la posibilidad de mantener una línea de células híbridas viables - y con la capacidad para llevar a cabo la síntesis de AcMc de especificidad conocida. Los detalles en relación a la metodología para la producción, identificación y mantenimiento de - los híbridos productores de AcMc no son uno de los objetivos de esta revisión, por lo que se sugiere revisar las citas 76 - y 77 en donde se reúne una amplia información al respecto.

Subsecuentemente a los trabajos de Kohler y Milstein han seguido una serie de estudios que demuestran la obtención de - AcMc que identifican antígenos restringidos a subclases funcionales de células T y otras células leucocitarias. Los primeros que se obtuvieron fueron producidos por una compañía - privada (Ortho Pharmaceutical) y a los AcMc los denominó con las siglas OK, seguida de la letra que indica la estirpe celular y un número de identificación. Posteriormente han aparecido otros AcMc que utilizan nomenclaturas diferentes, algunas de las cuales se resumen en el cuadro 1.

Recientemente un anticuerpo monoclonal denominado OKT-6, que había sido identificado inicialmente por su capacidad para reconocer un antígeno presente en timocitos normales ha demostra-

Cuadro 1

ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA ANTIGENOS DE SUPERFICIE  
DE LINFOCITOS T HUMANOS

Anticuerpos	Población	Nombres
Monoclonales	definida	Comerciales
Anti-T-1	Todas las células T maduras y timocitos medulares expresados, T1, T3 y T12. Además, T1 es expresado en timocitos de la corteza.	Anti T1 <sub>A</sub>
Anti-T-3		Anti-T-3 <sub>A</sub>
Anti-T-12		Leu4, OKT3
Anti-T-4	La mayoría de los timocitos y 50-65% de células T periféricas.	Anti-T-4 <sub>A</sub>
Anti-T-8(T-5)	La mayoría de los timocitos y 25-35% de células T periféricas.	Leu3a,b OKT4 Anti-T-8 <sub>A</sub>
Anti-T-6	70-80% de timocitos	Leu 2a,b OKT-8 Anti-T-6 <sub>A</sub> Leu6, OKT6 NA1/34
Anti-T-10	Todos los timocitos, células T activadas y células plásmas.	OKT10
Anti-T-11	Todos los timocitos y células T.	Anti-T-11, 9,6. Leu5, OKT11
Anti-TQ1	50% de células T periféricas la mayoría de las cuales son del subtipo T4+	
Clave: Anti-T Leu OK NA1/34		Fabricante: Coulter Electronics, Hialeah, Florida Becton, Mountain View, California Ortho Pharmaceutical, Raritan, New Jersey Accurate Chemicals, New Jersey.

Reinherz E. 1982

do identificar un antígeno similar en la membrana de las células de Langerhans (78).

Los antisueros OKT-6 están constituidos por anticuerpos de la subclase IgG<sub>1</sub>, no poseen capacidad para fijar complemento, muestran afinidad a  $\beta$ 2M y son homólogos a los aloantígenos-TL de ratón (moléculas presentes en timocitos y algunas leucemias de ratón, pero nunca en células de la médula ósea o - linfocitos periféricos) (79).

Mediante diferentes pruebas inmunocitoquímicas el AcMc OKT-6 ha probado ser un reactivo que identifica específicamente células de Langerhans, lo que resulta muy importante en relación a las posibilidades de estudio de esta población celular, ya que la mayoría de sus características histoquímicas o receptores de membrana anteriormente conocidos no resultan específicos para ellas (80).

Por otro lado Stingl y Cols. han demostrado que las C.L. expresan en su membrana celular antígenos Ia/DR (HLA tipo II) (81). La disponibilidad de antisueros de AcMc anti DR humano proporciona otra valiosa posibilidad para la identificación de las células de Langerhans, ya que aún cuando las moléculas Ia/DR son compartidas por diferentes células inmunocompetentes, las C.L. representan las únicas células residentes en epitelios -

que lo poseen (82).

La descripción de nuevos métodos para la visualización de las células de Langerhans mediante anticuerpos monoclonales conjugados con peroxidasa o moléculas fluorescentes abre nuevas posibilidades para el estudio de su distribución y comportamiento en diferentes estados patológicos, superando con ello las dificultades técnicas y falta de especificidad que habían prevalecido en el estudio de esta línea celular.

#### PROTEINA S-100

En 1965 Moore y Cols. lograron extraer y purificar a partir del cerebro bovino una proteína a la cual denominaron S-100 -- (83). Su nombre se debió a la solubilidad que presenta esta molécula en sulfato de amonio saturado al 100% en pH neutro- (84).

Isobe y Cols. demostraron que la S-100 está constituida por dos proteínas que resultan muy similares entre sí: la proteína S-100a ( , subunidades ) y S-100b ( , subunidades, ) que presentan un peso molecular de 20,900 y 21,000 respectivamente (85).

La metodología que se utiliza comunmente para la visualización

del antígeno S-100 se basa en la técnica peroxidasa- anti-peroxidasa (PAP), en la cual se utiliza como anticuerpo primario un antisuero anti-S-100 (86). Otra posibilidad para realizar su identificación se encuentra en la utilización de microscopía electrónica (87).

Inicialmente se supuso que esta proteína resultaba exclusiva para el sistema nervioso y que era sintetizada por células gliales (88-89). En consecuencia, la presencia de S-100 se utilizó como si se tratara de un marcador específico para células de este sistema y algunos tumores derivados de él (90).

A medida que se ha ido obteniendo mayor conocimiento del comportamiento y distribución de esta proteína intracelular, tanto en tejidos normales como en tejidos patológicos, se ha establecido que no resulta estrictamente específica para el sistema nervioso y que otras células normales o tumorales de diferente origen pueden contenerla (91-92).

A pesar del cuestionamiento de la especificidad de la S-100 como un marcador para células gliales y que por lo mismo su presencia no pueda ser considerada específica de una sola estirpe celular, su distribución no ocurre en forma aleatoria, por lo cual el conocimiento que se tiene de ella ha motivado el planteamiento de diferentes posibilidades para ser utiliza-

da dentro del campo de la patología diagnóstica (93-94).

Acutualmente no se conoce la razón de que la proteína S-100 esté presente en diferentes células normales provenientes de distintas capas germinativas durante la ontogenia, sin embargo, se ha propuesto que los tipos celulares que contienen la S-100 derivan de un antecesor común y que han emigrado durante la embriogénesis a diferentes tejidos que han constituido su localización final (94).

Dentro de los tejidos normales en que se ha detectado la S-100 destacan: Las neuronas y células de Schwann en tejido nervioso, melanocitos y células de Langerhans en piel, células mioepiteliales y conductos de algunas glándulas, como las salivales - etc, y en relación a los tejidos neoplásicos: el melanoma maligno, adenoma pleomorfo, osteocondroma e histiocitosis X entre otros. (86)

En lo referente a la presencia de proteína S-100 en las células que constituyen los epitelios, las células de Merckel y los queratinocitos, resultan negativos y por lo tanto son fácilmente distinguibles de los melanocitos y las células de Langerhans en las cuales se ha demostrado la proteína (87).

La primera observación de que las C.L. contienen esta proteína

fue realizada por Nakajima y Cols. (84), quienes encontraron que la capa suprabasal de la epidermis presenta células dendríticas positivas compatibles a las células de Langerhans; posteriormente esta asociación fue confirmada por Cocchia y Cols. (87) quienes demostraron mediante microscopía electrónica que los elementos suprabasales de la epidermis que contienen proteína S-100 son efectivamente células de Langerhans.

La reciente disponibilidad de marcadores celulares para las células de Langerhans como la proteína S-100 y los anticuerpos monoclonales anti-T-6 y anti-Ia/DR, ha permitido la identificación de la célula con un elevado grado de confiabilidad, lo cual ha ocasionado un gran interés por desarrollar modelos experimentales que permiten conocer el comportamiento de estas células en diferentes condiciones biológicas.

En cuanto a los reactivos que hemos mencionado para la identificación de las C.L., cabe señalar que existen diferencias marcadas en relación a su especificidad, sin embargo, resulta muy importante conocer las ventajas y limitaciones de cada uno de ellos para adquirir de esta manera un criterio que nos permita la selección adecuada del reactivo de acuerdo a nuestros objetivos.

## MATERIALES Y METODOS

Se realizó un análisis de la presencia de la proteína S-100 en diferentes tejidos sanos y enfermos, mediante la técnica de inmunoperoxidasa (PAP), utilizando como anticuerpo primario un antisuero anti-proteína-S-100 (DAKO). El método de inmunoperoxidasa fue igualmente utilizado con la modificación de una doble reacción, al ser incluido previamente el tejido fresco en 3, 4-dihidroxifenilalanina (DOPA) con el objeto de diferenciar en forma clara a los melancitos residuales en la estructura epitelial, debido a que estas células también contienen proteína S-100 en su citoplasma.

Las muestras estudiadas fueron gentilmente donadas por el Instituto Nacional de Cancerología, S.S.A., así como por el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (Departamento de Dermatología). EL tejido gingival estudiado fue obtenido en el Departamento de Periodoncia de la División de Posgrado, Facultad de Odontología, U.N.A.M.

TEJIDOS.- encía normal, piel normal, cerebelo, piel con vitiligo, tejido nervioso periférico, histiocitosis maligna, histiocitosis X, y melanoma maligno.

CONTROL POSITIVO.- Los cortes de histiocitosis X fueron utili-

zados como control debido a que anteriormente había sido analizado su contenido de proteína S-100 ( 95 ). El espécimen provenía de un paciente de 18 años de edad con lesiones pulmonares en las cuales se había demostrado previamente mediante microscopía electrónica la presencia de granulos "raquetoides de Langerhans" (Birbeck), en las células histiocíticas y de proteína S-100, usando el mismo antisuero primario que se utilizaría en este estudio (DAKO).

CONTROL NEGATIVO.- Se emplearon cortes de melanoma maligno -- utilizando suero diluido de conejos no inmunizados, en lugar del anticuerpo primario.

PROCEDIMIENTO.- A. Desparafinización y rehidratación de los cortes.

1. Se colocan las secciones en un horno a 56-60°C durante 30 minutos.
2. Se transfiere la laminilla a un recipiente con Xilol, y así se mantiene durante 3 minutos.
3. Se elimina el exceso de líquido y se coloca la laminilla en alcohol absoluto durante 3 minutos. ( Se repite el procedimiento ).

4. Se elimina nuevamente el exceso de líquido y se coloca la laminilla en alcohol al 95% durante 3 minutos. (Se repite el procedimiento).

5. Se enjuaga la laminilla en agua circulante durante 30 segundos, evitando que el agua golpee directamente el tejido, con el objeto de eliminar el alcohol. Finalmente se deja en solución salina de fosfatos (PBS) durante 5 minutos.

#### B. Eliminación de la actividad de la peroxidasa endógena.

1. Este paso es fundamental debido a que varias células normalmente contienen peroxidasa, entre las que se incluyen las células de Langerhans.

2. Los cortes deben colocarse en una solución de peróxido de hidrógeno y metanol (Peróxido de hidrógeno al 3%, 50ml. y metanol 200 ml.) por 20 minutos. Se lavan las laminillas en agua circulante por un minuto y se colocan en solución amortiguadora (TRIS) durante 5 minutos.

#### C. Proceso para eliminar futuras reacciones inespecíficas entre las inmunoglobulinas, la queratina y la colágena de los cortes.

1. Se uso suero porcino normal al 3%, obtenido de Dako Corporation C.A. instilado sobre los cortes colocados en forma horizontal en una caja húmeda (se incuban durante 40 minutos a temperatura ambiente).

2. Se elimina el exceso de suero y los corte se colocan en un baño de solución TRIS durante 20 minutos sobre un vibrador.

#### D. Colocación del anticuerpo primario.

1. El anticuerpo primario se coloca cubriendo cuidadosamente todo el tejido y se incuba durante 20 minutos.

2. Se realizan dos baños en solución TRIS con duración de 20 minutos cada uno.

#### E. Aplicación del anticuerpo de unión.

1. Se usó para este propósito suero porcino anti-suero de conejo a una dilución 1:20 (DAKO), con el objeto de unir por medio de este anticuerpo al anticuerpo primario con el siguiente anticuerpo antiperoxidasa.

2. Los corte deben ser cubiertos con este suero e incubarse durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el exceso

de suero y se bañan las laminillas en solución TRIS durante 20 minutos sobre un vibrador.

#### F. Aplicación del complejo peroxidasa-antiperoxidasa.

1. El PAP es un complejo inmune, soluble, que consiste de la encima peroxidasa y su anticuerpo correspondiente inducido en conejos. Fue obtenido de Dako Corp. C.A., y utilizado a una dilución de 1:100.

2. Los cortes fueron cubiertos con este suero e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente. Al terminar se elimina el exceso de suero, se lavan las laminillas y se dejan en baño con solución TRIS durante 40 minutos con el objeto de eliminar el anticuerpo no fijado.

#### G. Aplicación de la solución de sustrato.

1. Se prepara una solución fresca de 3, amino,9-etilcarbazol al 0.05% y peróxido de hidrógeno al 0.01% en una solución amortiguadora de acetatos al 0.1M, pH 5.2. Los cortes se incuban en esta solución durante 40 minutos a temperatura ambiente y se lavan en agua destilada para eliminar los precipitados de la reacción.

#### H. Tinción de contraste y montaje final de las laminillas.

1. Se utiliza hematoxilina de Mayer, por no contener alcoholes. Las laminillas son colocadas en una rejilla y son incluidas en la solución de hematoxilina por 5 minutos. Se lavan en agua corriente a 20 °C. durante 7 minutos con el objeto de hacer el viraje de la tinción.

2. Estando húmedas las laminillas se colocan los cubre-objetos utilizando gelatina/glicerol (DAKO) a 37°C.

#### MATERIALES Y REACTIVOS \*

- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- Suero porcino, prediluido en solución amortiguadora (TRIS) 0.05M, pH 7.6
- Antisuero de conejo antiproteína S-100, prediluido en solución amortiguadora TRIS. 0.05M, pH7.6
- Antisuero porcino anti-Ig de conejo, prediluido en solución TRIS, 0.05M pH7.6
- Solución de complejo peroxidasa anti-peroxidasa (PAP).
- 3-amino-9-etilcarbazol
- Solución amortiguadora de acetatos al 0.1M, pH5.2
- Alcohol
- Xilol

- Agua bidestilada.
- Solución salina de fosfatos (PBS).
- Solución amortiguadora TRIS, 0.05M, pH7.6
- Tubos de ensayo graduados
- Pipetas Pasteur
- Columnas filtro
- Hematoxilina de Mayer
- Solución glicerol/gelatina
- Porta-objetos y cubre-objetos
- Lápiz de diamante
- Microscopio de luz standard

\* Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos en los Laboratorios DAKO.

## R E S U L T A D O S

En la presente investigación fue realizada la demostración - preliminar de la presencia de tejido gingival de células que contienen proteína S-100 en su citoplasma (Fig. 2-3). Esto indica, que es posible llevar a cabo la identificación a nivel morfológico por medio de técnicas inmunohistoquímicas (PAP), - utilizando un anticuerpo primario que se una en forma específica a un antígeno presente en las células de Langerhans y melanocitos en epitelios u otros tejidos, para de esta manera - visualizarlas e identificarlas fácilmente por medio de un microscopio de luz.

Con el objeto de facilitar la identificación de estas dos estirpes celulares se muestra una modificación a la técnica convencional a la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa (95) mediante la realización de una doble reacción tintoreal, colocando el tejido fresco en una solución de 3, 4-dihidroxifenil alanina (DOPA) al 0.1% durante 5 minutos, fijando en formalina al 10% con solución amortiguadora de fosfatos, antes de ser incluída la muestra en parafina. El resultado de la misma proporciona una mayor confiabilidad en la identificación de estas células, como puede apreciarse en la figura 4.

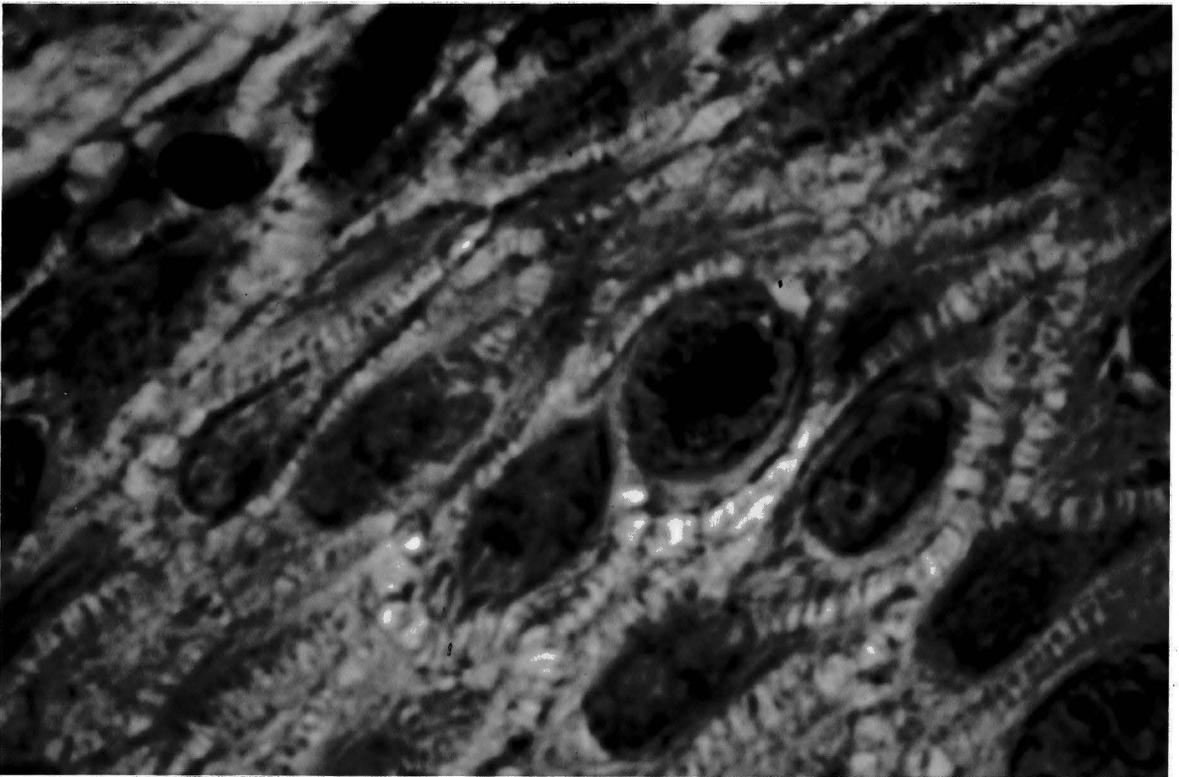
Fig. 2 CORTE DE ENCIA.- en la estructura epitelial destaca una célula ovoide cuyo citoplasma presenta una coloración rojiza como resultado de su positividad a la reacción anti-proteína S-100.

Fig. 3 CORTE DE ENCIA.- se observa intercalada entre las células epiteliales una célula de morfología dendrítica que puede ser visualizada claramente debido a que fue utilizado el antígeno S-100 como marcador celular.

Fig. 4 PIEL CON VITILIGO.- se muestra una imagen histológica de un corte de una mancha vitiliginosa en la cual se realizó una doble tinción mediante 3, 4-dihidroxifenilalanina y anti-suero anti-proteína S-100.

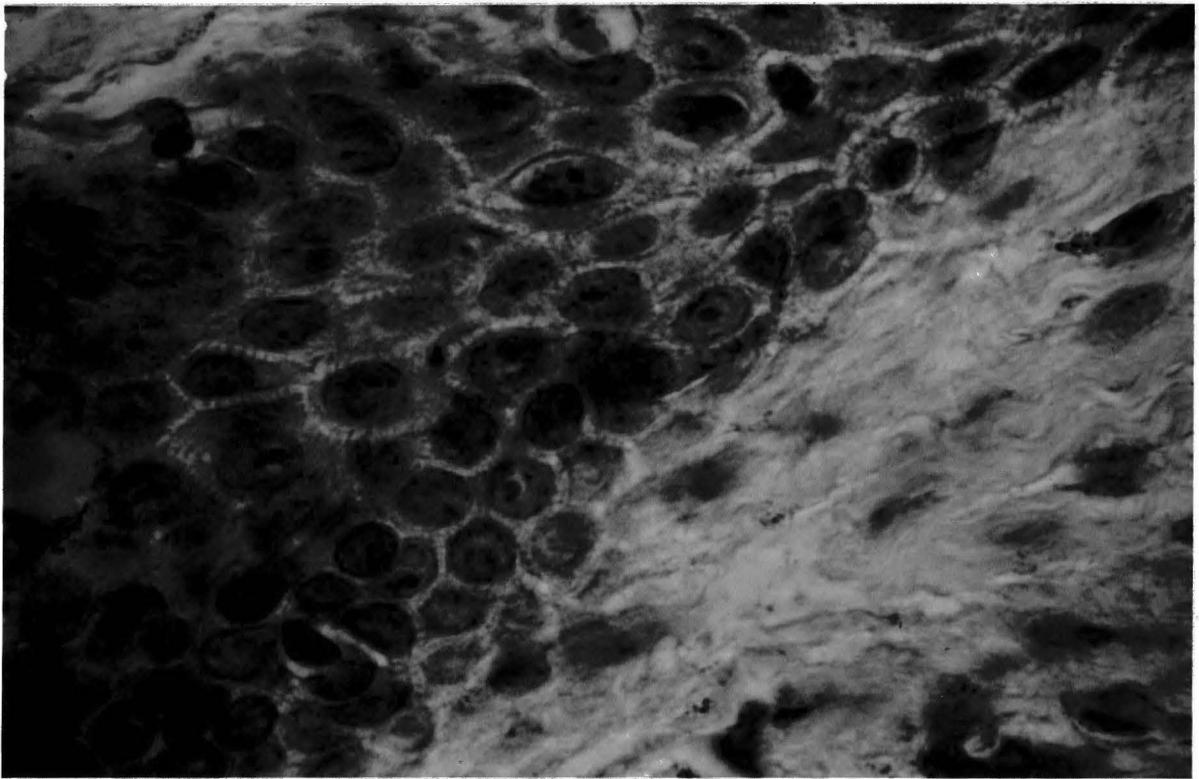
Las células DOPA positivas, se observan en el estrato basal de la epidermis, caracterizándose por su pigmento marrón oscuro y su configuración dendrítica. Por arriba de estas células y en la mitad de la epidermis aparecen otras células con el citoplasma rojizo, lo cual indica una positividad S-100 compatible con células de Langerhans.

Fig. No. 2



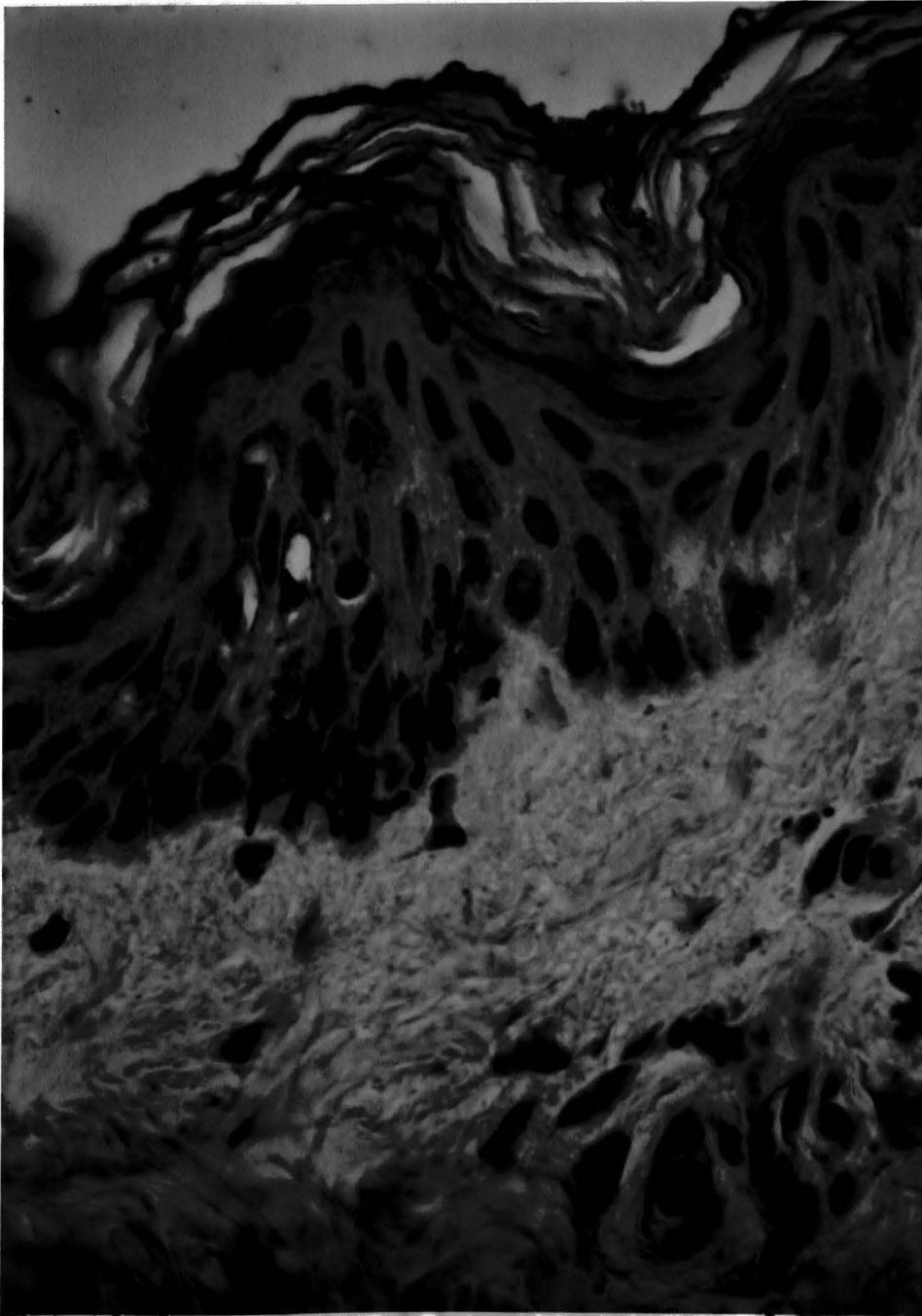
CORTE DE ENCIA

Fig. No. 3



CORTE DE ENCIA

Fig. No. 4



PIEL CON VITILIGO.- SE MUESTRA UNA IMAGEN HISTIOLOGICA EN DONDE SE REALIZO UNA DOBLE TINCION QUE PERMITE IDENTIFICAR CONJUNTAMENTE CELULAS DOPA POSITIVAS (MELANOCITOS, EN EL - ESTRATO BASAL DE LA EPIDERMIS) Y CELULAS PROTEINA S-100 POSITIVAS EN LA PORCION MEDIA DE LA MISMA (CELULAS DE LANGERHANS.)

Por otro lado, fue igualmente confirmada la presencia de este marcador celular en tejidos sanos y patológicos no asociados a la cavidad oral.

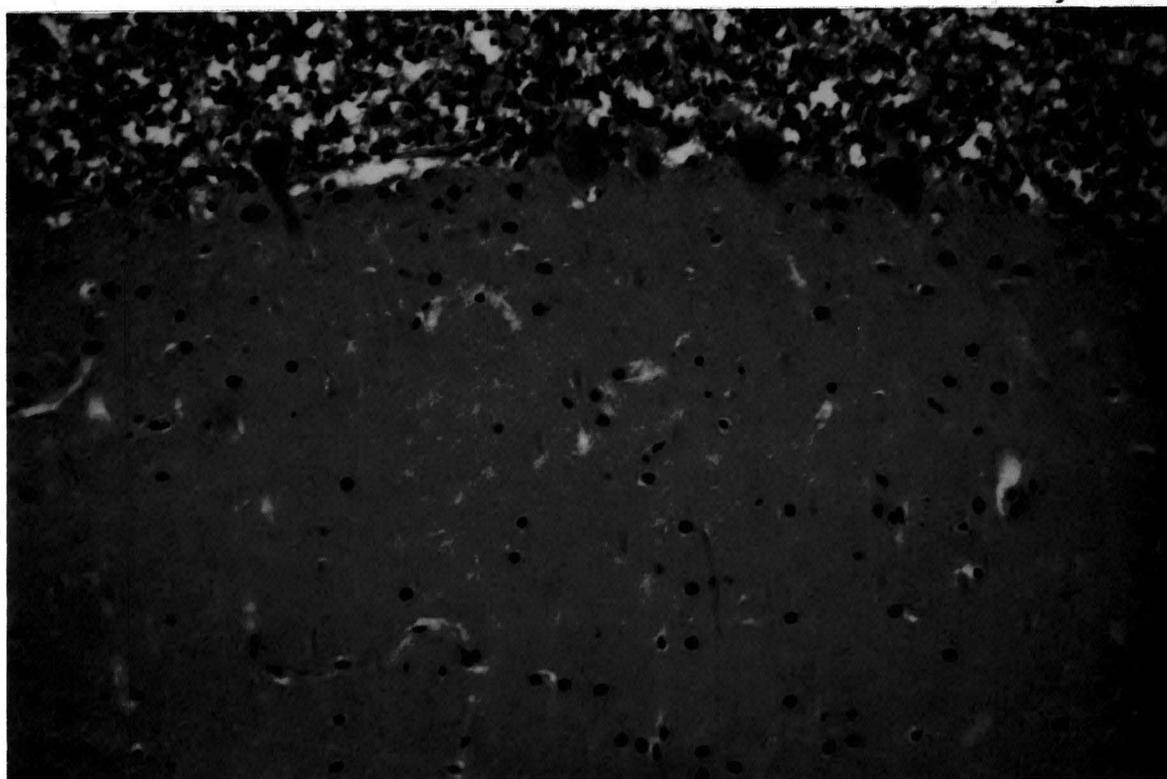
Los estudios iniciales consideraron a este marcador como específico para células del sistema nervioso; las figuras 5, 6, y 7 muestran respectivamente la presencia de proteína S-100 en células de cerebelo, receptores nerviosos y tejido nervioso periférico.

Fig. 5 CORTE DE CEREBELO HUMANO.- se muestran varias células de Purkinge, algunas con sus prolongaciones dendríticas típicas, cuyo citoplasma es S-100<sup>+</sup>.

Fig. 6 TEJIDO NERVIOSO PERIFERICO.- corte transversal de un nervio de tejido celular subcutáneo en el cual se encuentran enmarcadas dentro del perineurio, numerosas células fusiformes, onduladas, con citoplasma proteína S-100<sup>+</sup> y que corresponden a células de Schwann.

Fig. 7 PIEL NORMAL.- se presenta la imagen histológica de una zona acral en la cual se aprecia en la dermis papilar corpusculos nerviosos constituidos por células fusiformes en ovillo, compatibles con receptores de Meissner con citoplasma S-100<sup>+</sup>.

Fig. No. 6



CORTE DE CEREBELO HUMANO EN DONDE PUEDEN APRECIARSE AL-  
GUNAS CELULAS DE PURKINGE (S-100 POSITIVAS).

Fig. No. 5

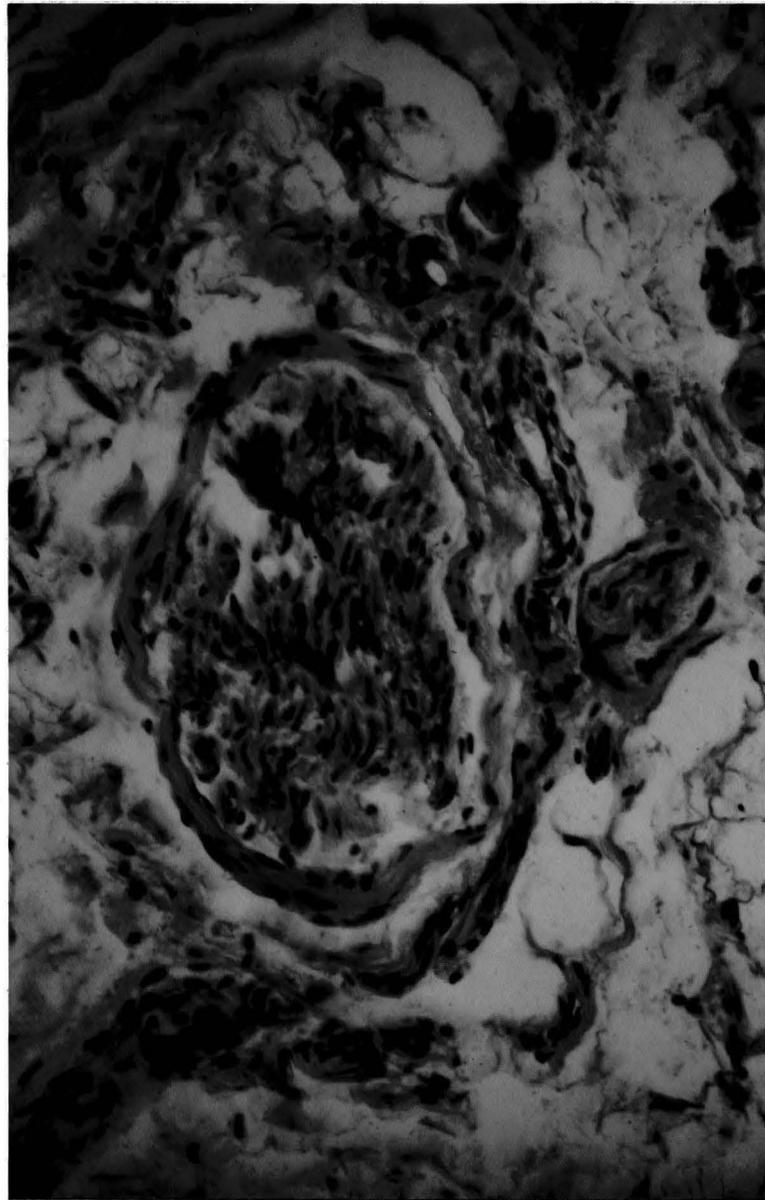
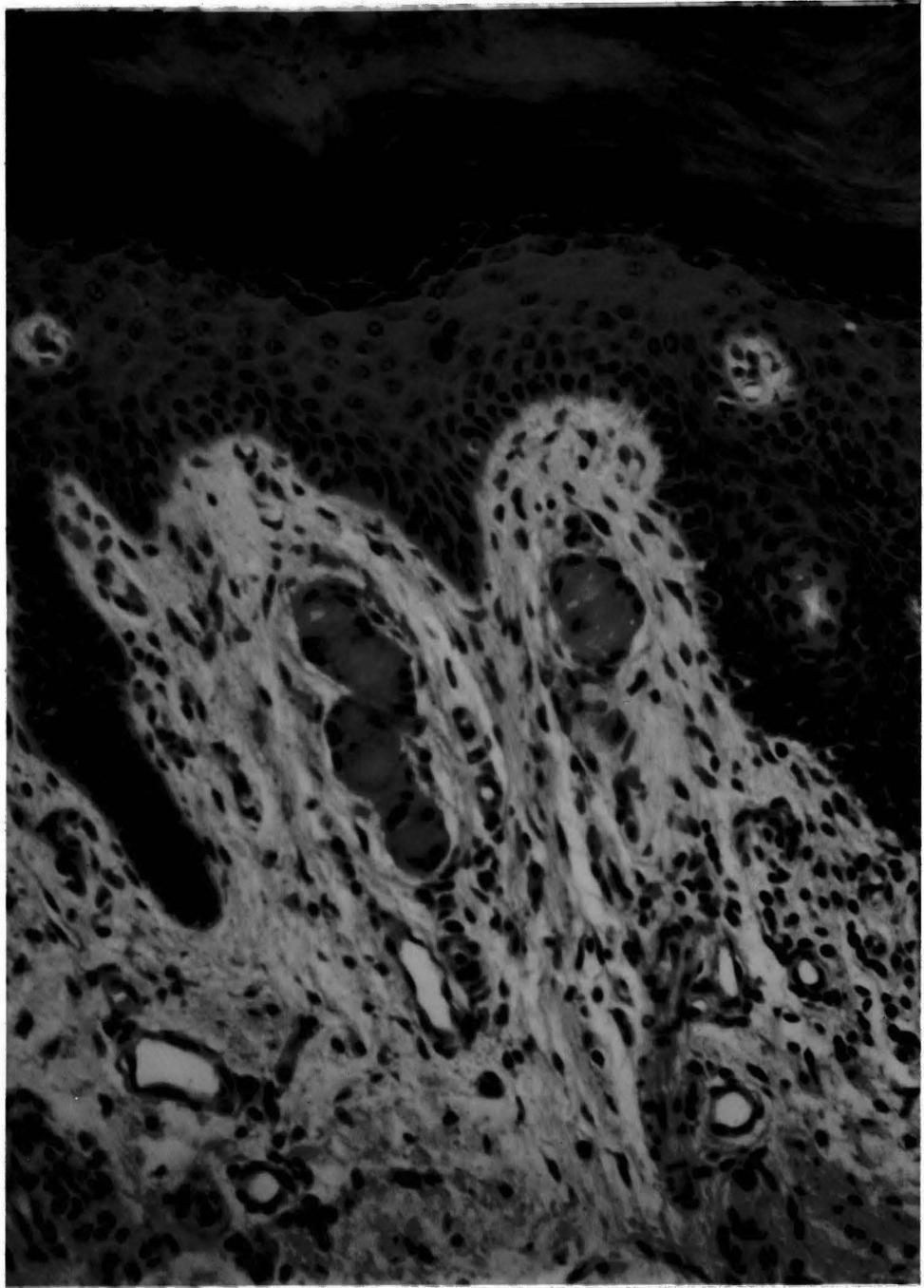


Fig. No. 6

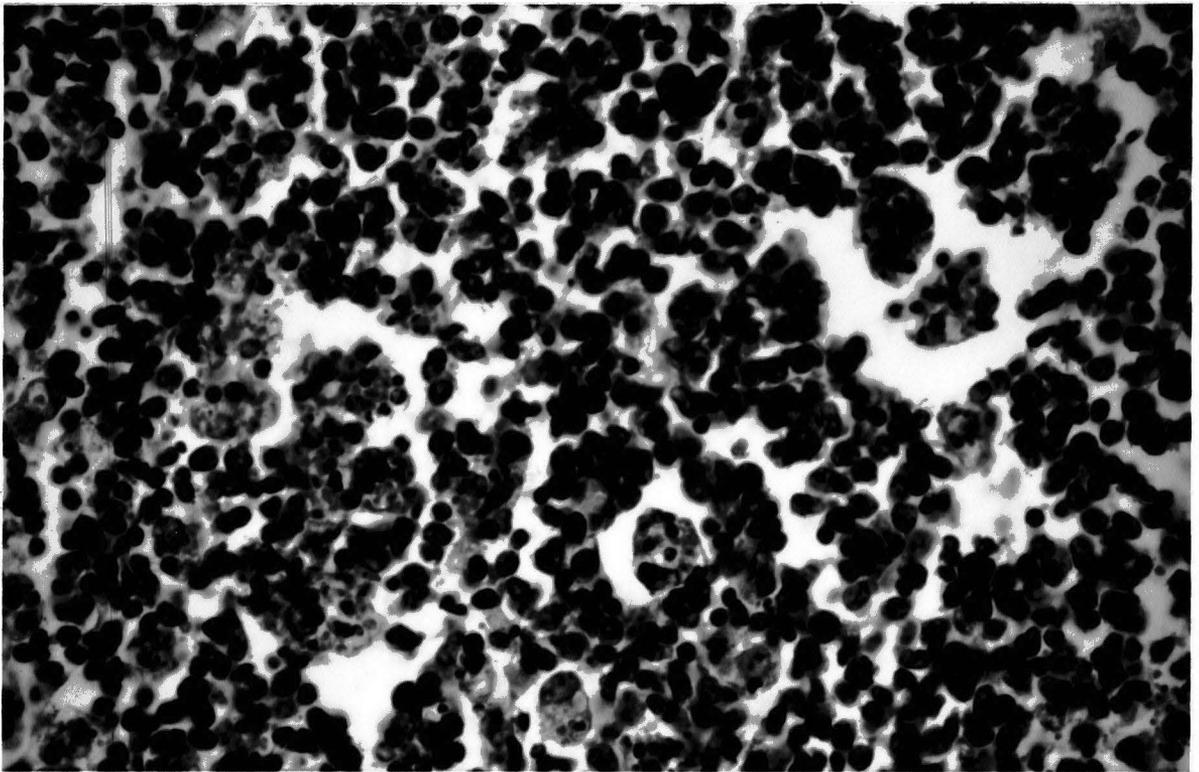


La proteína S-100 fue también analizada en algunos tumores de origen no-neurogénico. Su presencia indica como anteriormente había sido reportada que no es posible considerar a este marcador como específico para células del sistema nervioso.

Fig. 8 y 9 HISTIOCITOSIS MALIGNA.- se muestra la imagen de un corte de un ganglio linfático, producto de autopsia de un caso de histiocitosis maligna. Se observan numerosas células de aspecto histioide con muescas, algunas de las cuales se presentan en peripolesis. Otro número importante de células histiocíticas contienen una coloración rojiza del núcleo como evidencia de la presencia de la proteína S-100.

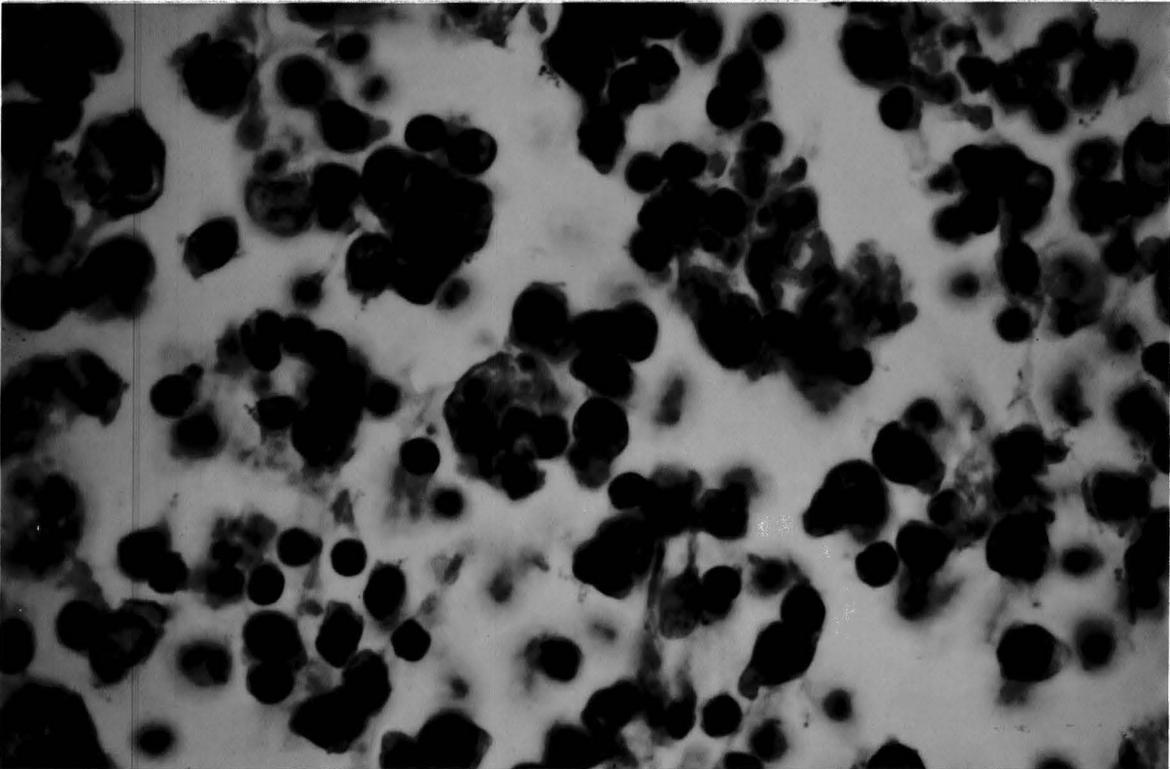
Fig. 10 MELANOMA MALIGNO.- corte histológico en el cual se observan tecas de células anaplásicas, poliedricas, algunas de las cuales contienen pigmento melánico de color marrón como evidencia de su histogénesis. Se observa además un aspecto rojizo del citoplasma de todas las células melánicas que demuestra su positividad al reactivo anti-S-100.

Fig. No. 8



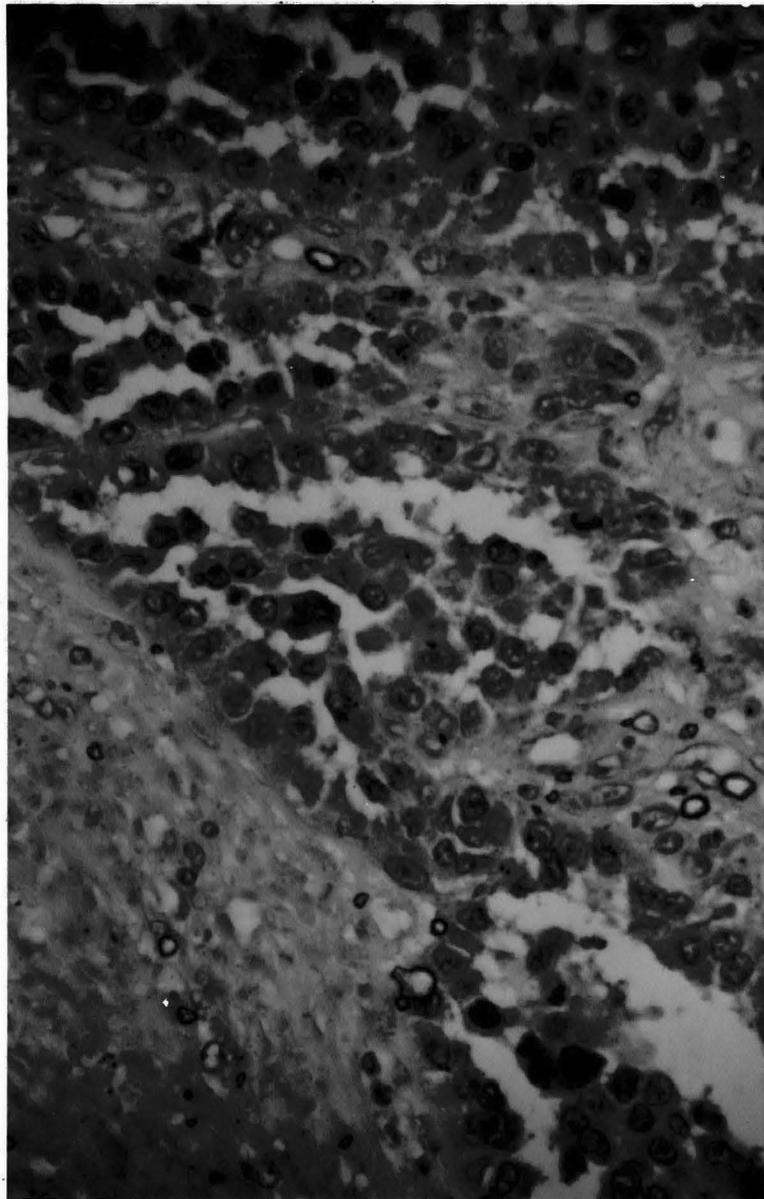
HISTOCITOSIS MALIGNA (GANGLIO LINFATICO)

Fig. No. 9



HISTOCITOSIS MALIGNA (GANGLIO LINFATICO)

Fig. No. 10



MELANOMA MALIGNO

## D I S C U S I O N

Las células de Langerhans, residentes normales de los epitelios escamosos y de la epidermis de humanos y otros mamíferos, son actualmente motivo de intensa investigación debido a que parecen realizar una actividad importante como células presentadoras de antígeno en las respuestas inmunológicas que ocurren localmente en piel y epitelios.

Recientemente las C.L. han sido reconocidas por ser los únicos componentes de los epitelios que contienen moléculas clase II (HLA-DR). Este hallazgo resulta muy importante debido a que las moléculas HLA/DR en humanos y H-2/Ia en ratón y cobayo son expresadas selectivamente en células que poseen capacidad inmunológica.

Conforme se ha progresado en el estudio de las C.L. se han ido acumulando evidencias que parecen sustentar la hipótesis de su participación en la captación y presentación a los linfocitos T de moléculas inmunogénicas que logran acceso a los epitelios. Debido a ello, las enfermedades periodontales y otros padecimientos con participación en su patogenia de mecanismos inmunológicos con expresión local, representan una nueva e importante área de investigación, que permite explorar la función biológica de la células de Langerhans, la cual, hasta hace po-

co tiempo era desconocido.

La realización de estas investigaciones requiere de la creación previa de una infraestructura que permita desarrollar con resultados confiables la línea de trabajo en estudio. Es por ello, que hemos iniciado en el presente trabajo con la demostración en tejido gingival de un marcador celular (proteína S-100) que ha sido reconocido previamente por estar presente en las células de Langerhans.

La especificidad de este marcador para diferenciar entre células de Langerhans y melanocitos dentro de la estructura epitelial puede ser aumentada mediante una modificación a la técnica convencional de inmunoperoxidasa (anti-S-100), realizando una doble reacción mediante la utilización previa de 3, 4-dihidroxifenilalanina (DOPA). De esta forma, los melanocitos pueden ser identificados por adquirir una coloración marrón oscuro (DOPA<sup>+</sup>), eliminándose su positividad a la proteína S-100 y quedando las células de Langerhans como las únicas células que expresan en su citoplasma este marcador. La figura 4 (hoja ) muestra claramente que la identificación de estas dos estirpes celulares puede realizarse en forma conjunta.

Resulta de interés, considerar las posibilidades de la proteína S-100 para ser utilizada como marcador celular dentro de mode-

los de experimentación a desarrollarse en animales. Esta proteína, ha sido reportada por estar presente en diversas especies vertebradas, existiendo entre ellas una fuerte reactividad cruzada, lo cual en determinadas situaciones puede representar una ventaja sobre otros marcadores que aún cuando son más específicos, solamente pueden ser usados en humanos.

El carácter local de las enfermedades periodontales, aunado a: la participación en su patogenia de mecanismos inmunológicos; el paso continuo de antígenos bacterianos a través de los epitelios gingivales y la presencia inequívoca de células de Langerhans, las constituye como un excelente modelo para el estudio del comportamiento de estas células, tanto en las E.P. como en otros padecimientos que afectan tejidos similares.

La disponibilidad actual de anticuerpos monoclonales que reconocen con gran especificidad poblaciones celulares humanas, incluyendo las C.L., hacen necesario realizar un análisis cuidadoso para la elección adecuada de los reactivos que deben emplearse en el trabajo experimental, ya que aún cuando estos antisueros monoespecíficos permiten realizar análisis muy depurados, su elevado costo de adquisición no permite su utilización sistemática.

Por otro lado, los alcances de la proteína S-100 para utilizarse

como un marcador para el diagnóstico de tumores por medios inmunohistoquímicos, dependen básicamente de la comprensión de su distribución en diferentes condiciones patológicas.

Actualmente no es clara la razón de que la proteína S-100 se encuentre presente en diversas células normales que derivan de distintas capas germinativas durante la ontogenia. Sin embargo, es posible considerar que estas células pueden originarse de un antecesor común migrar durante la embriogénesis a su localización final en diferentes tejidos (29).

La presencia de proteína S-100 en algunos tumores puede constituir un apoyo diagnóstico importante, ya que este marcador está presente en un número limitado de neoplasias y se encuentra ausente en muchas otras. Aún más, su presencia representa una característica de la estirpe celular y no una consecuencia de alteraciones de las células tumorales siendo, con ello posible confirmar su histogénesis al identificar la célula progenitora normal productora de la proteína.

## C O N C L U S I O N E S

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la presencia en el tejido gingival de células que contienen proteína S-100 en el citoplasma.

Este hallazgo indica que es posible realizar la identificación a nivel morfológico por medio de técnicas inmunohistoquímicas (PAP), de células de Langerhans y melanocitos, utilizando como marcador celular un anticuerpo primario (Anti-S-100) que se une en forma específica a un antígeno del citoplasma.

Aún más, la visualización de estas dos estirpes celulares, puede ser realizada en forma más confiable e individual utilizando una doble reacción tintoreal, incluyendo previamente el tejido en 3, 4, dihidroxifenilalanina (DOPA). El permitir la reacción enzimática de la DOPA, da como resultado que aún cuando los melanocitos residuales hubieran reaccionado con el antisuero primario, el producto de la reacción no es reconocible debido a lo intenso de la coloración de la DOPA, además de que este procedimiento no interfiere en la técnica inmunohistoquímica.

La evidente participación de las células de Langerhans en la captación y presentación de antígenos en epitelios, aunado al

caracter local de las enfermedades periodontales convierte a esos padecimientos en un excelente modelo para el estudio del comportamiento de estas células bajo diferentes condiciones patológicas. Los resultados que surjan de este nuevo campo de investigación seguramente van a redituarse en una mayor comprensión de los fenómenos de expresión local de la respuesta inmunológica, así como de los elementos que participan en ella.

La posibilidad de utilizar a la proteína S-100 como un marcador celular para la identificación de las células de Langerhans u otras células normales o patológicas parece estar determinada a la comprensión de su distribución y la consecuente variabilidad de especificidad en relación a los diferentes tejidos que pueden estudiarse.

## R E S U M E N

Fue demostrada la presencia de proteína S-100 en el citoplasma de algunas células del epitelio gingival, utilizando la técnica de inmunoperoxidasa (PAP) y como anticuerpo primario antisuero antiproteína-S-100 (DAKO).

Se mostró la posibilidad de realizar una modificación a la técnica señalada mediante una reacción previa del tejido en 3, 4-dihidroxifenilalanina (DOPA), y finalmente se realizó un análisis de los alcances de la proteína S-100 para ser empleado como marcador celular, en algunas condiciones patológicas y en animales de experimentación.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- LEHNER, T., WILTON, M.A., CHALLACOMBE, S.J., e IVANYI, L, (1974) Sequential cell-mediated immune responses in experimental gingivitis in man. Clin. Exp. Immunol. 16:481.
- 2.- HORTON, J., OPPENHEIM, J., y MERGENHAGEN, S.E., (1974) A role for cell mediated immunity in the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodontol. 45:351
- 3.- LINDHE, J., LILJEMBERG, B., y LISTGARTEN, M., (1980) Some microbiological and histopathological features of periodontal-disease in man. J. Periodontol 51:264.
- 4.- KLIMGE, B., MATSSON, L. y ATTSTROM, R., (1983) Histopathology of initial gingivitis in humans. A pilot study, J. Clin. Periodontol. 10:364.
- 5.- TEW, J.G., MILLER, G.A., GREEN, E.J., RICE, P.L., y RANNEY R.R., (1981) Immunological studies of young adults with severe periodontitis. II Cellular factors, J. Periodontal. Res. 16: 403.
- 6.- TAICHAMN, N.S., (1970) Mediation of inflammation by the polymorphonuclear leukocyte as a sequela of immune reactions. J., Periodontol. 41:228.

7.- GOREN, M.B., (1977) Phagocytic lysosomes: Interactions with infectious agents, phagosomes, and experimental perturbations in function. Annu. Rev. Microbiol. 31:507.

8.- CARDELLA, C.J., DAVIES, P., y ALLISON, A.C., (1974) Immune complexes induce selective release of lisosomal hidrolases from macrophages. Nature (London) 247:46.

9.- BRANDTZAEG, P., y TOLO, K., (1977) Immunoglobuline systems of the gingiva, p. 145. In T. Lehner (ed.) The borderland between caries and periodontal disease. Academic Press, London.

10.- MACKLER, B.F., ALTMAN, L.C., WAHL, S., ROSENSTREICH, D., L., OPPENHEIM, J.J., y MERGENHAGEN, S.E., (1974). Blastogenesis and LYMPHOKINE syntesis by T and B Lymphocytes form patients with periodontal disease. Infect. Immun. 4:844.

11.- KLINGE, B., MATSSON, L., y ATTSTROM, R., (1983). Histopathology of initial gingivitis in humans. A pilot study J., - Clin. Periodontol. 10:364.

12.- LEHNER, T., (1982). Cellular immunity in periodontal Disease: An overview. P. 202. In genco and Mergenhagen (ed.) - Host-parasite interactions in periodontal disease. American Society of Microbiology.

- 13.-SHEN, H.H., TALLE, M.A., GOLSTEIN, G., CHESS, L., (1983) Functional subsets of human monocytes defined by monoclonal - antibodies: A distinct subset of monocytes contains the cells capable of inducing the autologous mixed lymphocyte culture. J. Immunol. 130:698.
- 14.-KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., REINHERZ, E.L., SCOLOSSMAN, S., F., (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cells surface antigens. Science 206:347.
- 15.- HAYNES, B.F., EISENBART, G.S., y FAUCI, A.S. (1979) Human lymphocyte antigens: production of monoclonal antibody that defines functional thymus-derived lymphocyte subset. Proc. Nat. Acad. Sci. 76:5829
- 16.-KOHLER, G., y MILSTEIN, C., (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495.
- 17.- KOHLER,G., y MILSTEIN, C., (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6:511
- 18.-NABHOLS, M., (1979) Production of maintenance of antibody secreting myeloma hybrids. In UNDP/World Bank/WHO. Hybridoma technology with special reference to parasitic disease.

- 19.-SUNDERLAND, C.A., McMASTER, W.R., WILLIAMS, A.F., (1979) Purification with monoclonal antibody of predominant leukocyte-common antigen and glycoprotein from rat thymocytes. Eur. J. Immunol. 9:155.
- 20.-GHUR, R., y GUGGENHEIM, B., (1983) Antigenic heterogeneity of Bacteroides Intermedius as recognized by monoclonal antibodies. Infect. Immun. 42:459.
- 21.- REISFELD, R.A., HARRPER, J.R., y BUMOL, T.F., (1983) Human tumor-associated antigens defined bu monoclonal antibodies. CRC Critical Rev. Immunol. 5:27
- 22.- HERLYN, D., y KOPROWSKI, H., (1982) IgG<sub>2a</sub> Monoclonal antibodies inhibit human tumor growth thru interaction with effector cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:4761.
- 23.- ENGLEMAN, E.G., BENIKE, C., OSBORNE, B., y GOLDSBY, R., (1980) Functional characteristics of human T cell subpopulations distinguished by a monoclonal antibody. Proc. Nat. Acad. Sci. 77:1607.
- 24.- THOMAS, Y., SOSMAN, J., ROGOZINSKI, L., IRIGOYEN, O., - KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., y CHESS, L., (1981) Functional analysis of human T cell subjects defined by monoclonal antibodies III. Regulation of helper factors production by T cell

subjects. J. Immunol. 126:1948.

25.- EDWARDS, P.A.W., (1981) Some properties and applications of monoclonal antibodies. Review Article. J. Biochem. 200:1

26.- REINHERZ, E.L., KUNG., P.C., GOLDSTEIN, G., y SCHLOSSMAN, S.F., (1979) Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4061.

27.-REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., LEVEY, R.H., SCHLOSSMAN, S.F., (1980) Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic-lymphoblasts of T cell lineage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 77:1588.

28.- REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., y SCHLOSSMAN, (1979) Further characterization of human inducer T cell subsets defined by monoclonal antibody. J. Immunol. 123:2894

29.-DUBERTRET L., PICARD, O., BAGOT, M., TULLIEZ, M., FOSSE, M., AUBERT. C., y TOURAINE, R., (1982) Specificity of monoclonal antibody skin. Brit. J. Dermatol. 106:287.

30.-FITHIAN, E., KUNG. P., GOLDSTEIN, G., RUBENFELD, M., FENOGLIO, G., y EDELSON, R., (1981), Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 4:2541

31.-MURPHY, G.F., BHAN, A.K., SATO. S., MIHM, M.A., y HARRIST, T.J., (1981) A new immunologic marker for human Langerhans - cells N. Engl. J. Med. 304:791.

32.-STINGL, G., KATZ. S.I., SCHEVACH., E.M., ROSENTHAL, A.S., GREEN, I., (1978) Analogous functions of macrophages an Langerhans cells in the initiation of the immune response. J. - Invest. Dermatol. 71:59.

33.-STREILEIN, J.W., (1978) Lymphocyte traffic. T. cell malignancies and the skin (Review). J. Invest. Dermatol. 71:167.

34.- COCCHIA, D., MICHETTIN, F., y DONATO, R., (1981) Immunochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. Nature 294:85

35.- NAKAJIMA, T., WATANABE, S., SATO, Y., KAMEYA, T., SHIMOSATO, Y., y ISHIHARA, K., (1982) Immunohistochemical dmonstration of S-100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic applications. Cancer. 50:912.

36.- MODLIN, R.L., ROWDEN, G., TAYLOR, C.R., PHIL, D., and - THOMAS, H., (1984) Comparison of S-100 and OKT-6 antisera in human skin. J. Invest. Dermatol. 83:206

- 37.- NIEBAUER, G., (1968) Dendritic cells of human skin. Exp. Biol. Med. 2:1
- 38.-WOLFF. K., (1972) The Langerhans cell. Curr. Probl. Dermatol. 4:80.
- 39.- HUTCHENS, L.H., SAGEBIEK, R.W., y CLARKE, M.A. (1971) - Oral epithelial dendritic cells of the rhesus monkey-histologic demonstration, fine structure and quantitative distribution J. Invest. Dermatol. 56:325.
- 40.-AL YASSIN, T.M., y TONER, P.G., (1976) Langerhans cells in the human esophagus. J. Anat. 122:435.
- 41.- SILBERBERG-SINAKIN, L., THORBECKE, G.J., BEAR, R.L., -- ROSENTHAL, S.A., BEREZOWSKY. (1976) Antigen Bearing Langerhans Cells in skin, dermal, lymphatics and in lymph nodes. Cell Immunol. 25:137
- 42.- JIMBOW, K., SATO., S., y KUKITA, A., (1969) Langerhans - cells of the normal pilo sebaceous system. An electron microscopic examination. J. Invest. Dermatol. 52:177.
- 43.- ITO, K., KAWADA, A., SATO., S., y KUKITA, A., (1976) - Langerhans cells in human apocrine ducts. Arch. Dermatol. Res. 256:291.

- 44.- WOLFF, K., y WINKELMANN, (1967) Quantitative studies on the Langerhans cells population of Guinea Pig epidermis. J.-Invest. Dermatol. 48:504.
- 45.- FRIEDMANN, P.S., (1981) The immunobiology of Langerhans cells. Immunol. Today. 2:124
- 46.-BIRBECK, M.S., BREATHNACH, A.S, y EVERAL, J.D, (1961).An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. J. Invest. Dermatol. 37:51
- 47.- WOLFF, K., (1967)The fine structure of the Langerhans - cell Granule. J. Cell. Biol. 35:466.
- 48.- KATZ, S.I., TAMAKI, K., y SACHS, D.H., (1979) Epidermal Langerhans cells are derived from cells originatin in bone marrow. Nature 282:324.
- 49.- Silvers, W.K., (1957) A histological and experimental - approach to determine the relationship between gold ompregnated dendritic cells and melanocytes. Am. J. Anat. 100:225.
- 50.- TAMAKI, K., y KATZ, S.I., (1980) Ontogeny of Langerhans cells. J. Invest. Dermatol. 75:12.

- 51.- TAMAKI, K., STINGL, G., y KATZ, S.I., (1980) The origin of Langerhans cells. J. Invest. Dermatol.
- 52.- ROWDEN, G. (1981) The Langerhans cell. CRC. Crit. Rev. Immunol. 3:95.
- 53.- BJERCKE, S., ELGØ, J., BRAATHEN y THORSBY, E., (1984) - Enriched epidermal Langerhans cells are potent antigen-presenting cells for T cells. J. Invest. Dermatol. 83:286.
- 54.- BRAATHEN, L.R., THORSBY, E., (1983). Human epidermal - Langerhans cells are more potent than blood monocytes in inducing some antigen specific T cell responses. Br. J. Dermatol. 108:139.
- 55.- BRAATHEN, L.R., THORSBY, E., (1980) Studies on human - epidermal Langerhans cells. I. Alloactivating and antigen-presenting capacity. Scand. J. Immunol.. 11:401.
- 56.- STINGL, G., KATZ, S.I., ABELSON, L.D., y MANN, D.L., (1978) Immunofluorescent detection of human B cell alloantigens on S-Ig-positive lymphocytes and epidermal Langerhans cells. J. Immunol. 120:661.

- 57.-STINGL, G., KATZ, S.I., SHEVACH, E.M., WOLFF-SCHREINFER. E.C., GREEN, I., (1978). Detection of Ia antigens on Langerhans cells in Guinea pig skin. J. Immunol. 120:570.
- 58.-STINGL, G., KATZ, S.I., CLEMENT, L., GREEN, I., y SCHEVACH. E.M., (1979) Functional properties of Ia-bearing Langerhans cells. Arch. Dermatol. Res. 164:119.
- 59.-BACH, F.H., y VAN ROOD, J.J., 1976). The major histocompatibility complex genetics, and biology. N. Engl. J. Med. 295: 866.
- 60.-KING, D.P., y JONES, P.P., (1983) Induction of Ia and H-2 antigen on a macrophage cell line by immune interferon. J. Immunol. 131:135.
- 61.- SHREFFLER, D.C., y DAVID, C.S., (1975). The H-2 histocompatibility complex and the I Immune response region: Genetic variation, function and organization. Adv. Immunol. 21:125
- 62.-MOLLER, G., (ed.) (1976) Biochemistry and Biology of Ia antigens. Transp. Rev. 30.
- 63.-UNANUE, E.R., (1978) The regulation of lymphocyte functions by the macrophage. Immunol. Rev. 40:227.

- 64.- UNANUE, E.R., (1981) The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Part two: Symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. Adv. Immunol. 31:1
- 65.-STADECKER, M., WYLER, D., WRIGHT, J. (1982) Ia antigen - expression and antigen presentation function by macrophages isolated from hypersensitivity granulomas. J. Immunol. 128: 2739.
- 66.- UNANUE, E.R., (1972) The regulatory role of Macrophages in antigenic stimulation. Adv. Immunol. 15:95.
- 67.- UNANUE, E.R., (1984) Antigen - presenting function of the macrophage. Anv. Rev. Immunol. 2:395.
- 68.- SILVERBERG, I., BAER, R.L., ROSENTHAL, S.A., THORBECKE, G.J., y BEREZOWSKY, V., (1976) Dermal and Intravascular Langerhans cells at sites of passively induced allergic contact sensitivity, cell Immunol. 18:435.
- 69.- COWING, C., SCHWARTZ, B.D., DICKLER, H.B., (1978) Macrophage Ia antigens I. Macrophage populations difeer in their expression of Ia antigens. J. Immunol. 120:378.

- 70.- UNANUE, E.R., (1981) The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Part two: symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. Adv. Immunol. 31:1
- 71.- SNYDER, D.S., BELLER, D, I., UNANUE, E.R., (1982) Prostaglandins Modulate macrophage Ia expression. Nature. 299:163.
- 72.- EDWARDS, P.A.W., (1981) Some properties and applications of monoclonal antibodies. Reviw Article. J. Biochem. 200:1
- 73.- PONTECORVO, G., (1975) Production of mamalian somatic cell hybrids by menas of polyethylene glicol treatment. Somat. cell. Genet. 1:397.
- 74.- GALFRE, G., HOWE, S.C., MILSTEIN, C., BUTCHER, G.W., y - HOWARD, J.C., (1977). Antibodies to major histocompatibility antigens by hibrid cell lines. Nature 266:550.
- 75.- GEFTER, M.L., MARGULIES, D.H., SCHARFF, M.D., (1977) -A simple method for polyethylene glycol promoted hybridization of mouse myeloma cells. Somat. cell genet. . 3:231.
- 76.- W.H.O., UNDP/WORLD BANK. (1979) Hybridoma technology with special reference parasitic diseases.

77.- SHAROW, J., MORRISON, S.J., y HABAT, E.A., (1979) Detection of specific hibridoma clones by replica immunoadsorption of their secreted antibodies. Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 1420.

78.-FITHIAN, E., KUNG, S., GOLDSTEIN, G., RUBENFELD, M., FENOGLIO, C., EDELSON, R., (1981). Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:2544.

79.- REINHERZ, E., y SCHLOSSMAN, S., (1982) Human T lymphocyte differentiation. Immunol. today. Sept. 239.

80.-ROWDEN, G., (1977) Immunol.electron microscopic studies of surface receptors and antigens of human Langerhans cells Br. J. Dermatol. 97:593.

81.-STINGL, G., KATZ, S.I., CLEMENT, L., GREEN, I., SHEVACH, E.M., (1978) Immunological functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. J. Immunol. 121:2005.

82.- FREHLINGER, J.G., WETTSTEIN, P.J., FREHLINGER, J.A., y HOOD, L., (1978) Epidermal Ia molecules from I-A and I-EC - subregions of the mouse H-2 complex. Immunogenetics 6:125.

- 83.- MOORE, B.W., (1965) A soluble protein characteristic of the nervous systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19:739.
- 84.- KESSLER, D., LEVINE, L., FASMAN, G., (1968) Some conformational and immunological properties of a bovine brain acid protein (S-100) *Biochemistry* 7:758.
- 85.- ISOBE, T., TSUGITA, A., y OKUYAMA, T., (1981) The amino-acid sequence and the subunit structure of bovine brain S-100 protein (PAP1-b). *J. Neurochem* 30:291.
- 86.- NAKAJIMA, T., WATANABE, S., SATO, Y., KAMEYA, T., HIROTA T., SHIMOSATO, Y., (1982) An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues. *Am. J. Surg. Pathol.* 79:341.
- 87.-COCCHIA, D., MICHETTI, F., y DONATO, R., (1981) Immunochemical and Immunocythochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 294:85.
- 88.- BENDA, P., LIGHTBODY, J., SATO, G., LEVINE, L., SWEET, W., (1968) Differentiated rat glial cell stain in tissue culture. *Science.* 161:370.
- 89.- PFEIFFER, S.E., WECHSLER, W., (1972) Biochemically dif-

ferentiation neoplastic clone of schwann cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:2885.

90.-DeCITRY, F., PICART, R., JAQUES, C., LEGAULT, L., DUPO-  
NEY, P., TIXIER-VIDAL, A., (1980) Presumptive common precursor  
for neural and glial cell lineages in mouse hypothalamus. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA. 70:4165.

91.- STEFANSSON, K., WOLLMANN, R.L., MOORE, B.W., y ARNASCN  
B.G., (1982) S-100 protein in human chondrocytes. Nature.,  
295:63.

92.-NAKAJIMA, T., WATANABE, S., SATO, Y., KAMEYA, T., SHIMO\_  
SATO, Y., y ISHIHARA, K., (1982) Immunohistochemical demonstra-  
tion of S-100 protein in malignant melanoma and pigmented ne-  
vus, and its diagnostic application. Cancer. 50:912.

93.-GAYNOR, R., IRE, R., MORTON, D., HERSCHMAN, H.R., JONES,  
P., COCHRAN, A., (1981) S-100 protein: A marker for human ma-  
lignant melanomas? Lancet. 18:869.

94.- KAHAN, H.J., MARKS, A., THOM, H., BAUMAL, R., (1983) Role  
of antibody to S-100 protein in diagnostic pathology. Am. J.  
CLin. Pathol. 79:341.

95.- ALVAREZ, M.A. (1983) Estudio sobre el comportamiento de las células de Langerhans en el vitiligo, usando como marcador inmunohistoquímico a la proteína S-100. Tesis, Anatomía Patológica, (Hospital General de México). U.N.A.M.

## C I R R I C U L U M    V I T A E

NOMBRE: Filiberto Enriquez Habib

FECHA DE NACIMIENTO: 20 de Agosto de 1944

LUGAR DE NACIMIENTO: Cd. Ixtepec, Oaxaca.

NOMBRE DE LOS PADRES: Sr. Filiberto Enriquez Felipe  
Sra. Nayma Habib de Enríquez

PRIMARIA: Escuela Revolución, Ixtepec, Oax.  
1950-1956

SECUNDARIA: Escuela Federal No. XXVII  
Ixtepec, Oax. 1957-1959.

PREPARATORIA: Escuela Miguel Alemán, Tapa-  
chula, Chiapas. 1960-1961

LICENCIATURA: Escuela de Odontología, Universi-  
dad Nacional Autónoma de México  
1962-1967.

MAESTRIA EN PARODONCIA: Facultad de Odontología, Univer-  
sidad Nacional Autónoma de Méxi-  
co. 1968-1970.

MAESTRIA EN PATOLOGIA BUCAL: Facultad de Odontología, Univer-  
sidad Nacional Autónoma de México  
1973-1974.

DOCTORADO EN PATOLOGIA BUCAL: Facultad de Odontología, Universi-  
dad Nacional Autónoma de México  
1979-1980

DOMICILIO: Av. Dr. Vértiz No. 1224-6  
Col. V. Narvarte  
Del. Benito Juárez  
03020 México D.F.

TELEFONO: 539-39-15