

125
2º ejº



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LAS
CELULAS DE LANGERHANS EPIDERMICAS EN LA
TORTUGA TERRESTRE *Kinosternum integrum*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A
DIANA ALICIA MILLAN ALDAGO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR: DR. ARMANDO PÉREZ TORRES



1996

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LAS CELULAS DE LANGERHANS EPIDERMICAS
EN LA TORTUGA TERRESTRE Kinosternum integrum."

realizado por Diana Alicia Millán Aldaco

con número de cuenta 8321828-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M en C

ARMANDO PEREZ TORRES.

Armando Perez Torres

Propietario

M en C

PATRICIA RIVAS MANZANO.

Patricia Rivas

Propietario

M en C

ANDRES CASTELL RODRIGUEZ.

[Signature]

Suplente

M en C

MARIA CRISTINA VELAZQUILLO MARTINEZ.

[Signature]

Suplente

Dra.

MARICELA VILLAGRAN SANTACRUZ.

[Signature]

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo de Facultad de Ciencias

[Signature]

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco muy especialmente al Dr. Armando Pérez Torres, por brindarme su tiempo, apoyo y enseñanza para la realización de este trabajo dentro de su laboratorio, porque a su lado todo es aprendizaje.

Al Dr. Alfonso Cárbaz Trejo jefe del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, mi más profundo y sincero agradecimiento por el apoyo y la confianza que me ha brindado.

A la histotecnóloga Ma. Luisa Rodríguez Méndez por el apoyo técnico, pero principalmente por su amistad.

Al Dr. Adrián Rondán Zárate, por el apoyo técnico para la realización de la microscopía electrónica.

A los Sres. Tomás Cruz Méndez y Francisco Pasos Nájera, mil gracias por el trabajo fotográfico.

A todos los sinodales, por sus valiosas observaciones a este escrito.

A todas las personas quienes directa e indirectamente se vieron involucradas en esta trabajo, mil gracias.

A mis padres:
Alicia y Pedro con cariño y respeto,
gracias por su apoyo.

A mis hermanos:
Alejandro, Ivone y Sonia con cariño.

A mis sobrinos:
Edgar Miguel, Paola, Diana,
Angel y Fabiola con cariño

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A tí Por Todo.

CONTENIDO.

Introducción -----	1
Antecedentes Generales -----	2
Teoría Neural -----	3
Teoría Melanocítica -----	4
El Gránulo de las células de Langerhans -----	7
Métodos de Identificación -----	11
Origen -----	13
Función -----	16
El Sistema de Células de Langerhans -----	20
La Piel como un órgano inmunológico -----	22
Piel de Tortugas -----	26
Estructura del sistema inmunológico -----	30
Introducción -----	30
Médula Osea -----	32
Timo -----	34
Bazo -----	36
Linfonodos -----	37
Inmunidad Celular -----	38
Inmunidad Humoral -----	39
Complemento -----	39
Memoria Inmunológica -----	40
Factores que afectan la respuesta inmunológica -----	40
Temperatura -----	40
Nutrición -----	41
Variaciones estacionales -----	41
Corticosteroides -----	43

Antecedentes Directos -----	44
Planteamiento del Problema -----	46
Objetivos -----	47
Hipótesis -----	48
Material y Métodos -----	49
Resultados -----	55
Discusión -----	67
Referencias -----	73

ABREVIATURAS.

ATPasa: Adenosintrifosfatasa

CD : Células Dendríticas

CID : Células Interdigitantes

CL : Células de Langerhans

CV : Células Veladas

GCL : Gránulo de las Células de Langerhans

MHC : Complejo Principal de Histocompatibilidad

SCL : Sistema de las Células de Langerhans

SIP : Sistema Inmunológico de la Piel

TLAP : Tejido Linfoide Asociado a la Piel

INTRODUCCION.

En la epidermis de los mamíferos, las células de Langerhans son las únicas células dendríticas presentadoras de antígenos, que poseen la ectoenzima ATPasa (dependiente de Ca^{++}/Mg^{++}) y constitutivamente expresan moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron la presencia de células de Langerhans en la epidermis del pollo. El propósito del presente trabajo es demostrar la presencia de células parecidas a las de Langerhans, en la epidermis de la tortuga *Kinosternon integrum*, con histoquímica enzimática para ATPasa utilizando microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión. Las células dendríticas ATPasa positivas se observaron en láminas epidérmicas cuyo número máximo fue de 192 cels/mm². En los cortes de piel con histoquímica para ATPasa, procesados para microscopía electrónica, se observó un presipitado electrodense en la membrana plasmática de células dendríticas claras localizadas basal y suprabasalmente entre los queratinocitos, ultraestructuralmente similares a las células de Langerhans. En cortes seriados, algunas células dendríticas presentaron gránulos de Birbeck. En el presente trabajo se describe la presencia de células dendríticas ATPasa positivas, morfológicamente similares a las de Langerhans en la epidermis de reptiles.

ANTECEDENTES GENERALES.

Siempre se ha considerado a la piel, el órgano más grande del cuerpo humano, como una barrera física de protección entre el organismo y el medio externo. Esta función "protectora" ha sido explicada por las propiedades fisicoquímicas de la epidermis. Contrariamente, Fichtelius, en 1970, propuso que la piel podría tener la categoría de órgano linfoide primario y funcionar como un órgano inmunológico. En 1978, Streilein acuñó el concepto de tejido linfoide asociado a la piel (TLAP), que incluye a las células de Langerhans (CL), las subpoblaciones de linfocitos T epidermotrópicos, los queratinocitos y el drenaje linfático regional. Las propuestas de que la piel es un órgano inmunológico, constituyen uno de los desarrollos más excitantes de la biología cutánea en las últimas décadas y el papel central para el establecimiento de este concepto lo ocupan las CL.

La historia de las CL empieza en 1868 cuando el estudiante de Medicina Paul Langerhans describe una población de células intraepidérmicas, suprabasales y dendríticas en la piel humana, usando una técnica de impregnación metálica a base de cloruro de oro. Aunque se contaba con microscopios muy primitivos, los dibujos publicados por Langerhans dan una muy clara visión de células dendríticas, regularmente espaciadas dentro de la epidermis, cuyas prolongaciones basales estaban en aparente continuidad con nervios dérmicos y algunas llegaban hasta el estrato córneo. Langerhans pensó que dichas células constituían un "sistema de células nerviosas intraepidérmico".

Inicialmente la información acerca de las CL era sólo morfológica, ya que para evidenciarlas se utilizaban técnicas de impregnación metálica y tinciones supravitales que no son específicas y si muy caprichosas. Esto explicaría el progreso extraordinariamente lento durante el primer siglo de investigación en CL, a las que se relacionó ontogénicamente con el sistema nervioso (teoría neural) y también con los melanocitos (teoría melanocítica).

TEORIA NEURAL

Langerhans (1868), al hacer la descripción morfológica de las células que llevan su nombre, estaba convencido de que eran estructuras nerviosas y este concepto permaneció inalterable por casi cien años. Para evidenciar a las CL se usaban cortes gruesos de piel impregnada con sales metálicas (cloruro de oro) en los que también se observaban fibras nerviosas en las papilas dérmicas, lo que fue interpretado como una continuidad entre nervios y CL. El origen nervioso de las CL se fortaleció en 1928 al ser consideradas como células de Merkel (Kreibich, 1928); en 1957, Ferreira-Márquez, basado en la heterogeneidad de sus dendritas, sugirió que las CL podían ser células de Schwann migrando hacia la epidermis y que podrían funcionar como receptores al dolor o tener una diversidad de funciones sensoriales. Por otro lado, Wiedmann (1956) propuso la existencia de una unidad anatomofuncional formada por las CL, los melanocitos y las fibras nerviosas de la dermis papilar. Las CL representarían receptores para estímulos ambientales, los

melanocitos funcionarían como sitios de relevo y la red de fibras nerviosas conducirían los impulsos y así se provocaría una respuesta neuroendócrina con la liberación de sustancias vasoactivas. Hasta ahora, la continuidad anatómica entre CL, melanocitos y nervios nunca ha sido demostrada. Recientemente, se ha incrementado el interés en la relación entre CL y sistema nervioso, luego de que Hosoi y colaboradores (1993), informaron que fibras nerviosas que contienen el péptido relacionado al gene de calcitonina (CGRP), un neuropéptido vasodilatador, establecen contactos directos con las CL en la epidermis. Lo interesante de este hecho es que CGRP inhibe la presentación de antígenos por las CL *in vitro* (*vide infra*).

TEORIA MELANOCITICA

La teoría melanocítica, postulada originalmente por Masson en 1948, consideraba a las CL como "melanocitos desgastados" o melanocitos postdivisionales que habían perdido la capacidad de producir pigmentos y que estaban en vías de ser descamados. En 1957, Silvers refutó esta teoría al utilizar las experiencias de Mary Rawles (quien había demostrado el origen de los melanocitos a partir de las crestas neurales) y demostró la presencia de células dendríticas aureofílicas en piel de ratones experimentalmente privados de las crestas neurales; concluyó que las CL no se originaban de éstas ni tenían relación con los melanocitos. Zelickson (1966), por su parte, insiste en la idea de que la CL es una célula transicional, descendiente directo de los melanoblastos o bien un estado estacionario entre melanocitos funcionales y

melanocitos desgastados, capaz de producir melanosomas y el gránulo característico de las CL o gránulo de Birbeck. A pesar de lo anterior, todavía durante la primera mitad de la década de los 60, la teoría melanocítica continuaba ejerciendo una influencia importante en el estudio de las CL.

Michael S. Birbeck, Aodan S. Breathnach y John D. Everall, en 1961, trabajando con piel humana con lesiones de vitiligo, observaron que no era posible identificar histoquímicamente células que correspondieran a melanocitos pero si numerosas células con las siguientes características ultraestructurales distintivas:

1. Una cubierta nuclear marcadamente anfractuosa debido a la presencia de surcos profundos llegando a dividir el núcleo en lóbulos.

2. La región del complejo de Golgi bien desarrollada, formando racimos de vesículas yuxtancleares donde también se observaban estructuras centriolares.

3. Las mitocondrias eran cortas, pequeñas y poco numerosas.

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

5. La membrana plasmática carecía de desmosomas, encontrándose separada de las células vecinas por un espacio o hendidura.

6. No contenían premelanosomas ni melanosomas, pero se distinguía otro tipo de gránulo que no se encontraba en los queratinocitos ni en los melanocitos normales. Estos gránulos

aparecían como estructuras lineales con extremos redondeados y atravesados a todo lo largo y por el centro por una línea estriada. De acuerdo a las imágenes observadas, más que parecidos a bastones, los gránulos semejabán estructuras laminadas o discoides de $0.3\mu\text{m}$ de diámetro, con un arreglo bidimensional de partículas responsable de la estriación de la línea central, cuya periodicidad en ambas direcciones era de 9 nm, aproximadamente. Estos gránulos característicos no se observaban en todas las CL, posiblemente debido al plano de corte. Así, Birbeck y colaboradores describieron los rasgos ultraestructurales de las CL y sus marcadores morfológicos; mostraron que en lesiones con vitiligo, donde los melanocitos están ausentes, las CL abundan y aparentemente sustituyen a las células pigmentadas, sugiriendo que las CL no son células en involución o células agonizantes o moribundas. Sin embargo, a pesar de haber establecido los criterios ultraestructurales para identificar a las CL, estos investigadores no las consideraron como una población celular epidérmica independiente, sino como un melanocito desgastado que sintetizaba un gránulo citoplásmico característico, llamado gránulo de Birbeck o gránulo de las CL (GCL), en lugar de los gránulos de melanina característicos de los melanocitos activos. La forma anfractuosa o indentada del núcleo, la explicaron como el reflejo de una función desordenada o expresión de vejez celular.

En 1964, Breathnach revisó la ultraestructura de las CL y describió otras características del GCL y de los organelos de estas células. Breathnach observó que las CL podían localizarse a

diferentes niveles de la epidermis, desde el estrato basal hasta el estrato espinoso; nunca se encontraron en los estratos granuloso y córneo. Notó que las CL que se localizaban basalmente carecían de los GCL. Una característica constante en las CL, independientemente de su localización dentro de la epidermis, fue la presencia de una gran cantidad de vesículas localizadas principalmente en la región del complejo de Golgi. Propuso que estas estructuras podían sufrir alguna transformación y originar la porción en forma de bastón de los GCL; debido a que también observó una continuidad entre los GCL y la membrana plasmática concluyó que estos organelos podían originarse de ambos sitios.

EL GRANULO DE LAS CELULAS DE LANGERHANS.

Aunque los trabajos de Breathnach pudieron haber proporcionado mayor información para especular acerca del origen y función del GCL, siguió considerando a las CL como producto de los melanocitos que nunca se involucran en la melanogénesis. Zelickson (1967), por su parte, reafirma la idea de que la CL es una célula transicional o un estado estacionario entre melanocitos desgastados y melanocitos funcionales, capaz de producir melanosomas y el GCL. Interesantemente, Zelickson observó CL no sólo en la epidermis, sino también en la dermis y además atravesando la membrana basal; estas células presentaban GCL, descritos por Zelickson como estructuras en forma de raqueta de tenis. En 1967, Klaus Wolff confirmó esta forma del GCL, sugiriendo que estos se originaban de las cisternas del complejo de Golgi, basándose en la estrecha relación estructural entre ambos. Wolff propuso que el GCL se

"movía" hacia la membrana para abrirse al espacio extracelular, con lo que supuso una función secretoria de las CL.

Un año más tarde, Sagebiel y Reed (1968), hacen una reconstrucción tridimensional del GCL utilizando cortes seriados. Sin embargo, no abundaron más y no especularon acerca de su posible origen.

En 1968, Cancilla demostró que el lantano, un trazador del espacio extracelular, marcaba la membrana plasmática de las CL y los gránulos unidos a ésta. Este es un antecedente importante de la teoría endocítica de la formación del GCL, propuesta por Hashimoto en 1971, luego de los resultados que obtuvo al trabajar con piel previamente inyectada con peroxidasa. Hashimoto demostró la presencia de esta enzima en GCL unidos a la membrana y en vesículas cercanas a la región del complejo de Golgi; ya que la peroxidasa no atraviesa la membrana plasmática, esto indicaba que era tomada de la superficie por el GCL a través de un mecanismo endocítico. Esquema 1.

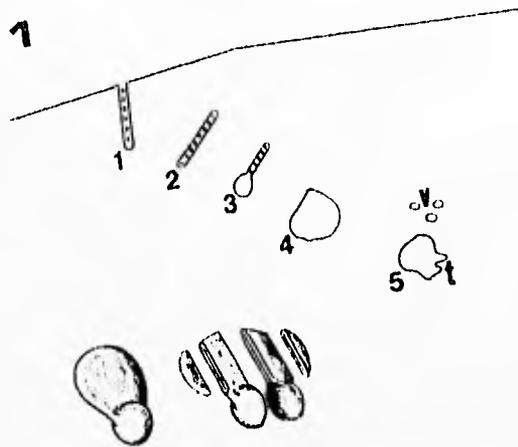
Takahashi, en 1985, empleó una técnica de inmunoperoxidasa ultraestructural con el anticuerpo anti CD1a (un marcador de membrana de las CL) en CL en cultivo y observó que los GCL y la membrana eran positivos, con lo que apoya fuertemente la teoría de que dicho organelo se origina de la membrana plasmática.

En 1987a, Hanau y colaboradores realizaron algunos experimentos similares utilizando técnicas de inmuno-oro ultraestructural en una suspensión de CL epidérmicas humanas, incubadas con los anticuerpos CD1a y para moléculas clase II del

Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (HLA-DR), a diferentes tiempos. Inicialmente, el marcaje se encontró en vesículas cubiertas, posteriormente en los GCL en continuidad con endosomas y más tarde en lisosomas. Hanau concluye que posiblemente la CL toma antígenos del exterior a través de vesículas cubiertas y de los GCL, transportándolos al interior de la célula para "degradarlos" cuando se fusionan con los lisosomas. En un trabajo posterior, Hanau y colaboradores (1989), observaron que se incrementaba la capacidad endocítica de las CL y la formación del GCL después de la aplicación epicutánea del hapteno dinitrofluorobenceno (DNFB).

Lo más importante de todos estos resultados es que iniciaron uno de los aspectos fundamentales en la biología de las CL que es la captación, el procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos, y la posible participación del GCL.

Actualmente el GCL sigue siendo considerado como el criterio ultraestructural de certeza para la identificación de CL, independientemente de su localización, sin embargo, no se ha dicho la última palabra con relación a su origen y su función.



Esquema 1. 1. Formación del GCL; 2, internalización del GCL; 3, Vesiculación parcial; 4, Vesiculación total; 5, Fusión con otras estructuras endosómicas. v, Vesículas, t, Estructuras tubulares. (Tomado de Bartosik, 1992).



Estructura del GCL en forma de raqueta de tenis con microscopía electrónica.

METODOS DE IDENTIFICACION.

Paul Langerhans identificó y describió a las CL utilizando una impregnación metálica de cloruro de oro diseñada por Cohnheim. La técnica no es específica ya que también evidencia elementos nerviosos presentes en la piel. No obstante, durante mucho tiempo continuó utilizándose en la forma original o conjuntamente con microscopía electrónica de transmisión (Zelickson y Mottaz, 1968).

Champy en 1913, y posteriormente Niebauer y Weidmann en 1958, demostraron la afinidad de las CL por una mezcla de ácido ósmico y ioduro de potasio. En 1969, Niebauer y colaboradores, utilizando las modificaciones previamente hechas por Maillet (1959) a la técnica de Champy, demostraron que las CL en piel normal y patológica presentaban sitios reactivos en la cubierta nuclear, el complejo de Golgi y particularmente en los GCL, a una mezcla formada por tetróxido de ósmio-ioduro de zinc (ZIO).

Las CL difícilmente se pueden observar con anilinas. Las tinciones supravitales con colorantes como el azul de metileno y el azul brillante de cresilo, demuestran células con las mismas características y en la misma localización epidérmica que las descritas al usar las impregnaciones con cloruro de oro, mientras que los melanocitos y las fibras nerviosas no muestran afinidad hacia estos colorantes.

Un hecho fundamental en el estudio de las CL fue la demostración de la actividad de la enzima ATPasa en estas células por Mustakallio en 1962. En 1967, Wolff y Winkelmann utilizaron la histoquímica enzimática ultraestructural para determinar la

localización de la ATPasa y encontraron que el producto electrodenso de la reacción se localizaba exclusivamente en la membrana plasmática de las CL.

La histoquímica para ATPasa aplicada en láminas epidérmicas separadas, permitió observar la distribución y facilitó el análisis cuantitativo y cualitativo de las CL, por lo que es considerada altamente confiable y específica para identificar a estas células epidérmicas (Mackenzie y Squier, 1975; Juhlin y Shelley, 1977; Robins y Brandon, 1981).

Las CL no sólo presentan actividad de ATPasa, sino también de otras enzimas como son la fosfatasa alcalina (Gshnait y, Brenner, 1979); aminopeptidasa; α -D-manosidasa (Elleder, 1975) y B-glucuronidasa (Hayashi y colaboradores, 1964). Jarret y Riley (1963) fueron los primeros en informar de la actividad de esterasa inespecífica en las CL de ratones. Posteriormente, Campo-Aasen y Pearse (1966) realizaron un extenso estudio histoquímico de las CL en cortes de piel y láminas epidérmicas de ratones albinos en el cual no lograron demostrar la actividad de fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, aril sulfatasa y ubiquinonas, pero sí de ATPasa y esterasa inespecífica, obteniendo muy buenos resultados para esta última cuando utilizaron la pararosanilina como agente acoplador y el naftol AS nonoato como sustrato. Los autores concluyeron que la CL no es una célula moribunda o desgastada y mucho menos de origen neural, sino que es una célula viva, con intensa actividad hidrolítica y, de acuerdo a la actividad de esterasa inespecífica, que podría ser el equivalente a un macrófago intraepidérmico. La

ATPasa y la esterasa inespecifica son los métodos enzimáticos más usados para la identificación histoquímica de las CL epidérmicas.

Los distintos estudios realizados para conocer mejor las características morfológicas y funcionales de las CL han comprobado que estas células difieren de las otras células epidérmicas por los antígenos de superficie y receptores que poseen. La utilización de procedimientos inmunohistoquímicos e inmunofluorescentes, ha permitido identificar plenamente a las CL y reconocer la presencia de varios antígenos de membrana. Schmitt y colaboradores (1983, 1985) describieron técnicas utilizando partículas de oro coloidal adsorbidas a porciones de anticuerpos específicos e identificándolas a nivel de microscopía electrónica, haciendo posible cuantificar la densidad de antígenos de superficie en las CL.

ORIGEN.

La década de los 60s representó un periodo importante en la investigación de las CL. El concepto que se tenía acerca de la estrecha relación entre CL, melanocitos y células nerviosas ya era fuertemente rebatido. Por otra parte, se fueron acumulando evidencias que sugerían un origen mesodérmico de las CL. Células con características ultraestructurales similares a las CL de la epidermis fueron identificadas en tejidos normales y patológicos diferentes a la piel como en los casos de histiocitosis X estudiados por Basset y Turiaf en 1965. Por otro lado, se sabía que las CL no estaban restringidas a la epidermis, pues atravesaban la unión dermoepidérmica y eran observadas en la dermis y dentro de

los vasos linfáticos (Silberberg y colaboradoras, 1974). Actualmente se conoce como granulomatosis de CL a la histiocitosis X.

Las características morfológicas y los marcadores para macrófagos eran bien conocidos; al encontrar que las CL compartían algunas de ellas, se pensó en la posible relación ontogénica entre ambos tipos celulares. Previamente se había propuesto la hipótesis de que las CL constituyeran un sistema fagocítico intraepitelial por las similitudes que presentan con los macrófagos, con la diferencia que aquellas tenían el GCL y eran una población intraepidérmica que se mantiene por sí misma (Hashimoto y Tarnowski, 1968). La evidencia de que las CL fagocitaban material exógeno como peroxidasa (Wolff y Schreiner, 1970) y ferritina (Sagebiel, 1972) apoyaba la idea del macrófago intraepidérmico, pero al compararlas con los queratinocitos, estos presentaban una actividad fagocítica mayor, por lo que al parecer la fagocitosis no era la función primaria de las CL. A partir de este momento, surge una nueva idea: si las CL son células inmunocompetentes, deben expresar en su superficie los receptores presentes en células del sistema inmunológico, particularmente los de los macrófagos.

Entre 1977 y 1979, se demostró que las CL en humanos, cobayos y ratones expresaban en su superficie receptores para el fragmento cristalizante (Fc) de la IgG (Stingl y colaboradores, 1977), para el componente C3b del complemento (Burke y Gigli, 1980) y también moléculas clase II (HLA/DR en humanos, Ia en roedores) (Rowden y colaboradores, 1977 ; Klareskog y colaboradores, 1977). En

conjunto, estos hallazgos indicaban que las CL podían pertenecer al sistema fagocítico mononuclear y por lo tanto originarse en la médula ósea.

Fue en 1979, cuando Katz, Tamaki y Sachs demostraron que después de 3 semanas, la mayoría de las CL epidérmicas de ratones a los que les habían trasplantado piel de un ratón (A/J a híbridos A/J x Balb/c) se originaban del receptor, mientras que los queratinocitos permanecieron con características del donador. En un ensayo de formación de rosetas se observó que el porcentaje de células formadoras de rosetas (Fc-IgG positivas, Ia positivas) se incrementaban hasta el 100% a los 49 días del injerto. Además, cuando se llevaron al cabo trasplantes de piel singénicos (cepa A/J hacia cepa A/J), el antisuero empleado contra el antígeno Ia de las CL de los ratones Balb/c no marcaba ninguna de las células epidérmicas, pero sí se marcaban al usar un suero policlonal que detecta antígenos Ia. Todos estos resultados sugerían que las CL de la piel trasplantada se originaban de células móviles del receptor. Un segundo experimento fue diseñado para evaluar más directamente el origen de estas células. Ratones C57B1/6 fueron irradiados y se les transfundieron células de la médula ósea de un ratón Balb/c; a los 62 días después de la quimerización, más del 45% de las CL tenían especificidad del donador (Balb/c). En una segunda combinación, ratones B10.A irradiados, recibieron intravenosamente células de la médula ósea de un ratón F1 (B10XB10A) y se determinó, a los 85 días de la quimerización, que el 80% de las CL fueron del donador de médula ósea. Además, ultraestructuralmente se observó

que las células formadoras de rosetas presentaban todas las características de CL y en ambos modelos experimentales, los queratinocitos tuvieron especificidad del receptor.

Así, los autores concluyen que las CL epidérmicas derivan y son continuamente reconstituidas por precursores móviles originados en la médula ósea, proponiendo que el precursor más probable sería el monocito ya que éste y las CL exhiben marcadores de superficie similares a los de la serie de células monocito-macrófago.

En 1984, Volc-Platzer y colaboradores obtuvieron evidencia del origen de las CL humanas a partir de células presentes en la médula ósea, con lo que se confirmaban los estudios en ratones quiméricos.

Considerando la posible relación de las CL con las células de la serie monocito-macrófago y la hipótesis de que pudieran estar involucradas en respuestas inmunológicas se despertó una gran controversia con respecto a su papel funcional. Entonces, ¿cuál era la función primaria de estos "macrófagos intraepidérmicos"?

FUNCION.

Las CL se localizan en un microambiente en el que establecen interacciones con otras poblaciones celulares presentes en la piel. Su apariencia dendrítica es considerada como una estrategia para realizar contactos con la mayor cantidad posible de linfocitos y queratinocitos.

En el contexto de la inmunocompetencia de las CL, fue Pruneiras, en 1969, quien formuló la hipótesis de que las CL podían capturar material antigénico y tener un papel en la respuesta inmunológica primaria.

En 1973, Silberberg observó el contacto directo entre células mononucleares parecidas a linfocitos y CL en piel humana y de cobayos con hipersensibilidad retardada, pocas horas después del reto antigénico. Además, notaron que las CL aparecían dañadas y en menor número, por lo que sugirieron que estas células eran estructuras blanco en las reacciones de hipersensibilidad. Posteriormente, los mismos autores encontraron un gran número de CL en la dermis, los vasos linfáticos dérmicos y en los linfonodos regionales de animales sensibilizados con DNFB, por lo que proponen que las CL capturan material antigénico de la piel (DNFB) y lo transportan a los linfonodos regionales, donde lo "transfieren" a los linfocitos.

Teniendo como antecedentes los trabajos de Silberberg con respecto al daño producido a las CL con la aplicación tópica de un sensibilizador por contacto (cloruro de mercurio), la aposición de células mononucleares con las CL y la presencia de CL en vasos linfáticos dérmicos en dermatitis por contacto, Shelley y Juhlin (1976), demuestran que las CL captan selectivamente sustancias que se conoce producen dermatitis por contacto, incluyendo metales, aldehídos y aminas; ellos sugieren que las CL forman un sistema retículoepitelial importante en el manejo de los antígenos y en la respuesta a la hipersensibilidad. Posteriormente, Hunziker y Winkelmann (1978), reportan datos similares a los anteriores pero trabajando con piel de cobayo tratada con dinitroclorobenceno (DNCB).

Subsiguientemente, Elofsson y colaboradores (1981), describen la actividad endocítica de las CL en piel normal y su incremento en piel de pacientes con dermatitis por contacto alérgica causada, principalmente, por níquel. Además, observan un aumento en el número de CL en aposición con diferentes tipos celulares; también demuestran una gran cantidad de GCL, sugiriendo que estos podrían mediar el transporte de alérgenos de contacto hacia el interior de la célula y concluyen que las CL forman un importante sistema de defensa en la epidermis.

A pesar de numerosas evidencias, el papel funcional de las CL continuaba sujeto a conjetura. Durante la década de los 80, numerosos experimentos *in vitro* e *in vivo* condujeron a documentar el papel de las CL en la presentación de antígenos. La primera evidencia al respecto, la aportan Stingl y colaboradores, quienes en 1978, realizan estudios adaptando los diseños experimentales que dieron excelentes resultados para la demostración de la función presentadora de antígenos de los macrófagos. Utilizaron animales de cepas endogámicas 2 y 13 de cobayo, los cuales fueron inmunizados con ovalbúmina (OVA) y proteína derivada de tuberculina (PPD). Después de intervalos de 2 a 3 semanas, las células T de estos animales fueron incubadas con células estimuladoras pulsadas con OVA y PPD (macrófagos de exudado peritoneal, células epidérmicas enriquecidas con CL y células epidérmicas depletadas de CL) o con células no tratadas de animales no inmunizados (singénicos o alogénicos). Después de 3 días de cultivo, la proliferación de células T antígeno específicas fue medida y se demostró que las

células epidérmicas enriquecidas con CL pulsadas con OVA y PPD inducen una fuerte respuesta proliferativa en las células T singénicas, similar en magnitud a la observada con macrófagos pulsados con antígenos. En contraste, las células epidérmicas depletadas de CL no produjeron proliferación de células T. Los autores concluyeron que las CL pueden presentar antígenos proteicos de un modo inmunológicamente relevante a los linfocitos T y que las CL son la única población celular dentro de la epidermis capaz de mediar esta función.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie específicos en humanos, facilitó la identificación funcional de diferentes subpoblaciones celulares. En 1981, Murphy y colaboradores, describen la presencia del antígeno T6 (hoy CD1a) en la superficie de CL empleando inmunocitoquímica a nivel de microscopía fotónica y de microscopía electrónica de transmisión. Así mismo, las CL expresan la proteína citoplásmica S-100 (Cocchia y colaboradores, 1981) y comparten esta característica con células dendríticas (CD) de la dermis, células interdigitantes (CID) de órganos linfoides, del epitelio de amígdalas y con células gliales del cerebro. La proteína S-100 está altamente conservada en diferentes especies y comprende un grupo de proteínas pequeñas ligadoras de calcio.

Así, a más de 100 años de su descubrimiento, las CL han sufrido una metamorfosis conceptual, desde células nerviosas a melanocitos, posteriormente a histiocitos y finalmente a células dendríticas presentadoras de antígenos.

EL SISTEMA DE CELULAS DE LANGERHANS.

Existen poblaciones celulares localizadas en tejidos extraepidérmicos con características morfológicas, inmunohistoquímicas y funcionales similares a las CL. Al conjunto de estas células se le ha denominado Sistema de Células de Langerhans (SCL) (Barbey y Nezelof, 1986 ; Pérez y Castell, 1989), debido a que las CL son las células más representativas, distinguiéndose de las células del sistema fagocítico mononuclear. Un concepto similar es el del Sistema de las Células Dendríticas propuesto por Steinman. Ambos sistemas están constituido por las CL epidérmicas e intraepiteliales, las células veladas (CV), las células interdigitantes del timo y linfonodos (CID), las células dendríticas intersticiales y las células dendríticas esplénicas (CD de Steinman y Cohn, 1973).

El establecimiento de estos conceptos parte desde los trabajos de Kondo (1969), quien observó, en linfonodos axilares de conejo, un tipo celular con características morfológicas parecidas a las CL, las cuales fueron denominadas por Veldman, en 1970, como células interdigitantes (CID), porque presentaban prolongaciones citoplásmicas que se entrelazaban con las proyecciones en forma de dedo de los linfocitos que las rodeaban. Al principio no parecía haber relación entre las CL y las CID, pero los trabajos de hipersensibilidad de contacto orientaron hacia dicha relación morfofuncional. En 1974, Silberberg y colaboradores, observaron CL marcadas con ferritina en el seno marginal y en la corteza de linfonodos que drenan el sitio de aplicación intradérmica con

ferritina, lo cual no sólo indicaba que las CL y las CID constituían la misma población celular, sino que además sugería que aquéllas eran capaces de captar antígenos, migrar y estimular a linfocitos inmunológicamente competentes, ya sea periféricamente en la piel o centralmente en los linfonodos. Más adelante, Kelly y colaboradores (1978), observaron que un porcentaje de las células mononucleares de la linfa tenían un organelo semejante al GCL y prolongaciones en forma de velo, por lo que fueron denominadas células veladas (CV), que corresponden a la forma migratoria o linfática de las CL, es decir la forma intermedia entre CL y CID. Hoy está plenamente demostrado que las CL epidérmicas, en condiciones normales y después de la estimulación antigénica, migran hacia la dermis y a los linfáticos aferentes como CV y posteriormente como CID en las áreas paracorticales de los linfonodos regionales (Macatonia, 1987)

En 1973, Steinman y Cohn identificaron un tipo especial de célula diferente de los granulocitos, linfocitos y fagocitos mononucleares, durante sus estudios sobre células del bazo de ratón, las cuales se adherían a superficies de vidrio o plástico y se localizaban en la pulpa blanca del bazo. Subsecuentemente, Steinman y colaboradores demostraron que las radiaciones ionizantes y los esteroides reducían considerablemente la población de CD esplénicas de ratón, siendo restituidas con la transferencia pasiva de médula ósea de ratones singénicos. Al año siguiente, Steinman y colaboradores, identificaron *in situ* células esplénicas de ratón con características ultraestructurales idénticas a las CD

caracterizadas *in vitro* y concluyeron que las CD eran análogas a las CID descritas por Veldman en los linfonodos.

En 1981, fue demostrado que las CID, al igual que las CL, poseían la proteína S-100 (Cocchia, 1981). Rowden y colaboradores (1985), posteriormente, demostraron la presencia de esta proteína en las CD de la vaina linfática periarteriolar de la pulpa blanca del bazo y en la médula tímica de roedores y de humanos.

LA PIEL COMO UN ORGANISMO INMUNOLÓGICO.

Es posible que los tegumentos constituyan un elemento corporal con un significado evolutivo muy importante ya que reflejan morfofuncionalmente la adaptación estrecha del organismo a su medio.

El sistema tegumentario está formado por la piel y sus derivados o faneras: glándulas, escamas, plumas, uñas y pelo. En conjunto, el primer papel que cumplen es el de proteger al organismo al que pertenecen. Así, evitan la pérdida de líquidos y la invasión o introducción de sustancias nocivas y de microorganismos patógenos. Sin embargo, y tal vez de manera más relevante, los tegumentos también tienen funciones más activas en coordinación con otros sistemas. En este sentido, la piel puede ser un órgano respiratorio importante, elimina desechos metabólicos y funciona como osmorregulador. Por su asociación a elementos sensoriales, los organismos pueden relacionarse con el medio y adaptarse a sus cambios de una manera eficiente para su supervivencia. La acumulación de reservas grasas en la piel de algunas especies les permite utilizarlas en situaciones de

restricción alimenticia (Pirlet, 1986).

La piel y sus capas (epidermis y dermis) presentan variaciones morfofuncionales de acuerdo a la especie de vertebrado de que se trate. En general, es muy fina en los vertebrados acuáticos y bastante gruesa en las especies terrestres.

La resistencia de la piel a daños exógenos es debida, principalmente, a la presencia de su estrato más superficial, capa córnea o cornificada de la epidermis. La prevención de pérdida indeseable de vapor de agua y la formación de un eficiente obstáculo contra la penetración de agua exógena y compuestos solubles se debe, básicamente, a las propiedades fisicoquímicas de toda la capa superficial (epidermis). Esta función de barrera es atribuida a la producción de láminas esfingolipídicas que son continuamente depositadas en los espacios de las capas de los estratos granuloso y córneo durante la queratinización de la epidermis. La luz solar, especialmente la radiación ultravioleta, provoca daño por radicales libres. Por lo anterior, el papel primario de la pigmentación es proteger contra dichos efectos, siendo relevante dentro de la función "protectora" de la piel (Maderson, 1985).

El abordaje científico del sistema inmunológico de la piel tiene una historia relativamente larga cuando se incluye el reconocimiento de su función de defensa general, pero también es corta como lo es la historia de la inmunología. Fue relativamente tarde en la historia de las ciencias médicas que la piel es reconocida como un órgano independiente e importante.

Recientemente ha sido aparente que la piel es también un órgano en el cual el sistema inmunológico sistémico ha evolucionado hacia un órgano específico especializado con variadas interacciones celulares y moleculares.

Es en 1970 cuando Fichtelius y colaboradores confieren a la piel el nivel de órgano inmunológico primario, como la médula ósea y el timo. Sugieren que los precursores no competentes de linfocitos entran continuamente a la piel para madurar a células inmunocompetentes, probablemente por la acción de factores de diferenciación y maduración presentes en el tegumento.

Posiblemente, la introducción del concepto del TLAP llevó a numerosos investigadores a concentrarse en la epidermis, estudiándola como un órgano inmunológico con su combinación de queratinocitos, CL y linfocitos T.

Además de las células de la epidermis asociadas a la respuesta inmunológica, se puede incluir también a otras células activas inmunológicamente, como las células cebadas, las células endoteliales, etc., así como también mediadores (IL-1, GM-CSF, etc) que normalmente se encuentran en este tejido. En este sentido, Bos y Kapsenberg (1986), proponen un concepto similar al TLAP, que denominan Sistema Inmunológico de la Piel (SIP) y que incluye a: macrófagos tisulares, células cebadas, neutrófilos, CL, CV y CID, pero excluyen al drenaje de los linfonodos regionales. Al respecto, un desarrollo importante en la inmunología es la identificación de moléculas de adhesión que no sólo juegan un papel central en el contacto célula-célula dentro del mismo sistema inmunológico, sino

que también determinan en parte el tráfico de células inmunocompetentes. Junto con los constituyentes celulares del SIP, una amplia variedad de mediadores inmunológicos e inflamatorios están presentes dentro del tegumento. Estos constituyentes humorales del SIP pueden ser divididos en mediadores que están presentes en estados fisiológicos normales (residentes), mientras que otros llegan a la piel a través de la circulación (circulantes). (Tabla 1)

Tabla 1. Componentes humorales y celulares del Sistema Inmunológico Cutáneo.	
Celulares	Humorales
Relacionados principalmente con la inmunidad innata.	
Queratinocitos.	Fibrinolisin
Macrófagos tisulares.	Péptidos antimicrobianos.
Monocitos.	Proteínas del complemento.
Granulocitos.	Eicosanoides.
Mastocitos.	Neuropéptidos.
	Citocinas.
Relacionados principalmente con la inmunidad adquirida.	
Células de Langerhans.	Inmunoglobulinas secretorias.
Células dendríticas tisulares.	Interferencias, interferones.
Células T.	Factores estimuladores de colonias.
Células endoteliales.	Otras citocinas (TGF, TNF)
(Tomado de Bos y Kapsenberg, 1993)	

Con el establecimiento del concepto del SIP en los mamíferos, es apropiado considerar los aspectos de su origen evolutivo, comparando su estructura y su función en grupos de animales representativos. Entre los vertebrados "inferiores," la mayoría de los constituyentes básicos del sistema inmunológico de los mamíferos están presentes. Los cambios en el sistema inmunológico

de la piel son primariamente de organización estructural y reflejan no sólo especialización del sistema inmunológico y sus componentes, sino tambien cambios en la morfología de la piel, los cuales pueden ser debidos a cambios en el hábitat . Algunas de las tendencias evolutivas de la piel, de la inmunidad y del sistema inmunológico de la piel incluyen:

1. Incremento en la cornificación de la epidermis, particularmente siguiendo el movimiento medioambiental de acuático a terrestre.

2. Incremento del sistema linfático y desarrollo de centros germinales en la dermis y tejido subcutáneo para el procesamiento de antígenos.

3. Cambio de linfocitos a células dendríticas presentadoras de antígenos como el principal inmunocito de la epidermis.

4. Incremento en el repertorio de antígenos a los que pueden responder los vertebrados "superiores".

5. Desarrollo de hipersensibilidad retardada asociada a la presencia de células cebadas liberadoras de histamina y a las múltiples clases de inmunoglobulinas.

6. Una posible disminución de compuestos defensivos no específicos, producidos por glándulas o células secretoras. (Cooper, Grewal y Magor, 1990).

PIEL DE TORTUGAS.

La piel de los reptiles es típicamente seca. A diferencia de la piel de los anfibios y mamíferos, contiene pocas glándulas o ninguna. Las capas basal y espinosa de la epidermis originan las

escamas córneas que se desprenden periódicamente en forma de placas o todas juntas. Por debajo de las escamas, muchos reptiles desarrollan placas óseas en la dermis (los llamados osteodermos). Estas pueden limitarse a la cabeza o pueden recubrir casi todo el cuerpo. El caparazón de las tortugas está formado por componentes córneos y óseos. Las escamas córneas se modifican a menudo y forman crestas, espinas u otros apéndices. Los reptiles se caracterizan por poseer una capa córnea muy desarrollada y bien queratinizada formando gruesas escamas. Esta capa es reemplazada gracias a una serie de mudas periódicas, lo que indica que la capa germinativa tiene una actividad cíclica de divisiones. Muchos reptiles, particularmente los lagartos y las serpientes, tienen coloraciones brillantes y complejas, las cuales pueden desempeñar un papel en el camuflaje. (Young, 1981). La dermis se caracteriza por la abundancia variable de cromatóforos, que junto con las escamas epidérmicas dan a los reptiles su aspecto característico.

La epidermis de los reptiles se caracteriza por un grado especialmente alto de cornificación. Existen comúnmente 3 estratos (con sus respectivas variaciones interespecie): un estrato germinativo donde ocurren las divisiones celulares, un estrato granuloso donde son encontrados gránulos basófilos de queratohialina y un estrato córneo de células muertas queratinizadas y duras. En reptiles, en contraste con los anfibios, se encuentran escalas de cornificación a través de toda la piel. En los cocodrilos y las tortugas, la descamación es un proceso usualmente poco importante y lento (Maderson, 1985).

En 1972, Matoltsy y Huszar realizan un amplio estudio ultraestructural de la piel de las tortugas y del proceso de queratinización de la epidermis, para obtener información sobre los productos, procesos de diferenciación y eventos secuenciales en la formación del estrato córneo. Describen que la epidermis de la piel que cubre el cuello y las patas está formada de 4 a 6 capas de células nucleadas y un grueso estrato córneo. Las células nucleadas en la capa basal son cúbicas, representan el estrato de células reproductivas y contienen muchos ribosomas y cisternas de retículo endoplásmico rugoso y vesículas y túbulos de retículo endoplásmico liso. Los filamentos son relativamente escasos; gotas de lípidos y glucógeno aparecen en cantidad moderada y se llegan a observar también cuerpos vesiculares y gránulos mucosos, aún en células ya diferenciadas. Los gránulos mucosos muestran una estructura interna variable y se disponen cerca de la periferia celular para descargar posteriormente su contenido hacia el espacio extracelular. Se observan también cuerpos multivesiculares que contienen una gran cantidad de pequeñas vesículas y un componente muy peculiar en forma de disco. Cuando las células entran en estado de transformación, la membrana plasmática se engrosa y los organelos se desintegran. Las células cornificadas están completamente ocupadas con lípidos y filamentos estrechamente empaquetados dentro de una matriz relativamente translúcida. La meta final de la diferenciación de los queratinocitos es la formación del estrato córneo que provee protección contra el medio ambiente particular en el cual viven estos vertebrados. Las células cornificadas de las

tortugas son similares a la de otros vertebrados. Los autores concluyen que el proceso de queratinización en la epidermis de tortugas es comparable al observado en la epidermis de anfibios, aves y mamíferos.

La función de la piel en las tortugas, como en el resto de los reptiles y los demás grupos de vertebrados, se divide principalmente en dos categorías. La función primaria es la de barrera y la función secundaria es la de coloración, que es mucho más variable dentro de los reptiles puesto que dicho patrón involucra el medio ambiente sexual y la depredación. La piel de las tortugas también es un órgano sensitivo y puede ser una fuente de secreción de feromonas y estar involucrada en la defensa u ofensa (Maderson, 1985).

Otro aspecto estrechamente relacionado con el presente trabajo es el que la piel de las tortugas ha sido utilizada para el estudio del sistema inmunológico y las reacciones de trasplantes cutáneos.

En 1969a, Borysenko realiza un amplio trabajo con injertos de piel en varias especies de tortugas en el cual informa que los aspectos fundamentales de la reacción a los injertos no difieren mucho de los observados en otros vertebrados. Borysenko describe dos fases en la permanencia de los injertos: la fase de latencia, que involucra la cicatrización del injerto y el ajuste al nuevo medio y la fase de rechazo, caracterizada por una invasión de células linfoides, un colapso vascular y, finalmente, necrosis del tejido injertado. Las fases se observan de la misma manera, independientemente de que el injerto sea aloinjerto o xenoinjerto,

pero existiendo diferencias en el tiempo de rechazo. Borysenko propone tres posibles explicaciones para el rechazo crónico de estos injertos en las tortugas; en la primera menciona que puede deberse a una razón puramente física; en la segunda considera que las tortugas presentan un sistema inmunológico filogenéticamente primitivo o deficiente y en la tercera propone que pueden explicarse con bases genéticas de histocompatibilidad.

En un trabajo posterior, el mismo Borysenko (1969b) reporta que a diferencia de otros vertebrados que alcanzan la maduración inmunológica al nacimiento o eclosión, las tortugas lo hacen varios meses después, lo cual puede explicar el que estos organismos presenten un rechazo crónico y no agudo a los injertos de piel.

ESTRUCTURA DEL SISTEMA INMUNOLOGICO DE REPTILES.

Introducción.

En comparación con la inmensa variedad de formas de expresión del sistema inmunológico de los phyla de invertebrados, los vertebrados poseen un plan básico de organización y a diferencia de aquellos, pertenecen a un sólo phylum. Aunque existe una notable divergencia evolutiva dentro de los vertebrados, los componentes básicos celulares y moleculares de la inmunidad se conservan fundamentalmente en todas las especies existentes. Sin embargo, la creciente especialización del tejido linfóide y de las funciones de los linfocitos, junto con la gran variedad de clases de inmunoglobulinas, parecen estar asociados con grados más complejos de organización. Así, el sistema inmunológico más complejo desde los puntos de vista estructural y funcional es el que poseen los

mamíferos (Roitt, 1996). Sin embargo, el sistema inmunológico de los reptiles no es tal vez muy diferente. El principal problema en el estudio de la inmunidad de los reptiles se presenta principalmente a nivel celular, por ejemplo, en la delineación de las subpoblaciones de linfocitos B y T. Otra área de gran interés es la respuesta inmunológica a los efectos medioambientales, específicamente la temperatura, que es de particular importancia cuando se analizan las influencias estacionales. Esto hace de los reptiles, y en particular a las tortugas (puesto que son capaces de rechazar injertos y montar otras respuestas inmunológicas de la misma manera que lo hacen los llamados vertebrados "superiores") un modelo interesante para intentar dar un paso más en el conocimiento de la evolución de la inmunidad. (Grey, 1963; Maung, 1963).

Los reptiles poseen células circulantes que se caracterizan por llevar a cabo funciones inmunológicas, como son los eosinófilos, granulocitos neutrófilos, basófilos, linfocitos, monocitos y células plasmáticas. Otro tipo celular, llamado granulocito azurófilo, se considera una etapa en la maduración de los granulocitos neutrófilos.

Varios de estos tipos celulares no sólo se localizan en la circulación, sino también en los órganos constituyentes del sistema inmunológico u órganos linfoides (Cooper y colaboradores, 1985).

El sistema linfoide de los reptiles está formado por órganos como el timo, el bazo, los agregados linfoides difusos localizados en varios órganos y sistemas (digestivo, respiratorio, endócrino y urogenital) y órganos parecidos a linfonodos.

Aunque las funciones inmunológicas de la médula ósea de reptiles son un tanto desconocidas, las observaciones sugieren que contiene células linfoides y células madre hematopoyéticas (Cooper y colaboradores, 1985, Zapata y Cooper, 1990a).

Médula Osea.

La médula ósea no ha sido del todo estudiada en estos vertebrados y la escasa información existente está relacionada sólo con su función hematopoyética, lo cual explica la carencia de resultados con respecto a la respuesta inmunológica. La organización de la médula ósea es similar en todas las clases de vertebrados. Estudios relacionados con variaciones estacionales en la misma especie y entre diferentes especies de diferentes clases, han revelado que la granulopoyesis y trombopoyesis ocurren exclusivamente en la médula ósea. En algunas lagartijas, el bazo es el principal órgano que realiza la eritropoyesis, pero en la mayoría de las especies dicha función la realiza la médula ósea, mientras que en las tortugas la eritropoyesis se realiza en ambos órganos, por lo que los reptiles parecen representar un grupo transicional entre los anfibios, en los que el bazo es principalmente eritropoyético, y las aves adultas cuya médula ósea es la que realiza esta función (Zapata y Cooper, 1990a).

El microambiente celular que rige la diferenciación de células sanguíneas está creado por un "estroma" celular formado por células reticulares adventiciales, células reticulares estromales y sinusoides sanguíneos (células endoteliales). Esta estructura es similar en todos los vertebrados. Las células endoteliales se

alinean en sinusoides sanguíneos, son electrodensas y contienen uniones tipo hendidura o comunicantes; son un componente esencial en la médula ósea por su función endocítica. Aunque la médula ósea de los vertebrados tiene macrófagos y células reticulares con capacidades endocíticas, el revestimiento de células endoteliales representa el principal tipo celular que "remueve" material ajeno de la circulación (Cooper y colaboradores, 1985, Zapata y Cooper, 1990a). En reptiles y mamíferos, las prolongaciones de las células reticulares constituyen una capa discontinua de células adventiciales por fuera del revestimiento de células endoteliales sinusoidales.

Además del revestimiento de células endoteliales fagocíticas, hay una gran cantidad de macrófagos libres en el estroma, pero son pocos los encontrados en la luz de los sinusoides sanguíneos. Junto con los macrófagos, siempre están presentes linfocitos y células plasmáticas en el parénquima, además de otras células sanguíneas maduras y en desarrollo. Los linfocitos pequeños presentan una relación núcleo-citoplasma alta, abundante cromatina condensada y un número escaso de organelos citoplásmicos. El citoplasma de las células plasmáticas contiene característicamente, cisternas dilatadas de retículo endoplásmico rugoso.

La médula ósea como fuente de células inmunológicamente competentes ha sido estudiada principalmente en anfibios anuros y los resultados experimentales muestran funciones equivalentes a la de los mamíferos (Cooper, Klempau y Zapata, 1985; Zapata y Cooper, 1990a).

Timo.

El timo es un órgano presente únicamente en los vertebrados. Además de las pequeñas diferencias anatómicas y el número de bolsas faríngeas que contribuyen a su formación, no hay variaciones histológicas en la organización del timo en todos los vertebrados, excepto por la discutida presencia o ausencia de los llamados corpúsculos de Hassall en vertebrados ectotérmicos y la variable presencia de células mioides (Zapata y Cooper, 1990b).

Existen algunos órdenes de reptiles en los que no se describe la presencia de timo, mientras que en las tortugas, algunos investigadores describen un sólo lóbulo y otros lo describen como un órgano multilobulado (Borysenko y Cooper, 1972; Leceta y Colaboradores, 1984).

El timo en todos los reptiles está delimitado por una cápsula de tejido conjuntivo formada principalmente por fibroblastos y fibras de colágena, por debajo de la cual, existe una capa continua de los procesos de las células reticulares con una membrana basal continua. Dicha capa separa los linfocitos corticales de los componentes de la cápsula. En las tortugas, la cápsula proyecta septos hacia el parénquima tímico, los cuales llevan vasos sanguíneos y nervios y dividen al órgano en lóbulos. Existen evidencias de que el timo es el primer órgano que llega a ser linfoide durante la ontogenia de reptiles (Zapata y Cooper, 1990b).

El timo de todos los reptiles se divide en corteza y médula. En la corteza, las largas células reticuloepiteliales con un núcleo irregular con cromatina condensada y largas prolongaciones unidas

por desmosomas constituyen una red en la cual descansan los linfocitos. Dentro de la corteza existe un tipo celular que recuerda a las llamadas células nodrizas del timo de mamíferos, por su asociación aparentemente estrecha con las células reticulares y porque se observan rodeadas por linfocitos, haciendo contacto con la superficie de aquellas. Sin embargo, no existen evidencias funcionales de estas células en ningún tipo de vertebrado no mamífero (Zapata y Cooper, 1990b).

En la médula del timo existen numerosas células epiteliales diferentes, muchas de las cuales podrían tener actividad secretora; frecuentemente se observan células quísticas.

Los timocitos de tortugas (y en general de todos los reptiles) son células en maduración, con un diámetro de 4 a 8 μm , presentan un núcleo grande con abundante cromatina condensada y son equivalentes a los llamados linfocitos medianos y pequeños, siendo obviamente las células más abundantes del timo. Los linfoblastos son células grandes poco electrodensas y frecuentemente se observan en mitosis, localizadas principalmente en la corteza (Zapata y Cooper, 1990b).

Los macrófagos y células plasmáticas son un componente común en el timo y su número varía de acuerdo a la especie.

En 1984, Leceta y colaboradores, confirman la presencia de células interdigitantes en el timo y en otros órganos linfoides de tortugas; los autores describen la presencia de CID en la corteza tímica, aunque son más numerosas en la región cortico-medular, presentando un núcleo irregular con cromatina condensada en la periferia y un citoplasma con escasos organelos y numerosas

prolongaciones interdigitadas con linfocitos pequeños. Los autores dejan abierto a discusión su posible papel funcional. Concluyen que por criterios morfológicos era imposible confirmar la naturaleza u origen de las CID, pero sugieren que podrían originarse de monocitos circulantes.

Una característica importante de la médula tímica de las tortugas, es la ausencia de los llamados corpúsculos de Hassall, que al parecer son característicos de los vertebrados endotérmicos (aves y mamíferos) (Zapata y Cooper, 1990b).

La estructura de los vasos sanguíneos del timo de todos los reptiles es similar al descrito en mamíferos. Se observa una capa de células reticuloepiteliales, con membrana basal, la cual está situada entre los timocitos y los espacios perivasculares. Este arreglo es la base estructural de la barrera hematotímica.

La involución del timo en todos los reptiles, como en otros vertebrados, se caracteriza por un incremento de tejido conjuntivo y disminución celular (linfocitos, células epiteliales, CID, etc.). La involución normal puede estar relacionada con el ciclo anual y ser transitoria; después se asocia con la edad cuando es definitiva (Cooper y colaboradores, 1985).

Bazo.

El bazo de los reptiles es un órgano redondo u oval de tamaño variable; se encuentra siempre asociado al páncreas y al estómago. En muchas especies están bien diferenciadas la pulpa blanca y la pulpa roja.

La pulpa blanca incluye áreas linfoides densamente enpaquetadas, rodeando arteriolas centrales, constituyendo una verdadera vaina linfática periarteriolar. Células reticulares aplanadas rodean la pulpa blanca y la separan de la pulpa roja, la cual consiste de un sistema anastomosado de cordones celulares y sinusoides cuyas paredes están delimitadas por células reticulares (Zapata y Cooper, 1990c).

En 1976, Borysenko describió la estructura del bazo de la tortuga *Chelydra serpentina*, en la que la pulpa blanca contiene linfocitos pequeños y un número bajo de linfoblastos; las células reticulares también se encuentran entre los elementos linfoides, pero están básicamente distribuidas en la periferia de la pulpa blanca donde forman una zona marginal entre la pulpa blanca y la pulpa roja; las CID, a las cuales se les ha adjudicado una función fagocítica, tienen un núcleo largo y frecuentemente lobulado y pueden formar cúmulos entre los linfocitos, aunque en ocasiones se han observado en estrecha asociación con éstos, lo que recuerda a las células presentadoras de antígenos de los órganos linfoides periféricos de los llamados "vertebrados superiores". La pulpa roja contiene un gran número y variedad de tipos celulares como grupos pequeños de linfocitos dentro de cordones, macrófagos y células plasmáticas (Zapata y Cooper, 1990c).

Linfonodos.

Con respecto a los linfonodos, la situación en reptiles puede ser más avanzada en comparación a los peces y a los anfibios en los que no se describen, como tales, órganos parecidos a linfonodos

(excepto en anuros); en los reptiles se ha descrito la presencia de tejido linfoide axilar en estrecha asociación con los sistemas linfático y sanguíneo (Cooper, Klempau y Zapata, 1985; Zapata y Cooper, 1990d). Como en todos los tejidos linfoides, los linfocitos se localizan en un soporte interno compuesto de células y fibras reticulares. Todos los vasos sanguíneos y linfáticos están recubiertos por un epitelio plano simple, a través del cual los linfocitos pueden movilizarse por diapedesis. Los linfonodos presentan folículos linfoides carentes de centros germinales.

Aunque su función ha sido difícilmente estudiada, se ha descrito también tejido linfoide asociado al intestino en varias especies de reptiles, formado principalmente por células linfoides y células plasmáticas.

Inmunidad Celular.

Con los trabajos realizados por Borysenko (1969a), en los cuales demuestra el rechazo de injertos cutáneos en las tortugas, es clara la presencia de una inmunidad mediada por células en estos organismos. Además, observó que las tortugas son capaces de llevar a cabo reacciones inflamatorias. Cooper y colaboradores, en 1985, mencionan que a este nivel de rechazo de injertos, pueden existir complejos similares al MHC. El mismo Borysenko (1969a), había sugerido que los resultados obtenidos pudieran estar regidos por genes de histocompatibilidad. Es hasta 1990, que Kaufman y colaboradores presentan evidencias de la posible presencia de moléculas clase I y II en reptiles, ya que observaron reacción cruzada con antisueros de pollo contra moléculas del MHC.

Inmunidad Humoral.

Todos los vertebrados elaboran anticuerpos frente a una amplia variedad de antígenos; los anticuerpos, comprenden cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras, con múltiples dominios. Existe IgM polimérica en todos los vertebrados y constituye el isotipo más conservado (Roitt, 1996).

La inmunidad humoral (cuyo estudio involucra usualmente la búsqueda de anticuerpos), es el aspecto mejor estudiado de la inmunidad de reptiles. Aparentemente el 50% de los esplenocitos son células IgM positivas, mientras que un número pequeño de linfocitos expresan IgM e IgY simultáneamente, siendo la IgY la segunda clase de inmunoglobulinas en reptiles (Cooper, Klompau y Zapata, 1985).

En 1963, Maung comenta que las tortugas pueden precipitar antígenos solubles, además de aglutinar la toxina de *Brucella abortus* y que ésta respuesta es T dependiente.

Complemento.

Los factores del complemento en el suero, son los que se presentan primero en la evolución de los vertebrados. Todos los grupos poseen proteínas similares al complemento que en conjunto con ciertas moléculas de anticuerpos, son responsables de la lisis celular, especialmente de bacterias gram-negativas.

Existe poca información acerca del complemento en reptiles. Cooper y colaboradores (1985), mencionan la existencia de citotoxicidad celular mediada por linfocitos dependiente de anticuerpos en reptiles.

Memoria inmunológica.

La memoria inmunológica se refiere al aumento de la reactividad después de un reto antigénico secundario. Esto sugiere que es un mecanismo mediado por células, involucrando poblaciones de linfocitos funcionales. La escasa literatura existente al respecto en tortugas, habla de la carencia de memoria en estos reptiles; sin embargo, esto podría representar una situación única en vertebrados, por lo cual se ha sugerido que, probablemente, se debe a procedimientos inadecuados de inmunización, así como a la carencia de controles óptimos (Cooper, Klempau y Zapata, 1985).

FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA INMUNOLOGICA.

Temperatura: Todos los vertebrados ectotérmicos presentan respuestas inmunológicas dependientes de la temperatura. Los reptiles tienen al menos 3 reacciones dependientes de la temperatura:

1. Reacción hospedero contra injerto.
2. Síntesis de anticuerpos.
3. Rechazo de aloinjertos.

Todos los investigadores concuerdan con el hecho de que los reptiles poseen una temperatura óptima de síntesis de anticuerpos, en la que producen los títulos más altos durante un tiempo mínimo. Borysenko, en 1969a, demostró que la respuesta inmunológica en tortugas hacia los injertos cutáneos es dependiente de la temperatura: mientras que a 25°C hay un rechazo, a 10°C no hay reacción inmunológica.

Nutrición: Experimentalmente se ha inducido involución tímica en reptiles sometidos a malnutrición. El resultado de la malnutrición en tortugas es una profunda deficiencia en la respuesta humoral y celular; el timo se atrofia aunque los linfocitos del bazo son menos afectados. Los 3 mecanismos sugeridos para estos cambios son:

1. Un efecto directo sobre el metabolismo celular y la síntesis de productos celulares.
2. Un efecto mediado por interacciones más complejas con el sistema endócrino.
3. La influencia del stress, incrementando los niveles de corticosteroides en el plasma. (Cooper, Klempau y Zapata, 1985).

Las deficiencias de vitaminas y minerales también son una posible causa directa de la inmunosupresión observada en tortugas malnutridas (Borysenko y Lewis, 1979).

Variaciones Estacionales: La información sobre las variaciones estacionales que afectan al sistema inmunológico en vertebrados ectotérmicos, puede resumirse en 3 categorías básicas:

1. Diferentes clases de vertebrados o especies sufren cambios inmunológicos similares durante distintas estaciones anuales.
2. Las características genéticas individuales pueden ser importantes en la explicación de resultados variables.
3. Diferentes agentes causales como la temperatura, el fotoperíodo y los mediadores homeostáticos internos (hormonas, neuromoduladores, neuropéptidos, etc.) pueden estar involucrados (Zapata y Cooper, 1990).

La mayoría de los reptiles, incluyendo lagartijas, serpientes y tortugas, presentan cambios histológicos estacionales. En general, durante el invierno, el timo de reptiles es pequeño, difícil de localizar y profundamente involucionado, con una pobre arquitectura y escasos linfocitos corticales, aunque la médula solamente está parcialmente depletada. En la tortuga *Mauremys caspica*, ha sido observada una leve involución tímica al inicio de la primavera; la corteza tímica es reducida y pálida, sin variaciones en la médula. Al final de la primavera se restaura nuevamente la corteza tímica, identificándose también las CID (Leceta y Zapata, 1985; Zapata, 1992). La involución estacional ocurre por una disminución en el número de timocitos durante el invierno; en la primavera, la población de estas células se restaura luego de una intensa proliferación linfoide que puede ocultar los límites de la corteza y la médula. En otoño y verano, el timo aparentemente no muestra modificaciones.

Las variaciones estacionales que afectan la estructura esplénica reflejan las descritas en el timo. En general, la pulpa blanca es depletada en invierno, quedando pocos y pequeños folículos linfoides; sin embargo, durante la primavera y verano, el bazo incrementa su tamaño. El otoño representa una fase estacionaria intermedia con pocos cambios estructurales. Estos cambios en la estructura del bazo pueden explicar las diferencias entre las respuestas de varios reptiles en comparación con los mamíferos (Zapata y Cooper, 1990).

En verano, la pulpa blanca consiste solamente de pequeños grupos de linfocitos frágilmente empaquetados; las vainas linfáticas periarteriolares muestran áreas carentes de linfocitos.

Durante el otoño, hay un incremento gradual en el tejido linfoide esplénico. No se encuentran otras variaciones durante el invierno, además de las que son evidentes en la pulpa blanca del bazo. Al inicio de la primavera, aunque no hay cambios en el tamaño del bazo, el número de linfocitos disminuye. Para el final de la primavera hay un considerable aumento en la pulpa blanca (Leceta y Zapata, 1985).

El tejido linfoide asociado al intestino de reptiles sufre cambios mínimos con las variaciones estacionales. Las condiciones son extremadamente diferentes entre varias especies.

Corticosteroides: El papel que juegan los corticosteroides en las modificaciones estacionales del sistema inmunológico de ectotermos fue afirmado, primero, por el establecimiento de la correlación entre las fluctuaciones en los niveles de corticosteroides circulantes e inmunorreactividad estacional. Con respecto a la inmunorreactividad, se han medido varios parámetros, que incluyen: el número de linfocitos periféricos, celularidad de órganos linfoides primarios y secundarios, respuesta inmunológica humoral y celular.

En las tortugas, se ha reportado la profunda involución del timo y del bazo durante el verano coincidiendo con niveles altos de corticosterona en la circulación, mientras que la disminución moderada en el tejido linfoide fue difícil de relacionar con

niveles altos de esteroides circulantes durante el invierno (Cooper, Klempau y Zapata, 1985; Zapata y Cooper, 1990).

Así, la información disponible sobre los efectos de los corticosteroides sobre el sistema inmunológico de tortugas es dispersa y frecuentemente contradictoria (Leceta y Zapata, 1985).

ANTECEDENTES DIRECTOS.

En 1990, Carrillo, Castell, Pérez y Rondán informaron de la presencia de células dendríticas suprabasales ATPasa positivas en la epidermis de *Rana catesbeiana*, las cuales ultraestructuralmente presentaban el producto de la reacción histoquímica en la membrana plasmática y mostraban un citoplasma claro, libre de tonofilamentos, desmosomas, premelanosomas, melanosomas y un núcleo de forma irregular. Los autores concluyen que dichas células podrían ser el equivalente morfológico de las CL en anfibios, siendo este trabajo la primera descripción formal de la presencia de células parecidas a las CL en este grupo de vertebrados. Ese mismo año, Du Pasquier y Flajnik demuestran la presencia de células dendríticas que expresan moléculas clase II del MHC en la epidermis de la piel de *Xenopus*. Ambos hallazgos podrían considerarse la evidencia de la presencia de CL en la epidermis de anfibios.

En 1991, Carrillo, Pérez, Castell y Antuna al trabajar con piel de pollo, células epidérmicas con características histoquímicas y ultraestructurales similares a las CL. Posteriormente, Pérez y Millán (1994), demuestran que las células dendríticas ATPasa positivas de la epidermis del pollo expresan moléculas clase II, concluyendo que estas células epidérmicas son

similares a las CL de la piel de los mamíferos.

En 1966, Breathnach y Poyntz realizaron una investigación para conocer la estructura básica, el desarrollo y los mecanismos de transferencia de los gránulos de melanina, de los melanocitos de la piel de la cola de *Lacerta vivipara*. Para ese entonces, las CL seguían siendo consideradas como el destino final de los melanocitos. En ese sentido, y de acuerdo con el objetivo primordial del trabajo, las CL fueron buscadas intencionalmente. Además de conocer la estructura de las células pigmentarias, ocasionalmente se observaron algunas células de citoplasma claro, sin desmosomas y sin tonofilamentos, con un núcleo indentado, claramente distinguibles de los melanocitos y de los queratinocitos, carentes del GCL lo que hizo que Breathnach y Poyntz concluyeran que la piel de los reptiles carecían de CL típicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los reptiles ocupan una posición filogenética intermedia entre los anfibios y las aves en los cuales está demostrada la presencia de CL, por lo que sería interesante conocer si existen células parecidas a las CL en la piel de los reptiles.

La piel de las tortugas tiene características que la hacen un órgano protector ante el medio y es capaz manifestar respuestas inmunológicas similares a las de otros vertebrados, como el rechazo a aloinjertos cutáneos, fenómeno dependiente de la disparidad del MHC y en el cual las CL han sido involucradas (Streilein y colaboradores, 1982). Siendo la piel un sitio por el que ocurren muchos estímulos antigénicos, ante los cuales se monta una respuesta inmunológica, el papel de "defensa" deberá estar basado en la presencia de células dendríticas presentadora de antígenos, morfológicamente similares a las CL de mamíferos.

OBJETIVOS.

1. Demostrar la presencia y caracterizar morfológicamente a las células de Langerhans de la piel de la tortuga terrestre *Kinosternon integrum*, utilizando histoquímica enzimática para ATPasa a nivel de microscopía fotónica y electrónica.

2. Contribuir al conocimiento del estudio filogenético de las células de Langerhans en vertebrados no mamíferos.

HIPOTESIS.

Si los reptiles se ubican filogenéticamente entre los anfibios y las aves y las tortugas son capaces de rechazar injertos cutáneos, fenómeno en el que están implicadas las CL, entonces estos organismos poseen células morfológicamente similares a las CL de otros vertebrados.

MATERIAL Y METODOS.

Animales: Se estudiaron 20 tortugas adultas de ambos sexos, de la especie *Kinosternon integrum*. Los animales se mantuvieron en el laboratorio en condiciones naturales de luz y temperatura y fueron alimentadas con hígado de pollo y lechuga 2 veces por semana.

Se sacrificaron 2 tortugas mensualmente (excepto en enero y en agosto) por sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico) administrado intraperitonealmente.

Obtención de muestras: La piel de la región ventral del cuello fue la utilizada en el presente trabajo por ser la que presentaba menor pigmentación en la especie estudiada. Para los análisis con microscopía fotónica, se cortaron fragmentos de piel de 1 cm², los cuales fueron fijados en formol amortiguado al 10% durante 24 h y procesados para realizar cortes en parafina de 5µm y teñirlos con la técnica de hematoxilina-eosina (H-E). Para microscopía electrónica, las muestras de piel fueron de 10mm x 1mm x 1mm. También se tomaron y fijaron en formol amortiguado al 10%, los timos y bazos de algunos animales, aunque esto no forma parte del trabajo.

Método de separación de láminas epidérmicas: La separación de láminas epidérmicas es tal vez el procedimiento más relevante. Los fragmentos de piel de 1 cm² fueron incubados durante 60 minutos a 37° C en PBS (pH 7.3) el cual contenía 20 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

También se probó el CaCl₂ 2M como método de obtención de láminas epidérmicas, pero el PBS + EDTA fue el método de separación

más eficiente, obteniéndose láminas epidérmicas fácilmente y conservando su estructura. Algunas de estas láminas, se procesaron para hacer cortes en parafina de 5 μ m y teñirlas con la técnica de H-E

La obtención de láminas epidérmicas fue realizada con la ayuda de pinzas finas sin dientes o con 2 agujas hipodérmicas, bajo el microscópio estereoscópico.

Histoquímica enzimática para ATPasa en láminas epidérmicas.

Una vez establecido el método de separación apropiado, las láminas epidérmicas fueron procesadas para la demostración histoquímica de ATPasa usando una modificación a la técnica de Robins y Brandon (1981) de la siguiente manera:

1. Lavado de las láminas epidérmicas en agua destilada 3 veces durante 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente.
2. Fijación en glutaraldehído al 2% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.4, durante 60 minutos a 4°C.
3. Lavado en solución tris-maleato, 3 veces durante 5 minutos cada una, a temperatura ambiente.
4. Incubación en la solución fresca de ATP (recién preparada y filtrada), durante 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavado en agua destilada, 3 veces durante 5 minutos cada una, a temperatura ambiente.
6. Revelado en sulfuro de amonio al 1%, durante 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Lavado en agua destilada, 3 veces durante 5 minutos cada una, a temperatura ambiente.

8. Montar las láminas epidérmicas con el lado dérmico (el más teñido) hacia arriba, utilizando gelatina glicerizada de Kaiser.

SOLUCIONES PARA LA TECNICA DE ATPasa.

PBS+EDTA:

NaCl-----3.415 g.
KCl-----0.10 g.
Na₂HPO₄ -----0.575 g.
KH₂PO₄ -----0.10 g.
agua destilada-----500 mL
Ajustar pH a 7.2-7.4 con NaOH 1N o HCl 1N.

Solución Tris-Maleato 0.25M, pH 7.2.

Tris Salt Buffer-----12.10 g.
Acido maléico-----11.60 g.
NaOH-----4.0 g.
Agua Destilada-----400mL.

Solución de ATP (medio de incubación de Robins y Brandon)

Solución de Tris-Maleato-----10.00 mL.
Agua Destilada-----12.50 mL.
Mg₂SO₄ -----2.5 mL.
Pb(NO₃)₂ -----2.75 mL.
Glucosa-----1.25 g.
ATP (sal disódica)-----0.02 g.

Solución reveladora de sulfuro de amonio al 1%.

Agua Destilada-----19.8 mL.
Sulfuro de amonio-----0.2 mL.

Se prepara en el momento, en campana de extracción.

Los controles de las láminas epidérmicas se incubaron en las mismas condiciones, pero el medio carecía de ATP.

Gelatina glicerinada de Kaiser.

Glicerina-----50 g.

Grenetina-----7 g.

Acido Fénico-----1 g.

Agua Destilada-----42 mL.

La grenetina en polvo se coloca en un cristalizador para hidratarla completamente con agua destilada vertida gota a gota, lentamente. Posteriormente se coloca el cristalizador en baño María y se agrega el resto del agua destilada y se deja que la gelatina se disuelva por si sola durante el tiempo que sea necesario.

El ácido fénico se disuelve en la glicerina y se agrega a la gelatina, procurando que escurra por las paredes del cristalizador para evitar la formación de burbujas. Continuando en baño María, los componentes se mezclan por si mismos hasta que la gelatina adquiere un color ámbar homogéneo; se deja enfriar a la temperatura ambiente o en refrigeración. Para usarla, se corta un fragmento y se disuelve dentro de un recipiente de vidrio a baño María.

Conteo de células dendríticas ATPasa positivas en láminas epidérmicas.

El conteo celular se llevó a cabo con un ocular graduado, calibrado con un micrómetro y usando el objetivo de 40X. Para cada animal se contaron por lo menos 10 campos, midiendo cada uno 0.097344 mm. Los resultados obtenidos se convirtieron a número de células/mm².

Histoquímica enzimática ultraestructural para ATPasa.

Para la demostración ultraestructural de ATPasa se emplearon variaciones a la técnica diseñada por Farquhar y Palade (1966):

1. Obtención de muestras de 10 mm x 1 mm x 1 mm, aproximadamente.
 2. Fijación en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.2, durante 30 minutos a 4°C.
 3. Las muestras fueron cortadas manualmente en fragmentos más pequeños y colocadas en el mismo fijador durante 60 minutos más a 4°C.
 4. Lavado en amortiguador de cacodilato de sodio 0.15M, pH 7.4, adicionado con sacarosa 0.025M y CaCl₂ 0.05%, 3 veces durante 10 minutos cada una, a temperatura ambiente.
 5. Incubación en el medio de Robins y Brandon durante 45 minutos a 37°C.
- Nota: no se realiza el revelado en sulfuro de amonio al 1% como en la técnica para microscopía fotónica porque el producto de la reacción es electrodensso.
6. Lavado en amortiguador de cacodilato de sodio 0.15M, pH 7.4 adicionado con sacarosa 0.025M y CaCl₂ 0.05%, 3 veces durante 10 minutos cada una, a temperatura ambiente.
 7. Posfijación en OsO₄ al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M, pH 7.2, durante 45 minutos a 4°C.
 8. Lavado como en 6.
 9. Deshidratación en alcoholes graduales ascendentes.
 10. Infiltración en Araldita 6005-tolueno (1:1) durante 7 días a temperatura ambiente.

11. Polimerización de la Araldita 6005 durante 48 h a 60°C.
12. Se realizaron cortes de 1µm y fueron teñidos con azul de toluidina para microscopía fotónica.
13. Los cortes finos se obtuvieron con cuchilla de diamante, contrastados con acetato de uranilo al 2% durante 24 minutos y citrato de plomo (Reynolds, 1963), durante 10 minutos.
14. Se realizaron 10 cortes seriados de 20 células dendríticas epidérmicas claras, de muestras controles y de muestras a las que se les realizó la histoquímica enzimática, con el fin de identificar un organelo similar al GCL.
15. Observación con el microscópio electrónico Zeiss EM-109.

Soluciones para ATPasa ultraestructural.

Amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M, pH 7.2.

Acido cacodílico 0.2M-----100 mL.

HCl 0.2M-----5.4 mL.

A partir de esta solución, se realizaron las diluciones necesarias.

Amortiguador de cacodilato de sodio 0.15M, pH 7.4, adicionado con sacarosa 0.025M y CaCl₂ 0.05%.

Acido cacodílico 0.15M-----100 mL.

HCl 0.15M-----5.4 mL.

Sacarosa-----0.855 g.

CaCl₂ -----0.05 g.

RESULTADOS.

Microscopía Fotónica: El método de separación empleando PBS+EDTA fue el más eficiente, ya que permitió la obtención fácil, rápida y exclusiva de la epidermis, completamente libre de componentes dérmicos (fig. 1). Las láminas epidérmicas teñidas con H-E presentaron un patrón histológico similar al observado en los cortes de la epidermis de piel total (fig. 2). La epidermis está formada por un epitelio plano estratificado queratinizado, formado de 4 a 5 estratos de células nucleadas y una gruesa capa superficial o estrato córneo organizado en láminas de células en descamación. Las células pigmentadas se observaron adosadas a la cara dérmica del epitelio (fig. 1) y profundamente dentro de la dermis (fig. 2), la cual presentó un tejido conectivo muy denso y poco celular.



Figura 1. Lámina epidérmica de *K. integrum*, separada con PBS+EDTA. La epidermis es un epitelio plano estratificado con estrato córneo; nótese la ausencia de componentes dérmicos. Los melanocitos (flecha), se observan adosados a la cara dérmica de la lámina epitelial. H-E. 100X.

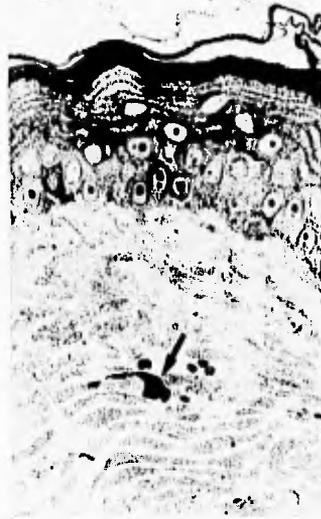


Figura 2. Corte semifino de la piel de la tortuga *K. integrum*. El patrón histológico de la epidermis es similar al observado en la figura anterior. En la dermis se observa una célula pigmentada (flecha). Azul de toluidina. 500X

Histoquímica enzimática para ATPasa: Cuando se utilizó la histoquímica para ATPasa en láminas epidérmicas según Robins y Brandon (1981), se obtuvieron resultados convincentes, constantes y definitivos. En las láminas epidérmicas obtenidas durante los meses correspondientes a primavera y otoño, se observaron células dendríticas ATPasa positivas uniformemente distribuidas y fácilmente distinguibles del resto de las células epidérmicas porque el producto de la reacción enzimática se localizaba únicamente en ellas (fig. 3).

Las largas prolongaciones citoplásmicas se observaron intercaladas entre los queratinocitos (fig. 3); sin embargo algunas células no mostraron el patrón dendrítico descrito y presentaron una forma poliédrica con dendritas cortas y gruesas (fig. 4)

Se observaron células melanocitos dentro de la epidermis, pero se distinguieron claramente de las células dendríticas ATPasa positivas, puesto que aquellos siempre presentaron prolongaciones citoplásmicas largas y delgadas con un aspecto punteado o en forma de "rosario", con su pigmentación natural y característica (fig. 5), además de localizarse siempre en un plano focal diferente al de las células dendríticas ATPasa positivas.

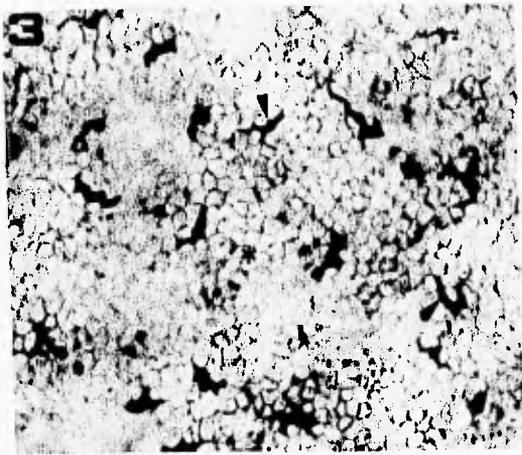


Figura 3. Lámina epidérmica de la tortuga *K. integrum*, representativa de los meses de primavera y otoño, procesada con histoquímica enzimática para ATPasa. Se observan las células dendríticas ATPasa positivas (cabezas de flechas) cuyas prolongaciones citoplásmicas se interdigitan entre los queratinocitos. 320X.

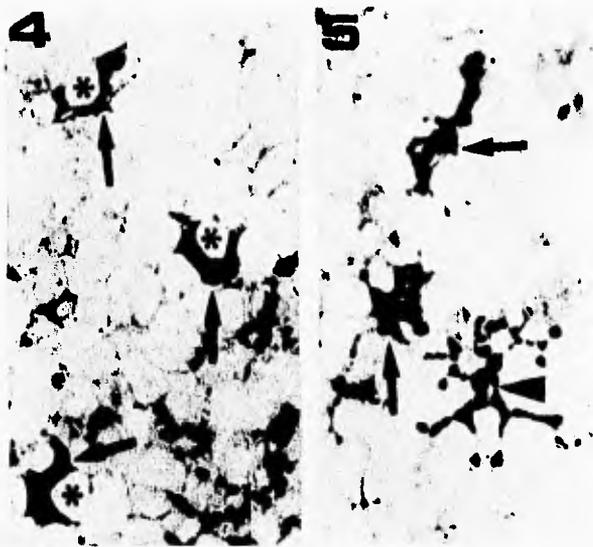
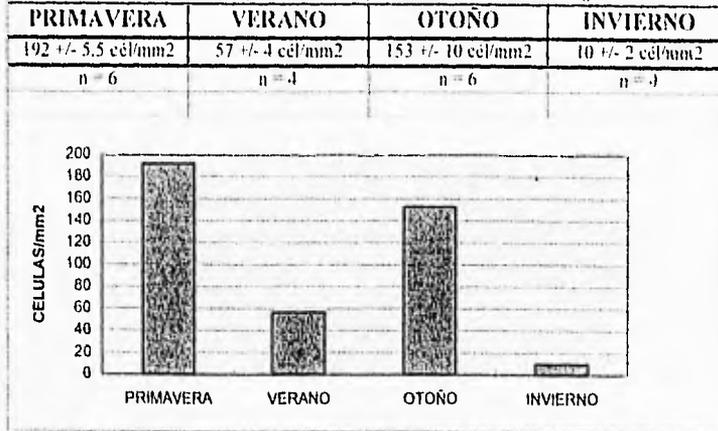


Figura 4. Lámina epidérmica de la tortuga *K. integrum*, en la que se observan células dendríticas ATPasa positivas (flechas) interdigitadas y rodeando a los queratinocitos(*). 800X.

Figura 5. Células ATPasa positivas de forma poliédrica, con dendritas cortas (flechas). Los melanocitos (cabeza de flecha) se caracterizan por su pigmentación natural y por la forma larga, delgada y arrosariada de sus prolongaciones. 800X.

El resultado del conteo de las células dendríticas ATPasa positivas arrojó los siguientes resultados: 192 ± 5.5 células/mm² durante la primavera (n=6), mientras que durante el otoño fue de 153 ± 10 células/mm² (n=6). En las láminas epidérmicas procesadas en los meses correspondientes a verano e invierno, el número de células ATPasa-positivas fue de 57 ± 4 células/mm² (n=4) y de 10 ± 2 células/mm² (n=4), respectivamente, las cuales mostraron una forma redondeada y una débil actividad enzimática (gráfica 1) (fig. 6).

Células de Langerhans ATPasa positivas en la epidermis de *Kinosternon integrum*



Gráfica 1. Variaciones estacionales en el número de células de Langerhans ATPasa positivas de *K. integrum*.

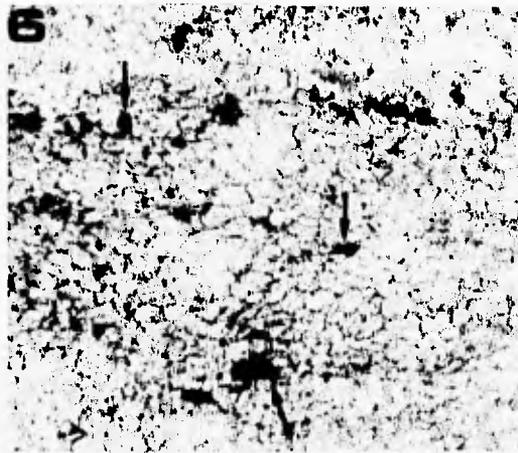


Figura 6. Células ATPasa positivas (flechas) de la tortuga *K. integrum*, representativas de los meses de verano e invierno. Compárese con la fig. 3. 312X.

En las láminas epidérmicas controles, las únicas células de forma dendrítica que se observaron fueron los melanocitos debido a su coloración natural (fig. 7).

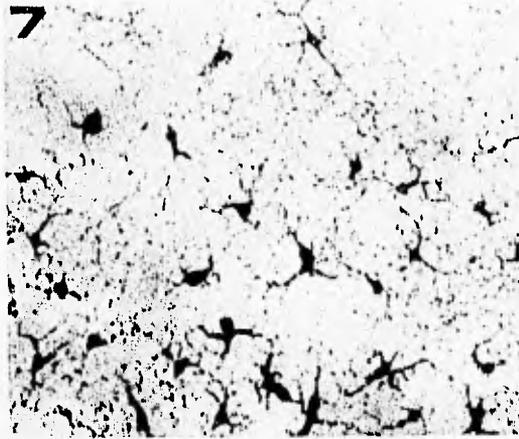


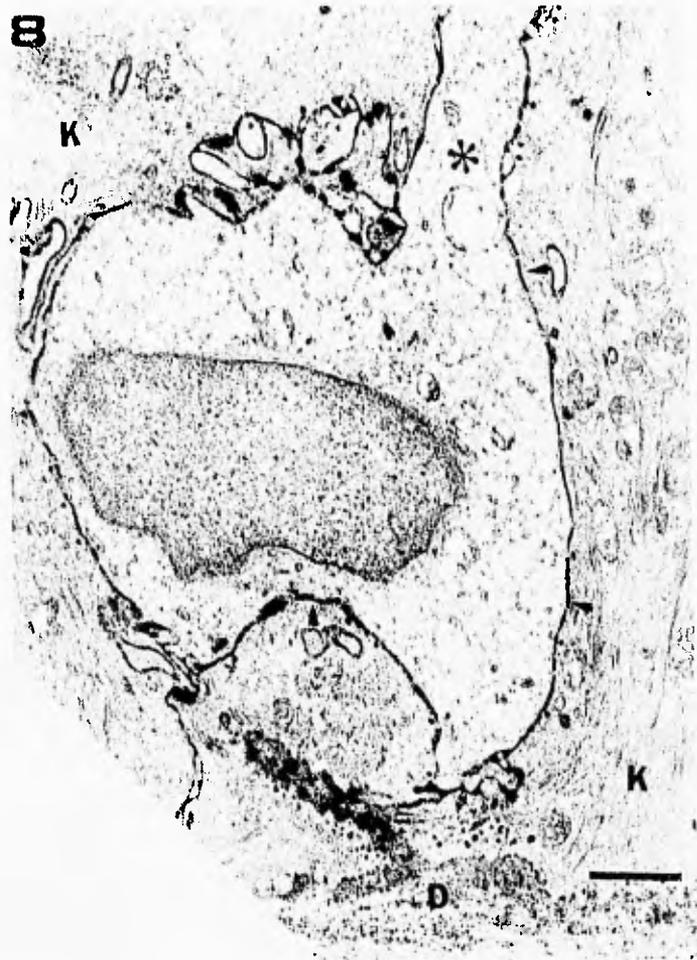
Figura 7. Lámina epidérmica de la tortuga *K. integrum* correspondiente a una muestra control, en la cual sólo es posible identificar melanocitos, con su forma y pigmentación característica.

Microscopía Electrónica.

ATPasa ultraestructural: La microscopía electrónica de los cortes de piel obtenidos durante la primavera y el otoño y procesados con la histoquímica para ATPasa, mostraron la presencia de células dendríticas en posición suprabasal, con un precipitado electrodenso depositado exclusivamente en la membrana plasmática, distinguiéndose de los queratinocitos por presentar un citoplasma claro, carente de tonofilamentos, desmosomas, premelanosomas y melanosomas; su núcleo era de forma irregular con masas de cromatina condensada asociada a la cubierta nuclear (fig. 8). Dichas células tenían un contorno irregular por la presencia de

Figura 8. Micrografía electrónica de transmisión de la piel de la tortuga *K. integrum*, obtenida durante la primavera y el otoño, procesada para la histoquímica de ATPasa. Entre los queratinocitos (K) basales, se observa una célula con citoplasma claro, núcleo irregular, prolongaciones dendríticas (asterisco), con el producto electrodensso de la reacción localizado en la membrana plasmática (flechas). No se observan desmosomas, melanosomas ni tonofilamentos en estas células ATPasa positivas. D= dermis, Barra=1µm.

prolongaciones citoplásmicas interdigitadas con los queratinocitos. Las células dendríticas ATPasa positivas fueron claramente distinguibles de los melanocitos, en los que no se observaba reacción enzimática en la membrana plasmática y que fueron identificados por la presencia de melanosomas característicos en el citoplasma (fig. 9).



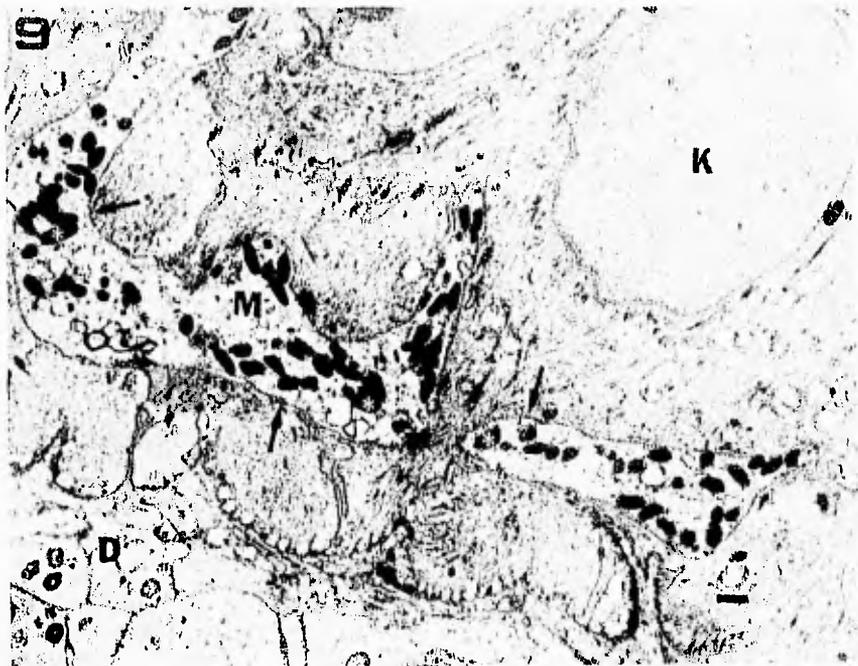
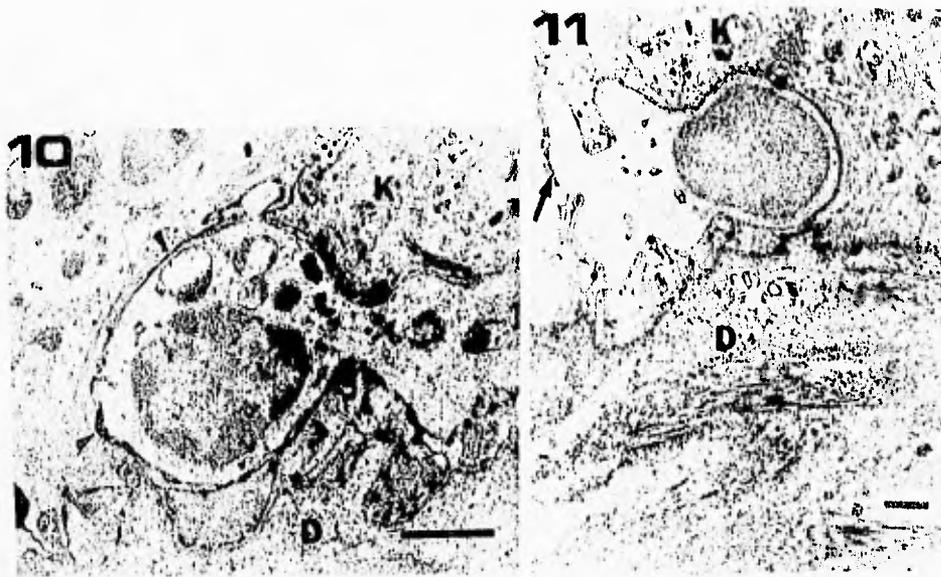


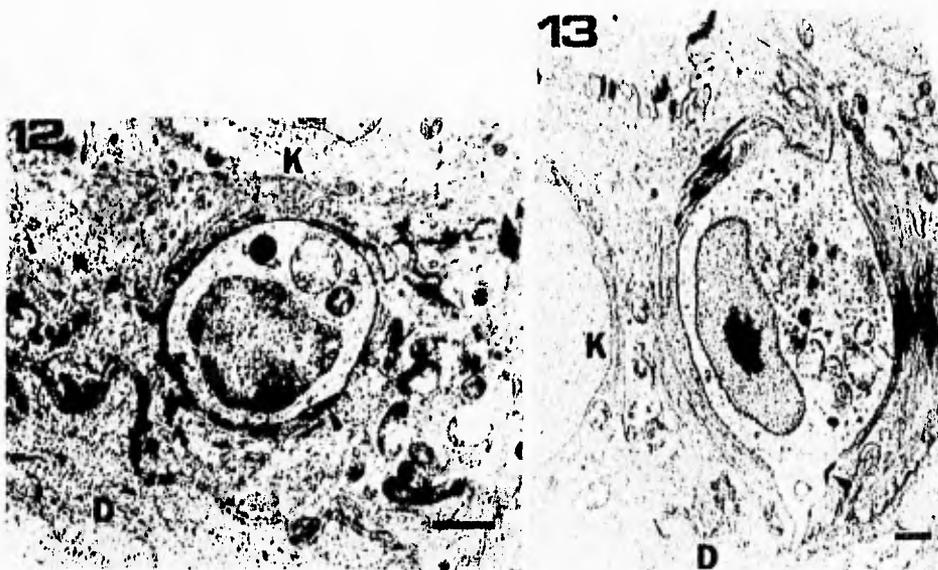
Figura 9. Micrografía electrónica de transmisión de la piel de la tortuga *K. integrum*, procesada para la histoquímica de ATPasa, en la que claramente se observa la ausencia de reacción enzimática en la membrana plasmática de los queratinocitos y los melanocitos (flechas), estos últimos identificados por la presencia de numerosos melanosomas en sus prolongaciones. K queratinocitos, D dermis. (*) Barra= 1 μ m.

En las muestras de piel procesadas en los meses correspondientes al verano y al invierno, también se observaron células claras en posición basal y suprabasal, que presentaban las mismas características ultraestructurales descritas anteriormente, pero que carecían del producto electrodenso de la reacción enzimática o, en el mejor de los casos, presentaban solamente pequeñas zonas de precipitado electrodenso en la membrana plasmática (figs. 10-13). Las células claras localizadas principalmente en el estrato basal, muy cercanas a la unión dermo-

epidérmica, característicamente tenían un citoplasma, rico en organelos, en particular, vesículas cubiertas y vesículas de diferente tamaño y forma, además de microfilamentos y microtúbulos (fig. 13).



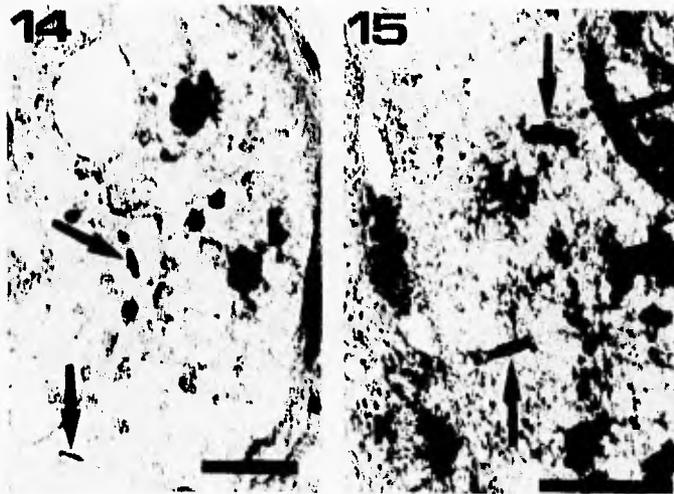
Figuras 10 y 11. Micrografías electrónicas de transmisión de la piel de la tortuga *K. integrum*, correspondiente al verano, la cual fue procesada para la histoquímica de ATPasa. Se observan células dendríticas claras, basales, con el producto de la reacción enzimática depositado en la membrana plasmática (fig. 10, flechas) y en ocasiones era escaso (fig. 11, flechas).



Figuras 12 y 13. Micrografías electrónicas de transmisión de la piel de la tortuga *K. integrum*, obtenida durante el verano y procesada para la histoquímica para ATPasa. Se observan células epidérmicas claras, con características ultraestructurales similares a las células dendríticas ATPasa positivas de la primavera y otoño, pero algunas no muestran producto de la reacción enzimática en la membrana plasmática (figura 13) o sólo algunos rastros (figura 12) (cabezas de flecha). Algunas células claras con diversos tipos de organelos, vesículas en el citocentro (flecha) y numerosos microfilamentos y microtúbulos se observaron cercanas a la lámina basal (figura 13). K: Queratinocitos; D: Dermis. Barras= 1 μ m.

Las células dendríticas encontradas en la epidermis de la piel de la tortuga *K. integrum*, semejaban a las CL por sus características ultraestructurales y de actividad enzimática, por lo que se llevó a cabo la búsqueda de un organelo citoplásmico similar al GCL. Así, en el análisis de los cortes seriados, se observó la presencia de estructuras que tenían forma de bastón, constituidos por membranas paralelas cuya localización más

frecuente fue cercana a la membrana plasmática de algunas prolongaciones de células ATPasa negativas. (figs. 14 y 15) pero que presentaban las características ultraestructurales distintivas de las CL. Con menor frecuencia, estos organelos presentaron la forma de raqueta de tenis, con una porción en forma de bastón y otra semejante a una vesícula (fig. 16).



Figuras 14 y 15. Micrografía electrónica de piel de tortuga. Corte transversal de un proceso dendrítico (fig. 14) y detalle del citoplasma de estas células semejantes a las CL (fig. 15), ambas son ATPasa negativas, pero contienen organelos en forma de bastón similares a los GCL (flechas), localizados frecuentemente en la vecindad de la membrana plasmática. Barra= 1 μ m.



Figura 16. Micrografía electrónica de piel de tortuga obtenida durante el verano. Dos organelos parecidos a los GCL se observan en el corte de una dendrita con rastros de reacción enzimática (flechas). Uno de los organelos presenta forma de bastón (cabeza de flecha), mientras que el otro presenta una forma de raqueta de tenis (rectángulo). Barra= 500nm.

Discusión.

El objetivo del presente trabajo fue demostrar la presencia de CL en la epidermis de la tortuga terrestre *Kinosternon integrum*, con base en las características histoquímicas y ultraestructurales consideradas únicas para las CL de los mamíferos. La histoquímica para ATPasa ha sido usada extensamente como un método confiable para identificar a las CL en los mamíferos, especialmente cuando se usan láminas epidérmicas. Las características ultraestructurales de las CL incluyen: un núcleo lobulado y un citoplasma claro con microtúbulos, microfilamentos, lisosomas y mitocondrias, pero carente de tonofilamentos, melanosomas y desmosomas. Sin embargo, es ampliamente aceptado que el GCL (o gránulo de Birbeck) es el principal rasgo característico de las CL a nivel de microscopía electrónica (Birbeck y colaboradores, 1961). Estas estructuras se presentan en el citoplasma como organelos en forma de bastón con una estriación central, que ocasionalmente presenta una dilatación vesicular en uno de los extremos dándole la apariencia de raqueta de tenis. Se ha demostrado que el GCL se origina por invaginación de la membrana plasmática de las CL (Hashimoto, 1971; Takahashi y Hashimoto 1985; Falck y colaboradores, 1985), manteniendo una continuidad temporal con el espacio extracelular de dónde captura material y lo transporta a endosomas (Bartosik, 1992). Existen evidencias de que la formación del GCL parece ser el aspecto morfológico de una muy especializada forma de endocitosis mediada por receptores (Hanau y colaboradores, 1987a; 1987b; 1988). Sin embargo, se ha propuesto también, que el GCL no es un requisito

para la identificación de CL o células semejantes a ellas (Wolff, 1972; Bock, 1974; Al Yassin y Toner, 1976), ya que no siempre se observa o son extremadamente escasos en las CL de todos los mamíferos (Hollis y Lyne, 1972; Khalil y colaboradores, 1982; Monteiro-Riviere, 1985; Takehana y colaboradores, 1985; Romano, 1991).

En el presente trabajo observamos células dendríticas ATPasa positivas uniformemente distribuidas en la epidermis de la tortuga, las cuales presentaron prolongaciones citoplasmicas interdigitadas con los queratinocitos. Así, histoquímica y morfológicamente, estas células son similares a las CL. La microscopía electrónica confirmó estas observaciones ya que las células dendríticas ATPasa positivas tuvieron los criterios ultraestructurales para ser consideradas equivalentes a las CL, incluyendo organelos parecidos a los GCL. Estas estructuras las observamos con menor frecuencia en células ATPasa positivas que en células ATPasa negativas y en células parecidas a CL de las muestras controles. Estos resultados pudieran estar relacionados con la actividad endocítica de estas células, como ha sido sugerido por la pérdida o desaparición de la actividad de ATPasa relacionada con el aumento en el número de GCL y de otros organelos endocíticos en las CL después de la aplicación epicutánea de un hapteno (Hanau y colaboradores, 1989).

Sorprendentemente, observamos que el número de CL y la intensidad de la reacción de ATPasa presentan variaciones estacionales. Las células fueron más numerosas y fuertemente positivas a la reacción histoquímica durante los meses de mayo y

noviembre y muy escasas y débilmente teñidas durante el verano y el invierno. Sin embargo, la microscopía electrónica demostró que esta depleción de células dendríticas en la epidemis de las tortugas puede ser más aparente que real, puesto que fue fácil identificar pequeños rastros del precipitado electrodensso localizado en la membrana plasmática de las CL durante el verano y el invierno.

La participación de las CL en el rechazo de injertos cutáneos (mediada por moléculas clase II), fue demostrada por Streilein y colaboradores (1982), quienes observaron que la viabilidad de los injertos de piel de ratón depletada de CL por la técnica de stripping descrita por Lessard y colaboradores (1968), es mayor que la de injertos con un número normal de CL. Así, es factible especular que dentro de las razones que Borysenko (1969a) menciona (temperatura, disparidad del MHC, físicas, etc) para explicar el rechazo de injertos cutáneos en las tortugas, podría incluirse la participación de las CL (si la especie estudiada las presenta) sobre todo con relación a la disparidad de las moléculas del MHC, que las CL expresan en grandes cantidades y a las variaciones numéricas estacionales encontradas en el presente trabajo.

En mamíferos, la aplicación tópica y sistémica de corticosteroides (Belsito y colaboradores, 1982; Berman y colaboradores, 1983) y de propionato de testosterona (Koyama y colaboradores, 1989) reducen el número de CL, además de cambiar su morfología, probablemente por un deterioro selectivo en la expresión enzimática y de marcadores inmunológicamente importantes en las CL.

Un número importante de evidencias sugieren una relación entre factores medioambientales (principalmente fotoperíodo y temperatura) y variaciones en el sistema inmunológico de "vertebrados inferiores", lo cual está mediado, probablemente, por los niveles de testosterona circulante y/o de corticosteroides. Se ha observado que los niveles altos de estos esteroides en el suero coinciden con cambios drásticos en la respuesta inmunológica tanto celular como humoral y además son dependientes de los períodos estacionales. Los niveles elevados de estas hormonas producen tanto depleción de los órganos linfoides, como la muerte de las células implicadas en la respuesta inmunológica de vertebrados no mamíferos (El Ridi y colaboradores; 1988; Zapata y colaboradores, 1992). Todas estas observaciones y las evidencias existentes en mamíferos, nos permiten sugerir que posiblemente los niveles altos de estas hormonas esteroides en las tortugas, puedan ser las responsables de la disminución en la actividad de ATPasa en las CL y por lo tanto, estar "ausentes" o más bien, no ser evidentes con la reacción histoquímica a la microscopía fotónica durante el verano y el invierno.

Los resultados circunstanciales obtenidos en el presente trabajo, como son la dependencia numérica estacional y las modificaciones enzimáticas en las CL de tortugas, deben ser estrictamente evaluadas, tomando en cuenta los cambios estacionales ya reportados en órganos linfoides (y componentes no linfoides) y la respuesta inmunológica en reptiles (Leceta y Zapata, 1985; El Ridi y colaboradores, 1988; Zapata y colaboradores, 1992). Aunado

a los resultados obtenidos en este trabajo, se observaron también cambios en la morfología del timo y bazo, caracterizados por un aumento del tejido conjuntivo y de células mioideas y disminución del número de folículos linfoides, junto con una proliferación de la pulpa roja, respectivamente. Estos cambios coincidieron con los números mínimos de CL presentes en la epidermis de las tortugas, observados durante el verano y el invierno. Se sugiere el análisis y correlación ordenada de estos datos, para conocer si hay una relación entre los cambios en CL y el sistema inmunológico sistémico. Por otro lado, es necesario conocer si los cambios observados coinciden también con niveles críticos hormonales (esteroides en particular) y/o con el período reproductivo de las tortugas estudiadas. Sin embargo, no debemos dejar de lado las evidencias que mencionan, claramente, que aunque los cambios pueden coincidir entre los reptiles, también son altamente especie-específicos (Zapata y colaboradores, 1992). En este sentido, las tortugas podrían ser un excelente modelo para estudiar la modulación neuroinmunoendócrina en la presentación de antígenos en vertebrados ectotérmicos.

Puesto que la piel de las tortugas es el órgano que ofrece mayor superficie al medio externo para captar estímulos antigénicos y conociendo los componentes de su sistema inmunológico, se sugiere que las células epidérmicas caracterizadas en el presente trabajo, son células análogas a las CL de mamíferos. Habría que demostrar que son capaces de captar antígenos, procesarlos y presentarlos. Por otro lado, los informes de la presencia de CID en el timo

(Leceta y colaboradores, 1984) y en el bazo de tortugas (Zapata y Cooper, 1990c) junto con los resultados del presente trabajo, facilitan la sugerencia de la existencia de un sistema de células de Langerhans y/o de células dendríticas en estos reptiles.

Por otro lado, Pérez y colaboradores describen la presencia de células con todos los criterios ultraestructurales, incluyendo el GCL para ser consideradas como CL en la piel del bagre. Dichos resultados junto con el presente trabajo completan la descripción de CL en vertebrados no mamíferos.

Finalmente, la utilidad y la especificidad de la histoquímica para ATPasa, así como la presencia de un organelo similar al GCL, resultaron ser, nuevamente, altamente confiables en la identificación de CL epidérmicas. Además, es de notarse que la actividad de la ATPasa dependiente de Ca^{++}/Mg^{++} presente en la membrana plasmática esté muy conservada en las CL de los diferentes grupos de vertebrados, lo que sugiere una importancia funcional fundamental para dichas células. Sin embargo, casi todos los aspectos de esta enzima son desconocidos.

REFERENCIAS.

Al Yassin TM and Toner DG. Langerhans cells in human oesophagus. *J Anat.* 122: 435, 1976.

Barbey B and Neselof Ch. Le systeme Langerhansien. *Pathol Biol.* 34 (4): 259, 1986.

Bartosik J. Cytomembrane-derived Birbeck granules transport horseradish peroxidase to endosomal compartment in the human Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 99: 53, 1992.

Basset F and Turiaf J. identification par la microscopie electronique des particules de nature probablement virales dans le lesion granuloma matenses d' une histiocytose x pulmonaire. *CR Acad Sci. Paris,* 261: 3701, 1965.

Berman B, France DS, Martinelli GP and Hass A. Modulation of expression of epidermal Langerhans cells properties following *in situ* exposure to glucocorticosteroids. *J Invest Dermatol.* 80: 168, 1983.

Belsito DV, Flotte TJ, Lim HW, Baer RL, Thorbecke J and Gigli I. Effect of glucocorticosteroids on epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.* 155: 291, 1982.

Birbeck MS, Breathnach AS and Everall AD. An electron microscopic study of the basal melanocyte and high level clear cell (Langerhans cell) in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 37: 51, 1961.

Bock P. Fine structure of Langerhans cells in the stratified epithelia of the oesophagus and stomach of mice. *Z. Zellforsch Mikrosk Anat.* 147: 237, 1974.

Borysenko M. Skin allograft and xenograft Rejection in the Snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *J Exp Zool.* 170: 341, 1969a.

Borysenko M. The maturation of the capacity to Reject skin allograft and xenograft in the snapping turtle *Chelydra serpentina*. *J Exp Zool.* 170: 359, 1969b.

Borysenko M. Ultrastructural analysis of normal and immunized spleen of the snapping turtle *Chelydra serpentina*. *J Morph.* 149: 243, 1976.

Borysenko M and Cooper EL. Lymphoid tissue in the snapping turtle *Chelydra serpentina*. *J Morph.* 138: 48, 1972.

Dorysenko N and Lewis S. The effects of malnutrition on immunocompetence and whole body resistance to infection in *Chelydra serpentina*. *Dev Comp Immunol.* 31: 89, 1979.

Bos JD, Das PK and Kapsenberg L. The Skin Immune System, Chapter 1, In : *Skin Immune System (SIS)*. Ed. Jan D. Bos, CRC Press, USA, 3, 1990.

Bos JD and Kapsenberg ML. The Skin Immune System (SIS): its cellular constituents and their interactions. *Immunol Today.* 1: 235, 1986.

Bos JD and Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today.* 14 (2): 75, 1993.

Breathnach AS. Observations on cytoplasmic organelles in Langerhans cells of human epidermis. *J Anat(Lond.)* 92 (2): 265, 1964.

Breathnach AS and Poyntz SV. Electron microscopy of pigment cells in tail skin of *Lacerta vivipara*. *J Anat* 100: 549, 1966.

Durke KE and Gigli L. Receptor for complement of Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 15: 66, 1980.

Campo-Asen I and Pearse AGE. Enzimología de la célula de Langerhans. *Medicina Cutánea.* 1: 35, 1966.

Cancilla PA. Demonstration of Langerhans cell granule by lanthanum. *J Cell Biol.* 38: 248, 1968.

Champy CJ. *J Anat Physiol.* 4: 140, 1913.

Carrillo-Farga J, Castell-Rodríguez A, Pérez-Torres A and Rondán-Sárate A. Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *J Anat.* 172: 39, 1990.

Carrillo-Farga J, Pérez-Torres A, Castell-Rodríguez A and Antuna-Bisarro S. Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). *J Anat.* 176: 1, 1991.

Cocchia D, Michetti F and Donato R. immunochemical and Immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 294: 85, 1981.

Cooper EL, Grewal IS and Magor BG. Comparative Immunology of the skin (chapter 2) In: *Skin Immune System (SIS)*. Ed. Jan D. Bos, CRC Press, USA, 9, 1990.

Cooper EL, Kemplau AE and Zapata AG. Reptilian immunology (chapter 8) In: Biology of the reptilia. Development a. Ed. Carl Gans, N. Y. USA. 14: 599, 1985

Cooper EL, Kemplau AE and Zapata AG. The bone marrow, Reptilian immunology (chapter 8) In : Biology of the reptilia. Development a. Ed. Carl Gans, N.Y. USA. 14: 524, 1985.

Cooper EL, Klemplau AE. and Zapata AG. Reptilian immunity (chapter 8) In: Biology of the reptilia. Development a. Ed. Carl Gans, N.Y. USA. 14: 599, 1985.

Du Pasquier L. and Flajnik MF. Expression of MHC antigens during *Xenopus* development. Dev Immunol. 1: 85, 1990.

Elleder M. Activity of alfa-D-mannosidase in human Langerhans epidermal cells. Virchows Arch B Cell Path. 19: 93, 1975.

Elofsson R, Andersson A, Falck B, and Sjoborg S. Evidence for endocytotic mechanism in the epidermal Langerhans cells. Acta Dermatovenet (Stockh) suppl 99: 29, 1981.

El Ridi R, Zada S, Afifi A, El Daeb S, El Roubi S, Faraj M and Saad AH. Cyclic changes in the diferentiation of lymphoid cells in reptiles. Cell Differ. 24: 1, 1988.

Falok B, Andersson A and Bartosik J. Some new ultrastructural aspects on human epidermis and its Langerhans cells. Scand J immunol. 21: 409, 1985.

Farquhar M. and Palade G. Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. J Cell Biol. 30: 359, 1966.

Ferreira-Márquez J. Systema sensitivum intraepidemicum. Die Langerhansschen Zellen als rezeptoren des hellen Schmerzes: Doloriceptores. Arch Derm Syph Berlin. 193: 191, 1951.

Fichtelius KF, Groth D and Liden S. The skin, a first level lymphoid organ?. Int Arch Allergy, 37: 607, 1970.

Gschnait F. and Brenner W. Kinetics of epidermal Langerhans cells. J Invest Dermatol. 73: 566, 1979.

Grey HM. Phylogeny of the immune response, studies of some physical, chemycal and serological characteristic of antibody produced in the turtle. J Immunol. 91: 819,1963.

Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Garaud JC, Pauly G and Casenave JP. Appearance of Birbeck granule-like structures in anti-T6-antibody-treated human Langerhans cells. J Invest Dermatol. 90: 298, 1988.

Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Garaud JC, Pauly G, Torigio HM, Mayer S and Cazenave JP. Human epidermal Langerhans cells cointernalize by receptor-mediated endocytosis "non classical" major histocompatibility complex class I molecules (T6 antigens) and class II molecules (HLA-DR antigens). Proc Natl Acad Sci USA. 84: 2901,1987a.

Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Lepoittevin JP, Stampf JL, Grosshans E, Benezra L and Cazenave JP. ATPase and morphologic changes in Langerhans cells induced by epicutaneous application of a sensitizing dose of DNFB. J Invest Dermatol. 92: 689,1989.

Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Stampf JL, Garaud JC, Bieber T, Grosshans E, Benezra C and Cazenave JP. Human epidermal Langerhans cells internalize by receptor mediated endocytosis T6 (CD1 "NH 34") surface antigens. Birbeck granules are involved in the intracellular traffic of the antigens. J Invest Dermatol. 89: 172,1987b.

Hashimoto K. Langerhans cell granule. An endocytic organelle. Arch Dermatol. 104: 148,1971.

Hashimoto K and Tarnowsky WM. Some new aspects of the Langerhans cells. Arch Dermatol. 97: 450, 1968.

Hayashi M, Nakajima Y and Fishman WH. The cytologic demonstration of β -glucuronidase employing naphtol AS-BI glucuronide and hexazonium pararosanilin: A preliminary report. J Histochem Cytochem. 12:293, 1964.

Hollis DE and Lyne AG. Acetylcholinesterase-positive Langerhans cells in the epidermis of wool follicles of the sheep. J Invest Dermatol. 58: 211, 1972.

Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A. and Granstein KD. Regulation of Langerhans cells functions by nerves containing calcitonin gene-related peptide. Nature 363: 159, 1993.

Hunziker N and Winkelmann RK. Langerhans cells in contact dermatitis of the guinea pig. Arch Dermatol. 114: 1309, 1978.

Jarret A. and Riley PA. Esterase activity in dendritic cells. Br J Dermatol. 75: 79,1963.

Juhlin L. and Shelley WB. New staining techniques for the Langerhans cells. Acta Dermatovenereol (stockholm). 57: 289,1977.

Katz SI, Tamaki K. and Sach DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. Nature. 282: 324, 1979.

Kaufman J, Skjoedt K. and Salomonsen J. The MHC molecules of nonmammalian vertebrates. *Immunol Rev.* 113: 83, 1990.

Kelly RH, Balfour BM, Armstrong JA and Griffiths S. Functional Anatomy of lymph nodes II. Peripheral lymphborne mononuclear cells. *Anat Rec.* 190: 5, 1978.

Khalil MM, Nituithai S and Allen JR. Alkaline phosphatase positive Langerhans cells in the epidermis of cattle. *J Invest Dermatol.* 79: 47, 1982.

Klareskog L, Tjernlund UM, Forsum V and Peterson PA. Epidermal Langerhans cells express Ia antigen. *Nature* 268: 248, 1977.

Kondo Y. Macrophages containing Langerhans cell granules in normal lymph nodes of the rabbit. *Z. Zellforsch.* 98: 506, 1969.

Koyama Y, Nagao S, Ohashi K, Takahashi H. and 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, 1989.

Kreibich C. Die hautnerven. A die Langerhans zell (L.Z.). *Arch Derm Syph.* 154: 329, 1928.

Langerhans P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchow Archiv. Pathol Anat Physiol Klin Med.* 44: 325, 1868.

Leceta J, Villena A, Rasquin B, Fonfria J. and Zapata A. Interdigitating cells in the thymus of the turtle *Mauremys caspica*. *Cell Tiss Res* 238: 381, 1984.

Leceta J. and Zapata A. Seasonal changes in the thymus and spleen of the turtle *Mauremys caspica*. A morphometrical light and microscopical study. *Dev Comp Immunol.* 9: 653, 1985.

Lessard RJ, Wolff K and Winkelmann RK. The disappearance and regeneration of Langerhans cells following epidermal injury. *J Invest Dermatol.* 50: 171, 1968.

Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S. and Fryer P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J Exp Med.* 166: 1654, 1987.

Mackenzie IC, Bickubach JR. and Rittman BR. Reactivity of epidermal Langerhans cells to a histochemical method for demonstration of beta glucuronidase. *J Invest Dermatol.* 78: 239, 1982.

Mackenzie IC. and Squier CA. Cytochemical identification of ATPase positive Langerhans cells in EDTA separated sheets of mouse epidermis. *Br J Dermatol.* 92: 523, 1975.

Maderson PFA. Some developmental problems of reptilian integument (chapter 7) In: *Biology of the Reptilia. Development* a Ed. Carl Gans, N.Y. USA. 14: 524, 1985.

Maillet M. Modifications de la technique de Champy au tetroxide d'osmium-iodure de potassium. résultats de son applications a l'étude des fibres nerveuses. *CR Seances Soc Biol Paris.* 153: 939, 1959

Masson P. Pigment cells in man. In: *Biology of melanosomas.* Ed. M. Gordon Spec. Publ. NY Acad Sci. 4: 15, 1948.

Matoltsy AG. and Hussar T. Keratinization of the reptilian epidermis: An ultrastructural study of the turtle skin. *J Ultrastruct Res.* 38: 87, 1972.

Maung RT. Immunity in the tortoise, *Testudo iberia.* *J Path Bact.* 85: 51, 1963.

Monteiro-Riviere MA. Ultrastructure of the integument of the domestic pig (*Sus scrofa*) from one through fourteen weeks of age. *Anat Histol Embriol.* 14: 97, 1985.

Murphy GF, Bhan AK, Sato S, Mihm MC. and Harrist TJ. A new immunologic marker for human Langerhans cells. *New Eng J Med.* 304:, 1981.

Mustakallio K. Adenosintriphosphatase activity in neural elements of human epidermis. *Exp Cell Res.* 248: 448, 1962.

Niebauer G, Krawczyk WS, Kidd RL. and Wilgram GF. Osmium zinc iodide reactive sites in epidermal Langerhans cells. *J Cell Biol.* 43: 80, 1969.

Niebauer G. and Wiedmann A. Zur histochemie der neurovegetative system der haut. *Acta Neurovegetativa.* 18: 280, 1958.

Pérez-Torres A. y Castell Rodríguez A. La célula de Langerhans III. El sistema de las células de Langerhans. *Laborat-acta.* 1 (4): 25, 1989.

Pérez-Torres A. and Millán-Aldaco DA. Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis. *J Anat.* 184: 591, 1994.

Pérez Torres A, Millán Aldaco DA, Rondán Zárate A. Identificación ultraestructural de células de Langerhans en la piel del bagre. XI Reunión Nacional de Morfología, Metepec, Puebla, septiembre de 1995.

Pirlot P. Sistema tegumentario, en: Morfología Evolutiva de los cordados. Ed. Omega, Barcelona, España. pp 868, 1986.

Pruneiras M. Interactions between keratinocytes and dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 52: 1, 1969.

Rawles ME. Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. *Physiol Zool.* 20: 248, 1948.

Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 17: 208, 1963.

Robins PG. and Brandon DR. A modification of the adenosine triphosphatase method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Technology.* 50: 87, 1981.

Roitt I, Brostoff J. and Male D. Evolution of Immunity (chapter 15), In: *Immunology.* Ed. Mosby, England, fourth edition, 1996.

Romano J. and Balaguer L. Ultrastructural identification of Langerhans cells in normal swine epidermis. *J Anat.* 179: 43, 1991.

Rowden G, Boudreau S. and Hingley M. Langerhans cells and extraepidermal dendritic cells. An investigation in laboratory animals and man with immunomorphological methods. *Scan J Immunol.* 21: 471, 1985.

Rowden G, Lewis MG. and Sullivan AK. Ia antigen expression on human Langerhans cells. *Nature.* 268: 247, 1977.

Sagebiel RW. In vivo and in vitro uptake of ferritin by Langerhans cells of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 54: 47, 1972.

Sagebiel RW. and Reed TM. Serial reconstruction of the characteristic granules of the Langerhans cell. *J Cell Biol.* 36: 595, 1968.

Schmitt D, Desutter-Dambuyant C, Faure M. and Thivolet J. Recent advances of ultrastructural immunocytochemistry of epidermal Langerhans cells. *Br J Dermatol.* 113: 2, 1985.

Schmitt D, Faure M, Desutter-Dambuyant C. and Thivolet J. Ultrastructural immunogold staining of Langerhans cell. *J Invest Dermatol.* 80: 344, 1983.

Shelley WB. and Juhlin L. Langerhans cells form a reticuloepithelial trap for external contact antigens. *Nature*. 261: 324, 1976.

Silberberg I. Ultrastructural studies of Langerhans cells in contact sensitive and primary irritant reactions to mercuric chloride. *Clin Res*. 19: 715, 1971.

Silberberg I. Apposition of the mononuclear cells to Langerhans cells in contact allergic reactions. An ultrastructural study. *Acta Dermatovener (Stockh)*. 53: 1, 1973.

Silberberg I, Baer RL. and Rosental SA. Circulating Langerhans cells in dermal vessel. *Acta Dermatovener (Stockholm)*. 54: 81, 1974.

Silberberg I, Baer RL, Rosental SA, Thorbecke GT. and Beresowsky V. Dermal and intravascular Langerhans cells at sites of passively induced allergic contact sensitivity. *Cell Immunol*. 18: 435, 1975.

Silvers WK. A histological and experimental approach to determine the relationship between gold impregnated dendritic cells and melanocytes. *Am J Anat*. 100: 255, 1957.

Steinman RM. and Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantification and tissue distribution. *J Exp Med*. 137: 1142, 1973.

Steinman RM. and Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties *in vitro*. *J Exp Med*. 139: 380, 1974.

Steinman RM, Lustig DS. and Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties *in vivo*. *J Exp Med*. 139: 1431, 1974.

Steinman RM, Adams JC. and Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution on mouse spleen. *J Exp Med*. 141: 804, 1975.

Steinman RM, Kaplan K, Witmer D. and Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers and maintenance *in vitro*. *J Exp Med*. 149: 1, 1979.

Stingl G, Katz SI, Clement L, Green I. and Shevach EM. Immunological functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol*. 121: 2005, 1978.

Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Gschnit F, Knapp W. and Wolff K. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. Nature 268: 245, 1977.

Streilein JW. Lymphocyte traffic, T cell malignancies and the skin. J Invest Dermatol. 71: 167-171, 1978.

Streilein JW, Longsberry LW and Bergstresser PR. Depletion of epidermal Langerhans cells and Ia immunogenicity from tape-stripped mouse skin. J Exp Med 155: 863, 1982.

Takahashi S. and Hashimoto K. Derivation of Langerhans cell granules from cytomembrane. J Invest Dermatol. 84: 469, 1985.

Takahashi K, Yamaguchi H, Ishise KT, Nakajima T. and Nakasato Y. Immunohistochemical and immunoelectronmicroscopic localization of S-100 in the human lymph node. Virchows Arch (Cell Pathol). 37; 125, 1981.

Takehana S, Kameyama Y, Sato E. and Misohata M. Ultrastructural observations on Langerhans cell in the rat gingival epithelium. J Periodont Res. 20: 276, 1985.

Veldman JE: Histophysiology and electron microscopy of the immune response. PhD. thesis. Groningen, the Netherland, State University, 1970.

Volc-Platzner B, Sting G, Wolff K, Hinterberg W. and Schnedl W. Cytogenetic identification of allogenic epidermal Langerhans cells in a bone marrow graft recipient. N Eng J Med. 310: 322, 1984.

Wiedmann A. Uber die interstitiellen zellen der haut. Hautarzt. 7: 123, 1956.

Wolff K. The fine structure of the Langerhans cell granule. J Cell Biol. 35: 468, 1967.

Wolff K. The Langerhans cell. Curr Probl Dermatol. 4: 79, 1972.

Wolff K. and Schreiner E. Uptake, intracellular transport and degradation of exogenous protein by Langerhans cells. An electron microscopic cytochemical study using peroxidase as tracer substance. J Invest Dermatol. 54: 37, 1970.

Wolff K. and Winkelmann RK. Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. J Invest Dermatol. 48: 50, 1967.

Young JZ. Life on Land: the reptiles (chapter 13) In: The Life of Vertebrates. Third Edition, Clarendon Press. London. pp 276, 1981.

Zapata AG. and Cooper EL. The bone marrow and its equivalents (chapter 3) In: The immune system: Comparative Histophysiology. Ed. John Wiley & Sons Ltd. England, pp 35, 1990a.

Zapata AG. and Cooper EL. The thymus (chapter 5) In: The immune system: comparative histophysiology. Ed. John Wiley & Sons. England, pp 104, 1990b.

Zapata AG. and Cooper EL. The spleen (chapter 6) In: The immune system: Comparative Histophysiology. Ed. John Wiley & Sons. England, pp 150, 1990c.

Zapata AG. and Cooper EL. Lymph Nodes (chapter 7) In : The immune system: comparative Histophysiology. Ed. John Wiley & Sons. England, pp 219, 1990d.

Zapata AG. Varas A. and Torreba M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. Immunol Today. 13: 142, 1992.

Selickson AS. The Langerhans cell. J Invest Dermatol. 44: 21, 1965.

Selickson AS. Melanocyte, Melanin Granule and Langerhans cell, In: Ultrastructural of normal and abnormal skin. Ed. H. Kimpton, Ltd, London, pp 163, 1967.

Selickson AS. Granule formation in the Langerhans cell. J Invest Dermatol. 47: 498, 1966.

Selickson AS. and Mottas JH. Localization of gold chloride and adenosine triphosphatase in human Langerhans cells. J Invest Dermatol. 52: 365, 1968.