

74
20j



Universidad Nacional Autónoma de México

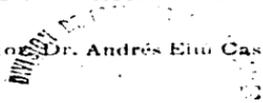
FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACION DE CELULAS
DENDRITICAS EN EL BAZO DE
LA RANA**

Rana pipiens

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
ALBERTO HERNANDEZ PEÑALOZA

Director: Dr. Andrés Elío Castell Rodríguez



FACULTAD DE CIENCIAS
MEXICO, D.F.

1997

**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
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" IDENTIFICACION DE CÉLULAS BENEFICAS EN EL BANO DE LA PANA Rana pipiens "

realizado por Alberto Hernández Peñalosa

con número de cuenta 01279250, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

M. en C. ANDRES EL CASTELL RODRIGUEZ

Propietario

M. en C. ARMANDO PEREZ TORRES

Propietario

M. en C. PATRICIA ELVAS MANSANO

Suplente

M. en C. MAL. LOURDES BURGIA TELLES

Suplente

M. en C. GUILHERME

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINADOR

*" Cuando se es muy joven y se sabe un poco, las montañas son montañas, el agua es agua, y los árboles son árboles.
Cuando se ha estudiado y se es leído, las montañas ya no son montañas, el agua ya no es agua, y los árboles ya no son árboles.
Cuando se es sabio, nuevamente las montañas son montañas, el agua es agua y los árboles son árboles."*

*A MIS PADRES POR SU APOYO Y DIRECCIÓN PARA LA
CULMINACIÓN DE UNO DE MIS OBJETIVOS*

A MIS HERMANAS ANA MARIA, MAGDALENA Y ROCIO

A ELENA POR TODO EL CARÍÑO QUE ME HAS BRINDADO

AGREDECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Andrés Elio Castell Rodríguez por su apoyo y dirección en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Alfonso Carabez Trejo jefe del Depto. de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina U. N. A. M., mi más sincero agradecimiento.

Estoy profundamente agradecido con

**Ma. Luisa Rodríguez Méndez
Herminia Suárez García
Miguel Hernández Vázquez
Tomas Cruz Méndez
Francisco Pasos Najera**

por sus valiosas aportaciones técnicas y consejos en la realización de esta tesis.

ABREVIATURAS

Acetona-Metilbenzoato-Xilol	AMex
Acidoetilendiamonotetraacético	EDTA
Adenosindifosfato	ADP
Adenosintrifosfato	ATP
Células Dendríticas	CD
Células Dendríticas Esplénicas	CDE
Células Dendríticas Foliculares	CDF
Células Dendríticas Tisulares	CDT
Células Interdigitantes	CID
Células de Langerhans	CL
Centros de Melanomacrófagos	CMMs
Células Presentadoras de Antígenos	CPA
Células Veladas	CV
Complejo Principal de Histocompatibilidad	CPIH
Factor Epidérmico Activador de Timocitos	ETAF
Gránulo de Birbeck	GB
Isotiocianato de Fluoresceína	FITC
Isotiocianato de Rodamina	TRITC
Interleucina-1	IL-1
Peroxidasa Anti-Peroxidas	PAP
Reacción Linfocítica Mixta	RLM
Receptor de Células T	TCR
Receptor de la Fracción Cristalizable de la IgG	FcR
Sistema Celular Dendrítico	SCD
Tejido Linfoide Asociado a Mucosas	MLT
Tercer Componente del Complemento	C3b

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS DENDRÍTICAS	1
2. ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS	2
3. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN	3
4. MÁRCADORES ENZIMÁTICOS	3
4.1. Adenosintrifosfatasa (ATPasa)	3
4.2. Esterasa inespecífica	5
5. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS	7
6. MARCADORES INMUNOLÓGICOS DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS	9
6.1. Moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad CPH (Ia) de las Células de Langerhans	9
6.2. Receptor Fc y C3b en Células de Langerhans	10
6.3. Marcadores de linfocitos T en Células de Langerhans	10
6.4. Proteína ácida S-100 en Células de Langerhans	12
7. EL SISTEMA DE CÉLULAS DE LANGERHANS	14
7.1. Generalidades	14
7.2. Células Veladas (CV)	15
7.3. Células Interdigitantes (CID)	16
7.4. Células Dendríticas Esplénicas o de Steinman y Cohn (CDE)	17
7.5. El Sistema de las Células de Langerhans (SCL) y Macrófagos	19
8. FUNCIÓN DEL SISTEMA DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS	22
8.1. Presentación de Antígenos	22
9. ANTECEDENTES DIRECTOS DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS EN LOS ANFIBIOS ANUROS	25
10. SISTEMA INMUNOLÓGICO DE LOS ANFIBIOS	28
10.1. Organización Genética del CPH de los Anfibios	28
10.2. Tejidos Linfoides en los Anfibios Anuros	29
10.2.1. El Bazo de los Anfibios	30

10.2.1.1. Pulpa Blanca	31
10.2.1.2. Centros de Melanomaerófagos	32
10.2.1.3. Pulpa Roja	32
10.2.2. El Timo de los Anfibios	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO	34
DISEÑO EXPERIMENTAL	35
MATERIAL Y MÉTODO	37
RESULTADOS	45
ORGANIZACIÓN GENERAL DEL BAZO	45
INMUNOHISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA	48
DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA	50
TÉCNICA DE ACETONA/METHILBENZOATO/XILOL (AMeX)	51
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS	59

INTRODUCCIÓN

I. CÉLULAS DENDRÍTICAS

En Inmunología, el término "células dendríticas" es utilizado para nombrar a un subtipo particular de Células Presentadoras de Antígenos (CPA) que tienen forma irregular por tener una variedad de procesos celulares que incluyen pseudopodos, lamelipodios y velos. Las células de este sistema se encuentran en varios estados de diferenciación y derivan de la médula ósea. ¹

Las Células Dendríticas (CD) son células especializadas en la presentación de antígenos que tienen una amplia distribución en todos los tejidos y órganos del cuerpo, constituyendo un Sistema Celular Dendrítico (SCD). De acuerdo a su localización las células de este sistema reciben diferentes nombres: en la epidermis y otros epitelios planos estratificados se les conoce como Células de Langerhans (CL); en linfa como Células Veladas (CV), en las zonas T-dependientes de los ganglios linfáticos y en la médula del timo como Células Interdigitantes (CID) y en el bazo se denominan como Células Dendríticas Esplénicas o Células de Steinman y Cohn (CDE). En el intersticio de corazón, hígado, riñón y páncreas también se han descrito células similares en morfología, fenotipo y función a las CL. EL SCD también es conocido como el Sistema de las Células de Langerhans (SCL) en donde las CL son el representante clásico. ²

Las diferentes CD comparten algunas características, como la presencia de el antígeno leucocitario común (CD45), las moléculas clase I y clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) y un origen común a partir de la médula ósea, pero pueden exhibir diferencias relacionadas con el estado de maduración y con el microambiente en el que se localicen. ³



2. ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Aunque todas las CD se originan de la médula ósea, las CL han sido las más estudiadas. En este sentido, Katz *et al.*, (1979) ⁴ demostraron que las CL derivan y son continuamente sustituidas por células precursoras móviles provenientes de la médula ósea. En sus elegantes experimentos, ellos trasplantaron piel de un ratón A/J a ratones híbridos F1 (A/J x Balb/c) y después, a diferentes tiempos, se determinó la especificidad de los antígenos clase I y clase II del CPH (HLA-A, B, C (Humano) / H-2 (Ratón) y HLADR (Humano) / Ia (Ratón), respectivamente) de las células trasplantadas con el objeto de definir si los queratinocitos y las CL tenían especificidad del donador o del receptor. Para esto se empleó una técnica de inmunofluorescencia indirecta y simultáneamente se hicieron pruebas de formación de rosetas para el Fc de la IgG. A los 11 días del injerto, se observó un incremento gradual en el porcentaje de CL con características del receptor (el antisero empleado reaccionaba sólo contra el antígeno Ia de las CL de ratones Balb/c y de los híbridos F1, pero no con el de las CL del donador A/J), mientras que los queratinocitos continuaron siendo del donador. El porcentaje de células formadoras de rosetas (Fc-IgG positivas, / Ia positivas) también se incrementó de un 61% a los 11 días hasta un 100% a los 49 días después del injerto. Esto sugirió que las CL presentes en la piel trasplantada se originaban de células móviles provenientes del receptor. Sin embargo, no se excluía la posibilidad de que las CL de la piel trasplantada se hubieran originado a partir de las CL de la epidermis que rodeaba al injerto. Para aclarar esto, se estudió la especificidad de los antígenos Ia y H-2 en las células epidérmicas de ratones irradiados subletalmente con radiaciones ultravioleta a los que posteriormente se les injertó médula ósea. A ratones C57B1/6 irradiados con 75 rads se les transfundieron células de médula ósea de un ratón híbrido F1 (A/J x Balb/c) y se encontró que más del 45% de las CL tenían especificidad del donador a los 65 días del trasplante; a los 85 días, el 80% de las CL eran del donador de la médula ósea. Ultraestructuralmente, (Ver *Características Ultraestructurales de las CL*) se observó que las células formadoras de rosetas tenían todas las características de las CL. En ambos sistemas experimentales, los queratinocitos de los animales quiméricos tuvieron especificidad del receptor. La conclusión fue que las CL epidérmicas derivan y son continuamente repobladas por precursores móviles originados en la médula ósea.

Un hallazgo que vino a reforzar este concepto fue la observación de marcadores de superficie comunes a las CL y a las células derivadas de la médula ósea. En cultivos de células de médula ósea, Goordyal *et al.*, (1985) ⁵ demostraron que células con propiedades fenotípicas de CL y macrófagos se originaban de una célula CD1a+. Además, estudios más detallados con los progenitores CD1a+ revelaron que esta población celular tenía receptores para la lecitina de cacahuete y para el Fc de la IgG y para el C3b y expresaban moléculas CD4, CD14, CD33, HLA-DR y HLA-DP. ^{6,7} Estas observaciones sugirieron que las CL y los monocitos/macrófagos tienen un ancestro común. A pesar de la ausencia de gránulos de Birbeck (GB) (Ver *Características Ultraestructurales de las CL*) en las células de médula ósea CD1a+, ellas constituyen el mejor candidato progenitor de las CL.

3. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Desde su descubrimiento las CL ⁸ han sido un enigma y objeto de múltiples estudios. Para su identificación se han empleado diversas técnicas de acuerdo con las propiedades de las CL: técnicas histoquímicas, que muestran marcadores enzimáticos como las enzimas Adenosintrifosfatasa (ATPasa) y Esterasa inespecífica; técnicas de microscopía electrónica de transmisión, que establecen criterios de identificación ultraestructural y técnicas inmunohistoquímicas, que ponen de manifiesto la presencia de marcadores citoplásmicos, como la proteína S-100 y marcadores de superficie como los antígenos Ia, CD1a, y receptores para el Fc de la inmunoglobulina G y para el tercer componente del complemento.

4. MARCADORES ENZIMÁTICOS

4.1. Adenosintrifosfatasa (ATPasa)

El método histoquímico para demostrar la actividad de la enzima Adenosintrifosfatasa (ATPasa) ha sido frecuentemente usado para demostrar la presencia de CL en diferentes epitelios planos estratificados. ⁹

El método está basado en el concepto de que los metales catiónicos (iones de plomo), en el medio de incubación, captan iones fosfato liberados por la hidrólisis enzimática del Adenosintrifosfato (ATP), resultando en la formación de precipitados altamente insolubles en los sitios catalíticos de la enzima. Estos precipitados se vuelven visibles al microscopio cuando se combinan con sulfuro de amonio, originando sulfuro de plomo.¹⁰

Mustakallio (1962),¹¹ tratando de demostrar que los elementos neurales epidérmicos muestran actividad ATPasa en piel humana, evidenció nervios papilares, extensiones intraepidérmicas y las redes dendríticas de CL. Cuando el ATP fue omitido de la mezcla de incubación o reemplazado por α -glicerofosfato, los elementos neurales de la epidermis permanecieron sin teñir. Mustakallio relacionó la presencia de ATPasa en las CL con funciones neurales.

Posteriormente, Mackenzie y Squier (1975)¹² obtuvieron láminas epidérmicas del cojineté plantar de ratones que fueron incubadas en un medio para demostrar la actividad de ATPasa+. Con microscopía fotónica se observó una población de células dendríticas ATPasa+, distribuidas heterogéneamente entre los queratinocitos. Este método resultó adecuado para la observación de CD epidérmicas por la localización precisa del producto de la reacción histoquímica.

En trabajos posteriores se modificó la técnica de histoquímica enzimática para demostrar la especificidad del método. Algunos de los parámetros que se analizaron y que tienen efecto sobre la histoquímica enzimática son la fijación, el tiempo de incubación y la concentración del sustrato (ATP o Adenosindifosfato ADP). De esta manera se encontró que cuando los especímenes no estaban fijados, las CL no se teñían con ningún método y existía un incremento en la coloración del fondo. Por otro lado, la fijación con glutaraldehído al 2.5% inhibió la actividad de ATPasa y la fijación con formol amortiguado fue mejor a temperatura ambiente que a 4 °C, en términos de la localización de las CL y en la reducción de la reactividad no específica de otras células epidérmicas. Usando como fijador formol-cacodilato a 4 °C se obtuvieron mejores resultados que con cualquier otro fijador. Además de lo anterior, también se encontró que, en general, los tiempos prolongados de fijación reducían la reacción inespecífica de las células epidérmicas y que la incubación por períodos prolongados en el medio que contenía ATP producía un mayor oscurecimiento de las CL y un incremento proporcional de reacción inespecífica.¹³

El empleo de técnicas histoquímicas combinado con la observación a través del microscopio electrónico de transmisión permitió nuevos avances en el estudio de las CL. Wolff y Winkelman (1967)¹⁴ tratando de dilucidar que células epidérmicas mostraban actividad de ATPasa, desarrollaron una histoquímica enzimática ultraestructural en piel de cobayos albino y rojo. Ellos encontraron un depósito electrón denso, producto de la reacción histoquímica de ATPasa, en la membrana plasmática de CL. Ellos identificaron a las CL por los siguientes criterios: citoplasma claro, núcleo polilobulado, gránulo citoplásmico en forma de bastón y ausencia de tonofilamentos, desmosomas, premelanosomas y melanosomas. Con estas observaciones concluyeron dos cosas, que han sido de gran importancia dentro del desarrollo de la investigación acerca de las CL.

- Las células dendríticas nucleósido trifosfatasa-positivas observadas con el microscopio fotónico son CL y aparentemente todas ellas son demostradas con esta técnica de histoquímica enzimática.
- En la epidermis del cobayo la actividad enzimática de ATPasa es una característica exclusiva de las CL, ya que los queratinocitos no mostraron tal actividad.

En conclusión, la técnica de histoquímica enzimática para ATPasa constituye un método eficaz y selectivo para evidenciar a las CL tanto con microscopía fotónica como electrónica. Debe recordarse que esta enzima está presente en otras células de diferentes tejidos, por lo que la especificidad del método sólo es válido para las CL epiteliales.

4.2. Esterasa inespecífica

En 1962, Jarret y Riley¹⁵ demostraron que algunas células dendríticas de la epidermis de la cola de ratón poseían actividad de esterasa inespecífica, al emplear una modificación de la técnica de pararosanilina descrita por Davis y Ornstein en 1959. En trabajos posteriores, en cortes de piel humana, se encontró actividad de esterasa inespecífica en células dendríticas de la dermis superior, sin embargo, no se demostraron células similares en la epidermis, aunque estuvo presente una banda de actividad enzimática en la capa granular. Al examinar la piel humana con la reacción para ATPasa, se observaron

células dendríticas en la epidermis y dermis superior, además de una gran actividad de la enzima en la capa granular epidérmica. Estos resultados indicaron que las CL poseían actividad de ATPasa y de esterasa inespecífica.

La presencia de esta enzima en CL proporcionó evidencias de una estrecha relación con las células del sistema monocito-macrófago ya que estos también poseen actividad de esterasa inespecífica.¹⁸

Posteriormente, se determinó la localización ultraestructural de esta enzima en CL empleando láminas separadas con Acidoetilendiaminotetraacético (EDTA) de orejas de ratón. Cuando los cortes se observaron sin contrastar el producto de la reacción de la actividad de esterasa inespecífica se localizó de manera uniforme en la membrana plasmática de células con todas las características de CL, incluyendo la presencia del GB. Cuando los cortes se contratiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, se determinó con precisión que el producto de la reacción se encontraba en la cara externa de la membrana plasmática.¹⁷

Estos resultados concuerdan con los encontrados en células del sistema monocito-macrófago, ya que con anterioridad se había demostrado ultraestructuralmente la localización de la esterasa inespecífica en la cara externa de la membrana plasmática de macrófagos alveolares del humano. La demostración por histoquímica enzimática de la actividad de esta enzima constituye un método sencillo para visualizar a las CL.¹⁸

5. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Con el empleo de la microscopía electrónica se obtuvo un perfil morfológico característico de las CL con el cual se les ha podido identificar, no solo en la piel sino también en otros órganos. Birbeck y cols (1961)¹³ estudiaron piel humana normal y de pacientes con vitiligo y encontraron melanocitos en la capa basal de la epidermis de individuos normales y en la epidermis normal de pacientes con vitiligo.

En contraste, en la epidermis afectada de vitiligo no se observaron melanocitos, sin embargo, se encontraron células fácilmente distinguibles de los queratinocitos en posición similar a la ocupada por los melanocitos basales en la epidermis normal. Estas células se identificaron como CL tanto en la epidermis de sujetos normales como en la epidermis de pacientes con vitiligo. Las características ultraestructurales de estas células fueron las siguientes:

- La envoltura nuclear presentaba una apariencia marcadamente indentada, debido a la presencia de profundas hendiduras. Algunos queratinocitos y melanocitos normales tenían una sola hendidura pequeña en la envoltura nuclear, pero el grado de indentación fue menor al de las CL.
- El aparato de Golgi se encontró bien desarrollado, consistiendo en una formación de vesículas y membranas a un lado del núcleo, también se observaron estructuras centriolares en esta región.
- Las mitocondrias eran cortas, pequeñas y no muy numerosas.
- El citoplasma era claro en comparación con el de los queratinocitos circundantes y ocasionalmente se observaron pequeños cúmulos de material fibrilar junto con numerosas vesículas pequeñas.
- La membrana plasmática no estaba unida a la de las células circundantes por medio de desmosomas.

- No se encontraron gránulos de melanina o premelanina en el citoplasma, pero se observaron gránulos de un tipo particular no encontrados en melanocitos y queratinocitos. A estos organelos se les denominó Gránulos de Birbeck (GB).

Estos gránulos tenían forma de bastón y estaban limitados por estructuras lineales con extremos redondeados y con una lámina estriada en el centro. Ocasionalmente estos gránulos se encontraban tangencialmente y se demostró que eran discos de aproximadamente 0.3μ de diámetro. Estos cortes mostraron un arreglo bidimensional de partículas, el cual era la causa de la estriación de la lámina central en los gránulos en forma de bastón. Estas partículas estaban espaciadas a cada 90 \AA . Ocasionalmente uno de los extremos del gránulo estaba ensanchado formando una vesícula lo cual le daba un aspecto de "raqueta de tenis".

Posteriormente, se realizó una descripción del GB y se propuso el primer modelo tridimensional de este organelo: en diferentes imágenes en distintos planos de corte, el GB apareció como una estructura aplanada aproximadamente de 50 nm de grosor y arriba de 1μ de diámetro, sin embargo, el cuerpo en forma de plato también podía estar ligeramente hinchado o curvado hasta adquirir una forma similar a la de una copa. Este modelo estableció que la porción discoide, correspondía en los cortes, a las imágenes en forma de bastón, mientras que la porción vesicular era la dilatación unida a uno de los extremos de éste.²⁰

Interesantemente se ha observado que las CL de los estratos suprabasales contienen más GB que las CL que se localizan en la capa basal.²¹

Por otro lado, se ha producido un anticuerpo monoclonal que reconoce al GB de las CL de humano. Este anticuerpo monoclonal llamado "Lag", reconoce a una glucoproteína de 40 kDa presente en la membrana del GB. Con este anticuerpo se ha logrado identificar CL en varios tejidos.²²

6. MARCADORES INMUNOLÓGICOS DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

6.1. Moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad CPH (Ia) de las Células de Langerhans

Los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) de humano y ratón controlan la expresión de varias proteínas (antígenos) de superficie celular. Existen dos clases de moléculas proteicas del CPH: las clase I H-L (ratón) / HLA A, B y C (humano), y las clase II Ia (ratón) / HLA-DR, DP y DQ (humano). Ambas moléculas permiten el reconocimiento de antígenos, diferenciando entre lo propio y no propio y asimismo, participan en la comunicación célula-célula durante la respuesta inmunológica. Todas las células nucleadas del organismo expresan moléculas clase I, mientras que sólo las células del sistema inmunológico expresan moléculas clase II. ^{23, 24}

Las moléculas clase II son necesarias para que una CPA pueda presentar antígenos extraños a los linfocitos T. En este sentido, diferentes trabajos han mostrado que estas moléculas son expresadas por CL epidérmicas, descripción que fue realizada por Rowden *et al.*, (1977). ²⁵ Ellos aislaron moléculas clase II de linfocitos B humanos las cuales fueron utilizadas para la producción de un heteroantisero de conejo con un peso de 30,000 Daltons; este suero, después de una absorción con una línea celular T-humana (MOLT4), mostró reacción contra células B pero no con células T de sangre periférica o con timocitos. Cuando se incubaron linfocitos de dos individuos diferentes para provocar una Reacción Linfocítica Mixta (RLM), el antisuero suprimió la incorporación de timidina. Con objeto de determinar la especificidad de este antisuero, se realizó una inmunofluorescencia en cortes por congelación de piel de humana, observándose células dendríticas intensamente fluorescentes en posición basal y suprabasal de la epidermis. Además, en estudios recientes se demostró que las CL de humano expresaban los tres subtipos de moléculas clase II del (CPH): HLA-DR, DP, y DQ aunque todas las CL fueron más reactivas para el HLA-DR. La identificación de estas moléculas en CL proporciona interesantes datos para la investigación de esta población celular, ya que estas participan en fenómenos como la RLM, en la Reacción Trasplante vs Hospedero y en la hipersensibilidad retardada por contacto. ²⁶

6.2. Receptor Fc y C3b en Células de Langerhans

En 1977 se describió la presencia de receptores para la fracción cristalizable de la IgG (Fc) y para el tercer componente del complemento (C3b). Suspensiones epidérmicas obtenidas de piel humana normal fueron incubadas con una suspensión de eritrocitos bovinos cubiertos con IgG y complemento. Después de 1 hora algunas células epidérmicas formaron rosetas con los eritrocitos opsonizados. Esta población celular resultó ser ATPasa+ y con microscopía electrónica se observaron GB en el citoplasma de estas células con lo cual se determinó que eran CL.²⁷ Posteriormente se han encontrado receptores no sólo para el Fc de la IgG sino también para el Fc de la IgE, lo cual resulta interesante ya que existe la posibilidad de que las CL estén involucradas en fenómenos de alergia.²⁸

6.3. Marcadores de linfocitos T en Células de Langerhans

Las CL poseen marcadores de superficie distintivos de linfocitos como los antígenos CD1a (marcador de Timocitos) y CD4.

Murphy *et al.*, (1981)²⁹ determinaron la presencia de los antígenos Ia y CD1a en biopsias de piel humana normal. Con microscopía folónica observaron células dendríticas positivas a ambos antígenos dispuestas en los estratos basales y suprabasales de la epidermis. Con microscopía electrónica, estas células Ia+ y CD1a+ se identificaron como CL.

Los antígenos CD1a e Ia además de haber sido localizados en la membrana plasmática fueron observados en el interior del GB.³⁰ La función exacta de las moléculas CD1a es desconocida, sin embargo se piensa que participan en el reconocimiento de antígenos entre los linfocitos y células presentadoras de antígenos. (Ver fig. 1)

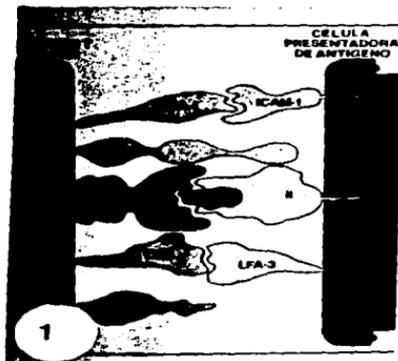


fig. 1 Representación esquemática de las moléculas involucradas en la activación de los linfocitos T. Existen múltiples interacciones entre los linfocitos T-cooperadores y las células presentadoras de antígenos. TCR = receptor específico de antígeno del linfocito T; II se refiere a la clase del CPH; CD45 = antígeno leucocitario común; LFA-1 = antígeno de función linfocitaria; ICAM-1 = moléculas de adhesión intercelular; CD2 = receptor de la molécula similar al LFA-3 sobre eritrocitos de carnero; LFA-1 es un miembro de la familia de las integrinas que incluyen el receptor Mac-1, iC3b.

La expresión de moléculas CD4 en CL ha sido reportada por varios investigadores, ³¹ e interesadamente se ha encontrado que la expresión de estas moléculas en las CL se incrementa en diferentes patologías cutáneas. Las moléculas CD4 en los linfocitos T juegan un papel muy importante ya que estas estabilizan de forma notable la interacción entre el complejo antígeno/moléculas clase II del CPH de una CPA y el Receptor de Células T (TCR) permitiendo así la activación de los linfocitos T. Sin embargo, la relevancia fisiológica de la expresión de moléculas CD4 en CL no está clara.

6.4. Proteína ácida S-100 en Células de Langerhans

La identificación de la proteína ácida S-100 es de particular interés, por sus posibles implicaciones ontogénicas, filogénicas y funcionales. Esta proteína está muy conservada a lo largo de la escala filogenética e inicialmente fue identificada en el cerebro y nervios periféricos de varios vertebrados.³²

La proteína ácida S-100 inicialmente fue considerada como la única proteína unidora de Ca^{2+} intracelular en astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann. Sin embargo, estudios inmunohistoquímicos han demostrado que esta proteína está presente en diferentes tipos celulares de tejidos no nerviosos de varias especies de mamíferos.³³

Cocchia *et al.*, (1981)³⁴ determinaron la localización celular y subcelular de la proteína ácida S-100 en piel normal de humano por inmunohistoquímica ultraestructural por el método de Peroxidasa Antiperoxidasa (PAP). En la epidermis el producto de la reacción fue detectado en melanocitos y CL. En las CL la proteína S-100 se localizó externamente en la matriz citoplasmática pero no se encontró en las sistemas del retículo endoplásmico, mitocondrias y GB. En el núcleo, la inmunoreactividad fue encontrada en el nucleoplasma pero no en la envoltura nuclear. Los queratinocitos fueron negativos al igual que los fibroblastos, linfocitos y células endoteliales vasculares.

La identificación de la proteína ácida S-100 en CL ha permitido utilizarla como un marcador específico de CD en diferentes órganos linfoides. Misra *et al.*, (1983)³⁵ identificaron células dendríticas S-100+ en la paracorteza de ganglios linfáticos, en la unión cortico-medular del timo y en la vaina periarteriolar del bazo. Los macrófagos fueron negativos para la proteína S-100, por lo que ésta es un marcador excelente para diferenciar a las CD de las células del sistema monocito-macrófago. Las primeras poseen la subunidad β S-100, mientras que las segundas ocasionalmente expresan la subunidad α S-100 pero nunca la β .

Por otro lado, Rowden G. *et al.*, (1985) ³⁶ describieron la distribución de la proteína S-100 en tejidos de diferentes mamíferos por medio de reacciones inmunohistoquímicas. Los tejidos examinados fueron: tejido nervioso (cerebro y nervios periféricos), piel, cartilago, tejido linfóide normal (ganglios linfáticos, bazo y timo) y tejido patológico (piel de pacientes con linfadenopatía dermatopática, histiocitosis X y colesteatoma). Por fraccionamiento celular se aislaron CDE y CL de ratón que fueron destinadas a estudios de microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión. Además, a las CL aisladas se les realizó una prueba de formación de rosetas.

La inmunoreactividad de la proteína S-100 en el tejido nervioso fue identificada en el citoplasma de astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann.

En tejidos no nerviosos la proteína S-100 fue identificada en condrocitos de cartilago traqueal. En la piel, la inmunoreactividad fue vista en CL suprabasales y melanocitos basales mientras que los queratinocitos fueron negativos. En el tejido linfóide se observaron células con morfología dendrítica S-100+ en la paracorteza de ganglios linfáticos, en la pulpa blanca esplénica (vaina linfática periantolar), y en la médula límbica. En los tejidos patológicos se observó un incremento gradual de CD S-100+.

Por otro lado, en los ganglios y la piel de pacientes con linfadenopatía dermatopática e histiocitosis X se observó un incremento de células S-100+ en infiltrados dérmicos y dentro del parénquima de los ganglios. En el colesteatoma se mostró aumento de células S-110+ en el epitelio de la membrana timpánica.

Con microscopía electrónica, sólo las células con morfología dendrítica tuvieron en su citoplasma la proteína S-100. Las CDE tenían forma irregular, con procesos citoplásmicos, núcleo multilobulado con eucromatina y en algunas de estas células se observó el GB. De manera general, el producto electróndenso de la reacción oscureció la mayoría de los organelos citoplásmicos. Linfocitos, macrófagos y granulocitos presentes en la suspensión celular no se marcaron con la proteína S-100. En las suspensiones epidérmicas las CL y los melanocitos fueron S-100+. Además, las CL formadoras de rosetas fueron S-100+.

La función exacta de la proteína S-100 en CD permanece incierto, pero se conoce que es una proteína unidora de Ca^{2+} intracelular y está presente en astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann.

7. EL SISTEMA DE CÉLULAS DE LANGERHANS

7.1. Generalidades

El Sistema Inmunológico requiere de la participación de células no linfoides, conocidas como células accesorias del sistema inmunológico y cuyo prototipo es la CL epidérmica. Distribuidas en el organismo se han identificado células con morfología dendrítica, fenotipo inmunológico y funciones similares a las de las CL, lo que ha originado el concepto del SCL. De acuerdo a su localización los elementos de este sistema han recibido diferentes nombres: en la epidermis y otros epitelios planos estratificados se les conoce como Células de Langerhans (CL), en linfa como Células Veladas (CV), en las zonas T-dependientes de ganglios linfáticos y en la médula del timo como Células Interdigitantes (CID) y en el bazo se denominan como (CDE). En el intersticio de corazón, hígado, riñón y páncreas también se han descrito células similares en morfología, fenotipo y función a las CL (CDT).² (Ver Tabla I).

TABLA I. DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN TEJIDOS NORMALES.²

TIPO CELULAR	DISTRIBUCIÓN
CL	Epidermis, Dermis y otros epitelios.
CV	Linfa
CID	Zonas de células T de linfonodos y timo
CDE	Zonas de células T de bazo
CDT	En intersticio de riñón, hígado, corazón, páncreas y músculo esquelético

Una hipótesis reciente sugiere que todas estas células tienen un precursor común proveniente de la médula ósea, el cual es distinto al del monocito-macrófago, cuya diferenciación está influida por las condiciones microambientales de los tejidos que coloniza.⁴⁷ Además, las CD de cada uno de estos compartimentos tisulares comparten algunas características, como el antígeno leucocitario común CD45, y la expresión constitutiva de moléculas clase II del CPH.³

7.2. Células Veladas (CV)

En 1969, dos grupos de investigadores informaron de la existencia de células con GB en ganglios linfáticos de conejo³⁷ y de humano.³⁸ Posteriormente, Silberberg y cols.³⁹ describieron células ultraestructuralmente idénticas a las CL en la linfa de cobayos a los que se les indujo hipersensibilidad de contacto. En un estudio posterior se encontró que las CL captan ferritina y después migran hacia los ganglios linfáticos regionales a través de la linfa.⁴⁰ Debido a que estas células tenían largas expansiones celulares o "velos" se les denominó células veladas (CV); el núcleo era indentado, rodeado de haces de microfilamentos, con un citoplasma generalmente más denso que el de las otras células dendríticas, con abundante retículo endoplásmico rugoso y numerosos lisosomas y mitocondrias. Un gran número de vesículas pequeñas parecidas a lagolisosomas estaban localizadas en la proximidad del complejo de Golgi.⁴¹ Las CV constituyen el 40-50% del total de la población celular de vasos linfáticos aferentes y de ellas el 10% son activamente fagocíticas y sólo el 3% contiene GB.⁴²

Estudios microcinematográficos han revelado que las CV están en movimiento constante y presentan una gran actividad pinocítica. Además, estas células tienen características morfológicas e inmunohistoquímicas análogas a las de las CL: poseen receptores para FC de la IgG, C3b y expresan el antígeno Ia.^{43, 44}

7.3. Células Interdigitantes (CID)

Estas células se han descrito en las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos y en la médula del timo.^{45, 46} Estas células deben su nombre a que sus membranas se entrelazan con prolongaciones en forma de "dedo" del citoplasma de los linfocitos con los cuales están en estrecha aposición. Las CL y las (CID) tienen similitudes ultraestructurales, enzimáticas, y de expresión de antígenos. Las CID presentan en su membrana plasmática actividad de ATPasa.⁴⁷ Por otro lado, en un estudio realizado por Lampert y cols (1980),⁴⁸ utilizando técnicas inmunohistoquímicas para caracterizar fenotípicamente a las células en la linfadenopatía dermatopática, las CID resultaron fuertemente positivas al antígeno Ia. Estos hallazgos apoyaron la propuesta de que la expresión de antígenos Ia puede estar restringida a una subclase de células cuya función principal está en el área de regulación de células T. Lo anterior concuerda con la observación de numerosas mitosis en los timocitos cuando se encuentran en las cercanías de células parecidas a CID.

Los GB no se observan frecuentemente en el citoplasma de las CID; después del reto intradérmico con antígenos, se puede apreciar un gran número de éstas con GB. Kamperdijk y Hoefsmit sugirieron que las CID podrían provenir de vasos linfáticos aferentes, ya que después de la ligadura de estos vasos, las CID desaparecen al cabo de 6 semanas.⁴⁹ También se ha sugerido que más que una migración de CL a las zonas paracorticales debido a la estimulación antigénica, la población local de CID es inducida a formar GB.⁴⁶

Lo anterior hace pensar que la distribución celular o diferenciación de organelos específicos, parece estar modulada por la fase inductiva de la respuesta inmunológica primaria. En estudios inmunohistoquímicos realizados para caracterizar a las CL, CV y CID se ha demostrado que éstas pertenecen a una misma línea celular. Por lo tanto, el ciclo biológico de éstas se inicia con las CL epidérmicas que migran, en condiciones normales y de estimulación antigénica, a través de los linfáticos aferentes donde se observan como CV, hacia los ganglios regionales donde aparecen como CID.²⁴ (Ver. fig. 2)



fig. 2. Las células del Sistema de las Células de Langerhans (SCL) derivan de la médula ósea. Se localizan principalmente en la piel y en los tejidos linfoides. Las células de Langerhans (CL) de la epidermis y mucosas migran hacia los vasos linfáticos aferentes, dentro de los cuales aparecen como Células Veladas (CV) y posteriormente como Células Interdigitantes (CID) en las áreas paracorticales de ganglios linfáticos, ricas en linfocitos inmunológicamente competentes. En el bazo, timo y tejidos intersticiales de diversos órganos, el SCL está representado por las Células de Langerhans.²⁴

7.4. Células Dendríticas Esplénicas o de Steinman y Cohn (CDE)

Steinman y Cohn (1973)²⁰ fueron los primeros en describir una población celular aislada del bazo de ratón, que mostraba una morfología dendrítica *in vitro*. Este tipo celular especial, diferente de los granulocitos, linfocitos y macrófagos, se adhería a superficies de vidrio o de plástico, presentaba un citoplasma con pseudopodios que variaban en longitud, anchura, forma y número, dando como resultado una variedad de formas celulares que iban desde la bipolar hasta la dendrítica estrellada. El interior del citoplasma contenía gránulos circulares densos, sin evidencia de endocitosis a pesar de ser cultivadas en concentraciones elevadas de suero, condición que se sabe estimula la endocitosis en los

macrófagos. El núcleo mostraba un perfil contorneado, con masas de cromatina gruesa y densa adherida a la cubierta nuclear.

La tinción vital de las Células Dendríticas Esplénicas (CDE) con Verde Janus demostró un gran número de mitocondrias en el interior de los pseudopodos, mientras que el Rojo neutro evidenció pocos lisosomas.

En las preparaciones de células adherentes, las CDE fueron PAS negativas, tiñéndose débilmente con azul de Toluidina y Hematoxilina. Histoquímicamente, las CDE y los macrófagos fueron claramente diferentes ya que estos últimos presentaban grandes gránulos perinucleares fosfatasa ácida positivos y otros teñidos con azul de Prusia, presumiblemente gránulos de hemosiderina. La actividad de ATPasa y Peroxidasa también fue demostrada únicamente en los macrófagos.⁵⁰

En estudios microcinematográficos en contraste de fases, se observó que los macrófagos eran más sedentarios que las CDE, cuyo citoplasma se movía de una manera pulsátil, emitiendo y retrayendo continuamente los pseudópodos y pequeñas dendritas. En las diferentes especies de ratones estudiadas, el fraccionamiento de la pulpa blanca y la pulpa roja, evidenció que las CDE estaban restringidas a la primera. En los linfáticos mesentéricos el porcentaje de CDE osciló entre el 0.2% y el 0.5%, en los ganglios linfáticos axilares y cervicales entre el 0.1 y el 0.3% y en las placas de Peyer entre 0.1 y el 0.2%. El intestino, la médula ósea, el hígado y la cavidad peritoneal casi no se presentan CDE. Otros mamíferos estudiados como el ratón desnudo, la rata, el conejo y la vaca también tuvieron CD en el bazo.⁵⁰

La participación de las CDE en la RLM indicó que estas eran 100 a 300 veces más potentes como estimuladoras, comparadas con células esplénicas no fraccionadas. En comparación, poblaciones enriquecidas de linfocitos T y B de bazo, ganglio linfático, timo, macrófagos de bazo, cavidad peritoneal e hígado, fueron pobremente estimuladoras en la RLM. Más aún, la elución de macrófagos y linfocitos de las suspensiones esplénicas no modifican la capacidad estimuladora de las CD.⁵¹ Estos hallazgos son importantes, ya que las CD representan únicamente el 1% de las células nucleadas en los órganos

linfáticos periféricos.⁵⁰ Esta capacidad estimuladora puede deberse a la presencia de antígenos Ia en CD.⁴⁹

Por las características de las CDE, estas parecen ser parte del SCL, excepto porque no presentan GCL y tampoco muestran actividad de ATPasa en su membrana plasmática. Además existe alguna diferencia en la capacidad de las dos células para formar rosetas con eritrocitos, aunque pudiera ser que los métodos enzimáticos empleados para la suspensión de células epidérmicas enmascare o allere los receptores de superficie de las CDE.⁵²

De los datos presentados se concluye que, independiente del sistema monocito-macrófago, existe una población de células dendríticas (CL; CV; CID y CDE) que por su ontogenia, morfología, fenotipo y función representan un mismo linaje. Las CL por ser las células dendríticas más conspicuas, son el representante clásico y podría darle su nombre a este sistema que se denominaría: Sistema de Células de Langerhans.

Las diferencias cuantitativas y cualitativas en el fenotipo antigénico pueden ser la representación de las diferentes influencias microambientales que participan en la diferenciación de las células del SCL. La expresión de estos marcadores no sólo es útil en el estudio normal de estas células, sino también en los diferentes procesos patológicos en los que se involucran.

7.5. El Sistema de las Células de Langerhans (SCL) y Macrófagos

Una opinión general, es que las células del SCL y los macrófagos constituyen dos grupos celulares que pertenecen al sistema de células mononucleares no linfoides. Sin embargo, ambas poseen diferentes funciones y fenotipos. Este concepto surgió debido a que las SCL son potentes estimuladoras de respuestas linfocíticas, función atribuida a los macrófagos.

Las células del SCL, pueden ser distinguidas por criterios morfológicos de los macrófagos. (Ver Tabla II)

TABLA II MORFOLOGÍA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y DE MACRÓFAGOS ²³

PROPIEDAD	CD	MACRÓFAGOS
Citología	Mitocondrias (+++)	Vesículas pinocíticas (+++)
	Lisosomas (*)	Lisosomas
	Núcleo indentado	Núcleo oval
	GCL	
Movimiento	Forma procesos, velos y pseudopodos	Forma vesículas y pliegues
	Núcleo pleomorfo	Núcleo estático

Además, las CD poseen un fenotipo antigénico diferente al de los macrófagos cuando se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos citoplásmicos y de membrana. De particular importancia es la presencia de antígenos CD1a en la membrana de CL y su ausencia en macrófagos ya que ha permitido una mayor diferenciación entre éstas ²⁹ La diversidad de fenotipos entre CL y Macrófagos es uno de los argumentos que sostiene la hipótesis de que ambos tipos celulares no están relacionados y que cada uno proviene de un precursor diferente originado en la médula ósea. ²⁴ (Ver Tabla III)

TABLE III
COMPARACIÓN ENTRE CL Y MACRÓFAGOS

	CL	MAC
Origen medular	+	+
Características Morfológicas		
Núcleo indentado	+++	-
Lisosomas	+	+++
GCL	+++	-
Actividad fisiológica		
Adherencia al vidrio	++	+++
Supervivencia in vitro	+	+
Lagritosos U ₂ dependiente	?	+++
Metabolismo		
Esterasa inespecifica	+	+++
α -D-manosidas	+	+
Fosfatasa Ácida	++	+++
Peroxidasa	+	+
ATPasa pH 7.2	+++	+
α -antitripsina	-	+++
α -antitripsina	-	+++
Lisozima	-	+++
Colapsina	?	+++
Proteina S-100	+++	+
Receptores de membrana		
Concanavalina A	+	+
Aglutinina de cacahuete	+++	+
Fc para IgG	+	+
C3b	+	+
Propiedades inmunológicas		
Ia	+++	+
Antígeno Lag	+	+
OKM-1	-	+
CD4	+	-
CD1a	+++	-
Antígeno I	?	+

8. FUNCIÓN DEL SISTEMA DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

8.1. Presentación de Antígenos

El concepto de que las CL son células presentadoras de antígenos se infirió inicialmente por las relaciones estructurales de las CL con otras células epidérmicas. En el curso de los estudios ultraestructurales de los eventos celulares que ocurren en las reacciones de hipersensibilidad de contacto en humanos y cobayos, Silberberg y cols.^{35,36} observaron la aposición entre CL y linfocitos, así como la presencia de aquellas, con antígenos en su superficie, dentro de los linfáticos dérmicos y en los linfonodos regionales. Debido a que estos fenómenos no se observan en la dermatitis inflamatoria inducida por estímulos no antigénicos (mecánicos), se sugirió que las CL podrían ser elementos importantes en la fase de inducción de la hipersensibilidad retardada en la piel.

El reconocimiento de antígenos por los linfocitos T requiere de la captación inicial y del procesamiento de éstos por una CPA [a/DR+.³⁷ Empleando la técnica de formación de rosetas para obtener suspensiones enriquecidas de CL, Stingl *et al.* (1979)³⁸ demostraron en cobayos que las CL son las responsables de esta estimulación alógena; además encontraron que después de pulsar las suspensiones de CL con un antígeno estas células eran capaces de presentarlo efectivamente a linfocitos T específicamente sensibilizados, los cuales proliferaban posteriormente. También se demostró que podían generar células T-citotóxicas en cultivos donde los autoantígenos blanco estaban dados por una suspensión enriquecida de CL.³⁹

En la activación de los linfocitos T por las CL participan también los queratinocitos, ya que se ha demostrado que estos secretan una citoquina llamada "factor epidérmico activador de timocitos" derivado de células epidérmicas (ETAF), que tiene las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la IL-1.⁴⁰ Debido a lo anterior, es comprensible que las reacciones inmunes iniciadas en la epidermis dependen de la estrecha relación morfofuncional entre los queratinocitos y las CL. (Ver. fig 3)

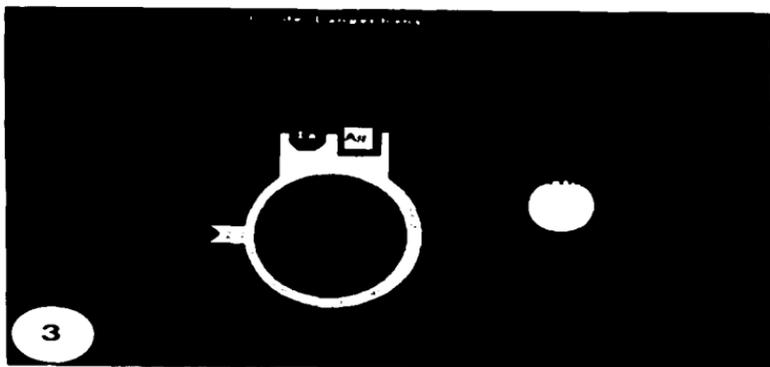


Fig. 3 Para presentar el antígeno (Ag) al linfocito T cooperador, la CL requiere presentar simultáneamente el antígeno Ia que expresa normalmente en su membrana. El queratinocito produce IL-1 que promueve la proliferación de linfocitos T, formándose un microsistema epidérmico en el que estas células se relacionan funcionalmente.

En otros estudios, que han provisto evidencias de la importancia de las CL en la inducción de hipersensibilidad de contacto, al aplicar dinitrofluorobenceno en zonas de piel con una baja densidad de CL, como en la cola de ratón,⁶¹ o en la epidermis previamente depletada de CL con radiación ultravioleta,⁶² con algunos agentes carcinogénicos,⁶³ ácido araquidónico,⁶⁴ o inmunomoduladores,⁶⁵ se observó que en lugar de inducirse una reacción de hipersensibilidad, se produjo un estado de tolerancia, posiblemente por la activación de linfocitos T supresores.

Las CD en general, son potentes estimuladoras de respuestas linfocíticas T primarias en la reacción linfocítica mixta alógena y estudios comparativos sugieren que sólo los linfocitos B activados tienen una capacidad estimuladora similar.⁶⁶ El disparador para la activación de linfocitos T es el reconocimiento por el receptor de células T de las moléculas clase II del CPH y el péptido antigénico procesado presentados por las CD.⁶⁷ El hecho de que las CD en el hombre expresen constitutivamente altos niveles de antígenos CPH es

significativo en este sentido; en contraparte los anticuerpos anti-CPH clase II bloquean la respuestas de la reacción linfocítica mixta.

Por otro lado, existen datos que indican que las CD, mediante las moléculas clase I del CPH, pueden estimular una respuesta alérgica directa CD8⁺ y una activación directa de linfocitos T citotóxicos en ausencia de linfocitos T CD4⁺ ⁶⁹

9. ANTECEDENTES DIRECTOS DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS EN LOS ANFIBIOS ANUROS

Se han observado células dendríticas presentadoras de antígenos en la epidermis y órganos linfoides de varios mamíferos. Interesantemente, se observan células dendríticas en la epidermis de anfibios,⁷⁰ aves,⁷¹ y reptiles⁷² con características de CL. En el caso particular de los anfibios, Carrillo *et al.*, en 1990⁷⁰ describieron la presencia de CL en láminas epidérmicas separadas, utilizando la técnica de histoquímica enzimática para ATPasa con microscopía fotónica y microscopía electrónica de transmisión. Con microscopía fotónica ellos observaron células dendríticas ATPasa+ con prolongaciones extendidas entre los queratinocitos y distribuidas homogéneamente. A nivel ultraestructural se observaron células con morfología dendrítica con citoplasma claro y núcleo redondeado, donde el producto electrondenso de la reacción se observó a lo largo de la membrana plasmática la cual no tenía desmosomas. (Ver. fig 4 y 5)

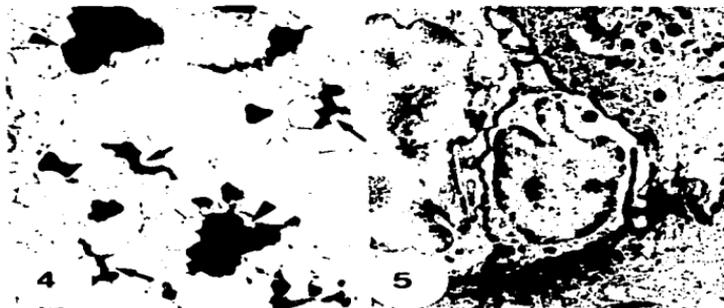


fig. 4 Lámina epidérmica de *Rana pipiens* marcada para ATPasa. Varias células dendríticas positivas (→) están presentes entre los queratinocitos. Estructuras oscuras (≡) corresponden a las aperturas de las glándulas de la piel X400.

fig. 5 Micrografía electrónica de piel ventral de *Rana pipiens* mostrando una célula ATPasa-positiva en posición suprabasal adyacente a una célula clara rica en mitocondrias (≡) X4400.

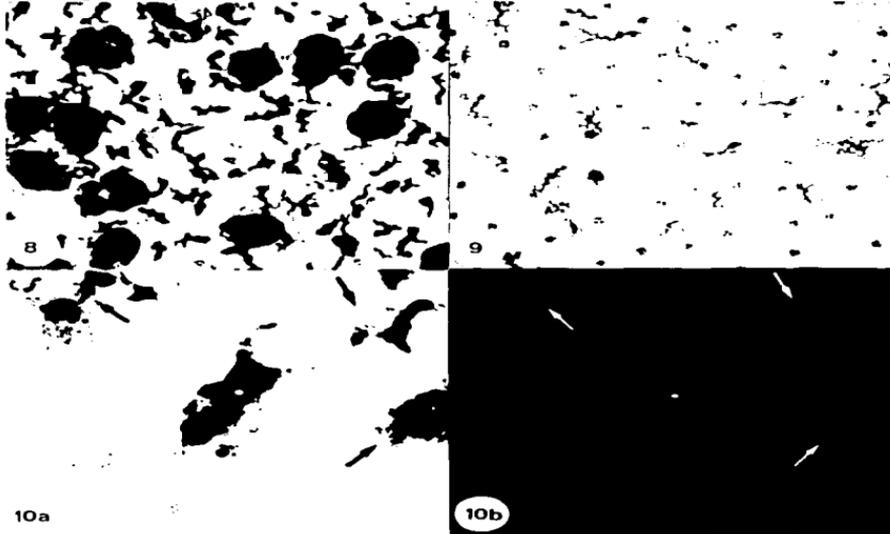
Por otro lado, Castell *et al.* (1994) ⁷³ aplicaron una histoquímica enzimática para demostrar la actividad de esterasa inespecífica en la epidermis de la *Rana pipiens*. La microscopía de luz demostró células dendríticas esterasa inespecíficas con prolongaciones cortas y distribuidas regularmente entre las células epiteliales. Con microscopía electrónica se observaron células con morfología dendrítica similar a las CL de mamíferos. (Ver. fig. 6 y 7.)



fig. 6. Micrografías de láminas epidérmicas de *Rana pipiens* procesadas para demostrar actividad de esterasa no-específica. a) Lámina epidérmica mostrando un melanocito (■) y células esterasa no-específica positivas (→) X250. b) membrana nictitante con algunas células esterasa no-específica+ de forma polihédrica X400. c) epitelio-corneal con células en mayor densidad en la unión esclero-corneal X400.

fig.7. Micrografía de histoquímica enzimática ultraestructural de Células de Langerhans de la piel de anfibios. Actividad débil (→) de esterasa no-específica positiva. bar = 1µm, X7000.

En 1996 Castiell *et al.*¹⁴ realizaron el marcaje simultaneo de CL en láminas epidérmicas con la enzima ATPasa y las moléculas clase II del CPH para microscopía fotónica y microscopía electrónica. Las células dendríticas ATPasa+ y clase II+ observadas a nivel fotónico y ultraestructural tenían una morfología similar y distribución a la descrita por Carrillo *et al.* en 1990.¹⁰ (Ver fig. 8, 9 y 10)



10a

10b

fig. 8 Histoquímica enzimática para ATPasa en lámina epidérmica de *Rana pipiens*. Células dendríticas positivas están presentes entre los queratinocitos X400.

fig. 9 Inmunohistoquímica para moléculas clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) en láminas epidérmicas de *Rana pipiens*. Los largos procesos dendríticos de las células positivas se extienden entre las células epiteliales X250.

fig. 10 Lámina epidérmica de *Rana pipiens* procesada para doble marcaje con las moléculas clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) FITC/ATPasa. Algunas células ATPasa positivas se muestran (→) en a) y b). Células dendríticas (*) con ambos marcadores, ATPasa y moléculas clase II del CMH-FITC X1000.

10. SISTEMA INMUNOLÓGICO DE LOS ANFIBIOS

En comparación con la inmensa variedad de formas que presentan los filos de los invertebrados, los vertebrados poseen un plan básico de organización muy uniforme y pertenecen a un sólo filo: los cordados. Aunque existe una notable divergencia evolutiva dentro de los vertebrados -ya que éstos comprenden los peces, los anfibios, los reptiles, las aves y los mamíferos-, los componentes básicos celulares y moleculares de la inmunidad se conservan llamativamente en todas las especies existentes.

10.1. Organización Genética del CPH de los Anfibios

Mediante caracterización molecular, genética y por criterios funcionales se ha podido demostrar que los mamíferos, las aves, los anfibios y los peces óseos poseen todos ellos CPH. Entre los criterios funcionales cabe citar la demostración de que la RLM y el rechazo agudo de los aloinjertos están controlados por una sola región genética polimórfica, y fenómenos tales como la colaboración entre las células T y B, la generación de respuestas citotóxicas antígeno-específicas y la instrucción tímica de las células de la línea T se encuentran todos ellos bajo el control del CPH.²²

La estructura básica del locus génico del CPH debió estar presente cuando los anfibios y los mamíferos divergieron a partir de un antecesor común (hace unos 350 millones de años). De hecho, datos recientes indican que el CPH se desarrolló en épocas tan tempranas como la de la aparición de los osteocitos. En el anfibio *Xenopus*, las cadenas α de clase I, codificadas por genes CPH, son moléculas de 40-44 kDa unidas de manera no covalente a la microglobulina (β_2 la cual no está codificada por el CPH. Interesantemente los estudios de clonación molecular predicen secuencias de aminoácidos similares a las moléculas CPH de clase I de los vertebrados superiores. Las moléculas de clase I se expresan en la superficie de todas las células adultas.

Las moléculas clase II de *Xenopus* están compuestas por cadenas α y β codificadas por el CPH, ambas son glucoproteínas transmembranales de 30-35 kDa. Las proteínas clase II se expresan sólo en una gama limitada de células adultas como los timocitos, las células T y B y diversas CPA, entre ellas las CL de la epidermis. Una característica especialmente interesante de la expresión del CPH en el *Xenopus* es que, a diferencia de la aparición de las moléculas clase II en la fase larvaria precoz (sobre las células B y diversas células epiteliales del renacuajo, en contacto directo con el ambiente exterior), las proteínas clase I no se expresan sobre la superficie de ninguna célula antes de la metamorfosis. Así, la expresión de moléculas clase I no es esencial para el desarrollo precoz, ni para el funcionamiento del sistema inmunitario de la larva; quizá la inmunidad celular restringida a las moléculas clase II desempeña un papel decisivo durante este período ontogénico. La amplia distribución del CPH clase II en los renacuajos, en comparación con el animal adulto, sugiere que este patrón podría representar el modo de presentación de antígenos en un sistema inmunitario menos complejo. ^{75, 76}

10.2. Tejidos Linfoides en los Anfibios Anuros

El tejido linfohematopoyético produce y almacena linfocitos, granulocitos y otras células sanguíneas. En los mamíferos, los órganos linfoides (el timo, los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido asociado a las mucosas (MALT), que contiene principalmente linfocitos, se hallan separados anatómicamente del tejido mielóide (la médula ósea), donde predominan los granulocitos y otros

diversos tipos de células sanguíneas. En cambio, en los vertebrados inferiores, los componentes linfoides y mieloides se encuentran entremezclados.⁷³

10.2.1. El Bazo de los Anfibios

El bazo de los anfibios anuros representa un modelo a estudiar. Primeramente, por la posición ocupada por los anfibios en la filogenia de la respuesta inmunológica. Segundo, la morfología del bazo en anfibios muestra marcadas diferencias en su significado funcional. Además estas diferencias no están claras entre los tres grupos principales de anfibios -ápodos, urodelos y anuros- pero incluso, entre las familias de anuros.

El bazo de los anfibios anuros es un órgano rojizo localizado dorsalmente en la cavidad del cuerpo; está irrigado por la arteria mesentérica y el drenaje venoso es por la vena esplénica⁷⁷. En todas las especies, el bazo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo, cuya capa externa se continúa con el peritoneo. El bazo está constituido por un estroma y un parénquima, y este último está formado por pulpa blanca y roja, sin embargo existen grandes diferencias en la organización del parénquima en las diferentes especies de anuros.

Con algunas excepciones la cantidad de tejido linfóide esplénico es escaso, condición que se repite en el bazo de los teleosteos. Considerando filogenéticamente el bazo de los anuros, Cooper y Wright (1976)⁷⁸ completaron un análisis comparativo de la histología del bazo en varias familias representativas de estos vertebrados. De acuerdo con sus observaciones, la tendencia de una forma "primitiva" a un tipo más "avanzado" del bazo es el desarrollo de la pulpa blanca en una forma difusa que contiene una concentrada organización de linfocitos.

Por ejemplo, una clara distinción entre pulpa roja y pulpa blanca no se encuentra, y se considera que esta última falta en los anuros primitivos *Ascaphustruon*⁷⁸. En *Scaphoipus cochii*, de la familia Pelobatidae, el bazo contiene pequeños grupos de linfocitos dispersos por todo el parénquima. Por el contrario en *Bufo powerii* y *Rana pipiens* la pulpa blanca es distinguible, aunque no está descrita

una zona marginal clara. ⁷⁸ Separado de su condición linfoide, el bazo es además el mayor órgano hematopoyético en los anuros adultos, mientras que en el estado larval se encarga de destruir eritrocitos. ⁷⁹

La histogénesis del bazo ha sido estudiada en detalle en *Xenopus Laevis* ⁸⁰ y *Rana pipiens*. ⁸¹ En *Xenopus*, el bazo comienza a distinguirse como una condensación celular en el mesogastrio dorsal (estadio 46), estableciéndose una diferenciación entre pulpa roja y blanca en el estadio 48. Entre el estadio 48 y 51 el órgano continúa incrementando su tamaño y la pulpa blanca llega a ser completamente linfoide. En *Rana pipiens* la histogénesis del bazo es similar.

10.2.1.1 Pulpa Blanca

La pulpa blanca en *Xenopus laevis* está en contraste con otros anuros, altamente elaborada, constituida por 2 o más estratos compactos de linfocitos que rodean a la arteriola central y una patente zona marginal que separa la pulpa blanca de la pulpa roja. ^{82, 83} De esta manera, la presencia de una compleja pulpa blanca en *Xenopus laevis* puede explicar la ausencia de nódulos linfoides en otras partes del organismo; de hecho éste es el caso de los anuros más avanzados, de tal manera que el bazo es la masa más importante de tejido linfoide. ⁸⁴ De acuerdo con este punto, Barrutia *et al.* (1983) ⁸⁵ describieron una bien organizada pulpa blanca esplénica en *Bufo calamita*, otro anfibio carente de nódulos linfoides en otras partes. El bazo en *Xenopus laevis*, descrito profundamente por Sterba (1951), ⁸² consiste en varias regiones de pulpa blanca formando folículos linfoides. Además se encuentran linfocitos dispersos en la pulpa roja constituyendo una zona perifolicular. En *Bufo calamita*, el bazo muestra dos áreas claramente diferenciadas: la pulpa blanca compuesta de linfocitos y la pulpa roja compuesta por cordones celulares y sinusoides. Estas dos áreas están separadas por una conspicua zona marginal formada por células reticulares. Los folículos linfoides, al igual que en mamíferos, rodean arterias excéntricas y están constituidos por elementos reticulares, macrófagos, células linfoides y células plasmáticas maduras y en desarrollo. ⁸³

Por otro lado, estudios con microscopía electrónica han revelado grupos de células no linfoides en la periferia de los folículos linfoides. Estas células recuerdan, por su morfología, a las CID, las cuales presentan un núcleo de forma irregular, con citoplasma electrónlúcido, pocos organelos membranosos, como retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias pequeñas. Además, presentan numerosos plegamientos de la superficie celular, los cuales establecen contactos con linfocitos vecinos.⁸⁶

10.2.1.2. Centros de Melanomacrófagos

En el bazo de los peces como en el de los anfibios anuros, encontramos Centros de Melanomacrófagos (CMMs) Estos centros están formados por agregados de macrófagos fuertemente empaquetados, los cuales tienen inclusiones heterogéneas de melanina, hemosiderina y lipofucsina.⁸⁷ En peces, Agius y Agbede (1984)⁸⁸ especulan que la actividad fagocítica elimina pigmentos tóxicos derivados de la ruptura o degradación de melanocitos, y eritrocitos o para neutralizar la actividad de los radicales libres formados durante la reacción de lipoperoxidación.

Con respecto a la inmunidad, Edelstein (1971)⁸⁹ ha discutido el papel de los pigmentos de melanina en mecanismos de defensa contra enfermedades y daño de tejido. La melanina puede ser empleada en el sistema peroxidasa-peroxidasa para ayudar a eliminar bacterias por iodatación de la pared celular. A este respecto, la melanina produce peróxido de hidrógeno por la oxidación de NADH, el cual es ocupado en la yodatación bacteriana, un sistema similar al utilizado por los leucocitos polimorfonucleares.

10.2.1.3. Pulpa Roja

La pulpa roja consiste en un laberinto de cordones celulares que contienen células libres como macrófagos, linfocitos, células plasmáticas maduras y células esteroidogónicas en estado de desarrollo. Todas están en una red de células reticulares y fibras que están interrumpidas por sinusoides sanguíneos.⁹⁰ EL componente más remarcado del bazo en *Xenopus laevis* y *Bufo calamita*, es la

presencia de células gigantes no linfoides semejantes a las células dendríticas atrapadoras de antígenos de los mamíferos, este tipo celular es conocido como Células Dendríticas Foliculares (CDF).

10.2.2. El Timo de los Anfibios

La diferenciación de los linfocitos T se desarrolla en el Timo. Esta glándula está presente en todas las clases de vertebrados, excepto en los ciclostomos.⁹⁰ En los anfibios anuros el timo es un órgano lobulado localizado inmediatamente por debajo de la piel y por detrás del oído medio. En todas las especies, el timo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo de la cual se proyectan trabéculas hacia el interior del parénquima tímico, aunque estas no forman lobulillos tímicos.⁷³

El timo de *Rana temporaria*^{91, 92} y *Rana perezi*⁹³ como en otros anfibios anuros está constituido por un parénquima formado por una corteza y médula. En ambas regiones se observan células retículoepiteliales, linfocitos, macrófagos y granulocitos. Además, la médula presenta células secretoras, células mioides, células retículo-epiteliales hipertrofiadas y CID. Las CID poseen un núcleo localizado excéntricamente con un pronunciado nucléolo, su citoplasma es electrónlúcido con pocos organelos, la membrana plasmática tiene invaginaciones e interdigitaciones con las que establece contactos con linfocitos, células mioides y células retículoepiteliales. En el citoplasma no se observan GB.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Sistema Celular Dendrítico (SCD) de los mamíferos está constituido por células presentadoras de antígenos y forman una población celular que capta, procesa y presenta antígenos a los linfocitos T. Estas células están distribuidas en la epidermis y otros epitelios planos estratificados, en las zonas T-dependientes de varios órganos linfoides y en el intersticio de otros órganos. La existencia de células homólogas a las CL en la epidermis de los vertebrados no mamíferos ya ha sido demostrada. En el caso particular de los anfibios (*Familia Ranae*), estas células se han demostrado en la epidermis y otros epitelios planos estratificados como la córnea y membrana nictitante, por lo que la presencia de células dendríticas en otros órganos linfoides como el bazo, timo y ganglios linfáticos es probable. La demostración de células dendríticas en órganos linfoides de anfibios, sugeriría, en este nivel filogenético la existencia de un sistema celular dendrítico comparable al de los mamíferos.

HIPÓTESIS

En la *Rana pipiens* se han demostrado células similares a las CL en la epidermis, córnea, y membrana nictitante. Por lo anterior, es posible que en otros sitios, como los órganos linfoides, se encuentren células morfológica e inmunohistoquímicamente similares a las células dendríticas.

OBJETIVO

Mostrar la presencia de células dendríticas mediante la expresión de las moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad y la Proteína citoplasmática S-100 en el bazo de los anfibios (*Rana pipiens*).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estudiaron 20 anfibios anuros (*Rana pipiens*) colectados en su ambiente natural (Cuernavaca Morelos), los cuales fueron mantenidos en condiciones adecuadas de humedad, luz (12D/12N) y temperatura (20/22 °C). Los organismos fueron sacrificados por descerebración, los bazoos fueron removidos o inmediatamente lavados en solución salina y destinados a estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para determinar la localización de la proteína S-100 y las moléculas clase II del CPH (AM/20).

Con el fin de conocer la histología general del bazo, algunas muestras fueron fijadas en formol neutro amortiguado y procesadas para hacer cortes en parafina de 6µm de grosor, los cuales fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina.^{94, 95}

En otras muestras se procedió a identificar a las CD por medio de una inmunohistoquímica para la proteína S-100 y las moléculas clase II del CPH. Cortes por congelación de 10µm, fijados en paraformaldehído al 4% y lavados en amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4, fueron preparados para realizar el inmuno-marcaje con los anticuerpos primarios (S-100 o AM-20 durante 12 horas a 4 °C), anticuerpos secundarios (anti-conejo IgG o anti-ratón IgG durante 30 minutos a 37 °C) y el complejo Avidina Biotina Peroxidasa (por 30 minutos a 37 °C). Para visualizar el sitio de unión antigénico, los cortes fueron revelados con 3,3'-Diaminobencidinatetrahidrocloruro o 3-Amino-9-Etil Carbazol. Además se realizó un contraste nuclear con Hematoxilina de Harris o Hematoxilina de Mayer según fuera el caso.^{96, 97}

Por otro lado, algunas muestras reveladas con 3,3'-Diaminobencidinatetrahidrocloruro se les infiltró con araldita, se incluyeron en la misma resina por el método de cápsula invertida y se realizaron cortes semifinos. Esta metodología se aplica en preparaciones permanentes de tejidos que previamente han sido procesados para una reacción inmunohistoquímica.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Para demostrar el marcaje simultáneo de 2 antígenos (proteína S-100 y AM-20), se utilizó la técnica de doble inmunofluorescencia en tejidos fijados en paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4. Cortes seriados por congelación de 7µm fueron preparados para realizar el marcaje inmunofluorescente. El primer anticuerpo primario (proteína S-100) fue evidenciado mediante una inmunofluorescencia indirecta con el método de Avidina TRITC y el segundo anticuerpo primario (clase II) fue evidenciado con una inmunofluorescencia indirecta con FITC. ^{96, 97}

También se verificó de manera simultánea la presencia de la proteína S-100 y las moléculas clase II en tejidos procesados por el método de AMeX (Acetona, Metil-benzoato y Xileno) ¹⁰¹⁻¹⁰³ Los tejidos fueron fijados en acetona a -20 °C durante 18 horas, deshidratados en acetona a 4 °C por 15 minutos y en acetona a temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente fueron aclarados en metil-benzoato por 30 minutos y xileno por otros 30 minutos, la inclusión se hizo en parafina de punto de fusión de 50-60 °C. Cortes seriados en parafina de 4µm, desparafinados con xileno y acetona y lavados en amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 fueron preparados para realizar el inmuno marcaje con los anticuerpos primarios (S-100 o AM-20 durante 12 horas a 4 °C), anticuerpos secundarios (anti-rabbit IgG o anti-mouse IgG durante 30 minutos a 37 °C) y el complejo Avidina Biotina Peroxidasa (por 30 minutos a 37 °C) Para visualizar el sitio de unión antigénica los cortes fueron revelados con 3,-3'-Diaminobencidinatetrahidrocloruro o 3-Amino-9-Etil Carbazol. Además se realizó un contraste nuclear con Hematoxilina de Harris o Hematoxilina de Mayer según fuera el caso.

Los controles positivos utilizados en cualquiera de los casos fueron tejidos que producen una reacción positiva para los anticuerpos primarios. Para las moléculas clase II del CPH se utilizaron cortes de piel de *Rana pipiens*, este anticuerpo marca CL epidérmicas. En el caso de la proteína S-100 se utilizaron cortes de pulmón de ratón Balb/c, este anticuerpo marca condrocitos pulmonares. Los controles negativos fueron tejidos experimentales a los que se les suprimió el anticuerpo primario.

MATERIAL Y MÉTODO

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA PROTEÍNA S-100 Y LAS MOLÉCULAS CLASE II DEL CPH PARA MICROSCOPIA FOTÓNICA EN CORTES POR CONGELACIÓN ⁹⁶⁻¹⁰⁰

1. Obtención de la muestra.
2. Lavar el órgano en solución salina balanceada pH 7.2
3. Fijar en paraformaldehído al 4%, en amortiguador de fosfatos 0.1 M., pH 7.4, durante 1 hora a 4 °C.
4. Lavar en sacarosa al 12%, 16% y 18% en amortiguador de fosfatos 0.1 M., pH 7.2, durante una hora a 4 °C en cada lavado.
5. Colocar el órgano en medio para incluir muestras de tejido congelado tissue-tek y congelar a -70 °C.
6. Realizar cortes por congelación de 10µm.
7. Inhibir peroxidasa endógena incubando en peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos o ácido peryódico al 0.28% durante 1 minuto.
8. Lavar en amortiguador salino de fosfatos 0.1 M., pH 7.2 durante 10 minutos.
9. **NOTA:** Antes de cada incubación lavar con amortiguador salino de fosfatos 0.1 M., pH 7.2 con albúmina sérica bovina al 0.5%, 3 veces por 10 minutos a 4 °C.
10. Incubar en anticuerpo primario:
 - a) Anti S-100 dilución 1:40 durante 18 horas a 4 °C.
 - b) AM-20 dilución 1:20 durante 18 horas a 4 °C.
11. Incubar en anticuerpo secundario:
 - a) Anti-IgG de conejo biotinilado durante 30 minutos a 37 °C para S-100.
 - b) Anti-IgG de ratón biotinilado durante 30 minutos a 37 °C para moléculas clase II del CPH.
12. Incubar en estreptoavidina-peroxidasa durante 30 minutos a 37 °C.

13. Revelar con 3,-3'-Diaminobencidinatetrahidrocloruro o 3-Amino-9-Etil Carbazol de 5 a 10 minutos.
14. Lavar con agua destilada abundantemente
15. Contrateñir con Hematoxilina Harris o Hematoxilina de Mayer.
16. Montar en medio de glicerol-polivinil alcohol.
17. **NOTA:** En tejidos previamente procesados se les realizaron cortes semifinos por el método de cápsula de gelatina invertida.
18. Fijar en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1 M., pH 7.4 durante 30 minutos.
19. Infiltrar en mezcla de resina tolueno 1:1 durante 24 horas
20. Inclusión en resina al 100% por el método de cápsula de gelatina invertida.
21. Polimerizar a 60 °C durante 15 horas.
22. Realizar cortes semifinos de 0.5µm y teñirlos con azul de Toluidina.
23. Montar en medio de glicerol-polivinil alcohol.

DOBLE INMUNOFLORESCENCIA PARA PROTEÍNA S-100 Y MOLÉCULAS CLASE II DEL CMH PARA MICROSCOPIA FOTÓNICA ^{96,97}

1. Obtención de la muestra
2. Lavar el órgano en solución salina balanceada pH 7.2
3. Fijar en acetona durante 10 minutos a 4 °C.
4. Lavar en sacarosa al 12%, 16% y 18% en amortiguador de fosfatos 0.1 M., pH 7.2, durante una hora a 4 °C en cada lavado.
5. Colocar el órgano en medio para incluir muestras de tejido congelado tissue-tek y enfriar a 70 °C.
6. Realizar cortes por congelación en el cryo-cut de 10µm.
7. Lavar en amortiguador salino de fosfatos 0.1 M., pH 7.2 durante 10 minutos.

8. **NOTA:** Antes de cada incubación lavar con amortiguador salino de fosfatos 0.1 M., pH 7.2, con albúmina sérica bovina al 0.5%, 3 veces por 10 minutos a 4 °C.
9. **Incubar con el anticuerpo primario:**
 - a) Anti-S-100 dilución 1:50 durante 18 horas a 4 °C.
10. **Incubar en anticuerpo secundario:**
 - b) Anti-IgG de conejo biotilado durante una hora a 37 °C.
11. **NOTA:** Los siguientes pasos se realizaran en cámara oscura.
12. **Incubar en Avidina-TRITC dilución 1:300 una hora a 37 °C.**
13. **Incubar con el segundo anticuerpo primario para moléculas clase II del CPH:**
 - c) AM-20 dilución 1:20 durante 18 horas a 4 °C.
14. **Incubar en anti-IgG- FICT dilución 1.32 una hora a 37 °C.**
15. **Lavar con amortiguador salino de fosfatos 0.1 M., pH 7.2.**
16. **Montar con glicerina en amortiguador salino de fosfatos 1:1.**

**INMUNOHISTOQUÍMICA PARA PROTEÍNA S-100 Y MOLÉCULAS CLASE II DEL
CPH PARA MICROSCOPIA FOTÓNICA POR EL MÉTODO DE AMEX. ¹⁰¹⁻¹⁰³**

1. **Obtención de la muestra.**
2. **Lavar el órgano en solución salina balanceada pH 7.2.**
3. **Fijar en acetona a -20 °C durante 12 horas.**
4. **Deshidratar en acetona a 4 °C durante 15 minutos.**
5. **Deshidratar en acetona a temperatura ambiente durante 15 minutos.**
6. **Aclarar con metil benzoato por 30 minutos y xilol por 30 minutos.**
7. **Incluir en parafina a 60 °C por 2 horas.**
8. **Realizar cortes seriados en parafina de 3µm de grosor.**
9. **Desparafinar en xilol durante 15 minutos e inmediatamente sumerjirlos en acetona.**

10. **NOTA:** Antes de cada incubación lavar con amortiguador salino de fosfatos 0,1 M., pH 7.2 con albúmina sérica bovina al 0,5%, 3 veces por 10 minutos a 4 °C.
11. **Inhibir peroxidasa endógena** incubando en peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos o ácido peryódico al 0,28% durante 1 minuto.
12. **Incubar en anticuerpo primario:**
 - a) S-100 dilución 1:40 durante 18 horas a 4 °C.
 - b) AM-20 dilución 1:20 durante 18 horas a 4 °C.
13. **Incubar en anticuerpo secundario:**
 - a) Anti-IgG de conejo biotinilado durante 30 minutos a 37 °C para S-100.
 - b) Anti-IgG de ratón biotinilado durante 30 minutos a 37 °C para moléculas clase II del CPH
14. **Incubar en estreptoavidina-peroxidasa** durante 30 minutos a 37 °C.
15. **Revelar con** o 3-Amino-9-Etil Carbazol de 5 a 10 minutos.
16. **Lavar** con agua destilada abundantemente.
17. **Contrateñir** con Hematoxilina de Harris o Hematoxilina de Mayer.
18. **Montar** en medio de glicerol-polyvinil alcohol

10. **NOTA:** Antes de cada incubación lavar con amortiguador salino de fosfatos 0,1 M., pH 7.2 con albúmina sérica bovina al 0.5%, 3 veces por 10 minutos a 4 °C.
11. Inhibir peroxidasa endógena incubando en peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos o ácido peryódico al 0.28% durante 1 minuto.
12. Incubar en anticuerpo primario:
 - a) S-100 dilución 1:40 durante 18 horas a 4 °C.
 - b) AM-20 dilución 1:20 durante 18 horas a 4 °C.
13. Incubar en anticuerpo secundario:
 - a) Anti-IgG de conejo biotinilado durante 30 minutos a 37 °C para S-100.
 - b) Anti-IgG de ratón biotinilado durante 30 minutos a 37 °C para moléculas clase II del CPH.
14. Incubar en estreptoavidina-peroxidasa durante 30 minutos a 37 °C.
15. Revelar con o 3-Amino-9-Etil Carbazol de 5 a 10 minutos.
16. Lavar con agua destilada abundantemente.
17. Contrateñir con Hematoxilina de Harris o Hematoxilina de Mayer.
18. Montar en medio de glicerol-polyvinil alcohol.

**SOLUCIONES PARA LAS TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA
PROTEÍNA S-100 Y LAS MOLÉCULAS CLASE II DEL CPH Y DOBLE
INMUNOFLORESCENCIA ⁴¹ 198**

SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA

NaCl	6.83 g.
KCl	0.20 g.
Na ₂ HPO ₄	1.15 g.
KH ₂ HPO ₄	0.20.
Agua destilada	1000 ml.

Ajustar el pH con NaOH 1 N. o HCl 1 N. según sea el caso

HIDRÓXIDO DE SODIO 1N

NaOH	4 g.
Agua destilada	100 ml.

ÁCIDO CLORHÍDRICO 1N

HCl	8.285 ml.
Agua destilada	100 ml.

PARAFORMALDEHÍDO AL 4% EN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.1 M, pH 7.4

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.2 M, pH 7.4

a) Fosfato monobásico.	NaH ₂ PO ₄	2.7598 g.
	Agua destilada	100 ml.
b) Fosfato dibásico.	Na ₂ HPO ₄	2.8392 g.
	Agua destilada	100 ml.
Mezclar	Solución a	9.5 ml.
	Solución b	40.5 ml.

PARAFORMALDEHIDO AL 8%

c) Paraformaldehido	
Paraformaldehido	4 g.
Agua destilada	50 ml

Mezclar 4 gr de paraformaldehido en 50 ml de agua destilada a 60° C. aclarar la solución con 2 gotas de NaOH 1N. Los 50 ml de paraformaldehido al 8% se mezclan con 50 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.4, 0.2M. La solución final queda de la siguiente manera paraformaldehido al 4% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4

SOLUCIONES DE SACAROSA

SACAROSA AL 12%	
a) Sacarosa	12 g
Agua destilada	100 ml
SACAROSA AL 16%	
b) Sacarosa	16 g
Agua destilada	100 ml.
SACAROSA AL 18%	
c) Sacarosa	18%
Agua destilada	100 ml.

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS pH 7.2

Na_2HPO_4	1.48 g.
KH_2PO_4	0.43 g.
NaCl	7 g.
Agua destilada	1000 ml.

ÁCIDO PERYÓDICO AL 0,28%

Ácido peryódico	0.028 g.
Agua destilada	100 ml.

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 3%

Peróxido de Hidrógeno	1 ml.
Agua destilada	9 ml.

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS CON ALBÚMINA SÉRICA BOVINA pH 7.2

Na_2HPO_4	1.48 g
KH_2PO_4	0.43 g
NaCl	7 g
Albumina	1 g
Agua destilada	1000 ml

**SUSTRATO CROMÓGENO O REVELADORA PARA PERÓXIDASA CON
3,3'-DIAMINOBENCIDINA Y TETRAHIDROCLORURO (DAB)**

Solución tris maleato.	a) Tris-maleato salt	2.423 g.
	Agua destilada	100 ml.
Solución de HCl 37%.	b) HCl	0.833 ml.
	Agua destilada	100 ml.
Mezclar :	Solución a	5 ml.
	Solución b	8 ml.
	Agua destilada	7 ml.

A 9.9 ml de la mezcla de la solución agregar 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. A los 10 ml restantes agregar 0.005 g de diaminobencidina. La solución que contiene diaminobencidina se le agrega 0.1 ml de la que contiene peróxido de hidrógeno inmediatamente antes de usarla.

**SOLUCIÓN SUBSTRATO CROMÓGENO O REVELADORA PARA PEROXIDASA CON 3-AMINO -
9-ETHIL CARBAZOL (AEC)**

AMORTIGUADOR DE ACETATOS 0.2 M, pH 5

Acido acético glacial	a) $\text{CH}_3\text{-COOH}$	11.55 ml
	Agua destilada	1000 ml
Acetato de Sodio anhidro	b) $\text{CH}_3\text{-COONa}$	16.41 g
	Agua destilada 1000 ml	1000 ml
Mezclar :	Solucion a	14.8 ml
	Solucion b	35.2 ml

Disolver 20 mg de (AEC) en 0.5 ml de N, N-Dimetil-Formamida. A esta mezcla se le agrega 9.5 ml de amortiguador de acetatos pH 5 y 3 gotas de H_2O_2 al 3%

RESULTADOS

ORGANIZACIÓN GENERAL DEL BAZO

El bazo de *Rana pipens* es un órgano de color rojizo que mide aproximadamente 0.5 X 0.3 X 0.3 cm, se localiza dorsalmente en la cavidad abdominal y se encuentra cubierto por peritoneo. Cuando se examinaron los cortes histológicos de este órgano se encontró que una delgada cápsula de tejido conectivo lo rodea. Entre las fibras de colágena de la cápsula se encuentran distribuidos fibroblastos de forma aplanada. A diferencia de la cápsula del bazo de los mamíferos, las fibras de tejido elástico son muy escasas y no se observaron fibras musculares lisas. En la superficie externa de la cápsula, rodeándola en su totalidad, se encontró una delicada capa de epitelio plano simple. En algunos sitios esta cápsula está engrosada por la presencia de grandes vasos sanguíneos y nervios, que se localizan siempre en la línea media y que de manera general se encuentran agrupados, aunque algunos vasos de menor calibre se observan de manera aislada.

La cápsula de tejido conectivo se continúa con pequeños filamentos de fibras de colágena que se introducen al parénquima del bazo y que forman una red que proporciona sostén a las células linfoides.

Por otro lado, a diferencia del bazo de aves y mamíferos, no se observan trabéculas que penetren al parénquima, por lo que los vasos sanguíneos, aun los de mayor tamaño, están rodeados por escaso tejido conectivo. Los vasos de gran calibre tienen dos capas musculares que se diferencian de manera clara. Las fibras de la capa muscular externa están dispuestas longitudinalmente, mientras que las de la capa interna lo están de manera circular.

En el parénquima del bazo se apreciaron claramente dos áreas: una pulpa blanca, constituida por cúmulos de linfocitos, y una pulpa roja, en la cual se observaron abundantes eritrocitos nucleados. Es interesante notar que no existe una clara demarcación o límites entre las dos áreas, ya que no se observa una zona marginal

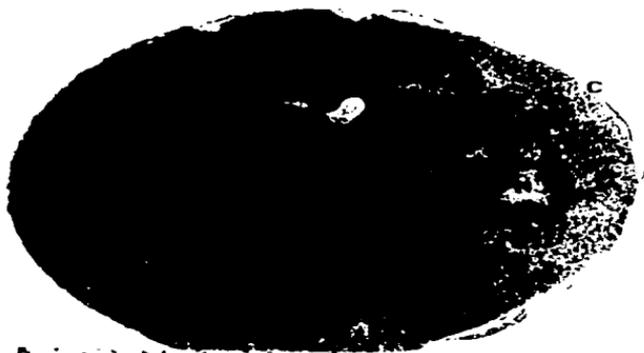
formada por células reticulares aplanadas rodeando a los cumúlos de linfocitos, como sucede en otros vertebrados como aves y mamíferos

En la pulpa roja no se apreciaron con claridad cordones celulares como en los mamíferos, sin embargo, si se observaron grupos celulares y entre ellos están dispuestos sinusoides, algunos de ellos muy dilatados. En esta área se observó gran cantidad de eritrocitos nucleados con citoplasma intensamente eosinófilo y con una forma que va desde la ovoide hasta la redondeada. Frecuentemente se observaron eritrocitos agrupados formando nidos; estos sitios podemos considerarlos como "brotes entropoyéticos", sin embargo, también se apreciaron con frecuencia eritroblastos aislados en mitosis, algunos de ellos, incluso, en el interior de los sinusoides.

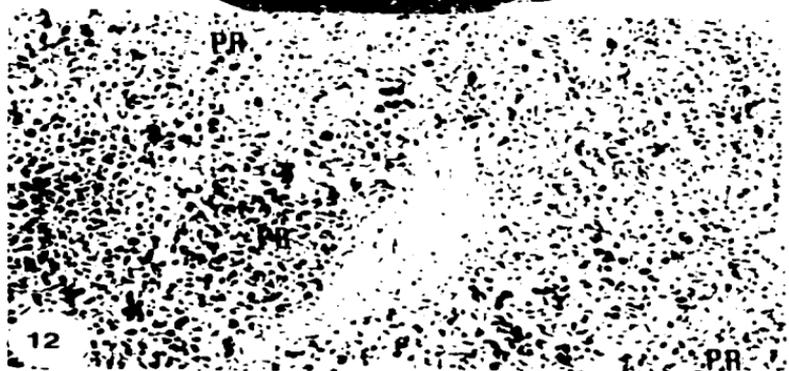
Por otro lado, entre la gran cantidad de eritrocitos se observaron células de forma estrellada y de citoplasma pálido con núcleo redondeado con quijos finos de cromatina. Estas características concuerdan con las de células reticulares cuya función es proporcionar sostén.

La pulpa blanca estaba dispuesta, de manera general, alrededor de vasos sanguíneos, aunque no en todos los casos se observó un vaso sanguíneo en la cercanía de la pulpa blanca. La pulpa blanca estaba constituida fundamentalmente por células de citoplasma basófilo, cuyos núcleos variaba de forma desde la redondeada hasta la amañonada. Algunas de estas células se identificaron como linfocitos por el núcleo redondeado de abundante heterocromatina y por el escaso citoplasma ligeramente basófilo.

Por otro lado, se observaron células con gránulos que se tiñeron intensamente con la eosina y que tenían núcleos excéntricos algunos de ellos lobulados. Estas células por su morfología corresponden a eosinófilos. También se identificaron basófilos cuyos gránulos son grandes e intensamente teñidos, de tal manera que el núcleo de estas células quedaba oculto. Ver fig. 11 y 12.



11



12

PR

fig. 11 Corte longitudinal de bazo de *Rana pipiens*. Se observa una delgada cápsula de tejido conectivo que rodea al órgano (C), de la cual no se observan trabéculas que penetren al parénquima. En el parénquima se aprecian dos áreas: una pulpa blanca (PB) y una pulpa roja (PR). Hematoxilina-Eosina X400.

fig. 12 Corte de bazo de *Rana pipiens*. Se observa una discreta pulpa blanca (PB) alrededor de un vaso sanguíneo. Nótese la abundante pulpa roja (PR). Es interesante notar que no existe una clara demarcación o límites entre las dos áreas, ya que no se observa una zona marginal. Hematoxilina-Eosina X400.

INMUNOHISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA

En los cortes por congelación de bazo fijados con paraformaldehído al 4%, se observaron células S-100 positivas alrededor de vasos sanguíneos o sin relación con ellos, pero siempre en la pulpa blanca y frecuentemente formando cúmulos. Algunas de las células S-100 positivas tenían un citoplasma muy abundante y con gránulos de pigmento, por lo cual se identificaron como melanomacrófagos.

En otras células más pequeñas y sin gránulos de pigmento se observó marca para la proteína S-100. Estas células tenían un aspecto de redondeado a dendrítico y la mayoría de ellas tenía un núcleo excéntrico. Ver fig 13.

Cuando los cortes se procesaron para identificar las moléculas clase II, se observaron abundantes células positivas en la pulpa blanca y alrededor de los vasos sanguíneos. El bazo tenía un aspecto como de celadas, ya que la marca estaba distribuida en toda la pulpa blanca y por la tendencia de esta a confluir. Ver fig 14.

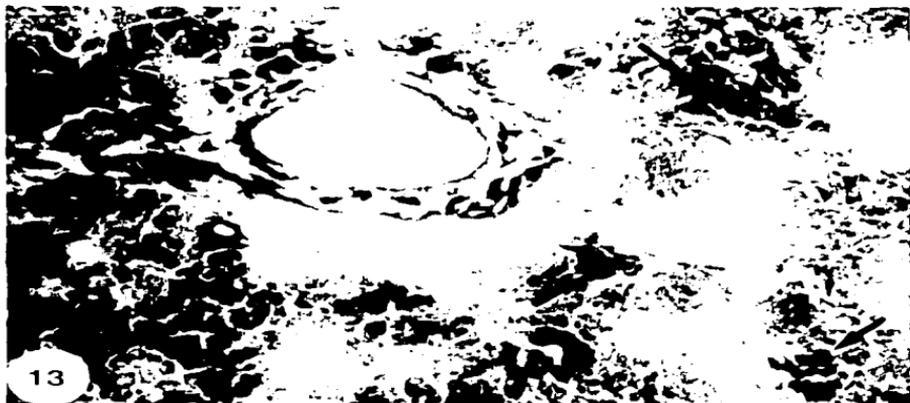


fig. 13 Fotomicrografía de bazo de *Rana pipiens* tratado por inmunohistoquímica enzimática para demostrar la presencia de la proteína S-100. Se observan algunas células positivas (→) en la periferia de un vaso sanguíneo formando cúmulos. Revelado con AEC y contrateñido con Hematoxilina-Mayer 40X.

fig. 14 Fotomicrografía de bazo de *Rana pipiens* tratado por inmunohistoquímica enzimática para demostrar la presencia de las Moléculas Clase II del CMH. Se observan abundantes células positivas en la pulpa blanca y alrededor de los vasos sanguíneos (→). El bazo tiene un aspecto como de células debido a que la marca está distribuida en toda la pulpa blanca y por la tendencia de ésta a confluir. Revelado con DAB y contrateñido con Hematoxilina-Harris 40X.

DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA

Cuando se observaron los cortes en los que se realizó una doble inmunofluorescencia (para la proteína S-100 y las moléculas clase II), células positivas a ambos marcadores estuvieron presentes. Sin embargo, por ser inmunofluorescencia no ubicamos la localización de las células positivas (Ver fig 15). Por lo que se decidió aplicar otra técnica que permitiera verificar el doble marcaje en las células positivas.



Fig. 15 Bazo de *Rana pipiens* procesado para doble inmunofluorescencia con la proteína S-100/TRICT¹ y las moléculas clase II del CPH/ETIC. Células positivas (E+) con ambos marcadores en a) proteína S-100/TRICT¹ y b) Moléculas Clase II del CPH/ETIC 100X.

TÉCNICA DE ACTINOMETHILBENZOATO/NIHOL (AMeX)

La técnica de AMeX, inicialmente propuesta por Gato et al. (1995), resultó útil para la observación de células positivas con los dos marcadores. Esgrafiando la forma, una metodología muy adecuada que a través de ellos, por comparación. En los cortes procesados para demostrar la proteína S-100, se observó por el contrario la reacción en células que se localizaron en la pulpa blanca y en muchos exámenes el siguiente corte se adjuntó, se observaron células positivas a las moléculas clase II en la misma localización. Ver fig. 16 y 17.

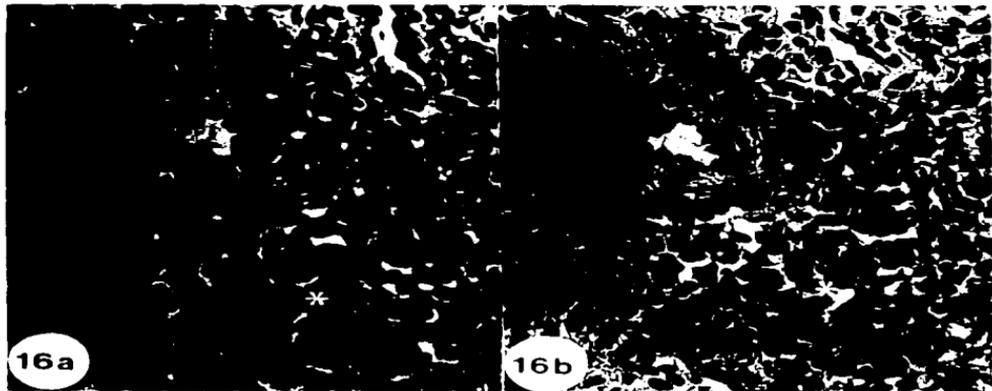


Fig. 16 Fotomicrografías de cortes seriados de 3µm de bazo de *Rana pipiens* en el que se observan células clase II+ del CPH (a) y células proteína S-100+ (b). Las células que tienen doble marcaje tienen un asterisco (E+). Como referencia observe el vaso sanguíneo. Revelado con AEC x contrateñido con Hematoxina Mayer. 40X.

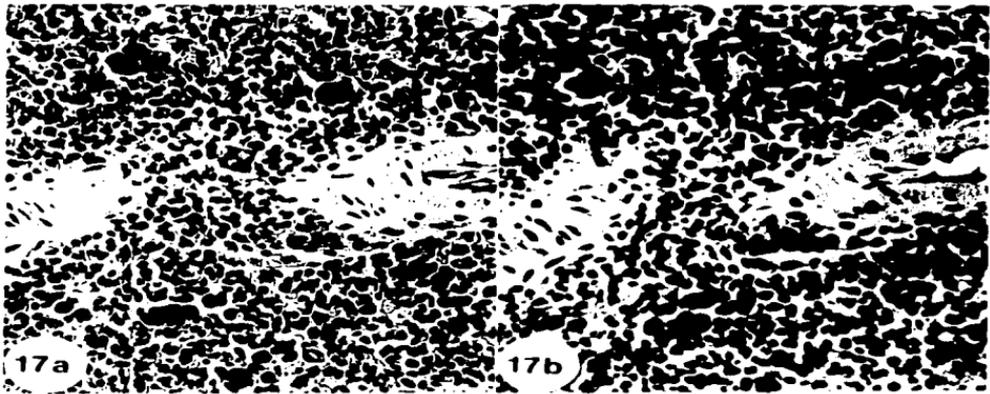


Fig. 17. Fotomicrografías de cortes seriados de la de bazo de *Rana pipiens*, se observan células clase II* del CPH (a) y células proteína S 100 (b). Las células que tienen doble marcaje tiene un asterisco (*). Como referencia observe los vasos sanguíneos. Revelado con AEC y contrateñido con Hematoxilina-Mayer 40X.

DISCUSIÓN

El presente estudio sugiere la existencia de Células Dendríticas en el bazo de la *Rana pipiens* equivalentes morfológica y fenotípicamente a las Células Dendríticas Esplénicas ó Células Dendríticas de Steinman y Cohn de los mamíferos. El antecedente previo que se tiene sobre la existencia de células dendríticas en el bazo de los anfibios, fue realizado por Barrutia M., G., et al., (1985),²⁸ en su trabajo *Presence of presumptive interdigitating cells in the spleen of the natterjack, Bufo calamita*. Con microscopía electrónica de transmisión, ellos describieron células con morfología dendrítica con numerosos pliegues de la membrana plasmática formando un sistema de interdigitaciones. El citoplasma de estas células era claro, con una baja densidad electrónica y con escasos organelos citoplásmicos. Barrutia *et al.*, (1985)²⁸ concluyeron que estas células corresponden a CD en el bazo de los anfibios. Sin embargo, reconocieron que es necesario la utilización de inmunomarcaje para ratificar la presencia de este tipo celular.

En el presente trabajo se utilizaron dos marcadores fenotípicos de las CD. La proteína S-100 y las moléculas clase II del CPH. La proteína S-100 que inicialmente fue identificada en el cerebro y nervios periféricos de diferentes vertebrados,³² ha sido localizada en tejidos no nerviosos de diferentes especies.³³ Cocchia *et al.*, (1981)³⁴ determinaron la localización celular y subcelular de la proteína ácida S-100 en piel de humano normal. Ellos encontraron que la proteína S-100 se localizó externamente en la matriz citoplasmática, pero no se encontró en las sistemas del retículo endoplásmico, mitocondrias y GB.

Por otro lado, existen estudios que confirman que otras células del SCL también expresan la proteína S-100. De esta manera se ha identificado esta proteína en las células dendríticas dérmicas,¹⁰⁵ células interdigitantes en órganos linfoides¹⁰⁶ y células dendríticas epiteliales tonsilares.¹⁰⁷ En el ratón, las células dendríticas esplénicas aisladas también son S-100 positivas.³³ La proteína S-100 está altamente conservada entre las especies y comprende un grupo de proteínas ácidas unidas de Ca^{2+} de peso molecular de 21,000. Esta proteína está constituida por dos subunidades α y β cuya distribución es diferente en cada tejido. Por ejemplo, la subunidad alfa

se encuentra en grandes cantidades en músculo cardíaco, túbulo renales, células foliculares del tiroides, células exócrinas de glándulas salivales, mamas y sudoríparas y células centroacinares y acinares del páncreas, mientras que la subunidad β se localiza en grandes cantidades en células de Schwann, condrocitos y adipocitos.¹⁰⁸ Interesantemente ha sido demostrado que los macrófagos son negativos para la proteína S100, por lo que éste es un marcador excelente para diferenciar a las CD de las células del sistema monocito/macrófago, ya que las primeras poseen la subunidad beta S-100, mientras que las segundas ocasionalmente expresan la subunidad alfa S-100 pero nunca la β .³³ Este puede ser el caso de nuestros hifalagos, ya que en ocasiones los melanomacrófagos fueron positivos para la proteína S-100, sin embargo de manera constante encontramos que células pequeñas, no relacionadas con los melanomacrófagos y localizadas de manera preferencial en la pulpa blanca, expresaban la proteína S-100. Nosotros creemos que esta última población es la homóloga de las CD en el bazo de los anuros. El significado funcional de la proteína S-100 no está claro, sin embargo, ha sido mostrado que está involucrada en el desarrollo y la extensión de neuritas en las células nerviosas.¹⁰⁹ Esta puede ser una explicación para su presencia en tipos celulares que tienen una forma dendrítica (la única excepción parecen ser las células dendríticas foliculares, las cuales no expresan la proteína S-100).³⁶

Si bien es cierto que la proteína S-100 identifica CD en diferentes tejidos de mamíferos y que nosotros encontramos reactividad a ella en células esplénicas que parecían ser CD, no podíamos asegurar que lo fueran debido al amplio espectro de distribución de esta proteína, por lo que fue necesario utilizar otro marcador de CD como las moléculas clase II del CPH.²⁹ El anticuerpo contra las moléculas clase II evidenció una intensa marca en todos los linfocitos del bazo de la *Rana pipiens*. Estos resultados concuerdan con los de trabajos previos que demuestran que todos los linfocitos esplénicos de anuros adultos son intensamente positivos a las moléculas clase II, mientras que los de anuros en etapas larvianas son negativos.¹¹⁰ La demostración de CD clase II+ fue imposible ya que la marca estuvo ampliamente distribuida en diferentes tipos celulares. Por lo anterior se hizo indispensable realizar dobles marcajes que permitieran evidenciar a las CD.

La doble inmunofluorescencia (S-100 y clase II) y los cortes seriados en parafina por el método de AMeX mostraron células positivas a ambos marcadores: algunos melanomacrófagos, no todos, y células situadas

en la pulpa blanca y cercanas a vasos sanguíneos. Nosotros consideramos que estas últimas son el equivalente de las CDE de los mamíferos. En este sentido, las CDE de los mamíferos se encuentran situadas idealmente en la vaina periarteríolar de los vasos sanguíneos, la cual es una región T-dependiente, donde pueden interactuar con células T circulantes y seleccionar aquellos con reactividad específica para los antígenos presentados¹¹¹ y además importantemente, las CD expresan constitutivamente altos niveles de moléculas clase II del CPH. El hecho de que células en el hazo de anuros muestren reactividad a marcadores que identifican CDE en los mamíferos y que además están localizadas en la pulpa blanca, una vaina periarteríolar no se muestra claramente en esta especie, sugiere fuertemente que son el representante de las CD en estos vertebrados. Aunque se observaron cortes semifinos de material al que se le realizó inmunohistoquímica para demostrar reactividad a la proteína S-100 o a las moléculas clase II (fig. 18 y 19) no pudimos identificar los tipos celulares. El estudio ultraestructural combinado con técnicas inmunomorfológicas proporcionará la prueba definitiva de la existencia de estas células en estos vertebrados.

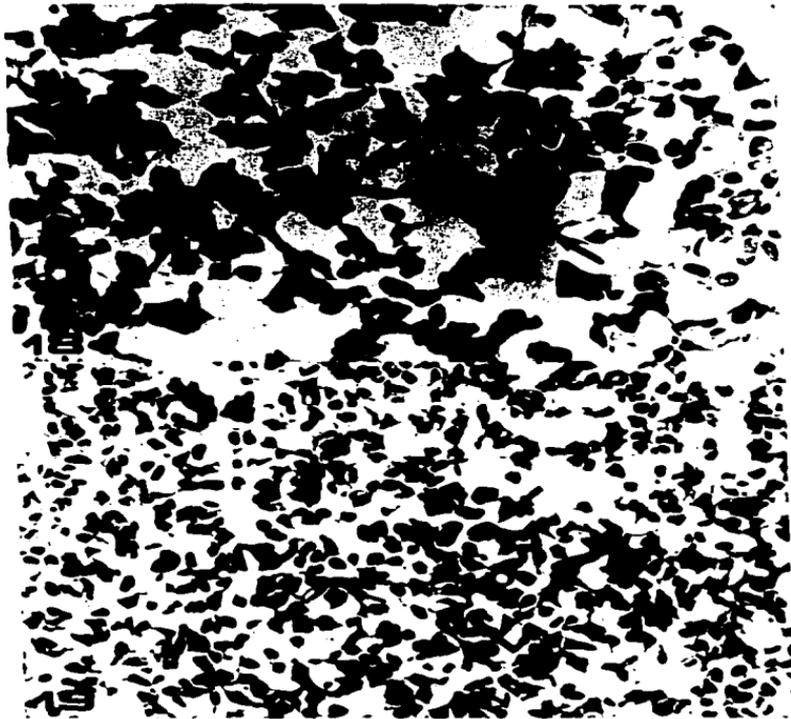


fig. 18 Corte semifino de bazo de *Rana pipiens* tratado con inmunohistoquímica enzimática para demostrar la presencia de las moléculas clase II del CPII. Se observan dos tipos de células positivas para estas moléculas, el primer tipo celular posee un citoplasma abundante sin gránulos citoplásmicos (→), el segundo tipo celular posee un citoplasma con gránulos (*). Revelado con DAB y contrateñido con azul de Toluidina X1000.

fig. 19 Corte semifino de bazo de *Rana pipiens* tratado con inmunohistoquímica enzimática para demostrar la presencia de la proteína S-100. Se observan dos tipos de células positivas para esta proteína, el primer tipo celular posee un citoplasma abundante sin gránulos citoplásmicos (→), el segundo tipo celular posee un citoplasma con gránulos (*). Revelado con DAB y contrateñido con azul de Toluidina X800.

Los centros de melanomacrófagos resultaron en ocasiones, positivos a ambos marcadores y a la fecha esta es la primera mención de la expresión de estos en melanomacrófagos. Los melanomacrófagos derivan de médula ósea y característicamente se encuentran en vertebrados inferiores (peces, anfibios y reptiles), particularmente en los órganos hematopoyéticos como, bazo, riñón e hígado donde tienen la función de fagocitar eritrocitos.¹¹² Además, se ha encontrado que los melanomacrófagos pueden fagocitar agentes infecciosos y en esas condiciones son capaces de iniciar respuestas inmunológicas.¹¹³ Los melanomacrófagos poseen hemosiderina y lipofucsina, que son productos de la degradación de los eritrocitos, y son capaces de sintetizar melanina, la cual se piensa es utilizada como un atrapador de radicales libres generados por la catálisis de los grupos hem.¹¹⁴

Si la presencia de CD en el bazo de los anfibios es confirmada, esto evidenciará la existencia de un SCD en estos vertebrados ya que con anterioridad se han identificado CD en epitelios planos estratificados de estos vertebrados.

El bazo de estos vertebrados es de un tipo difuso, es decir, no tiene una clara separación entre pulpa blanca y roja, y la tendencia evolutiva es hacia la formación de una pulpa blanca bien delimitada como en los mamíferos. Sin embargo, la función básica del sistema inmunológico, el reconocimiento de lo propio de lo no propio, puede llevarse a cabo en estos vertebrados, por la presencia de células presentadoras de antígenos en diferentes localizaciones y en especial en el bazo. Si las células esplénicas descritas en este trabajo resultan ser

homólogas de las CDE de los mamíferos, estas deben de jugar un papel crucial en la inmunovigilancia en estos vertebrados, ya que estos carecen de otros cúmulos linfoides, como ganglios linfáticos, en el organismo.

CONCLUSIONES

- Se demostró la presencia de células localizadas en la pulpa blanca del bazo de la *Rana pipiens* que expresan moléculas clase II del CPH y la proteína citoplásmica S-100. Estas células pueden ser el homólogo de las CDE de los mamíferos.
- Esta es la primera mención de la presencia ocasional de estos marcadores en los melanomacrófagos de estos vertebrados.
- El estudio inmuno-ultraestructural y funcional confirmará la presencia de CD en el bazo de los anfibios anuros. De confirmarse, entonces se evidenciará un SCD en estos vertebrados.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

1. Austyn J. M. (1987) Lymphoid dendritic cells. *Immunology* 62 161-170
2. Pérez T. A., Castell R. A. (1989) La célula de Langerhans. III. El sistema de las células de Langerhans. *Lab-acta* 1(4) 25-29
3. Caux C., Yong-Yun L., Banchereau J. (1985) Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunology Today* 16 2-4
4. Katz S. Y., Tamaki K., Sancha D. H. (1979) Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282 324-326
5. Goordyal P., Isaacson P. G. (1985) Immunocytochemical characterization of monocyte colonies of human bone marrow: a clue to the origin of Langerhans cells and interdigitating reticulum cells. *J Pathol* 146:189-195
6. Cothell Y., Sharon N., Grant E. (1986a) Fractionation of human bone marrow mononuclear cells with peanut agglutinin: phenotype characterization with monoclonal antibodies. *Human Immunol* 17:37-44.
7. De Fraissinette A., et al. (1988a) Culture of putative Langerhans cell bone marrow precursors: characterization with of their phenotype. *Exp Hematol* 16 764-768.
8. Langerhans P. (1868) Ueber die nerven der menschlichen haut. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 44:327-337.
9. Wachstein M., Meisel E. (1957) Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special references to the demonstration of bile canaliculi. *Am J Clin Pathol* 27:13-23.
10. Ogawa K., et al. Recent progress in enzyme cytochemical methods for ATPases. *J Ultrastru Microsc*
11. Mustakillo K. (1962) Adenosine triphosphatase activity in neural elements of human epidermis. *Exp Cell Res* 28 449-451
12. Mackenzie Y. C., Squier C. A. (1975) Cytochemical identification of ATPase positive Langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. *Br J Dermatol* 92 523-532
13. Robins P. G., Brandon D. R. (1981) A modification of the adenosine triphosphatase method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Tech* 56 87-89.
14. Wolff K., Winkelmann R. K. (1967) Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 48 50-54
15. Jarret A., Riley P. A. (1962) Esterase activity in dendritic cells. *Br J Dermatol* 75:79-81
16. Leder L. D. (1967) *Der bulmonocyt*. Berlin, Heilderberg, New York, Springer Verlag
17. Maruyama T., Uda H., Yokoyama M. (1980) Localization of non-specific esterase and endogenous peroxidase in the murine Langerhans cells. *Br J Dermatol* 103:61-66.
18. Jaubert F., et al. (1980) Histiocyte X positivity for nonspecific esterase. *J Histochem Cytochem* 28:45-46.
19. Birbeck M. S., Breathnach A. S., Everall J. D. (1961) An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37 51-64.
20. Wolff K., Winkelmann R.K. (1967) Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 48 50-54.

21. Breuthnach A. (1964) Observations on cytoplasmic organelles in Langerhans cells of human epidermis. *J. Anal.* 98:265-270.
22. Kashihara M., et al (1986) A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 87:602-607.
23. Roitt I, Brostoff J. and Male D (1996) Immunology. *Erlit Mosby Barcelona Spain.*
24. Toussain M. B. M. (1992) Dynamic nature and function of epidermal Langerhans cells *in vitro* and *in vivo*: a review, with emphasis on human Langerhans cells. *Histochem J* 24: 697-716.
25. Rowden G., Lewis M. G. and Sullivan A. K. (1977) Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature*. 268:247-248
26. Sonthmeier R. D., Stastny P. and Nunez G. (1986) HLA-D region expression by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 87:707-710
27. Stingl G., et al (1977) Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature*. 268:245-246.
28. Bruynzeel-Koomen C., et al (1988) Associated expression of CD1 antigen and Fc receptor for IgE on epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*. 74:137-142.
29. Murphy G. F., et al (1981) Characterization of Langerhans cells by the use of monoclonal Antibodies. *Laboratory J* 45:465-468
30. Dezutter-Damboyant C., et al (1985) Immunogold technique applied to simultaneous identification of T6 and HLA-R antigens in Langerhans cells by electron microscopy. *J Invest Dermatol*. 84:465-468.
31. De Panfilis G., et al (1988) Simultaneous colloidal gold immunoelectronmicroscopy labeling of CD1a, HLA-DR and CD4 surface antigens of human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol*. 91:547-552
32. Moore B. W. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 19:739-744.
33. Rowden G., Boudreau S. and Higley H. (1985) Langerhans cells and extra-epidermal dendritic cells. *Scand J Immunol*. 21:471-478
34. Cocchia D., Michetti F., Donato R. (1981) Immunocytochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature*. 294:85-87.
35. Misra B., et al (1983) S-100 As a cytoplasmic marker for dendritic cells (CD) in lymphoid organs. *Am Soc Exp Biol* 42:1374
36. Rowden G., et al. (1985) Langerhans cells and extra-epidermal dendritic cells. *Scand J Immunol*. 21: 471-478.
37. Kondo Y. (1969) Macrophages containing Langerhans cells granules in lymph nodes of rabbit. *Z. Zellforsch* 98:506-511.
38. Jimbow K., Zysoos S., Kukita A. (1969) Cells containing Langerhans granules in human lymph nodes of dermatopathic lymphadenopathic. *J Invest Dermatol*. 53:295-299.
39. Silberberg I., Baer R., Rosenthal S. (1974) Circulating Langerhans cells in a dermal vessel. *Acta Dermatovenor*. 54:81-86.
40. Silberberg-Sinakin I., et al. (1976) Antigen bearing langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes. *Cell Immunol*. 25:137-151.
41. Hoelsmit E., et al (1980) Lymph node macrophages. In: *The reticuloendothelial system* (de Carr I, Daems W. T.) Vol I:417-468.

42. Kelly R. H., *et al* Functional anatomy of lymph nodes. II Peripheral lymph-borne mononuclear cells. *Anat. Rec.* 190:5-22.
43. Drexhage N. A., *et al* Veiled cells resembling Langerhans cells. In: mononuclear phagocytes, functional aspects. (de R. van Furth) Vol I:235.
44. Spry C. J. F., *et al* (1980) Large mononuclear (veiled) cells with "Ia-like" membrane antigens in human afferent lymph. *Clin. Exp. Immunol.* 39:750-755.
45. Raush E., *et al* (1977) Langerhans cells and interdigitating reticulum cells in the thymus dependent region in human dermatopathic lymphadenitis. *Virchows Arch. B.* 25:327-.
46. Kamperdijk E. W. A., *et al* (1978) Lymph node macrophages and reticulum cells in the immune response. I. the primary response to paratyphoid vaccine. *Cell Tissue Res.* 192:1.
47. Müller-Hermelink H. K. (1974) Characterization of the B cell and T cell region of human Lymphatic tissue, through enzyme histochemical distribution ATPase and 5-nucleotidase activities. *Virchows Arch. B.* 16:371.
48. Lampert I., *et al* (1980) Immunohistochemical characterization of cells involved in dermatopathic lymphadenopathy. *J. Pathol.* 131:145.
49. Kamperdijk E. W. A., Hoefsmit E. O. (1978) Birbeck granules in lymph nodes macrophages. *Ultramicroscopy.* 3:137.
50. Steinman R. M., Corh Z. A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral organs of mice. Y. Morphology, quantitation and tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142-1162.
51. Steinman R., Witner M. (1978) Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:5132-5136.
52. Rowden G. (1981) The Langerhans cell. *C. R. C. Critical Rev. Immunol.* 3:95-180.
53. Wesley C., *et al* (1983) The phenotype of dendritic cells and macrophages. *Fed. Proc.* 42:31143118.
54. Barbey S., Nezelof C. (1971) Le système Langerhansien. Définition, Modifications physiologiques et pathologiques. *Path. Biol.* 34:259-273.
55. Silberberg I. (1971) Ultrastructural studies of Langerhans cells in contact sensitiv and primary irritant reactions to mercuric chloride. *Clin. Res.* 19:715 (Abstr.)
56. Silberberg I. (1973) Apposition of the mononuclear cells to Langerhans cells in contact allergic reactions. An ultrastructural study. *Acta Dermatovener. (Stockh.)* 53:1-12.
57. Schwartz R. H., Yano A., Paul W. E. (1978) Interaction between antigen-presenting cells and primed lymphocytes: An assessment of Ia gene expression in the antigen-presenting cell. *Immunol. Rev.* 40:153-180.
58. Stügel G., *et al* (1979) Analogous function of macrophages and Langerhans cells in the initiation of the immune response. 71:59-64.
59. Pehamberger H., *et al* (1983) Epidermal cell-induced generation of cytotoxic T-lymphocyte responses against alloantigens or TNP-modified syngenic cells. Requirement for a-positive Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 81:208-211.
60. Luger T. A., *et al.* (1983) Properties of murine and human epidermal cell-derived thymocyte-activating factor. *Fed. Proc.* 42:2772-2776.
61. Bergstresser P. R., *et al* Unusual numbers and distributions of Langerhans cells in skin with unique immunologic properties. *J. Invest. Dermatol.* 74:312-316.

62. Toews G. B., Bergstresser P. R., Streilein J. W. (1980) Epidermal Langerhans cells density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* 124:445-453.
63. Halliday G. M., Muller H. K. (1986) Induction of tolerance via skin depleted of Langerhans cells by a chemical carcinogen. *Cell Immunol.* 99 220-227.
64. Rheins L. A., Nordlund J. J. (1986) Modulation of the population density of identifiable epidermal Langerhans cells associated with enhancement or suppression of cutaneous immune reactivity. *J Immunol.* 136 867-876.
65. Girolomi G., Tigelaar R. E. (1990) Capsaicin-sensitive primary sensory neurons are potent modulators of murine delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol* 145, 1105-1112.
66. Inaba K., Steinman R M (1987) Monoclonal antibodies to LFA'1 and to CD4 inhibit the mixed leucocyte reaction after the antigen dependent clustering of dendritic cells and T lymphocytes. *J Exp Med* 165: 1403-1417.
67. Rudensky *et al.* (1991) Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353.: 622-627.
68. Prickett *et al.* (1990) Anti-leucocyte common (CD45) antibodies inhibit dendritic stimulation of CD4 and CD8 T lymphocyte proliferation. *Immunol* 69 250-256
69. Young and Steinman. (1990) Dendritic cells stimulate primary human cytotoxic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med* 171: 1315-1332.
70. Carrillo F. J., Castell R. A., Pérez T. A (199) Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *J Anat* 172:39-45.
71. Carrillo F. J., Pérez T. A., Castell R. A. (1991) Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken *Gallus gallus*. *J Anat* 172 39-45
72. Pérez T. A., Millán A. D, Rondán Z. A. (1995) Epidermal Langerhans cells in the terrestrial turtle *Kimnosterium integrum*. *Dev. Com Immunol* 3 225-236
73. Castell R. A., Hernández P. A., Rondán Z. A (1994) Nonspecific esterase positive dendritic cells in amphibian. I.C.E.M. 13-Paris. 415-416
74. Castell R. A., Hernández P. A., Rondán Z. A. Langerhans-like in stratified epithelia of the frog *Rana pipiens* co-express ATPase and class II molecules of the major histocompatibility complex.
75. Moller G. *et al.* (1990) Phylogeny of the MHC complex Immunological reviews. No. 113
76. Du Pasquier J., Schwanger J., Flajnik M. F. (1989) The immune system of *Xenopus*. *Ann Rev Immunol* 7: 251.
77. Cooper E. L. (1976) Immunity mechanism. In Iotts B. Edit. *Physiology of the amphibian*. Vol. 3. Academic Press New York 163-272
78. Cooper E. L. and Wright R. K. (1976) The anuran amphibian spleen. An evolutionary model for terrestrial vertebrates. In Battisto J. R. and Strelein J. W. Edit. *Immuno-Aspects of the spleen*. Elsevier/North-Holland Amsterdam 47-60
79. Jordan H. E. and Speidel C. C. (1923a) An experimental study of the spleen of the frog *Rana pipiens*. *Anat Rec.* 25: 136-137.
80. Manning M. J. and Horton J. D. (1969) Histogenesis of lymphoid organs in larvae of the south african clawed toad *Xenopus laevis* (Daudin). *J Embryol Exp. Morphol.* 22 265-277g.
81. Horton J. J. (1971) Ontogeny of the immune system in amphibians. *Am Zool.* 11:219-228.

82. Sterba G. (1951) Untersuchungen an der Milz des Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, *Morph. Jb.* 90:221-248.
83. Manning M. J. (1975) The phylogeny of thymic dependence, *A. Zool.* 15:63-71.
84. Turner R. J. (1969) The functional development of the reticuloendothelial system in the toad *xenopus laevis* (Daudin), *J. Exp. Zool.* 170:467-480.
85. Barrutia M. S. G., *et al.* (1983) Response of the toad *Xenopus laevis* to circulating antigens. I. Cellular changes in the spleen, *J. Exp. Zool.* 183:21-34.
86. Barrutia M. S. G., *et al.* (1985b) Presence of presumptive interdigitating cells in the spleen of the natterjack *Bufo calamita*, *Experientia* 41:1393-1394.
87. Zapata G. A. and Cooper L. E. (1990) The immune system: comparative histophysiology. Edit. British Library, 335 pp.
88. Agius C. and Agbade S. A. (1984) An electron microscopical study on the genesis of lipofucsin, melanin and hemosiderin in haemopoietic tissues of fish, *J. Fish Biol.* 24: 471-488
89. Edelstein L. M. (1971) Melanin: a unique biopolymer. In Joachim H.L., Edit. Pathobiology Annual. Vol 1. Butterworth: London. 309-324 pp.
90. Manning M. J. (1981) The involution of vertebrate lymphoid organs . In: J. B. Salomon, Ed. Aspects of developmental and Comparative immunology Oxford, Pergamon Press, Y. 62-72 pp.
91. Bigaj and Plytycz B. (1984) Cytoarchitecture of the thymus gland of the adult frog *Rana temporaria* Folia. *Histochem. Cytobiol.* 22:63-70
92. Bigaj and Plytycz B. (1987) Interdigitating cells in the thymus of the frog, *Rana temporaria*. Folia *Histochemical et Citobiologica* 24: 65-68
93. Alvarez R. (1990) Thymus of *Rana perezi*: Presence of interdigitating cells. *Journal of Morphology* 204: 305-312.
94. Estrada F. E., Peralta Z. L., y Rivas M. P. (1982) Manual de técnicas Histológicas. Edit. A. G. T. 140.
95. Culling C. F. A. (1974) Handbook of histopathological and histochemical techniques.
96. Wordinger R. J. *et al.* (1984) Manual of immunoperoxidase techniques. 73 pp.
97. Bullock G. R., and Petrusz P. (1982) Techniques in immunocytochemistry. Edit. Academic Press. U. S. A. 306 pp.
98. Santander R. (1968) Técnicas de microscopía electrónica en biología. Edit. Aguilar. 666 pp.
99. Baur P., *et al.* (1981) Introduction to diagnostic electron microscopy. Edit. Apleton-Century-Crofts. 250 pp.
100. Ogawa K., Barka T. (1987) Electron microscopic cytochemistry and immunocytochemistry in biomedicine.
101. Sato Y., *et al.* (1986) The AMeX Method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am. J. Pathol.* 125:421-435.
102. Shamoto M., *et al.* (1991) Langerhans cells in the lymph node: mirror section and immunoelectron microscopic studies. *Virchows Archiv B.* 61:337-341.
103. Shinzato M., *et al.* (1985) Differentiation of Langerhans cells from interdigitating cells using CD1a and S-100 protein antibodies. *Biotechnic and Histochemistry.* 3:114-118.
104. Matthew J. L., *et al.* (1987) Métodos de laboratorio. Edit. Interamericana. México. 1522 pp.

- 105 Wen D R, *et al.* (19) **S-100 protein: a marker for melanocytic tumors.** *Ann N Y Acad Sci*, 487, 261, 198
- 106 Takahashi K, *et al.* (1984) **Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lympho reticular system.** *Am J Pathol* 116 497.
- 107 Weinberg D.S., Pinkus G S., Murphy G F. (1987) **Tonsillar epithelial dendritic cells: demonstration by lectin binding, immunohistochemical characterization and ultrastructure.** *Lab Invest* 56 622.
- 108 Haimoto H., Hosoda S., Kato K (1987) **Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues.** *Lab Invest* 57 489
- 109 Kligman D., Hill D C **The S-100 protein family.** (1988) *Trends Biochem Sci* 13 437
- 110 Du Pasquier L., Flajpek M F (1990) **Expression of MHC class II antigens during *Xenopus* development.** *Develop Immunol* 1 85
- 111 Austyn J M., Kupiec Weglinski J W., Hankins D F., Morris P J (1988) **Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T-cell dependent areas of spleen, and binding within marginal zone.** *J Exp Med* 166 1654-1667.
- 112 Falk K., Press C M., Landsverk T., Dannevig B H. (1995) **Spleen and kidney of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) show histochemical changes early in the course of experimentally induced infectious salmon anaemia (ISA).** *Vet Immunol Immunopathol* 49 115-126
113. Yokoyama H., Ogawa K., Wakabayashi H. (1985) **Myxobolus cultus n. sp. (Myxosporaea: Myxobolidae) in the goldfish *Carassius auratus* transformed from actinosporocan stage in the oligochaete *Brachiura soweryi*.** *J Parasitol* 81 (3) 446-51 pp.
- 114 Henninger J. M., Bernsford W. A. (1990) **Is it coincidence that iron and melanin coexist in hepatic and other malnoma macrophages.** *Histol Histopathol* 5 457-459