

90
2e;



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ONTOGENIA DE LAS CELULAS DENDRITICAS
EPIDERMICAS DE LA RANA LEOPARDO

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 :

MIGUEL ANGEL HERRERA ENRIQUEZ



DIRECTOR DE TESIS: M. C. ANDRES CASTELL RODRIGUEZ



1998

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION DE GRADUADOS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

268904



Universidad Nacional
Autónoma de México

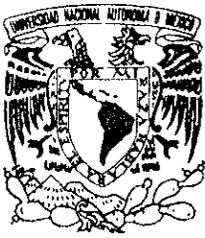


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**“ONTOGENIA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EPIDÉRMICAS
DE LA RANA LEOPARDO *Rana pipiens*”**

realizado por **MIGUEL ANGEL HERRERA ENRÍQUEZ**

con número de cuenta **9052207-7** , pasante de la carrera de **BIOLOGÍA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario M. en C. Andrés Castell Rodríguez
Propietario M. en C. Armando Pérez Torres
Propietario M. en C. Patricia Rivas Manzano
Suplente Doc. Concepción Sánchez Gómez
Suplente Biol. José Aquiles Bernal Moreno

Armando Pérez Torres
Patricia Rivas Manzano
Concepción Sánchez Gómez
José Aquiles Bernal Moreno

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM
Consejo Departamental de Biología
Edna María Suárez Díaz
DRA. EDNA MARÍA SUÁREZ DÍAZ
DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

A MIS PADRES POR TODO LO QUE SON Y LO QUE SOY.

A MIS HERMANOS POR TODO LO QUE HEMOS VIVIDO JUNTOS.

A TODA MI FAMILIA POR QUE GRACIAS A ELLA ESTOY AQUÍ.

A RENATA POR TODO Y MÁS

AGRADECIMIENTOS:

A mi maestro y amigo M. en C. Andrés E. Castell Rodríguez, por su dirección en el presente trabajo, por su amistad y sobre todo por ayudarme a crecer.

Al M. en C. Armando Pérez Torres
A la M. en C. Patricia Rivas Manzano
A la D. En C. Concepción Sánchez Gómez
Al Biol. José Aquiles Bernal Moreno

Por sus comentarios en la revisión de este trabajo.

Por su apoyo técnico a:

La Biol. Beatriz Hernández Téllez
La M.C. Judith Alvarez Pérez
La Histotecnóloga Ma. Luisa Rodríguez Méndez
La Histotecnóloga Verónica Rodríguez Mata
El M.C. Adrián Rondan Zárate
El Biol. Alberto Hernández Peñaloza.

Por su apoyo y amistad a Andrés, Armando, Enrique, Miguel, Judith, Beatriz, Alberto, Herminia, Martha, Diana, Xochitl, y José.

Al Biol. Alberto Gómez Priego, por haberme mostrado lo maravilloso y todo lo que implica trabajar en investigación.

A Laura Sarti, por su amistad y por ser una parte muy importante en mi formación.

A Renata, Geor, Cesar, Carlos y Patricia, por todas las cosas que hemos pasado juntos y porque gran parte de este título se los debo.

A todos mis amigos de Tortugas Marinas, por supuesto a las tortugas.

A mis tíos Carmen y Jorge por todos sus consejos y ayuda.

A Pol, Armando y Ricardo por todo.

GRACIAS

ABREVIATURAS

Acetona-Metil benzoato-Xilol	AMeX
Adenosin trifosfatasa	ATPasa
Tercer componente del complemento	C3
Cuarto componente del complemento	C4
Célula Dendrítica	CD
Glicoproteína de superficie MHC clase I	CD1
Presente en timocitos y CD	CD1a
Presente en timocitos	CD1b
Forma no clásica de MHC clase I	CD1c
Marcador de células T restringidas a MHC clase II	CD4
Glicoproteína presente en monocitos	CD14
N acetil lactosamina presente en monocitos	CD15
Marcador de células tallo de médula ósea	CD34
Marcador de leucocitos	CD45
Célula dendrítica esplénica	CDE
Célula dendrítica tisular	CDT
Célula interdigitante	CID
Célula de Langerhans	CL
Célula presentadora de antígenos	CPA
Complejo Principal de Histocompatibilidad	CPH
Célula velada	CV
Dinitro cloro benceno	DNCB
Ácido etilen diamonio tetraacético	EDTA
Fracción cristalizable de Inmunoglobulina	Fc
Gránulo de Birbeck	GB
Factor estimulador de colonias de granulocitos macrofagos	GM-SCF
Nomenclatura para CPH clase II en humanos	HLA-DP
Nomenclatura para CPH clase II en humanos	HLA-DQ
Nomenclatura para CPH clase II en humanos	HLA-DR
Nomenclatura para CPH clase II en ratones	Ia
Interleucina 1	IL-1
Línea celular de macrofagos monocitos	MQ/MO
Receptor alfa para interleucina 3	R α -IL3
Sistema de células dendríticas	SCD
Receptor de células T	TCR

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN A LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	1
1.1 Células Dendríticas.	1
1.2 Historia de las Células de Langerhans.	2
1.3 Fenotipo de las Células de Langerhans.	6
1.4 Ontogenia de las Células de Langerhans.	9
1.5 El Sistema de las Células Dendríticas.	13
II. ANFIBIOS.	17
2.1 El desarrollo de los anfibios.	17
2.2 El Sistema inmunológico de anfibios.	18
2.3 Células Dendríticas en tetrápodos no mamíferos.	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	22
IV. HIPÓTESIS.	22
V. OBJETIVOS	23
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.	24
VII. RESULTADOS.	29
VIII. DISCUSIÓN.	39
X. CONCLUSIÓN.	44
REFERENCIAS	46
APÉNDICE (MATERIAL Y MÉTODOS)	52

I. INTRODUCCIÓN

1.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Para que algunas poblaciones de linfocitos T puedan reconocer las partículas antigénicas y desencadenar una respuesta inmune contra dichos antígenos es necesaria la participación de una segunda célula: las Células Presentadoras de Antígenos (CPA), que incluyen a los monocitos /macrófagos (MO/MQ) y a las células dendríticas (CD).

Las CD se encuentran distribuidas en todo el organismo formando un sistema celular llamado "Sistema de Células Dendríticas" (SCD). En la epidermis y otros epitelios planos estratificados de mamíferos se conocen como células de Langerhans (CL), en la 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 como células dendríticas esplénicas (CDE). Estas células también se han encontrado en el intersticio de otros órganos como el corazón, riñón, hígado y páncreas y se denominan células dendríticas tisulares (CDT).

Las células de este sistema, en general, se caracterizan por presentar una forma irregular con proyecciones del citoplasma, por lo que reciben el nombre de células dendríticas. Son células carentes de desmosomas y tonofilamentos; todas expresan el antígeno común leucocitario CD45, así como las moléculas clase I y II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH), sin embargo presentan otras características fenotípicas según el órgano en el que se encuentren, reflejando por lo tanto, el microambiente en el que se localizan.

1.2. HISTORIA DE LAS CL.



Fig. 1 Dibujo de las observaciones de P. Langerhans en 1868. Tomado de Schuler, 1991

En 1868, Paul Langerhans estudiando la piel humana observó una población celular dendrítica intraepidérmica localizada basal o suprabasalmente, mediante una impregnación metálica con cloruro de oro, destacando en sus dibujos que las dendritas de las CL se prolongaban hasta la dermis (Langerhans, 1868) Fig. 1.

Langerhans y otros autores escribieron acerca de su presuntiva función nerviosa (Kreibich, 1917 en: Schuler, 1991), pero también se pensó que eran células de Schwann que habían migrado a la epidermis mientras que otros las mencionaban como una parte integral del sistema nervioso autónomo de la piel (Ferreira, 1951).

Esta "Teoría Neural" se derrumbó con la llegada del microscopio electrónico, evidenciando que su morfología era diferente a la de las células nerviosas, además de que se encontraron en tejidos denervados (Birbeck *et al*, 1961), sin embargo, la mayor objeción que tuvo esta teoría es el hecho de que nunca se observaron conexiones entre estas células aureofílicas epidérmicas con las terminaciones nerviosas de la dermis (mencionado en: Castell, 1989). A partir de 1948 empezó a tomar fuerza la "Teoría Melanocítica" (Masson, 1948), donde se consideraba que las CL eran melanocitos desgastados o melanocitos que habían perdido su capacidad de sintetizar pigmentos y eran llevadas a la superficie donde, junto con los queratinocitos, eran descamadas. Esta teoría tenía su fundamento en que ambas células son dendríticas, residen en la epidermis (siendo los melanocitos basales y las CL suprabasales), además de que ambas reaccionan con algunas sales de metales: los melanocitos son argentafines mientras que las CL son aureofílicas. Esta teoría fue desechada porque, al estudiar la ontogenia de los melanocitos, se observó que las CL ya estaban presentes en la epidermis mientras que los melanocitos todavía no se encontraban o se encontraban inmaduros. Además cuando se removieron experimentalmente las crestas neurales, se observó en epidermis una ausencia de melanocitos mientras que las CL si estaban presentes.

Posteriormente, Birbeck *et al* (1961) encontraron que en piel humana normal los melanocitos presentan un citoplasma claro, debido a la ausencia de tonofilamentos, abundantes gránulos de melanina con diferentes estadios de desarrollo, un aparato de Golgi bien desarrollado, escasas y pequeñas mitocondrias, y una envoltura nuclear de contorno regular que puede presentar un solo surco, carecen de desmosomas y uniones intercelulares; mientras que en piel con vitiligo no se observaron células con estas características,

en su lugar encontraron en mayor densidad y misma ubicación, células claras con características similares, pero con una envoltura nuclear notoriamente convolucionada por abundantes surcos, los cuales en ocasiones dividían al núcleo en lóbulos, incluso más marcadamente que en los leucocitos, además de que no encontraron ningún tipo de gránulo de melanina, pero si otro tipo de gránulos, los cuáles estaban constituidos por una estructura lineal con una terminación redondeada lo que le daba la apariencia de bastón o de raqueta de tenis, siendo por mucho más pequeños, de diferente estructura interna y forma, que cualquier gránulo de melanina. En la actualidad este organelo es conocido como gránulo de Birbeck (GB) y usado como característica diagnóstica de las CL. Estos hechos permitieron concluir que las CL no son derivados de la cresta neural, ni pertenecen al linaje de los melanocitos. (Fig. 2)

La primera connotación de las CL en la inmunocompetencia fue en 1965, cuando Billingham y Silvers (en: Schuler, 1991) sugirieron que las CL podían capturar materiales antigénicos y tener un papel en la respuesta inmunológica primaria. Sin embargo, no fue sino hasta 1976 que se demostró que esta idea podía ser cierta al observarse que en cobayos sensibilizados con 2,4 Dinitro-cloro-benceno (DNCB) se presentaban numerosas aposiciones de células mononucleares, posiblemente linfocitos, con CL en la epidermis; después de un tiempo había una disminución en el número de CL epidérmicas, observándose éstas en la dermis y en la cercanía e interior de algunos vasos, aparentemente vasos linfáticos. Estos resultados permitieron suponer que las CL servían como

estructuras blanco en reacciones de hipersensibilidad de contacto, siendo una población celular de gran importancia inmunológica; por otro lado, debido a que encontraron grandes cantidades de CL en los vasos linfáticos de la dermis, lo que sugirió que éstas podrían portar antígenos y llevarlos de la piel a los ganglios linfáticos (Silberberg, 1971, 1976, 1977 y 1978). Braathen (1980) demostró que al sensibilizar CL con sulfato de níquel se producía una respuesta por parte de las células T.

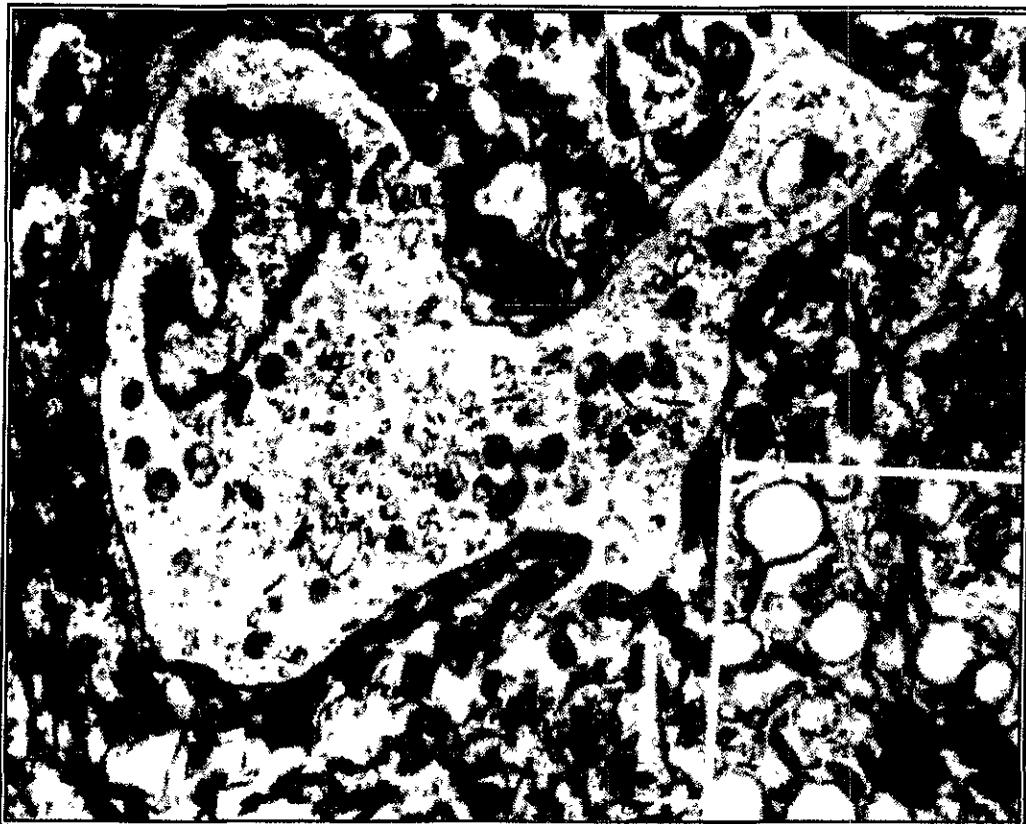


Fig. 2. Fotomicrografía de una Célula de Langerhans, en el recuadro se observan numerosos gránulos de Birbeck. (tomada de Schuler, 1991)

Posteriormente se pensó que si las CL estaban involucradas en reacciones inmunológicas, entonces debían presentar marcadores de superficie característicos de células con funciones inmunológicas, tales como los receptores para el tercer componente del complemento (C₃) y la fracción cristalizable (Fc) de la IgG. Mediante la técnica inmunológica de formación de rosetas, se demostró que las únicas células epidérmicas que mostraban estos receptores eran las CL, por lo que se concluyó que como estos receptores se encuentra presentes tanto en las CL como en linfocitos, monocitos y macrófagos, entonces podían ser consideradas como células inmuno-competentes, siendo su función disparar respuestas inmunológicas (Stingl *et al*, 1977 y 1978).

Por otro lado, Rowden y *et al.* (1977) y Klareskog *et al.* (1977), trabajando en grupos separados, evidenciaron por inmunofluorescencia la expresión de antígenos Ia (moléculas clase II del CPH) en las CL de epidermis humana, al mismo tiempo confirmaron que estos antígenos no se encuentran ni en queratinocitos, ni en melanocitos.

1.3. FENOTIPO DE LAS CL.

Características morfológicas y ultraestructurales.

A la microscopía de luz las principales características de las CL son su forma dendrítica, un citoplasma claro y su ubicación basal o suprabasal; pero al observarlas en microscopía electrónica se distingue el característico GB en forma de bastón o raqueta de tenis, un citoplasma electrón lúcido por la ausencia de tonofilamentos y melanosomas, un núcleo marcadamente indentado, aparato de Golgi bien desarrollado y numerosas y pequeñas mitocondrias. (Fig. 2)

Marcadores enzimáticos.

Las CL se caracterizan por presentar una fuerte actividad de ciertas enzimas, lo que en su momento les dio la calidad de células funcionales. La demostración de esta actividad enzimática todavía es útil para la identificación de las CL.

La técnica histoquímica, para demostrar la actividad de adenosin-trifosfatasa (ATPasa) ha sido ampliamente usada en el estudio de CL, tanto en microscopía fotónica como electrónica (Bradshaw, 1963), siendo estas el único tipo celular que presenta esta actividad en la epidermis, por lo que esta técnica solamente es indicada en epitelios.

También presentan fuerte actividad de esterasa inespecífica y mieloperoxidasa, las cuales también se encuentran en macrófagos, sin embargo las CD no poseen actividad de α -antitripsina y α -antiquimotripsina (Holden, *et al*, 1982). (Fig. 3)

Marcadores inmunológicos.

El fenotipo de las CL es similar al que caracteriza de las células del sistema inmune. Entre los marcadores que expresan las CL están: el antígeno común leucocitario CD45, que lo presentan todos los leucocitos, las moléculas clase I del CPH presentes en todas las células nucleadas y en las CL es donde se presentan en mayor cantidad, y las moléculas clase II del CPH, siendo las CL las únicas células epidérmicas que constitutivamente las presentan (Romani *et al*, 1989). Los antígenos CD1, que se dividen en CD1a, CD1b y CD1c y cuya función no está muy clara, son expresados por las CD de manera diferencial. En la epidermis sólo las CL presentan el CD1a, mientras que en la dermis sólo algunas células de aspecto dendrítico pueden presentarlo, el CD1c es débilmente expresado por CL epidérmicas y pocas CL dérmicas, mientras que el CD1b no es

expresado en células epidérmicas. El antígeno CD4, el cuál es necesario para el reconocimiento del antígeno por el receptor de la célula T (TCR), también es expresado por las CL de humano. Los marcadores del linaje de los monocitos/macrófagos CD14 y CD15 se han encontrado débilmente expresados en CL pretratadas con neuraminidasa (De Fraissinette, *et al* 1989). La proteína ácida S-100 fue descrita por primera vez en neuronas de bovinos, cuya función es modular el calcio intracelular, y también esta presente en las CL pero su función no es conocida, sin embargo su detección nos permite hacer una discriminación con los MO/MQ, ya que éstos no la presentan (Cocchia, *et al* 1981). Ésta proteína esta constituida por dos subunidades (α y β) las cuáles se pueden presentar como: $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ o $\beta\beta$; Watanabe *et al* (1983) y Atoji, *et al* (1991) han demostrado que las CL presentan la subunidad β S-100 mientras que los MQ sólo expresan pobremente la subunidad α S-100.(Fig. 3)

De manera importante las CL también presentan receptores para la fc de la IgG y el C3b (Schuler, 1991).



Fig. 3. Marcadores fenotípicos de las CL

1.4. ONTOGENIA DE LAS CL.

En cuanto al origen de las CL se han realizado algunos trabajos como los de Katz *et al* (1979) y Frelinger *et al* (1979) que han demostrado que las CL derivan de la médula ósea, además que continuamente son reemplazadas por un "pool" de células precursoras migratorias originadas en la médula ósea.

Otros estudios sugieren que el bazo o los ganglios linfáticos pueden ser tan buenos como la médula ósea en la producción de CL. Chen *et al* (1986) estudiaron dos cepas de ratones CPH compatibles, de los que se obtuvo una F1 híbrida, tanto neonatos como adultos de las cepas originales fueron radiados a una dosis de 300R, suficiente para matar las células de médula ósea, e inmediatamente después se les inyectaron esplenocitos de los ratones híbridos, y posteriormente determinaron el número de CL del donador y del hospedero, encontrando que después de seis semanas de haber inyectado los esplenocitos alrededor del 70% de las CL eran de origen del donador. Roberts *et al* (1985) (mencionado en Schuler, 1991) sugieren que existen precursores de CL en ganglios linfáticos y bazo, y que tienen la capacidad de moverse más rápido hacia la epidermis que los de la médula ósea. Posteriormente, se demostró que las CL presentan el antígeno común leucocitario CD45 y el Ly-5, proteínas que presentan todas las células derivadas de la médula ósea, quedando claro que éste es su origen.

Shelley y Juhlin (1976) sugirieron que las CL debían estar relacionadas al linaje de los MO/MQ, ya que eran capaces de captar selectivamente antígenos que causan dermatitis de contacto, sin embargo su capacidad fagocítica es mucho menor que la de los macrófagos y menos aun que la de los queratinocitos. Posteriormente se descubrió que las CL comparten marcadores de superficie con los

MQ, como las moléculas clase I y II del CPH (en humanos: HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ), siendo necesarios el HLA-DR y HLA-DQ para la presentación de antígenos de los monocitos a las células T (Carr, 1986).

Las CL, al igual que una subpoblación de linfocitos T, expresan el antígeno CD4. Además las CL junto con los timocitos inmaduros presentan el antígeno CD1a, y por otro lado se ha reportado que tienen receptores para C3, C4d, C3b-C4b (Burke y Gigli, 1980), por lo que está en debate, si pertenecen al linaje de los monocitos/macrófagos o a algún otro.

En resumen, las CL pertenecen a una familia de células dendríticas de origen hematopoyético, las cuales se diferencian del resto de las células de origen mieloide, por su forma irregular, la presencia de un núcleo indentado, además de presentar un fenotipo inmunológico característico, presentando marcadores de monocitos/macrófagos y de otros linajes como células T indiferenciadas. Su función es la de captar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T para iniciar una respuesta inmunológica primaria. Para amplificar la respuesta inmunológica las CL migran de la piel a los ganglios linfáticos regionales, donde efectúan la presentación del antígeno. Durante la migración se lleva a cabo un proceso de preparación del antígeno, en el cuál las CL endocitan a los antígenos y los transforman expresando los determinantes antigénicos, y conjugándolos con moléculas de reconocimiento para el linfocito, y una vez que se encuentran en la zona T dependiente del órgano linfoide presentan el antígeno al linfocito, el cuál se encarga de iniciar la respuesta inmune celular. (Fig. 4).

En estudios recientes (Olweus, *et al*, 1997) basados en el cultivo de células de origen mieloide, identificaron una subpoblación de células que dan origen a las CD, las cuales carecen de los marcadores del linaje de los linfocitos, son CD34+ y presentan el receptor α para la Interleucina 3 ($R\alpha$ -IL3) con lo que se destaca su ruta de diferenciación separada de otras células mieloides.

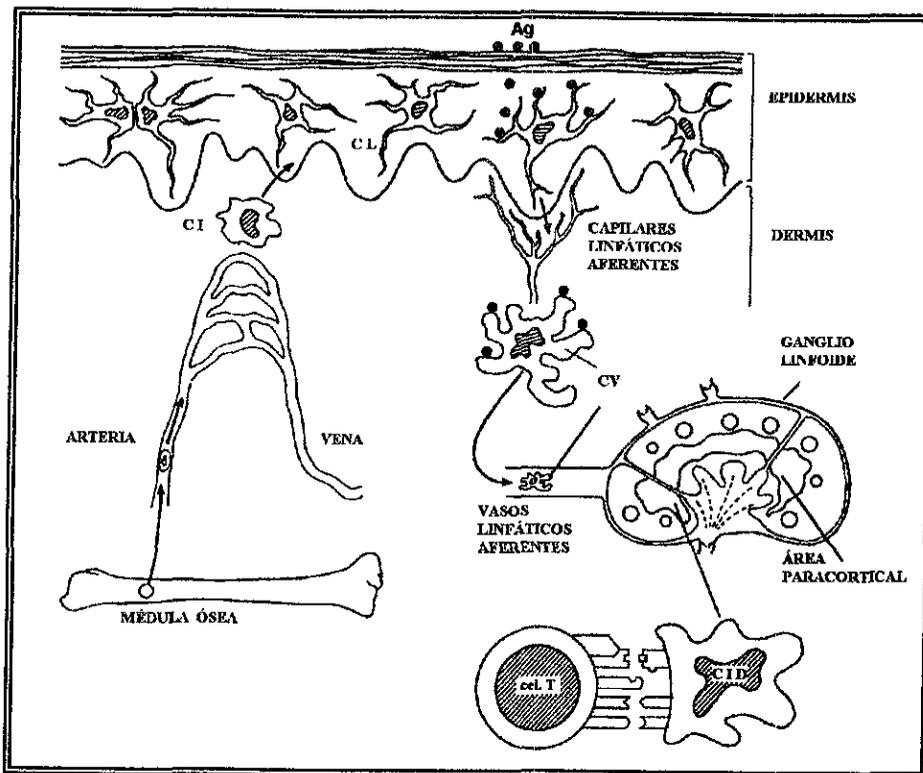


Figura 4. Vía de recorrido de las CL, desde la médula ósea hasta iniciar una respuesta inmune en los ganglios linfáticos. Ag = Antígenos. CL = Célula de Langerhans. CI = Célula indeterminada. CV = Célula velada. CID = Célula interdigitante. (Teunissen, 1992)

Por otro lado Peters, J.H., *et al* (1996) proponen que el linaje de las CD está íntimamente relacionado con el de los MO/MQ ya que ambos tipos celulares tienen un mismo precursor, el que puede seguir dos rutas de diferenciación, una que lleva hacia monocito y posteriormente a macrófago y otra que lo lleva hacia CD, en la primera ruta destacan la posibilidad de que un monocito se

diferencie en CD o en MQ, pero que ambos tipos celulares pueden en un momento dado cambiar de MQ a CD indistintamente, según sean las condiciones microambientales así como de las necesidades del individuo en ese momento. Así pues, las CD y los MQ representarían los extremos de una misma familia, ya que mientras los MQ cuentan con una gran capacidad fagocítica y su capacidad para realizar la presentación antigénica es poca, en las CD sucede lo contrario, ya que tienen poca capacidad fagocítica y una gran capacidad como células presentadoras de antígenos (Fig.5).

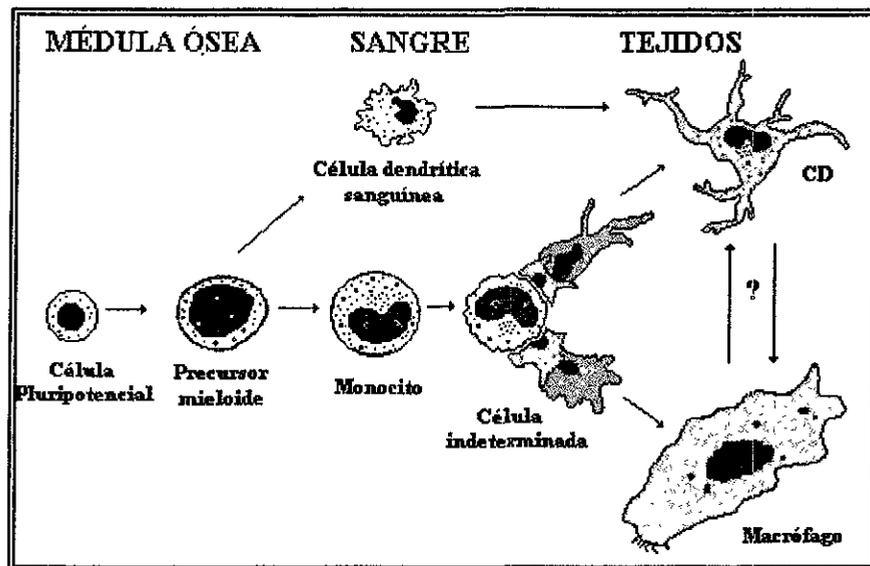


Figura 5. Ruta de desarrollo donde se destaca la posibilidad de que las Células de Langerhans y los Macrófagos pertenezcan a un solo linaje. (Peters, 1996).

En la piel del embrión humano se han identificado CL ultraestructuralmente a las 14 semanas de gestación (Breathnach y Willie, 1965), y no expresan los antígenos HLA-DR (clase II) sino hasta después de las 24 semanas (Natali *et al*, 1982), aunque a las 14 semanas, Monti *et al* (1985) encontraron células clase II+, CD1a+ y S-100+ en epidermis.

Por otro lado Foster en 1986, identificó CL clase II+/ATPasa+ a las 6 ó 7 semanas de gestación, siendo CD1a-, a los 45 días,

posteriormente a los 60 días un pequeño porcentaje fue CD1a+ y no fue sino hasta las doce semanas en que la mayoría de las células clase II+/ATPasa+ resultó CD1a+. Antes de las semanas 10 u 11 las CL se originan en el hígado fetal, sitio primario de hematopoyesis durante el periodo embrionario, y no son capaces de sintetizar CD1a inicialmente, pero a las 12 semanas que inicia la función de la médula ósea aumenta la reactividad de las CL a este antígeno.

Hasta la semana 10 del desarrollo embrionario las CL fetales difieren substancialmente de las adultas porque son de menor tamaño, menos dendríticas y heterogéneas fenotípicamente coexistiendo poblaciones clase II+/CD1a+ y clase II+/CD1a-. Entre los 50 y 100 días de gestación la densidad de CL se mantiene constante (100 cels/mm²) y se cree que éstas migran a la epidermis en el primer trimestre de desarrollo, por lo que existen mucho menos CL por unidad de área que en la epidermis adulta. Para el segundo trimestre las CL fetales son fenotípica y morfológicamente similares a las CL del adulto, por tanto las CL están presentes en la piel, antes de que el sistema inmunológico esté completamente activado (Hayward, 1981).

1.5. SISTEMA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS:

Para la iniciación de la respuesta inmunológica el sistema inmunológico requiere de la participación de CPA, células accesorias localizadas en sitios estratégicos, como los epitelios, en donde las CL son un representante clásico de CPA, y en todo el organismo se han identificado células con características similares, modificadas según sea el microambiente del órgano en el que se encuentran, por lo que se han denominado como Sistema de Células Dendríticas (Fig. 6).

Se cree que todas las células de este sistema tienen un origen común en la médula ósea, posiblemente el mismo que el de los MO/MQ, y su diferenciación esta influida por el microambiente del órgano que colonizan (mencionado en: Castell, 1989), o bien que según sea el estímulo o señal que reciban sera al organo al que se dirigañ. (Bruijnzeel-Koomen, 1993)

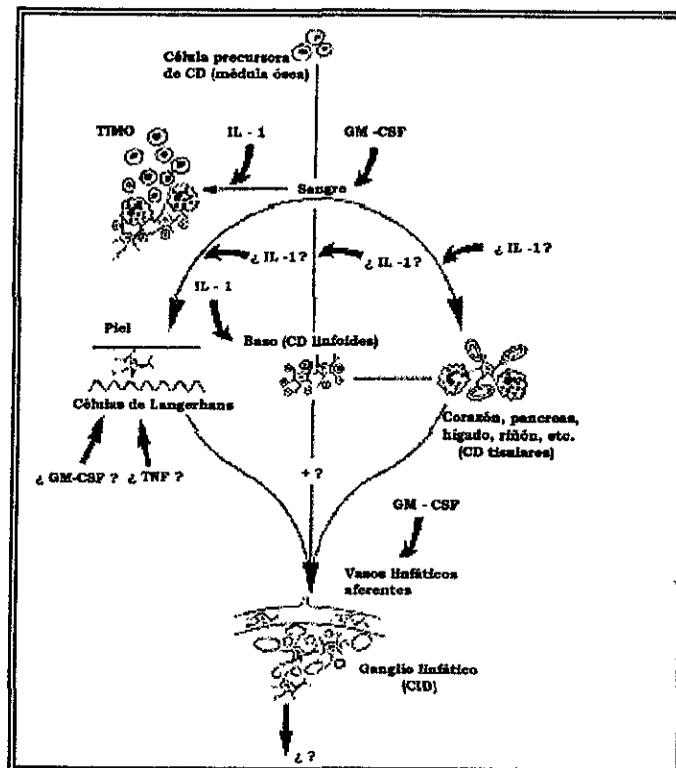


Figura 6. En el esquema se ilustra el origen de las CD en médula ósea y como dependiendo de la influencia de ciertas señales se dirigen a distintos órganos y cambia su fenotipo. IL-1 = Interleucina I. GM-CSF = Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos. (Bruijnzeel-Koomen, 1993)

Las células de este sistema se localizan en órganos linfoides y no linfoides, así como en la circulación, ya sea linfática o sanguínea y según su distribución y características se conocen de la siguiente manera: En la epidermis y otros epitelios estratificados se conocen como células de Langerhans; en la linfa como células veladas; en las zonas T-dependientes del timo y ganglios linfáticos como células interdigitantes y en las zonas T-dependientes de el bazo se conocen como células de Steinman y Cohn o células dendríticas esplénicas.

Estas células también se han encontrado en el intersticio de otros órganos como hígado, corazón, riñón, páncreas, etc. y se conocen como células dendríticas tisulares. (Castell, 1990)

Los tipos celulares integrantes de este sistema presentan características en común, como la forma irregular, un perfil nuclear irregular, ausencia de uniones intercelulares, un citoplasma claro debido a la ausencia de queratina, la presencia de los antígenos de superficie común leucocitario CD45 y las moléculas clase II del CPH, la expresión de la proteína ácida S-100, y la fuerte actividad de ATPasa, entre otras.

CÉLULAS DENDRÍTICAS EPIDÉRMICAS. Se localizan basal o suprabasalmente en la epidermis y ocasionalmente se observan en la dermis; presentan proyecciones citoplásmicas pudiendo llegar a formar redes, muestran actividad de ATPasa, esterasa inespecífica, y expresan fuertemente moléculas clase II del CPH y presentan receptores para el Fc de la IgG y para el C3b. En cultivo su tamaño aumenta casi al doble, a la vez que aumenta la expresión de moléculas clase II del CPH y de moléculas de adhesión, pero carecen del característico GB, y de los receptores para FC de IgG, y por ello asemejan a las CD sanguíneas o linfoides. (Steinman, 1991).

CÉLULAS VELADAS. Éstas se denominaron células veladas debido a que presentan grandes proyecciones citoplásmicas en forma de velos; se localizan en la linfa, únicamente en los vasos linfáticos aferentes, siendo alrededor del 50% de la población celular de los vasos linfáticos y en general presentan características análogas a las CL. Al igual que las demás CD su actividad fagocítica es baja en contraste con su alta actividad presentadora de antígenos, y solamente un bajo porcentaje de estas cuentan con el característico GB. En sangre menos del 0.1% del total de las células presentan

características dendríticas, siendo éstas, las únicas que pueden presentar velos retráctiles. (Steinman, 1991)

CÉLULAS INTERDIGITANTES. Este subtipo celular se encuentra en las zonas T-dependientes de los ganglios linfáticos y en la médula del timo. Su nombre se debe a que forman interdigitaciones entre sus proyecciones y las de los linfocitos T con los que se encuentran en íntima aposición para realizar la presentación antigénica. Como las demás células del sistema presentan características análogas a las CL, pero su actividad de ATPasa y la cantidad de receptores para Fc y C3b es menor, contrastando el aumento en la expresión de moléculas clase II del CPH. (Steinman, 1991)

CÉLULAS DENDRÍTICAS ESPLÉNICAS. Las células de Steinman y Cohn, a diferencia de las demás CD, carecen del característico GB, de la actividad de ATPasa y de receptores para el Fc de las IgG y el C3b. Se encuentran en grandes cantidades en la vaina periarteriolar de los vasos (zona T-dependiente) y expresan fuertemente la proteína S-100 y las moléculas clase II del CPH. En este órgano las CD son similares a las del timo pero de menor tamaño. (Steinman, 1991)

CÉLULAS DENDRÍTICAS INTERSTICIALES. También se han descrito CD en el intersticio de algunos órganos como corazón, hígado, riñón, intestino y páncreas, con las mismas características de las CL. En estudios sobre trasplante de tejido cardíaco se observó, algunos días después y mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos para el donador, que las CD de éste colonizan el bazo del individuo receptor. (Steinman, 1991)

II. ANFIBIOS.

2.1 EL DESARROLLO DE LOS ANFIBIOS.

Dentro de los vertebrados, el grupo de los anfibios representa un parteaguas evolutivamente hablando, ya que no sólo es el grupo a partir del cual se originaron los grupos restantes, sino que además presentan una serie de características que los hacen ser modelos experimentales de amplio uso, para comprender los procesos evolutivos que se dieron en los órganos y sistemas, lo que es de gran utilidad para comprender la biología de otros grupos de vertebrados.

La principal característica de los anfibios es que cuentan con un tipo de desarrollo distinto a cualquier otro vertebrado, esto es, que durante sus etapas de desarrollo cambian de un tipo de vida acuática a un tipo de vida terrestre, atravesando por un periodo de metamorfosis en el cual la larva acuática modifica casi toda su fisiología, para adecuarse a la vida terrestre, aunque en algunas especies, tras la metamorfosis, el adulto puede permanecer en vida acuática. Es importante resaltar que las etapas embrionarias y de metamorfosis son de vida libre, lo que los hace modelos adecuados, para el estudio de la ontogenia de la respuesta inmunológica.

En general, el desarrollo de los anfibios anuros se puede dividir en dos etapas:

1) Desarrollo embrionario. Se inicia con la fertilización de los huevos. Este proceso es externo y se da en el medio acuático, en la mayoría de las especies no hay cuidados paternos, quedando los huevos prácticamente abandonados en el lugar donde se realizó la fecundación, y culmina con la formación de una larva de vida libre,

acuática y capaz de alimentarse por sí misma, cuya respiración se da por medio de branquias (Porter, 1972)

2) Una vez que entran a la etapa larval forzosamente pasarán por la metamorfosis, durante ella las branquias son substituidas por pulmones, las piezas dentales larvales se pierden y la boca se modifica al mismo tiempo que se desarrollan las cuatro extremidades y se pierde la cola. Por otro lado, se dan modificaciones en la piel, ya que aumenta el número de capas y la cantidad de glándulas, aparece una gran vascularización dérmica. Esta capa de la piel interviene en la respiración durante la vida adulta. Macroscópicamente éstos son los principales cambios que se dan; pero los sistemas digestivo, respiratorio, inmunológicos, etc. también se ven modificados. Al final de la metamorfosis se convierten en adultos miniatura, de vida acuática o terrestre, y durante su primer año de vida alcanzan la madurez en todos sus sistemas.

Todas estas modificaciones que se dan durante la ontogenia y el hecho de que tanto el desarrollo embrionario como larval sean de vida libre, nos brindan la oportunidad de utilizarlos como modelo, para comprender el desarrollo del sistema inmunológico, puesto que son de fácil acceso y se pueden realizar experimentos *in vivo*.

2.2 EL SISTEMA INMUNOLÓGICO DE ANFIBIOS.

El sistema inmunológico de los anfibios se encuentra bien desarrollado, presentando timo, bazo, y al menos un par de ganglios linfáticos cervicales. El número de órganos linfoides varía según la familia de anfibios, por ejemplo, en el caso de las familias primitivas como *Xenopus*, cuyo sistema linfoide es más similar al de los endotermos que al de los urodelos y peces, poseen timo, bazo, y ganglios linfáticos, además de una medula ósea linfopoyética, así

como tejido linfoide asociado a mucosas, sin embargo, el sistema inmunológico de *Xenopus* es menos complejo que el de las familias más avanzadas como *Ranidae* y *Bufo*, ya que éstos cuentan además con múltiples estructuras linfáticas similares a ganglios en cuello y axilas, filtros linfoides y sanguíneos que contienen trampas antigénicas y células formadoras de anticuerpos. Otras familias también cuentan con numerosos nódulos linfoides en la cloaca, en los oviductos, vejiga, e intestino grueso. (Goldstine, *et al*, en: Marchalonis, 1976)

Durante el estadio 26 de desarrollo larval de *R. Pipiens* se puede distinguir el timo como un órgano bien definido, pero todavía no se presentan linfocitos maduros. Hacia finales del estadio 27 de desarrollo larval el timo se empieza a diferenciar en corteza y médula, al mismo tiempo que se pueden encontrar linfocitos inmaduros y algunos maduros. De manera similar, los órganos linfoides ventrales se han desarrollado, coexistiendo linfocitos maduros e inmaduros. En los estadios 27 y 28 todos los órganos linfoides están en proceso de diferenciación a excepción del bazo, éste inicia el proceso hasta el estadio 31.

Durante y después de la metamorfosis el bazo y la médula ósea se desarrollan rápidamente y asumen un papel importante en la producción de células linfoides, pero el timo sigue siendo el principal órgano linfopoyético. En *Rana pipiens*, entre los estadios 32 a 34, aparecen hasta 30 órganos linfoides ventrales en la zona branquial, mientras que en otras especies pueden ser hasta 3 pares. Una posible función de estos órganos es la respuesta a sustancias extrañas que pasan a través de las branquias, ya que éstos disminuyen al inicio de la metamorfosis, conforme se va atrofiando la cámara branquial. En este mismo periodo los órganos linfoides

ventrales que se localizan en la zona de los miembros delanteros alcanzan su máximo tamaño. Después de la metamorfosis el timo comienza a crecer alcanzando su máximo tamaño 8 semanas después y cuando alcanzan la madurez sexual, al año de edad, comienza a involucionar quedando un poco más grande que antes de la metamorfosis (Horton, 1971; Du Pasquier, 1973)

2.3 ANTECEDENTES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN TETRÁPODOS NO MAMÍFEROS.

Las CD, en particular las CL, se han estudiado ampliamente en diferentes mamíferos con gran éxito, ya que se conoce detalladamente el SCL, pero en otros vertebrados no mamíferos es poco lo que se sabe acerca de este sistema, aunque desde la década de los 60s empezaron a estudiarse en otras especies, pocos son los trabajos que se tienen acerca de este tema.

En anfibios, los primeros que mencionan la posible existencia de CD son Farquhar y Palade (1966), donde se observó actividad de ATPasa con microscopía electrónica en epidermis de *R. pipiens*, *R. temporaria* y *B. marinus*. Sin embargo, no es sino hasta la década de los ochenta en que intencionalmente se empieza a abordar el tema de las CD en los anfibios. Barrutia (1985) describió células con características similares a CD en el bazo de *Bufo*. Banerjee (1985), intenta describirlas en piel por medio de microscopía electrónica en *Rana catesbeiana*; pero concluye que no hay CD en estos animales. Bigaj (1987), describió CD en el timo de *Rana temporaria*. (Castell, et al 1989 y Carrillo, et al 1990) describieron CD clase II+ y ATPasa+ en epidermis de *Rana catesbeiana*. Du Pasquier y Flajnik (1990), describieron CD clase II+ en la epidermis de *Xenopus leavis*, mencionando que éstas no aparecen sino hasta entrada la

metamorfosis. Para 1994 este tipo celular fue identificado mediante la técnica histoquímica para esterasa inespecífica, ampliando las técnicas de diagnóstico para las CD en anfibios (Castell, 1994). Hernández (1997) las observa en la zona periarteriolar del bazo de *R. pipiens*.

Para el caso de los reptiles, Breathnach (1966), identificó CL en la cola de la lagartija *Lacerta vivipara* y las describió como células con núcleo indentado, citoplasma claro, sin tonofilamentos y libre de desmosomas, pero sin GB, por lo que concluyó que no existían las CL en los reptiles. (mencionado en: Castell, 1989 y Millan, 1996). Sin embargo recientemente se caracterizaron CD epidérmicas en la tortuga terrestre *Kinosternon integrum* donde observaron GB o su equivalente. (Pérez, 1995).

En el caso de las aves, en los años 70's Reamps y Thompkins (1973) intentaron demostrar CL en piel de pollo pero concluyeron que en este grupo no existían CL, y no fue sino hasta principios de esta década que Carrillo, *et al* (1991) describió células ATPasa+ en la epidermis de pollo con microscopía de luz y electrónica. Posteriormente, Akhter, *et al* (1993) describió células ATPasa+ y clase II+ en la epidermis de distintas aves. Más adelante se evidencio la coexpresión de estos marcadores mediante un doble marcaje de ATPasa e inmunofluorescencia para moléculas clase II del CPH, en la epidermis de *Gallus gallus* (Pérez, 1994)

En los diferentes trabajos realizados en anfibios, reptiles y aves, en los que se han descrito este tipo de células, la mayoría coinciden acerca de las características morfológicas e inmunológicas que comparten con su contraparte mamífera, por lo que al parecer no cabe duda de que en los vertebrados no mamíferos también existe el SCD.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se ha demostrado la presencia de CD parecidas a CL en anfibios anuros; nuestro grupo de trabajo básicamente ha estudiado la familia *Ranidae*, mediante la utilización de técnicas enzimáticas, inmuno histoquímica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica, hemos evidenciado CD en epidermis, córnea y órganos linfoides como el bazo, entre otros, estos hallazgos nos han permitidó hacer inferencias fisiológicas y filogenéticas sobre estas células. Sin embargo en cuanto a la ontogenia de las CD en anfibios, sólo se sabe que están presentes en la epidermis durante el desarrollo larval. Du Pasquier, (1990) menciona que durante la metamorfosis es que aparecen en la epidermis, restando por conocer en que etapa de desarrollo larval es en la que aparecen estas células.

IV. HIPÓTESIS:

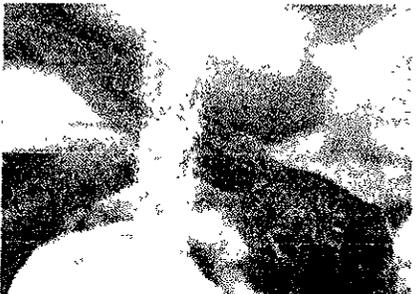
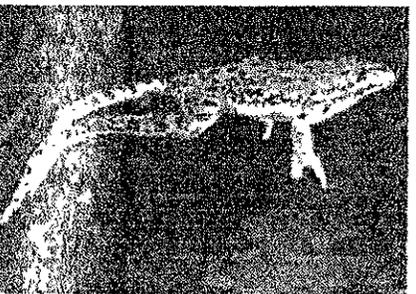
En este estudio se planteó que al liberarse del huevo y adquirir una fase móvil la larva comienza a entrar en contacto con distintos antígenos presentes en el medio, lo que estimula la aparición o presencia de CD. Este hecho y la capacidad de presentar una reacción de rechazo a injertos en estas edades, nos indica que deben de contar con células presentadoras de antígenos y con moléculas del CPH, por lo que pensamos que las CD estarán presentes en la epidermis de la larva de *R. pipiens* al iniciar la vida larval. Por otro lado, al llegar a la metamorfosis habrá una disminución de ellas debido a la reestructuración de antígenos.

V. OBJETIVOS:

- Demostrar la presencia de CD epidérmicas en la larva de la *Rana pipiens*.
- Establecer en que etapa del desarrollo larval aparecen las CD epidérmicas.
- Determinar si se mantiene o se modifica el número de CD epidérmicas durante el desarrollo.
- Determinar si las CD epidérmicas en la larva de la *Rana pipiens* co-expresan las moléculas clase II del CPH y la actividad de ATPasa.
- Correlacionar la aparición de CD epidérmicas con la presencia de CD en bazo y timo, durante el desarrollo larval.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.

1.- Se utilizaron 40 renacuajos de *Rana pipiens* colectados de lagunas del estado de Morelos en los meses de enero a mayo, a los que se les determinó la edad siguiendo la tabla de desarrollo para *Buffo valliceps* de Limbaugh y Volpe (Porter, 1972). Dividiendo el desarrollo larval en Premetamorfosis, prometamorfosis y Climax de la metamorfosis

	<p>Estadio 1 a 25 Desde huevo hasta una larva libre.</p>
	<p>PREMETAMORFOSIS Estadios 26 a 31</p> <p>Inicia el desarrollo larval con la formación del opérculo en el lado derecho y culmina con la aparición de las extremidades posteriores.</p>
	<p>PROMETAMORFOSIS Estadios 32 a 40</p> <p>Caracterizada por el rápido desarrollo de las extremidades posteriores, y el tamaño de la cola alcanza su máximo.</p>
	<p>CLIMAX DE LA METAMORFOSIS Estadios 41 a 45</p> <p>Última parte del desarrollo larval, inicia con la aparición de las extremidades anteriores y se presentan todos los cambios asociados a la metamorfosis.</p>
	<p>VIDA ADULTA POSTMETAMORFOSIS</p> <p>La metamorfosis ha terminado y la apariencia de la rana juvenil es idéntica a la del adulto, sólo que de menor tamaño.</p>

Los animales fueron mantenidos en el laboratorio, en peceras de 40 litros con oxigenación constante y a una temperatura promedio de 22°C, óptima para su desarrollo (Dodd y Dodd, en Lofts, 1976), y fueron sacrificados por descerebración conforme alcanzaban diferentes edades e inmediatamente se les tomó un pedazo de piel ventral, que tiene menos melanocitos y hace más fácil la identificación de las CL, la cual fue seccionada en fragmentos de 3 x 3mm que fueron incubadas en EDTA para obtener láminas epidérmicas. Otras muestras se procesaron para obtener cortes por congelación y otras más fueron fijadas en acetona y se procesaron para realizar cortes en parafina por el método de AMeX. Con microscopio estereoscópico se disecó el bazo y finalmente fueron decapitados para obtener el timo, que se encuentra en la región dorsal de la cabeza, por atrás del oído; en las últimas etapas de desarrollo larval el timo migra hacia la región ventral de la cabeza. Adicionalmente se analizó la piel de ranas postmetamórficas para seguir el desarrollo hasta la madurez.

2.- Las muestras de timo y bazo fueron procesadas para inmunohistoquímica por el método de AMeX para demostrar la presencia de las moléculas clase II del CPH y la proteína ácida S-100.

Tanto las láminas epidérmicas como los cortes de piel completa se dividieron en dos grupos:

- a) Inmunohistoquímica para demostrar la presencia de las moléculas clase II del CPH y la proteína ácida S-100.
- b) Histoquímica enzimática para demostrar la actividad de ATPasa.

- Inmunohistoquímica para Moléculas Clase II del CPH y proteína ácida S-100.

Inmunohistoquímica en cortes por parafina por el método de AMeX.

Los órganos de este grupo: piel (epidermis y dermis), bazo y timo fueron procesados según la técnica de AMeX, la cual permite el detalle de la técnica histológica en parafina y mantiene la antigenicidad para la inmunohistoquímica, como en los cortes por congelación. Los especímenes fueron fijados en acetona pura al 100% a -20 °C durante 18 horas, para después ser deshidratados en acetona al 100% a 4 °C por 15 minutos y acetona al 100% a temperatura ambiente durante 15 minutos más. Posteriormente fueron aclarados en metil-benzoato y en xilol durante 30 minutos cada uno. Finalmente fueron incluidos en parafina de punto de fusión de 50-60°C. De estos órganos se obtuvieron cortes de 4µm, los cuales fueron desparafinados con xilol y acetona (Shinzato, 1985; Sato, 1986 y Shamoto, 1991) y posteriormente fueron lavados en amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4, para después ser incubados en el anticuerpo primario, AM-20 (ratón anti-rana contra moléculas clase II del CPH) durante 12 horas a 4°C y con el anticuerpo secundario, biotinilado, cabra anti IgG de ratón, durante 60 minutos a 37°C. Finalmente fueron incubados en el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 30 minutos a 37°C. Para visualizar la enzima peroxidasa se revelaron con 3-3' diaminobenzidina tetrahidrocloruro. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Harris o de Mayer (Bullok, 1982 y Wordinger, 1984)

El tratamiento para la proteína ácida S-100 fue similar, utilizando un anticuerpo primario de conejo contra proteína S-100 y el anticuerpo secundario fue de cabra contra IgG de conejo.

Inmunohistoquímica en láminas epidérmicas

Una vez obtenidas las láminas epidérmicas se fijaron en acetona al 100%, durante 10 minutos, y la técnica inmunohistoquímica se siguió de igual manera que en los tejidos tratados en AMeX.

- ATPasa en cortes de piel y lámina epidérmica.

En este grupo solamente se trabajó con piel, ya que la ATPasa no es específica de CD en bazo, los tejidos de este grupo fueron fijados en una solución de formol-cacodilato durante toda la noche y posteriormente lavados 3 veces en solución salina balanceada (SSB) durante 10 minutos cada vez, luego fueron enclaustrados en un medio de inclusión para tejidos en congelación (OCT), y almacenados hasta su uso a -70 °C, de estos tejidos se obtuvieron cortes por congelación los cuales fueron lavados con SSB y se incubaron en Tris-Maleato durante 10 minutos, después se incubaron en una solución recién preparada de ATP durante 10 minutos a 37°C, posteriormente se lavaron en agua destilada y fueron revelados con sulfuro de amonio al 1% hasta obtener un color dorado. Finalmente los cortes fueron lavados con agua destilada (Juhlin, 1977 y Robins, 1981). Las láminas epidérmicas fueron tratadas de igual manera, a excepción de que éstas no fueron incluidas en OCT.

3.- Cuantificación de CD. En los cortes teñidos para evidenciar la ATPasa y las moléculas clase II, se cuantificó el número de CD. En el caso de los cortes de piel se contó el número de CD por milímetro de longitud de epidermis, de acuerdo a la técnica descrita por Bieber (1988), y en el caso de el timo y bazo se contó el número de CD/mm². Para determinar si existen diferencias entre cada una de las edades se analizaron estadísticamente mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) entre los diferentes estadios de desarrollo larval.

4.- Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Algunas muestras de piel, de tres animales en prometamorfosis, fueron procesadas para MET. Los especímenes fueron fijados con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.3, durante 2 horas a 4°C; después se lavaron tres veces en amortiguador de fosfatos 0.2M y posfijados en tetraóxido de osmio al 1% en amortiguador de fosfatos 0.1M, durante 45 minutos a temperatura ambiente y se lavaron durante 24 horas en amortiguador de fosfatos 0.2M, para posteriormente ser deshidratados en alcoholes graduales (30% - absoluto) durante 15 minutos en cada uno, y dos cambios de óxido de propileno de 30 minutos a temperatura ambiente, finalmente se infiltraron en óxido de propileno y epon 40 (V/V) con agitación continua durante 12 horas y dos cambios de resina pura cada 2 horas y se dejaron polimerizar a 60°C.

Se obtuvieron cortes finos que se contrastaron con acetato de uranilo al 2% durante 20 minutos y citrato de plomo durante 10 minutos.

VII. RESULTADOS.

Debido a que durante la etapa larval del desarrollo estos organismos cuentan con una epidermis muy delgada, en algunas regiones formada por una sola capa celular, la técnica de separación de láminas epidérmicas con EDTA no fue efectiva, ya que no sólo no se separaba la dermis de la epidermis, sino que esta última se disgregaba, por lo que se decidió estudiar la epidermis solamente mediante la utilización de cortes transversales de piel, en el que aparecen epidermis, dermis y tejido conectivo.

En la mayoría de los cortes transversales de piel ventral, realizados por congelación, la epidermis se encontraba parcial o totalmente dañada, lo que impidió el establecer la presencia de CD, mientras que en los cortes de cabeza que fueron menos manipulados, la epidermis se encontraba casi intacta, por lo que se modificó la metodología original y en vez de cuantificar CD en piel ventral se hizo en piel de la cabeza. (Fig. 7) En esta región del cuerpo la epidermis cuenta con un número mayor de capas (hasta 4 en algunas) zonas, además se observó un número variable de glándulas, según la edad observada y un gran número de melanocitos, caracterizados por su citoplasma claro conteniendo numerosos gránulos de melanina. (Fig. 8).

También se observaron las modificaciones que sufre la piel al atravesar la metamorfosis, particularmente en la epidermis: Aumento de capas celulares y la presencia de un estrato córneo definido, así como un aumento drástico en el número de glándulas tanto en la epidermis como en la dermis.

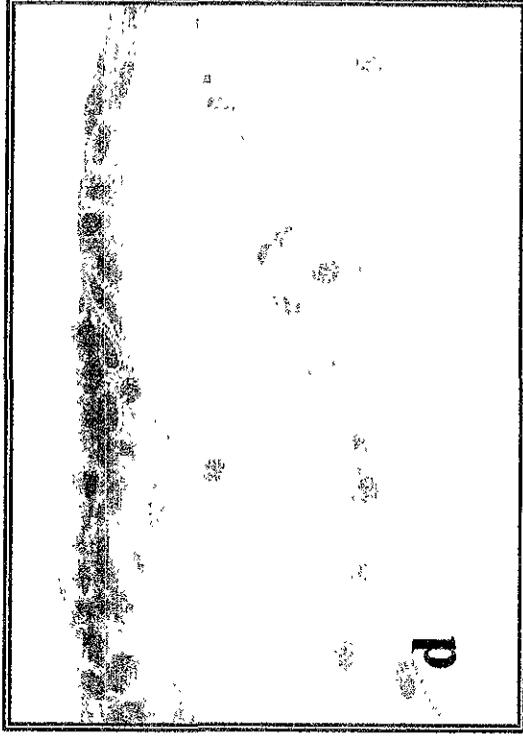
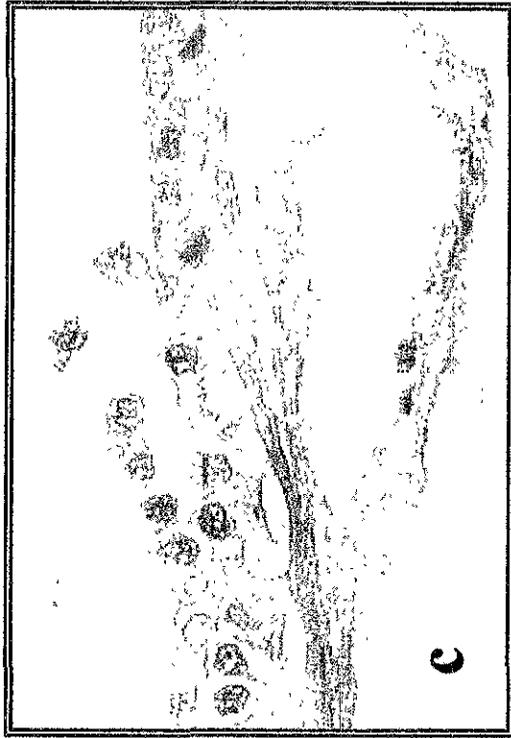
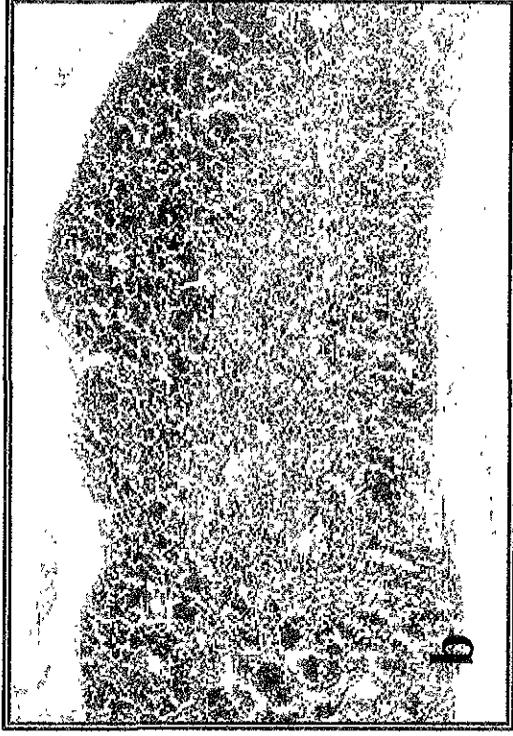
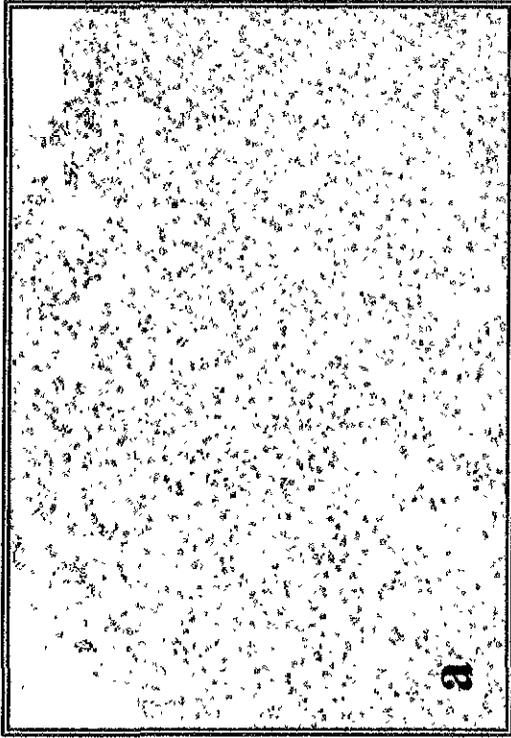


Figura 7. Tejidos de renacuajo pre-metamórficos, teñidos con H-E-.a) bazo (carencia de cápsula y trabéculas). b) timocon corteza y médula bien diferenciadas. c) epidermis en corte por congelación (daño). d) epidermis en corte mediante AMeX.

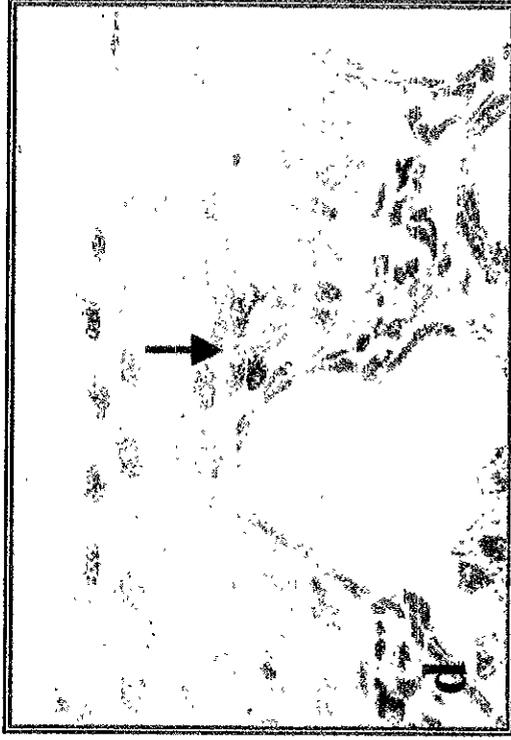
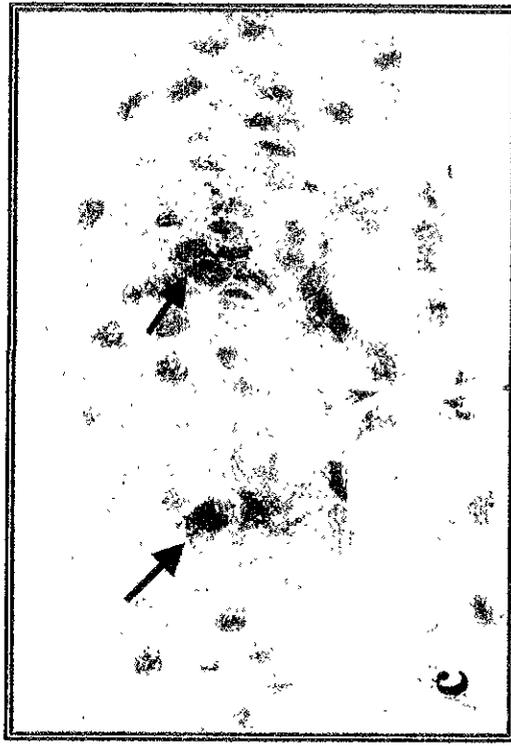
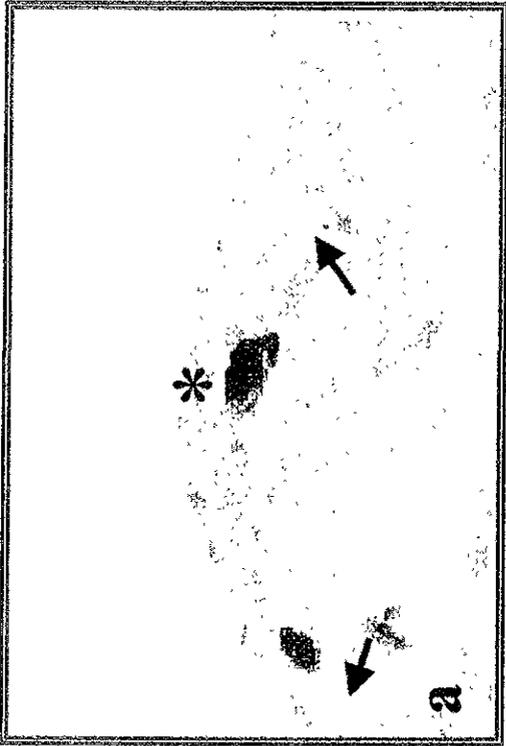


Figura 8. Cortes transversales de piel de la región cefálica donde se observa la reacción inmunohistoquímica para moléculas clase II del CPH en cortes de epidermis, mediante la técnica de AMeX. a) Premetamorfosis. b) Prometamorfosis. c) Climax de la metamorfosis. d) Postmetamorfosis. (CD flechas, melanocitos asteriscos)

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA MOLÉCULAS CLASE II DEL CPH CD EPIDÉRMICAS

A partir del estadio No. 26 de desarrollo, segundo de la etapa larval (varía según el autor), se encontraron células Ia+, las cuales presentaron una morfología variable, que podía ir desde redondeada hasta dendrítica, pero siempre en una ubicación basal o semibasal, las cuales fueron identificadas como CD. Cuando se comparan con los melanocitos, estos fueron de un tamaño mucho mayor y una coloración casi negra. Las CD pudieron distinguirse de los macrófagos, a pesar de que su morfología y su tamaño son similares, sin embargo estos presentan grandes gránulos, mientras que las CD presentaban una tinción de roja a café, según el sustrato cromógeno que se use. (Fig. 8).

Mediante el ANOVA que se realizó para comparar el número de CL entre las distintas edades se comprobó que no hay diferencias significativas entre los estadios de cada parte del desarrollo larval, pero sí entre las distintas etapas del desarrollo larval.

En la Tabla I se presenta el número promedio de CL/mm de longitud de epidermis, para cada una de las etapas de desarrollo y se puede notar cómo aumentan drásticamente de la premetamorfosis a la prometamorfosis, seguido de un decremento en la cantidad de CD durante el clímax, para posteriormente elevarse al entrar a la etapa adulta, donde n representa al número de animales.

TABLA I

CANTIDAD DE CD EPIDÉRMICAS CLASE II+ DURANTE EL DESARROLLO DEL RENACUAJO DE LA *Rana pipiens*.

Etapa de Desarrollo	Clase II (cel./mm)	ATPasa (cel./mm)	n
Premetamorfosis	13	0	10
Prometamorfosis	58	31	16
Clímax	16	11	9
Postmetamorfosis	34	23	3

De manera interesante, las CD ATPasa+ aparecen hasta la prometamorfosis, sin embargo, se comportan de manera similar a las CD clase II+ en las etapas restantes.

Adicionalmente se realizó inmunohistoquímica para la proteína ácida S-100 (característica diagnóstica de CD en mamíferos), y se encontraron células positivas para este marcador, en algunos de los estadios de la prometamorfosis, en una proporción 1 : 1.2 en relación con las células clase II positivas.

ÓRGANOS LINFOIDES.

El bazo se encontró en todos los estadios analizados, variando el tamaño según es estadio, de forma redonda, localizado al igual que en los adultos en la parte dorsal de la cavidad abdominal, envuelto en peritoneo y cubierto por una cápsula de tejido conectivo, pero no se observaron estructuras del tipo de las trabéculas, así como tampoco se observaron fibras musculares, y escasos vasos sanguíneos (Fig. 7). Aunque en adultos dichas estructuras son fácilmente observables (Pitchhippan, 1980).

El timo se encontró en todos los estadios analizados, exhibiendo médula y corteza bien diferenciada. (Fig. 7) Su localización fue dorsal y posterior al oído en estadios tempranos, para posteriormente migrar a la región ventral de la cabeza.

CD en órganos linfoides.

En el caso del bazo la densidad de células Ia+ fue mayor a la de la piel, además que estas células presentan un aspecto más dendrítico. (Fig. 9), mientras que la densidad de CD no cambió, conforme al desarrollo, como se puede notar en la Tabla II.

Por otro lado la densidad de células clase II+ en el timo fue todavía mayor que en el bazo, pero a diferencia de éste, en el timo sí hubo una disminución de células clase II+ durante el clímax de la metamorfosis, lo cual coincide con la reorganización de dicho órgano (Fig. 9). Cabe destacar que en estos órganos no todas las células con marca son CD sino que también puede haber macrófagos y linfocitos.

TABLA II

CANTIDAD DE CÉLULAS CLASE II+ ESPLÉNICAS DURANTE EL DESARROLLO DEL RENACUAJO DE LA *Rana pipiens*.

Etapa de Desarrollo	Bazo (cel./mm²)	Timo (cel./mm²)	n
Premetamorfosis	331.6	1104.2	10
Prometamorfosis	888.5	1366.7	16
Clímax	1248.3	1090.3	9
Postmetamorfosis	781.3	1097.2	3

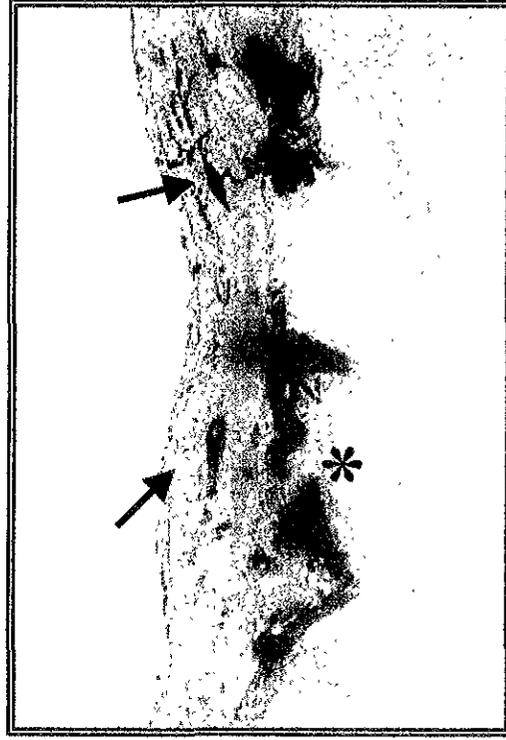
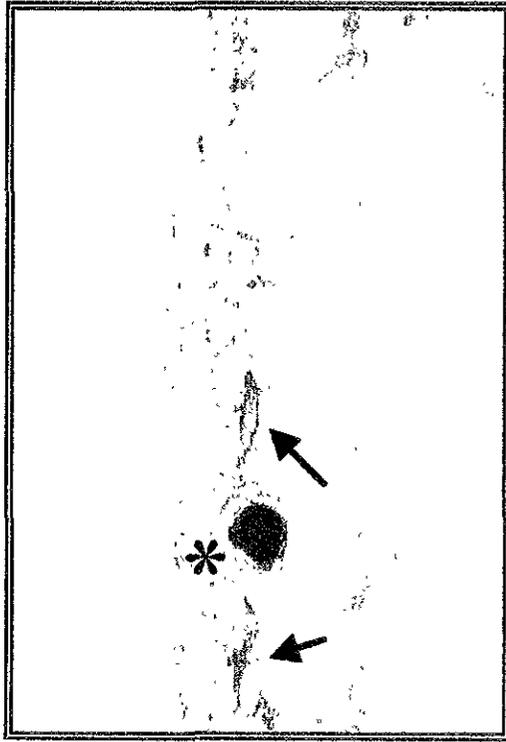


Figura 9. Cortes transversales de piel de la región cefálica, donde se observa la reacción histoquímica enzimática para ATPasa en CD (flechas), los asteriscos señalan a los melanocitos.

HISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA PARA ATPasa EN CORTES POR CONGELACIÓN.

En cuanto a la presencia de la ATPasa en la epidermis de anfibios, nuestras observaciones revelan que las CD ATPasa+ se comportan de igual manera que las CD Clase II+, disminuyendo en densidad durante el clímax de la metamorfosis, pero a diferencia de éstas, nosotros no pudimos encontrar CD ATPasa+ durante la primera etapa de desarrollo (premetamorfosis), como se observa en la Tabla No. I.

Las CD ATPasa+ observadas en la epidermis de estos organismos presentaron una morfología típica, con dendritas bastante largas y una coloración café clara, a diferencia de los melanocitos, cuya coloración va de la café oscura a negra y su tamaño es varias veces más grande que las CD, como se puede apreciar en la figura 10.

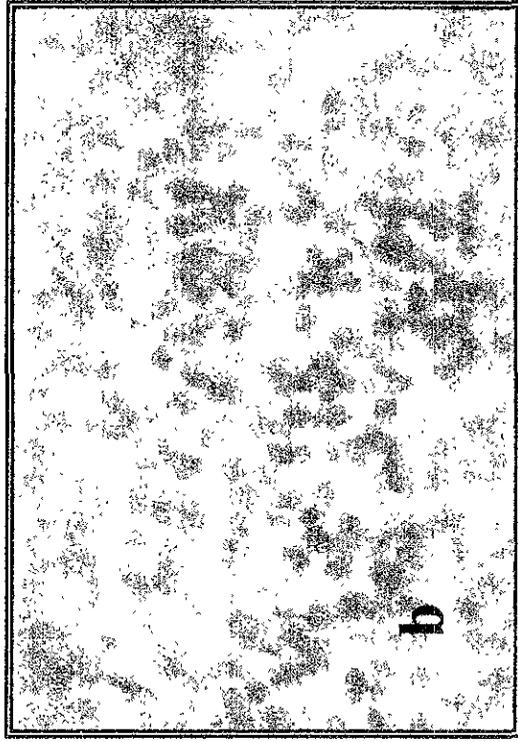


Figura 10. Cortes transversales de timo y bazo, procesados mediante AmeX, donde se observa la reacción inmunohistoquímica para moléculas clase II del CPH en órganos linfoides. a) Timo. b) Bazo.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

En los cortes de piel procesados para MET, se observaron algunas CD, las cuales se pueden diferenciarse de los queratinocitos y melanocitos, por su citoplasma claro, carente de desmosomas y premelanosomas, un núcleo indentado y con cromatina densa en la periferia, pequeñas mitocondrias y vesículas de distintos tamaños.

Al observar a mayor aumento observamos encontramos un organelo parecido al GB, en forma de raqueta.(Fig. 11)



Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión de piel de larva prometamórfica de *R. pipiens*. En el recuadro se observa un acercamiento de un organelo similar al GB.

VIII. DISCUSIÓN.

En los anfibios, durante la vida larval, se dan al menos tres momentos para el desarrollo del sistema inmunológico, antes durante y después de la metamorfosis. En el primero, el timo es el principal órgano linfático, ya que el bazo comienza su crecimiento y maduración más tarde (Horton; 1971). Por otro lado, se ha observado que en *Rana pipiens* durante esta etapa hay una gran actividad inmunológica en la región ventral, sobre todo en la zona de las branquias y en la cavidad oral. Durante esta etapa los organismos son filtradores, por lo que dicha zona está ampliamente expuesta al contacto con antígenos; posteriormente cuando se atrofian las branquias y comienzan a respirar por pulmones, disminuye el número de órganos linfoides, evidenciando que dichos órganos están relacionados con el contacto a antígenos.

En el presente trabajo se planteó como objetivo principal el demostrar la presencia de células homólogas a las CL en las distintas etapas de desarrollo de la *Rana pipiens*, mediante la utilización de las técnicas de histoquímica enzimática para ATPasa e inmunohistoquímica para moléculas clase II del CPH, ya que tanto la ATPasa como estas moléculas son marcadores diagnósticos de las CD.

Como se observó, desde las primeras etapas del desarrollo larval, estadio 26, se encontró que existe una población de células Clase II+/ATPasa- cuya morfología fue desde la redondeada hasta la dendrítica en posición basal o suprabasal, que posteriormente al entrar a la prometamorfosis son células Clase II+/ATPasa+.

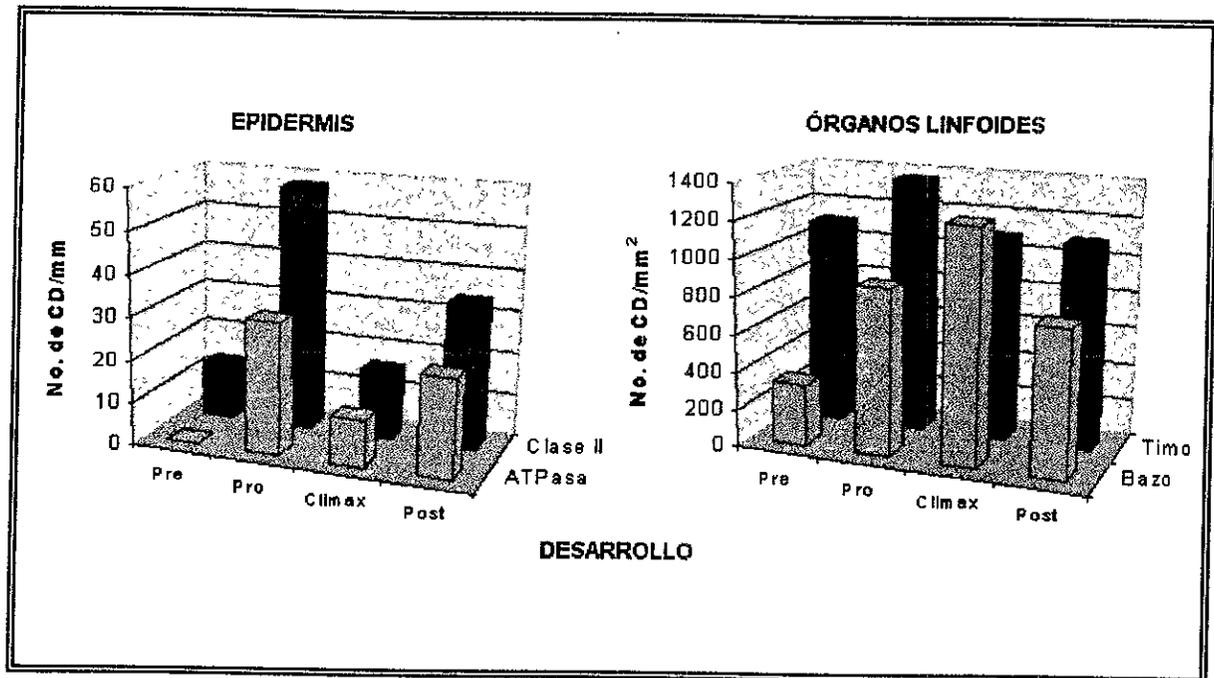
En humanos la aparición de estas células se da durante el desarrollo embrionario, y alrededor de la décima semana después de

la gestación, momento en que el sistema inmunológico todavía no está completamente activado, siendo estas morfológica e inmunológicamente diferentes a las que se encuentran en estadios de desarrollo posterior a la activación del sistema inmune, ya que no sólo son de menor tamaño sino que reaccionan histoquímicamente contra distintos marcadores y en menor potencia. Esta observación corresponde con los resultados encontrados en este trabajo, ya que durante la etapa de premetamorfosis que comprende los estadios 25 a 30 de desarrollo, ya están presentes estas CD, aun cuando el sistema inmunológico de estos organismos no está completamente desarrollado.

Al igual que en humanos, durante el desarrollo larval de estas ranas el número de CD aumenta conforme se desarrolla el sistema inmune, en las ranas el timo es el primer y principal órgano linfopoyético en desarrollarse. Durante la etapa de prometamorfosis, que va del estadio 31 al 40, el sistema inmune está totalmente activo, presentando fuerte actividad de células Ia+, tanto en bazo como en timo, correspondientemente en la epidermis aumenta drásticamente el número de células con características de CD.

Para la última etapa de la vida larval, clímax de la metamorfosis, se esperaría que, de igual modo que sucede en mamíferos, el número de CD aumentara, pero a diferencia de éstos, en los anfibios durante la metamorfosis se da la mayoría de los cambios internos, modificando y sustituyendo a los órganos premetamórficos por los que darán lugar a los órganos de la vida adulta, incluyendo a los del sistema inmunológico, como sucede en el timo, ya que en el clímax de la metamorfosis se da una reducción y posteriormente vuelve a crecer una vez terminada la metamorfosis.

En la gráfica siguiente la línea describe la actividad del sistema inmunológico durante las etapas de desarrollo, notándose una disminución durante el clímax de la metamorfosis, debido a la reorganización de los tejidos y la expresión de nuevos antígenos. De igual manera la densidad de CD se ve disminuida durante esta etapa, tanto en piel como en el timo; a diferencia de estos órganos el bazo continuará creciendo hasta la madurez.



En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio con *R. catesbeiana* y *R. pipiens* se ha observado en láminas epidérmicas que la cantidad de CD ATPasa⁺ es superior a la de CD Clase II⁺, lo cuál es contrario a nuestros resultados. Ésta observación no le hemos podido explicar, sin embargo esto no le resta valor a nuestros datos, ya que se puede apreciar la misma tendencia para ambos marcadores durante el desarrollo de estos vertebrados.

Du Pasquier y Flajnik, (1990), dicen que la expresión de estas moléculas en células no linfoides está concentrada en aquellas zonas que tienen contacto directo con estímulos externos, pero a diferencia de nuestros resultados, ellos afirman que estas células clase II+ no aparecen en la epidermis sino hasta que inicia la metamorfosis, entrando en controversia con nuestros resultados.

Si tomamos en cuenta que durante las distintas etapas de vida larval los renacuajos están expuestos a distintas condiciones podríamos explicar el porque de la presencia de estas células durante las etapas tempranas de desarrollo:

Al iniciar su vida libre los renacuajos se encuentran ampliamente expuestos a antígenos del medio, y de acuerdo con Horton (1971), en esta especie se encuentra una gran actividad linfoide en las branquias y en la cavidad oral durante esta etapa, lo cual está de acuerdo con la observación anterior de Du Pasquier, pero no sólo en esta zona hay exposición a antígenos ambientales, ya que la epidermis esta en contacto con gran cantidad de antígenos, por lo que la presencia de CPA es necesaria. Posteriormente durante la prometamorfosis se activa totalmente el sistema inmune aumentando en los principales órganos linfoides la cantidad de células clase II+, al igual que en la epidermis; pero al entrar al clímax la mayoría de los órganos sufren una transformación, el sistema inmune prácticamente se atrofia, disminuyendo la producción de células mieloides y linfoides durante esta etapa, por lo que en la epidermis debe haber una menor cantidad de CD, además de que la piel se ve modificada substancialmente, presentando un estrato córneo bien desarrollado, al terminar la metamorfosis el timo y bazo vuelven a activarse explicando así el aumento de CD en la epidermis al entrar a la vida adulta.

Por otro lado el hecho de que en estas células se observe a la microscopía electrónica un gránulo similar al GB nos da otro apoyo para homologarlas con las CL de mamíferos, ya que desde que se describió hasta la fecha se considera al GB como principal característica en microscopía electrónica de las CL, sin embargo también está reconocido que el GB no es requisito indispensable en estas células, ya que no en todos los mamíferos se pueden apreciar en igual proporción, mientras que en otras especies no mamíferas en ocasiones se pueden observar. (Pérez, 1995)

Ahora bien, el encontrar dicho gránulo, nos indica que estas células realmente están captando y procesando antígenos, aunque habría que realizar un estudio más detallado al respecto para poder determinar tanto su participación en el procesamiento de los antígenos como la densidad de dichos organelos en cada una de las etapas del desarrollo de estos organismos.

IX. CONCLUSIONES

Por su fenotipo, morfología, localización y apoyándonos en los supuestos anteriores podemos decir que las células clase II+ observadas en la epidermis del renacuajo de la *Rana pipiens* son las homólogas a las Células de Langerhans, que en humanos también aparecen durante las primeras semanas de el desarrollo embrionario.

Otro punto que homologa a estas células clase II+ con las CL de mamíferos es el hecho de que se expresa la enzima ATPasa no sólo en individuos adultos, sino que se encuentra en etapas de desarrollo tempranas, incluso antes de que el sistema inmunológico esté completamente activado, al igual que se ha observado en humanos, así como la presencia de un gránulo parecido al GB.

Interesantemente la expresión de la proteína ácida S-100 en estas CD epidérmicas, indica que efectivamente son CL. Siendo este el primer reporte de CL S-100+ en epidermis de anfibios.

Por otro lado, el porque de la disminución en el número de CD durante el clímax de la metamorfosis, se podría explicar simplemente, porque en esta etapa la actividad del sistema inmunológico de estos organismos está bastante disminuida debido a la reorganización del sistema inmune y a todos los cambios que está sufriendo el organismo, ya que estos cambios como toda la metamorfosis están preparando al individuo a la vida adulta. Pero quizá la mejor explicación sería el cambio de antígenos, o mejor dicho, la expresión de unos antígenos y la supresión de otros, ya que durante esta etapa prácticamente podríamos hablar, de que un individuo se comporta como dos organismos distintos, antes y después de la metamorfosis.

Basándonos en los puntos anteriores podemos concluir que en las larvas de los anfibios (renacuajos) se encuentra presente un SCD bien establecido, el cuál varía en densidad dependiendo de las condiciones ambientales a las que se tenga que enfrentar en cada una de sus etapas de desarrollo, y que al igual que en los mamíferos, este sistema se presenta antes de ser necesitado, como sucede en humanos, donde las CL son funcionales durante el desarrollo embrionario, aunque el embrión no esté en contacto con antígenos externos.

REFERENCIAS:

1. **Atoji, Y., Shirogane, D., Kurono, T., Suzuki, Y., y Sugimura, M.**, S-100-Immunoreactive giant macrophages in lymphoid tissues of the guinea pig, *Acta Anat*, 140:17-25, 1991.
2. **Akhter, N., Kobayashi, M., Hoshino, T.**, Avian epidermis contain ATPase and Ia-positive Langerhans-like cells. *Cell Tiss Res* 271, 103-6, 1993.
3. **Banerjee, T.K. and Hoshino, T.** ATPase-positive and metallophilic cells in the skin of frog *Rana catesbeiana*. *Nag J Med Sci* 47(3-4): 83-90, 1985.
4. **Barrutia, M.S.G.**, Presence of presumptive interdigitating cells in the splen of the natterjack *Buffo calamita*. *Experientia* 41: 1393-4 1985.
5. **Bieber, T., ring, J.y Braun-Falco, O.**, Comparison of different methods for enumeration of Langerhans cells in vertical cryosections of human skin., *Br J Dermatol* 111 (3): 385-92, 1988.
6. **Bigaj and Plytycz**, Interdigitating cells in the Thymus of the frog *Rana temporaria*. *Folia Histochemical et citobiologica*. 24: 65.8, 1987.
7. **Billingham, R.E., and Silvers, W.K.**, Some unsolved problems in the biology of skin, en: Lyne, A.G. and Short B.F.; Eds. Angus & Robertson, *Biology of the Skin and Hair Growth*, Sydney, 1965. en: Schuler, G., *Epidermal Langerhans Cells*, CRC Press, USA, 1991.
8. **Birbeck. M.S., Breathnach, A.S., and Everal, J.D.**, An electron microscopic study of the basal melanocyte and high level clear cell (Langerhans cell) in vitiligo, *J. Invest. Dermatol*, 37, 51, 1961.
9. **Bowers, W.E:, & Goodell E.M.**, Dendritic cell ontogeny, *Proceedings of the 28th Forum in Immunology*, 880-2, 1990.
10. **Braathen, L.R.**, Studies on human epidermal Langerhans cells. III. Induction of T lymphocyte response to nickel sulphate in sensitized individuals, *Br. J. Dermatol*. 103, 517, 1980.
11. **Bradshaw, M., Wachstein, M., Spence, J., and Elias, J.M.**,

- Adenosine triphosphatase in melanocytes and epidermal cells of human skin. *J. Histochem. Cytochem*, 11, 465, 1963.
12. **Breathnach, A.S., and Wyllie, L.M.**, Electron microscopy of melanocytes and Langerhans cells in human fetal epidermis at fourteen weeks, *J. Invest. Dermatol.*, 44, 51, 1965.
 13. **Breathnach, A.S., Poyntz, S.V.** Electron microscopy of pigment cells in tail skin of *Lacerta vivipara*. *J Anat* 100: 549-69, 1966
 14. **Bruijnzeel-Koomen C., y Hoefsmit, E.** Eds., Immunopharmacology of Macrophages and Other Antigen-Presenting Cells., *Academic Press, USA*, 201pp
 15. **Bullok, G.R., and Pestrusz, P.**, Techniques in immunocytochemistry. Edit *Academic Press US* 1982
 16. **Burke, K., and Gigli, I.**, Receptors for complement on Langerhans cells, *J. Invest Dermatol.*, 75, 46, 1980.
 17. **Carr, M.M., Mc Vittie, E., Guy, K., Gawkrödger, D.J., and Hunter, J.A.A.**, MHC class II antigen expression in normal human epidermis, *Immunology*, 59, 223, 1986.
 18. **Carrillo, F.J., Castell, R.A., Pérez, T.A. and Rondan, Z.A.**, Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *J Anat* 176: 1, 1990.
 19. **Carrillo, F.J., Pérez, T.A. and Castell, R.A.**, Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken *Gallus gallus*. *J.Anat.*, 172, 39, 1991.
 20. **Castell, R.A.**, Caracterización morfológica de las células de Langerhans de anfibios. *Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM, México*, 1989
 21. **Castell, R.A., Hernández, P.A., and Rondan, Z.A.**, Nonspecific esterase positive dendritic cells in amphibian. *I.C.E.M. 13-Paris*, 415-416, 1994.
 22. **Cocchia, D., Michetti, F. y Donato R.**, Immunochemical and immunocytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin, *Nature*, 294, 85-7, 1981.
 23. **Chen, H.D., Ma, C., Yuan, J.T., Wang, Y.K., and Silvers, W.K.**, Occurrence of donor Langerhans cells in mouse and rat chimeras

- and their replacement in skin grafts., *J. Invest. Dermatol.*, 86, 630, 1986
24. **De Fraissinete, A., Dezutter-Dambuyant, C., Staquet, M.J., Schmitt, D. and Thivolet, J.**, Epidermal Langerhans cells and cord blood monocyte-like CD1a-positive cells express specific myelomonocytic membrane markers: CD14 and CD33, *J. Invest. Dermatol.*, 92, 429A, 1989.
 25. **Dodd, M.H.I., Dodd, J.M.**, Biology of metamorphosis: Physiology of the Amphibia Vol. 3., Edit. Lofts B., USA.
 26. **Du Pasquier L., & Flajnik M.F.**, Expression of MHC Class II Antigens During *Xenopus* Development, *Developmental Immunology*, 1, 85-95, 1990.
 27. **Du Pasquier, L., and Weiss, N.**, The thymus during ontogeny of the toad *Xenopus laevis*: growth, membrane-bound immunoglobulins and mixed lymphocyte reaction, *Eur. J. Immunol.* 3, 773, 1973.
 28. **Farkuhar, M. y Palade, G.**, Adenosine Triphosphatase localization in amphibian epidermis. *J Cell Biol* 30: 359-379, 1966.
 29. **Ferrerira-Marques, J.**, Systema, sensitivum, intraepidermicum. Die Langerhansschen Zellen als Receptoren des hellen Schemerzes: Doloriceptores, *Arch. Derm. Syph Berlin*, 193, 191, 1951.
 30. **Foster, C.A., Holbrook, K.A., and Farr, A.G.**, Ontogeny of Langerhans cells in human embryonic and fetal skin: expression of HLA-DR and OKT6 determinants, *J. Invest. Dermatol.*, 86, 240, 1986.
 31. **Frelinger, J.G., Hood, L., Hill, S., and Frelinger, J.A.**, Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin., *Nature* 282, 321, 1979.
 32. **Goldstine et al**, Capítulo 8 en: Marchalonis, J.J., Comparative Immunology, Blakwell Scientific, Oxford. 470PP, 1976.
 33. **Hayward, A.R.**, Development of lymphocyte responses and interactions in the human fetus and newborn, *Immunol. Rev.*, 57, 39, 1981.
 34. **Hernández, P.A.**, Identificación de células dendríticas en el bazo

de la rana *Rana pipiens*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 1997.

35. **Holden, C.A., Kerdel, F.A., and MacDonald, D.M.**, Lack of lysozyme, alpha₁-antitrypsin and alpha₁-antichymotrypsin in normal Langerhans cells: Differentiation from cells of the monocyte-histiocyte-macrophage series, *Acta Dermatovener. (Stockholm)*, 62, 513, 1982.
36. **Horton, J.D.**, Ontogeny of the immune system in amphibians, *Am. Zoologist*, 11, 219, 1971.
37. **Juhlin, L. y Shelley, W.B.**, New staining techniques for the Langerhans cell. *Acta Dermatovener* 57: 289-296, 1977.
38. **Katz, S.I., Tamaki, K., and Sachs D.H.**, Epidermal Langerhans cells are derived from cells which originate in the bone marrow, *Nature* 282, 324, 1979.
39. **Klareskog, L., Malmnäs-Tjerlund, U.M., Forsum, U., and Peterson, P.A.**, Epidermal Langerhans cells express Ia antigens, *Nature*, 268, 248, 1977.
40. **Kreibich, C.**, Nervenzellen der Haut, *Arch. Derm. Syph. (Berlin)*, 124, 487, 1917.
41. **Langerhans, P.**, Über die Nerven der menschlichen Haut, *Virch. Arch. Path. Anat.*, 44, 325, 1868.
42. **Masson, P.**, Pigment cells in man, *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 4, 15, 1948.
43. **Millan, A.D.**, Caracterización morfológica de las células de Langerhans en la tortuga terrestre *Kinosternum integrum*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 1996.
44. **Monti, M., Cusini, M., Buscaglia, M., Serri, R., Motti, S., and Caputo, R.**, T6 and Ia positive dendritic cells in 2nd trimester foetal skin (abstr) *J. Invest. Dermatol.*, 84, 442, 1985.
45. **Natali, P.G., Russo, C., Ng, A.K., Nicotra, M.R., Apollong, C., Pellegrino, M.A., and Ferrone, S.**, Ontogeny of human Ia antigens, *Cell. Immunol.*, 73, 385, 1982.
46. **Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P.A., Carballido, J., Picker, L.J. y Lund-Johansen, F.**, Dendritic cell ontogeny: A human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc*

ESTO ES UN LIBRO
DE LA BIBLIOTECA
Nº 17 DE 1975

- Nat Acad Sci USA*, 1997, 94, 12551-6.
47. **Perez, T.A., Castell, R.A., Antuna, S., y Carrillo, J.**, Células de Langerhans epidérmicas en el pollo domestico *Gallus gallus*, XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Oro. México, 1988.
 48. **Pérez T.A. y Millan, A.D.**, Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis, *J Anat* 184,591-6, 1994.
 49. **Pérez, T.A., Millan, A.D., Rondán, Z.A.**, Epidermal Langerhans cells in the terrestrial turtle *Kinosternum integrum*, *Dev. Com. Immunol.* 3, 225, 1995.
 50. **Peters, J.H., Gieseler, R., Thiele, B. y Steinbach, F.**, *Immuno today*, 1996, 17 (6), 273-8.
 51. **Pitchippan, R.M.**, Review on the phylogeny of splenic structure and function, *Developmental and Comparative Immunology*, 4, 395-416, 1980.
 52. **Porter, K.R.**, Herpetology, *Saunders, USA*, 1972 p351-9.
 53. **Reamps, W.M., y Thompkins, S.P.**, A developmental study of murine epidermal Langerhans cells. *Dev Biol* 31: 114-123, 1973.
 54. **Roberts, L.K., Krueger, G.G., and Daynes, R.A.**, Correlation between the inducible keratinocyte expression of Ia and the movement of Langerhans cells in to the epidermis., *J. Invest. Dermatol.*, 134, 3781, 1985.en: Schuler, G.,Epidermal Langerhans Cells, CRC Press, USA, 1991.
 55. **Robins, P.G.y Brandon, D.R.**, A modification of the adenosine triphosphatase method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Tech* 56: 87-9, 1981.
 56. **Romani, N., Lenz, A., Glassi, H., Stössel, H., Stanzi, U., Majdic, O., Fritsch, P., and Schuler, G.**, Cultured human Langerhans cells resembled lymphoid dendritic cells in phenotype and function, *J. Invest. Dermatol.*, 93, 600, 1989.
 57. **Rowden, G., Lewis, M.G., Sullivan, A.K.**, Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells., *Nature*, 268, 347, 1977.
 58. **Sato, Y., Mukai, K., Watanabe, S., Goto, M. y Shimosato, Y.** The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and parafin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J Patol* 125 (3): 341-5, 1986.

59. **Schuler, G.**, Epidermal Langerhans Cells, *CRC Press, USA, 1991*
60. **Shamoto, M., Shinzato, M., Hosokawa, S., Kaneco, C., Hakuno, T. y Nomoto, K.** Langerhans cells in the lymph node: mirror section and immunoelectron microscopic studies. *Virchows Archiv B, 61 (5) 337-41, 1991.*
61. **Shelley, W.B., and Juhlin, L.**, Langerhans cells from a reticuloepithelial trap for external contact allergens, *Nature, 261, 46, 1976.*
62. **Shinzato, M., Shamoto, M., Hosokawa, S., Kaneco, C., Osada, A., Shimizo, M. y Yoshida, A.** Differentiation of Langerhans cells form interdigiting cells using CD1a and S-100 protein antibodies. *Biotech Histochem, 70 (3): 114-8, 1985.*
63. **Silberberg, I., Baer, R.L., and Rosenthal, S.A.**, The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs, *J. Invest. Dermatol., 66, 210, 1976.*
64. **Silberberg-Sinakin, I., Baer, R.L., and Thorbecke, G.J.**, Langerhans cells. A review of their nature with emphasis on their immunologic functions , *Prog. Allergy, 24, 245, 1977.*
65. **Steinman, R.M.**, The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Am Rev Immunol, 9 (271), 96, 1991*
66. **Stingl, G., Katz, S.I., Clement, L., Green, I., and Shavac, E.M.**, Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells, *J. Immunol., 121, 2005, 1978.*
67. **Stingl, G., Wolff-Screiner, E.Ch., Pichler, W.J., Gschnait, F., Knapp, W., and Wolff, K.**, Epidermal Langerhans cell bear Fc and D3 receptors, *Nature, 268, 245, 1977.*
68. **Teunissen, M.B.M.**, Dynamic nature and function of epidermal Langerhans in vitro and in vivo: a review, with emphasis on human Langerhans cells. *Histochem J., 24: 697-716, 1992.*
69. **Watanabe, S., Nakajima, T., Shimosato, Y., Shimamura, K. y Sakuma, J.**, T-zone histiocytes with S-100 proteins. Development and distribution in human fetuses. *Acta Pathol Jpn, 33, 15-22, 1983.*

APENDICE (MATERIAL Y MÉTODOS)

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA MOLÉCULAS CLASE II DEL CPH PARA MICROSCOPIA FOTÓNICA POR EL MÉTODO DE AMeX.

1. Obtención de la muestra.
2. Lavar en solución salina balanceada pH = 7.2 - 7.4
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 a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Aclarar con xilol a temperatura ambiente durante 30 minutos.
8. Incluir en parafina a 60 °C por dos horas.
9. Realizar cortes en parafina de 4 µm.
10. Desparafinar en xilol durante 15 minutos y sumergirlos inmediatamente en acetona.
11. Inhibir peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos.
12. Lavar 3 veces durante 10 minutos con PBS/ASB/Tween.
13. Incubar con anticuerpo primario (AM-20 en dilución 1:20) durante 18 horas a 4°C.

14. Incubar con anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón biotinilado) durante 1 hora a 37°C.
15. Incubar en estreptoavidina-peroxidasa durante 1 hora a 37 °C.
16. Revelar con 3-3' 4-4' Diaminobenzidina tetrahidrocloruro.
17. Lavar con agua corriente.
18. Contrateñir con Hematoxilina de Mayer.
19. Montaje en resina.

Nota: Antes de cada incubación se debe lavar durante 10 minutos, 3 veces con PBS.

HISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA PARA ATPasa EN CORTES DE PIEL POR CONGELACIÓN.

1. Obtención de muestras.
2. Fijar en formol-cacodilatos durante 18 horas a 4 °C.
3. Lavar en solución salina balanceada.
4. Enclaustrar en O.C.T.
5. Obtener cortes por congelación 4µm.
6. Lavar en solución salina balanceada tres veces durante 10 minutos.
7. Incubar en Tris-Maleato durante 10 minutos.
8. Incubar en solución de ATP recién preparada durante 10 minutos a 37°C.

9. Lavar en Agua destilada tres veces durante 10 minutos.
10. Revelar con sulfuro de amonio 1% hasta obtener un color dorado.
11. Lavar con Agua destilada.

SOLUCIONES PARA LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA MOLÉCULAS CLASE II DEL CPH POR EL MÉTODO DE AMeX.

SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA (SSB)

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

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS).

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

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS) ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (ASB) TWEEN 20.

Na ₂ HPO ₄	1.48 g
KH ₂ PO ₄	0.43 g
NaCl	7.0 g
ASB	1.0 g
Tween 20	0.5 ml
H ₂ O dest.	1000 ml

SUSTRATO CROMÓGENO PARA PEROXIDASA CON 3-3' DIAMINOBENCIDINATETRAHIDROCLORURO (DAB).

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

Tomar 9.9 ml de la solución y agregarle 0.1 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, a los 10 ml restantes agregarles 0.005 g de diaminobenzidina. A la que contiene la diaminobenzidina se le agrega 0.1 ml de la que contiene el peróxido de hidrógeno, inmediatamente antes de ser usada.

SUSTRATO CROMÓGENO PARA PEROXIDASA CON 3-AMINO-9-ETIL CARBAZOL (AEC).

Amortiguador de Acetatos.

a) Acido acético Glacial	CH ₃ -COOH	11.55 ml
	H ₂ O dest	1000 ml
b) Acetato de sodio anhidro	CH ₃ -COONa	16.41 g
	H ₂ O dest.	1000 ml
Mezcla:	Solución a)	14.8 ml
	Solución 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 H₂O₂ al 3%..

SOLUCIONES PARA LA TÉCNICA HISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA PARA ATPasa EN CORTES POS CONGELACIÓN.

FORMOL CACODILATOS

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

El Ácido cacodílico se prepara previamente a la solución fijadora

SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA (SSB)

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

TRIS-MALEATO pH 7.2 0.25M

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

SOLUCIÓN DE ATP

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

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