



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA
DE LAS CELULAS DE LANGERHANS
EN LA PIEL DEL BAGRE *Arius seamanii*, Günther.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

PRESENTA:

ABRAHAM AQUINO CARREÑO

DIRECTOR: DR. ARMANDO PEREZ TORRES



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA DE LA QUÍMICA
MEXICO, D.F. 1970



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo profesional.

NOMBRE: ABRAHAM AQUINO

CARREÑO

FECHA: 7 DE JUNIO 2004

FIRMA:

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Identificación y caracterización morfológica de las células de Langerhans en la piel del bagre Arius seamanii, Günther."

realizado por AQUINO CARREÑO ABRAHAM

con número de cuenta 08453174-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Armando Pérez Torres

Propietario

Dra. en C. Patricia Rivas Manzano

Propietario

M. en C. Abraham Kobelkowsky Díaz

Suplente

Dr. Andrés Castell Rodríguez

Suplente

M. en C. Rosario Ortiz Hernández

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

Tesis realizada en:

Laboratorio de Inmunología Comparada de piel y mucosas del Departamento de Biología Celular y Tisular; Facultad de Medicina, UNAM, México, D. F.

Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Carrera de Biología, Instituto de Ciencias Biomédicas de la UACJ, Cd. Juárez, Chih.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue apoyado por la Dirección General de Investigación y Postgrado (DGIP) de la UACJ, Cd. Juárez, Chih.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. en C. Armando Pérez Torres

Por la confianza depositada, por los conocimientos transmitidos, por su invaluable apoyo y el tiempo invertido en la revisión y corrección del presente trabajo, con el único propósito de mi superación profesional, siendo para mí un ejemplo de dedicación en el arduo trabajo científico.

Al equipo del Laboratorio de Inmunología Comparada de piel y mucosas del Departamento de Biología Celular y Tisular; Facultad de Medicina, UNAM, por su disposición incondicional a apoyarme en este proyecto.

Al Dr. Andrés Eliú Castell

Por sus acertados comentarios y su apoyo incondicional durante la elaboración de esta investigación.

Al Dr. Abraham Kobelkowsky D.

Por su disposición y apoyo recibidos, por su valioso tiempo y la experiencia compartida para la identificación taxonómica de los peces utilizados.

A la Dra. Patricia Rivas Manzano

Por sus valiosos comentarios, por su profesionalismo y entusiasta participación en la revisión del presente trabajo.

Al Biol. Héctor Esparza Valencia

Gracias por su apoyo incondicional, por la confianza depositada desde el primer momento.

Al Dr. Eduardo Pérez Eguía

Por todo su apoyo y sus palabras de aliento.

Al M. en C. Raymundo René Rivas Cáceres

Por todo su apoyo en los momentos difíciles, por propiciar y ser participe de mi superación profesional, pero sobre todo por su amistad

A mis maestros, a mis amigos y compañeros de trabajo y de toda la vida:

Biol. Enrique Gutiérrez, Biol. Hilda Pérez, Don José, Don Enrique y Don Antonio Gutiérrez y familiares, Doña Olga Márquez, Dr. Héctor Rivas y familia, Ing. Alberto Borrego, Dra. Florinda Jiménez, Ing. Raúl Quintero, Ing. Ricardo Castillo, Q.F.B. Patricia Olivas, Q.F.B. Leticia Muro, Dr. Rafael Corral, M. en C. Lucio Lozada, M. en C. Claudia Gallardo, Dra. Nelly Diego, M. en C. Rosa María Fonseca, Biol. Francisco Núñez, Biol. Francisco Pasos, M. en C. Martha Ustarroz, Arq. Oscar Nieto, Sra. Esthela Martínez de Calderón y familia

A todos los que en este momento pudiera olvidar, gracias por todo.

DEDICATORIAS

A mis padres

Por su ejemplo de trabajo y dedicación constantes, porque siempre han creído en mi, por su amor, comprensión y cariño incondicionales.

A mis hermanos

Jesús, Gema, Sonia y Emmanuel, por todo el tiempo compartido, deseo seguir siendo merecedor de su cariño

A toda mi familia

A mis queridos abuelos: Papache, Mamá María, Mamá Lola y abuelo Hilarión que está en el cielo, por todas sus bendiciones, tíos, primos, sobrinos, agradecido eternamente por todo su cariño y aprecio.

A Gloria

Por su invaluable ayuda, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por sus palabras de aliento, por el precioso tiempo compartido y por todo lo que significa nuestro amor.

A César y Cecilia

Mis hijos amados, por quienes cada día intento ser mejor.

CONTENIDO

Resumen	1
Abstract	2
Antecedentes generales	3
Antecedentes históricos	3
Las CL como células nerviosas	3
Las CL como melanocitos	4
Las CL como macrófagos	5
Las CL como células inmunocompetentes	6
Las CL como células originadas en la médula ósea	6
Identificación de las CL	8
Microscopía electrónica de transmisión	8
Histoquímica enzimática. Adenosintrifosfatasa (ATPasa)	11
Técnicas inmunohistológicas	11
CL y moléculas Clase I del CPH	12
CL y moléculas Clase II del CPH	12
CL y los antígenos CD1	13
CL y la glucoproteína de membrana DEC-205	14
CL y Langerina	14
Función de las células de Langerhans	15
Antecedentes directos	20
Células de Langerhans en vertebrados no mamíferos	20
Peces	20
Anfibios	21
Reptiles	21
Aves	22
Ubicación taxonómica del bagre <i>Arius seemanii</i> Gunther, 1864	23
Planteamiento del problema	25

Hipótesis	25
Objetivos	26
Materiales y métodos	27
Obtención de muestras	27
Método de separación de láminas epidérmicas	27
Modificaciones al método de separación de láminas epidérmicas	28
Histoquímica enzimática para ATPasa en láminas epidérmicas	29
Soluciones para la técnica de ATPasa en láminas epidérmicas	30
Histoquímica enzimática ultraestructural para ATPasa	32
Soluciones para ATPasa ultraestructural	33
Resultados	34
Método de separación de láminas epidérmicas	34
Modificaciones al método de separación de láminas epidérmicas	34
Histoquímica enzimática para ATPasa en laminas epidérmicas	36
Histoquímica enzimática ultraestructural para ATPasa	39
Discusión	46
Bibliografía	51

RESUMEN

El tegumento de los vertebrados y los órganos linfoides secundarios, constituyen elementos de defensa contra posibles agentes patógenos externos. La integración de este sistema de defensa está determinada por la participación de un inmunocito localizado en los tegumentos, las células de Langerhans (CL). Las CL son células dendríticas (CD) que participan en las respuestas inflamatorias de la piel y mucosas de mamíferos y de otras clases de vertebrados; son importantes inmunoestimuladores mediante su interacción con los linfocitos T, en los órganos linfoides secundarios principalmente. Los trabajos sobre morfología del sistema inmunológico de la piel en los diferentes grupos de vertebrados son escasos y relativamente recientes.

En el presente trabajo, se realizó un estudio histológico y con histoquímica enzimática para ATPasa en láminas epidérmicas separadas y en fragmentos de piel total de la región ventral del bagre *Arius seemanii* Günther, 1864, las cuales fueron observadas con el microscopio óptico y con el microscopio electrónico. Los resultados de las observaciones muestran que la epidermis del bagre es un epitelio plano estratificado sin estrato córneo en el que destacan grandes células eosinófilas suprabasales conocidas como células de alarma y otras fuertemente PAS positivas o células mucosas, así como la ausencia de células pigmentadas. Mediante el procedimiento histoquímico para ATPasa se observaron células parecidas a las CL con prolongaciones citoplásmicas cortas y gruesas lo que les confiere una morfología poliédrica más que dendrítica. El resto de las células epidérmicas no mostraron actividad a la enzima. Los resultados de la histoquímica enzimática ultraestructural mostraron células ATPasa positivas suprabasales, de citoplasma claro, sin desmosomas ni tonofilamentos, con un núcleo indentado y algunas presentaron un organelo similar al gránulo de Birbeck o gránulo de las células de Langerhans. El resto de las células fueron queratinocitos típicos, que no presentaron el producto electrodenso de la reacción enzimática. Otras células observadas tenían características similares a leucocitos polimorfonucleares y a linfocitos.

Los resultados presentados son la primera demostración de la existencia de células de Langerhans en la piel de peces y con ello se completa el conocimiento de su presencia en la piel de todos los grupos de vertebrados.

ABSTRACT

The tegument of vertebrates and the secondary lymphoid organs play an important role in the immune response against external pathogens. The make up of this immune defense system is determinate by an immunocyte localized in the integument, the Langerhans cells (LC). LC are dendritic cells (DC) that participate in the inflammatory response associated to the skin and mucosal membranes of mammalian and other classes of vertebrates. Moreover, LC are important immune stimulating cells by means of their interaction with T-lymphocytes, primarily in the secondary lymphoid organs. The studies of the immune system of the skin of different vertebrates are scarce and mainly recent.

In the present study, epidermis tissue preparations of the ventral region of the catfish *Arius seemanii* Günther, 1864 were carried out and processed for observation in both, optic and electronic microscope. The results of the observations in the skin of the catfish shows that the epidermis is formed by a squamous stratified epithelia without corneous strata, which presents a huge suprabasal eosinophilic cells or alarm cells and other strongly PAS-positive cells called mucous cells. This tissue preparations also showed the lack of pigmented cells in the epidermis. Through the histochemical procedure for ATPase-positive was observed LC-like cells with short and thick cytoplasm prolongations, feature that confers polyhedral morphology, rather than a dendritic morphology. The other epidermal cells did not show any activity in response to the enzyme. The results of the enzymatic ultrastructural histochemistry showed ATPase positive suprabasal cells with clear cytoplasm without desmosomes either as tonofilaments, with a convoluted nucleus and some of them displayed a similar organelle to Birbeck granules or LC granules. The rest of the cells were identified as typical keratinocytes, which did not show the electrondense product of the enzymatic reaction. Other cells that were observed had similar features to polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes.

These results establish the first demonstration of the presence of LC in the skin of fishes and complete the knowlegment of these cells in the tegument in all vertebrate classes.

ANTECEDENTES GENERALES

La piel es el órgano más grande del cuerpo de los vertebrados cuya función como una barrera mecánica de defensa ha sido reconocida desde tiempos pasados. Actualmente, también se le reconocen funciones de osmorregulación, termorregulación e incluso como órgano linfoide primario (Fichtelius 1970). Una idea más amplia al respecto es el concepto de tejido linfoide asociado a la piel (TLAP) que incluye a los linfocitos cutáneos, a las CL, a los queratinocitos y a los ganglios linfáticos regionales que drenan la piel (Streilein 1978). El estudio del TLAP en los diversos grupos representativos de vertebrados, con base en su estructura y función, es todavía incipiente. El abordaje de este tema a través de las CL es muy apropiado para establecer posibles vínculos filogenéticos durante el desarrollo del sistema inmunológico asociado a la piel en los diferentes grupos de vertebrados. Las CL son células dendríticas inmaduras, localizadas estratégicamente en el tegumento de los vertebrados como parte de una barrera entre el organismo y el ambiente, donde desempeñan importantes funciones de "centinelas" del sistema inmunológico. Para ello, las CL forman una red continua de células capaces de captar antígenos (Ag) y haptenos y de migrar hacia los ganglios linfáticos regionales donde llegan como células dendríticas maduras, capaces de presentar fragmentos pequeños de dichos antígenos, asociados a moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH), de manera que puedan ser reconocidos por los linfocitos T (revisado por Jacob & Udey 1999).

Sin embargo, este conocimiento es relativamente reciente. En la actualidad las CL son consideradas como adyuvantes naturales de la respuesta inmunológica y como las células centrales que modulan y determinan la forma de responder del sistema inmunológico.

ANTECEDENTES HISTORICOS

Las CL como células nerviosas. Las CL fueron identificadas en 1868 por Paul Langerhans, quien las describió como "cuerpos negros, los cuales son muy distintos de las células epiteliales" (figura 1), usando impregnaciones con cloruro de oro

desarrolladas inicialmente para la identificación de células del tejido nervioso (Langerhans 1868).

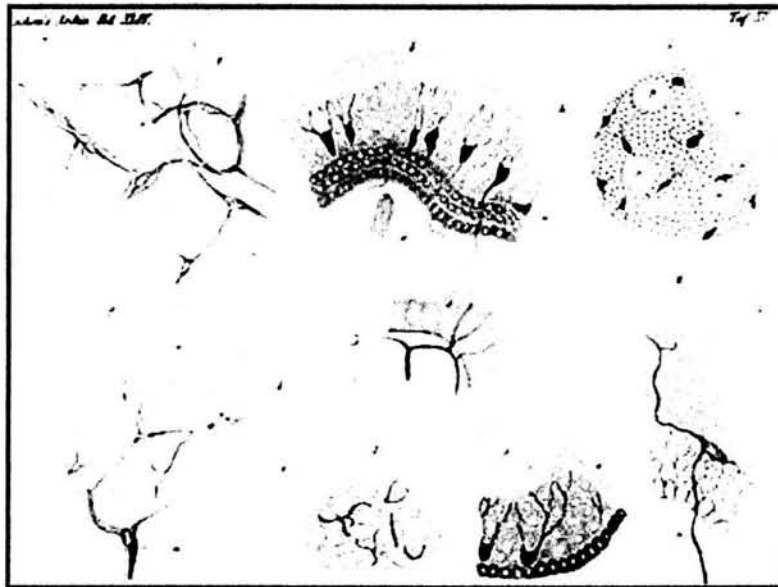


Figura 1.- Dibujo de Paul Langerhans de las células homónimas, publicado en el artículo original de 1868, (tomado de "Epidermal Langerhans Cells, Ed. G. Schuler, CRC Press, 1991).

Desde entonces, el origen y función de las CL han sido motivos de controversia. Inicialmente fueron consideradas células nerviosas y luego melanocitos gastados o inactivos; se pensó que eran artefactos de tinción, ya que las técnicas empleadas para su visualización eran caprichosas y de resultados inciertos. A esto se agregó que las técnicas de tinción de rutina, como la hematoxilina y eosina, no las teñían y por eso muchos investigadores dudaron que las CL realmente existieran. Seguramente todo esto explicaría el porqué se haya escrito tan poco sobre las CL durante mas de medio siglo después de su descubrimiento.

Las CL como melanocitos. Durante un tiempo, las CL fueron conocidas como "células claras suprabasales de Masson" debido a que este investigador propuso que las CL eran "melanocitos gastados, inmaduros o postdivisionales" (Masson 1948, Billingham & Medawar 1953). Como ya se había demostrado que los melanocitos derivaban de las crestas neurales (Rawles 1948), la observación de células dendríticas aureofílicas (es decir CL) en la piel de los primordios de las extremidades de ratones

experimentalmente deprivados de las crestas neurales (Silvers 1957) era una evidencia en contra del origen melanocítico y nervioso de las CL.

Poco después se demostró que las CL presentaban características ultraestructurales de una célula metabólicamente activa y no de una "célula gastada", con un organelo distintivo que al corte era similar a un bastón o a una raqueta de tenis, el gránulo de las CL (GCL) o gránulo de Birbeck (Birbeck *et al.* 1961).

Finalmente, los resultados de los experimentos de deprivación de crestas neurales en ratones fueron reproducidos al identificarse ultraestructuralmente que las CD aureofilicas correspondían a CL (Breathnach *et al.* 1968). Así, transcurrieron 100 años para que las CL adquirieran identidad propia y para que el contenido de las investigaciones tuviera un giro radical.

Las CL como macrófagos. Entre 1965 y 1976 se aportaron evidencias que culminaron con la demostración del origen mesodérmico de las CL; más exactamente, de su origen en la médula ósea. Las primeras evidencias relacionaron a las CL con el sistema fagocítico-mononuclear cuando se descubrió que las células proliferantes en la histiocitosis X (hoy granulomatosis de CL) presentaban un organelo similar al GCL (Basset & Turiaf 1965, Tarnowski & Hashimoto 1967). Casi al mismo tiempo, se demostró, en cortes de piel y en láminas epidérmicas de ratón, que las CL presentaban actividad de esterasa inespecífica y se sugirió que eran macrófagos intraepidérmicos (Campo-Aasen & Pearse 1966) o fagocitos intraepiteliales que se mantienen o renuevan por mitosis o a partir de "histiocitos" dérmicos que atraviesan la membrana basal para entrar a la epidermis (Hashimoto & Tarnowski 1968).

Congruentes con estas ideas fueron las observaciones de que las CL eran capaces de captar materiales antigénicos (Pruneiras 1969). En las reacciones de hipersensibilidad a alérgenos aplicados epicutáneamente, algunas células parecidas a linfocitos establecen contactos estrechos con CL y éstas se incrementan notablemente en los vasos linfáticos, llevando probablemente consigo el alérgeno, y llegando a los linfonodos regionales (Silberberg 1973, Silberberg-Sinakin *et al.* 1978).

Las CL como células inmunocompetentes. La posible función inmunológica de las CL, sugerida por los trabajos de hipersensibilidad por contacto, fue robustecida al demostrarse que estas células captaban sensibilizadores de contacto como algunos metales, aminas y aldehídos, formando un "sistema reticuloepitelial", posiblemente relacionado con el sistema fagocítico-mononuclear (Shelley & Juhlin 1978). Por lo anterior, se propuso que las CL deberían poseer algunos marcadores característicos de las células con funciones inmunológicas conocidas.

A finales de los años 70 se demostró que las únicas células de una suspensión epidérmica que formaban rosetas con eritrocitos cubiertos con IgG (pero no con IgM) y con el componente C3b del complemento eran las CL. La explicación fue que las CL poseían receptores para el fragmento cristalizante (Fc) de la IgG y para el componente C3b del complemento (Stingl *et al.* 1977, Berman & Gigli 1979). Igualmente relevante fue la demostración de moléculas clase II (Ia, HLA-DR) del CPH en las CL (Rowden *et al.* 1977, Klareskog *et al.* 1977, Tamaki *et al.* 1979). Estos resultados fueron interpretados como evidencia de la probable relación ontogénica y funcional entre las CL y los macrófagos, por lo que aquéllas también podrían originarse en la médula ósea.

Las CL como células originadas en la médula ósea. Fue en 1979 cuando Katz, Tamaki y Sachs demostraron que las CL derivaban y eran continuamente sustituidas por células precursoras móviles provenientes de la médula ósea. En sus experimentos se trasplantó piel de un ratón A/J a ratones híbridos F1 (A/J x BALB/c) y después de períodos variables, se determinó la especificidad de los antígenos Ia y H-2 de las células trasplantadas, para 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 antisuero empleado reaccionaba sólo contra el antígeno Ia.B de las CL de ratones BALB/c y de los híbridos F1, pero no con el antígeno 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.B positivas) también se incrementó de un 61 % a los 11 días hasta un 100 % a los 49 días después del injerto. Esto sugería que las CL Ia.B positivas y Fc IgG positivas, presentes en la piel trasplantada, se originaban de células móviles 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 (Katz *et al.* 1979).

Para aclarar esta duda se estudió la especificidad de los antígenos Ia y H-2 en las células epidérmicas de ratones irradiados a los que posteriormente se les injertó médula ósea. A ratones C57B/6 irradiados con 750 R se les transfundieron células de la médula ósea de un ratón BALB/c (sistema alogénico) y a los 62 días después de la quimerización se encontró que más del 45 % de las CL tenían especificidad del donador (BALB/c). En un segundo experimento, ratones B10.A irradiados con 900 R, recibieron intravenosamente células de la médula ósea de un ratón F1 (B10 x B10.A) (sistema semialogénico) y se determinó que a los 85 días de la quimerización, el 80 % de las CL eran del donador de médula ósea (Katz *et al.* 1979, Frelinger *et al.* 1979). Ultraestructuralmente 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 obvia fue que las CL epidérmicas derivaban y eran continuamente repobladas por precursores móviles presentes en la médula ósea trasplantada (Katz *et al.* 1979).

La naturaleza de dichos precursores no fue determinada, especulándose que la célula más probable fuera el promonocito, ya que las CL expresaban marcadores de superficie similares o idénticos a los de las células de la serie monocito-macrófago (Katz *et al.* 1979).

En 1984, Volc-Platzer y colaboradores obtuvieron evidencias del origen de las CL humanas a partir de células presentes en la médula ósea. Una mujer de 19 años de edad con anemia aplásica, secundaria a tratamiento con cloramfenicol, recibió un aloinjerto de médula ósea de su hermano. A los 150 días del procedimiento, la paciente desarrolló un síndrome parecido al liquen plano que progresó hasta una forma esclerodermoide, afectando únicamente la piel. A los 614 días se tomaron biopsias de piel y se procesaron para estudios inmunohistológicos con el anticuerpo OKT6

(específico para CL) y anticuerpo secundario marcado con rojo-Texas. Los cortes de piel también fueron expuestos a mostaza de quinacrina para verlos al microscopio de fluorescencia. Se observó que varias células OKT6 positivas del receptor femenino presentaban cuerpo "Y" en sus núcleos. El cuerpo "Y" es un segmento distal del cromosoma Y que fluoresce brillantemente y es visible después de la tinción de núcleos en interfase y metafase con mostaza de quinacrina (Volc-Platzer *et al.* 1984). La conclusión fue que las CL de la paciente se habían originado de células presentes en la médula ósea que recibió de su hermano, confirmando los primeros estudios en ratones quiméricos sobre el origen de las CL (Volc-Platzer *et al.* 1984).

IDENTIFICACIÓN DE LAS CL

Las CL no se identifican con las técnicas histológicas ordinarias (H&E, por ejemplo). Sin embargo, pueden observarse con impregnaciones metálicas (Langerhans 1868, Gairns 1930, Billingham & Medawar 1953, Silvers 1957, Niebauer *et al.* 1969), microscopía electrónica, histoquímica enzimática, o con técnicas inmunohistológicas. Debido a que las tres últimas son las más empleadas, serán descritas a continuación.

Microscopía electrónica de transmisión. Las características ultraestructurales básicas, principalmente su marcador morfológico distintivo, el gránulo de la CL (Birbeck *et al.* 1961), han permitido demostrar CL en la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas y en otros sitios distintos a la epidermis, como la dermis, los vasos y ganglios linfáticos, el timo y diferentes mucosas. A pesar de que sigue siendo casi enigmático en su origen y función, la gran mayoría de los estudios sobre CL establecen que la característica absoluta para designar a una célula como tal, es la presencia del GCL. Es por ello que se considera que la microscopía electrónica ha dado a las CL su identidad propia.

Además de este organelo, las CL se distinguen entre las células de la epidermis por presentar un citoplasma claro debido a la ausencia de tonofilamentos, desmosomas, melanosomas y a la presencia de un núcleo indentado. La descripción original del GCL los refiere como estructuras lineales con extremos redondeados y

atravesados a todo lo largo y por el centro, por una línea estriada. Más que parecidos a bastones, los GCL semejaban estructuras laminadas o discoideas de 0.3 μm de diámetro, con un arreglo bidimensional de partículas, responsable de la estriación de la línea central (Birbeck *et al.* 1961, Breathnach 1964).

Las observaciones ultraestructurales, derivaron dos hipótesis sobre el origen del GCL. La teoría secretoria postulaba que los gránulos en forma de varilla o bastón se originaban por colapso de las vesículas vecinas al complejo de Golgi (Hashimoto & Tarnowski 1968). La teoría endocítica enfatizaba el origen del GCL a partir de invaginaciones de la membrana plasmática (Breathnach 1964). A partir de aquí, el GCL suscitó numerosos trabajos tendientes a conocer su origen, su estructura y su función. La metodología empleada ha sido muy variada e incluye la microscopía electrónica de transmisión rutinaria (MET) (Breathnach 1964, Wolff 1967) y con trazadores del espacio extracelular (Cancilla 1968, Hashimoto 1970), la MET de cortes seriados y reconstrucción tridimensional (Sagebiel & Reed 1968), la impregnación metálica ultraestructural (Niebauer *et al.* 1969, Rodríguez & Caorsi 1978), la criofractura (Caputo *et al.* 1976), la difracción óptica de la MET (Caputo *et al.* 1976, Runge *et al.* 1981), la microdensitometría ultraestructural (Rodríguez & Caorsi 1978) y la inmunohistoquímica ultraestructural (Takahashi & Hashimoto 1986).

Los resultados estáticos y circunstanciales apoyaban a alguna de las dos teorías aunque la endocítica se consolidó más (Hashimoto 1970, Ishii *et al.* 1984, Takigawa *et al.* 1985, Takahashi & Hashimoto 1986) ya que correspondía más con las funciones, hasta entonces reconocidas, de las CL.

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

endocitosis estaría mediado por lectinas; esta endocitosis, además, era inhibida por el pretratamiento de las suspensiones de CL con una manosidasa (Takigawa *et al.* 1985).

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

La naturaleza exacta de las señales que disparan la formación del GCL es desconocida y aun es debatible si este gránulo juega un papel crítico en la capacidad de las CL para estimular linfocitos. Es vieja también la idea de que el GCL representa solamente un marcador del microambiente epidérmico y que su presencia dependería del grado de queratinización (cornificación) del epitelio donde se encuentren las CL (Hoefsmit 1982). Más recientemente, se ha propuesto que el GCL es un marcador de las vías de diferenciación de las CL a partir de sus precursores circulantes (Mackensen *et al.* 1995, Strunk *et al.* 1996).

Actualmente se ha mencionado que el GCL representa un subdomino del sistema endosomal, en el que se retienen Ag para su procesamiento. La formación del GCL estaría relacionada con la expresión de la proteína Langerina, ya que los fibroblastos que son transfectados con el gene que la codifica presentan GCL, lo que en condiciones normales no ocurre. La disminución del número de GCL durante la maduración *in vitro* de las CL y durante su migración en los vasos linfáticos (maduración *in vivo*) como células veladas apoyan la idea del papel funcional del GCL en la captación, procesamiento, y probablemente presentación de Ag (McDermott *et al.* 2002).

Histoquímica enzimática. Adenosintrifosfatasa (ATPasa). Las primeras demostraciones de la actividad de ATPasa en CL se realizaron en cortes de piel humana (Mustakallio 1962, Jarret & Riley 1962, Bradshaw *et al.* 1963) aunque no fueron discriminadas de otras "células dendríticas de la epidermis", como los melanocitos.

Posteriormente se planteó que las CL eran las únicas células ATPasa positivas de la epidermis del cobayo (Wolff 1964), lo cual fue confirmado ultraestructuralmente al identificar que el producto electrodensito de la reacción enzimática estaba confinado a la membrana plasmática, libre de desmosomas, de células con citoplasma claro que poseían GCL (Wolff & Winkelmann 1967).

A partir de entonces, la demostración histoquímica de ATPasa es considerada como marcador altamente específico para identificar CL epidérmicas (y de mucosas), comparable a la demostración inmunofenotípica de otros marcadores. La técnica es particularmente útil cuando se emplea para demostrar CL en láminas epidérmicas separadas, ya que esto permite cuantificar fácilmente las células ATPasa positivas por mm² y observar su morfología y distribución espacial (Mackenzie & Squier 1975).

Hasta ahora no se conoce cuál es la importancia funcional de la actividad de ATPasa para las CL. La enzima podría ser modificada por factores normales y patológicos y la ausencia de tinción no significaría, necesariamente, ausencia o número menor de las CL (Pérez-Torres *et al.* 1995).

Técnicas inmunohistológicas. Aunque no se conoce la relevancia de ciertos marcadores inmunológicos de las CL, muchos de ellos son moléculas que se usan para identificarlas, otros están involucrados en la función de captar y presentar Ag, algunos son receptores para quimocinas, citocinas y factores de crecimiento o son moléculas que participan en la "conducta" migratoria y de localización ("homing") de las CL.

Como todos los leucocitos, las CL son CD45 positivas (T200, Ly-5, antígeno común leucocitario) y expresan los marcadores mieloides CD13 y CD33, tanto en humanos (Wood *et al.* 1984, Flotte *et al.* 1984, Cooper *et al.* 1985, Romani *et al.* 1989) como en ratones (Haines *et al.* 1983, Leibl *et al.* 1985), mientras que son claramente negativas para CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56.

CL y moléculas clase I del CPH. Como todas las células nucleadas, las CL de humanos (Bronstein *et al.* 1983, Gielen *et al.* 1988) y de algunos murinos (Witmer *et al.* 1988, Lenz *et al.* 1989) expresan moléculas clase I del CPH, las cuales están formadas por una cadena pesada polimórfica y la cadena no polimórfica β_2 microglobulina.

La expresión de estas moléculas podría conferir a las CL la capacidad de presentar Ag a los linfocitos citotóxicos CD8 positivos Ag específicos (restringidos por moléculas clase I), siguiendo una vía de procesamiento de Ag endógenos o citoplásmicos como los Ag virales, tumorales o de parásitos que sobreviven intracelularmente, escindidos por proteosomas multicatalíticos y formándose péptidos que son llevados al retículo endoplásmico (RE) por un transportador asociado con la presentación de Ag. En éste organelo, los péptidos son asociados a las moléculas clase I con la participación de β_2 -microglobulina y, subsecuentemente, este complejo molecular es transportado a través del complejo de Golgi y sale de la red trans-Golgi en la membrana de vesículas de secreción, quedando incorporado a la membrana plasmática donde es reconocido por los linfocitos CD8 positivos (York & Rock 1996).

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

Las moléculas clase II poseen una ranura especial para unir no covalentemente a los péptidos derivados de Ag exógenos. Después de ser sintetizadas en el RE, las moléculas clase II son asociadas no covalentemente a la llamada cadena invariante (CD74) (Claesson-Welsch *et al.* 1986) que está relacionada con prevenir la unión de Ag endógenos con la ranura de las moléculas clase II y con la transportación de éstas a través del complejo de Golgi y la red trans-Golgi hasta el compartimiento endosomal, donde es eliminada por proteólisis y, con ello, permitir la unión de los Ag exógenos captado con la ranura especial de las moléculas clase II. Así se forma un complejo CPH/Ag que es expresado en la membrana celular para ser reconocido por el receptor de células T (TCR) de linfocitos CD4+ Ag específicos (Watts 1997).

CL y los antígenos CD1. En los humanos se ha demostrado que las CL expresan fuertemente una molécula de diferenciación de timocitos: el antígeno T6, identificado originalmente con el AcMo OKT6 (Fithian *et al.* 1981, Murphy 1981), actualmente conocido como CD1a. Ya que CD1a no se expresa en ninguna otra célula de la epidermis, se le considera como el marcador más confiable para identificar CL epidérmicas humanas (Chu *et al.* 1982, Van de Rijn *et al.* 1984, Dezutter-Dambuyant *et al.* 1985), aunque también se ha comprobado que casi todas las CL que son CD1a positivas son HLA-DR positivas y ATPasa positivas (Liu *et al.* 1986).

Las CL humanas también expresan CD1c, pero débilmente (Schmitt *et al.* 1986). La isoforma CD1b no ha sido demostrada en ninguna célula epidérmica pero si en células dendríticas de la dermis (Nestle *et al.* 1993, Lenz *et al.* 1993). Las isoformas de CD1 están relacionadas estructuralmente a las moléculas clase I del CPH, aunque a diferencia de éstas, que son polimórficas y codificadas por el cromosoma 6, aquellas son no polimórficas y están codificadas por el cromosoma 1 (Calabi & Milstein 1986).

La importancia de las moléculas CD1 es que representan una familia nueva de moléculas presentadoras de Ag lipídicos y glucolípidos típicamente encontrados en las paredes celulares bacterianas (Porcelli & Modlin 1999). Esta vía de presentación de Ag involucraría la captación de glucolípidos por receptores de manosa expresados en la CL y luego la liberación de aquellos en el compartimiento endosomal, donde se formaría

el complejo CD1/lípido-glucolípido (Prigozy *et al.* 1997). En los murinos, CD1 presenta una ranura similar a la del CPH pero de naturaleza hidrofóbica, ideal para presentar lípidos hidrofóbicos o glucolípidos a células T (Zeng *et al.* 1997).

CL y la glucoproteína de membrana DEC-205. Las CL de murinos y otras CD expresan una glucoproteína integral de membrana de 205 kDa, el receptor multilectina del tipo C (requiere calcio) llamado DEC-205, que es reconocido por el AcMo NLDC-145 (Kraal *et al.* 1986, Swiggard *et al.* 1995). DEC-205 posee 10 dominios externos contiguos (Jiang *et al.* 1995) con una alta homología con el receptor de manosa de macrófagos (Ezekowitz *et al.* 1990), aunque es hasta 100 veces superior a éste en la función presentadora de Ag (Mahnke *et al.* 2000).

En los humanos, DEC-205 presenta un 77% de homología con su contraparte del ratón y se incrementa su expresión durante la diferenciación y activación de las CD (Kato *et al.* 1998, Guo *et al.* 2000). El receptor DEC-205 sería un receptor tipo lectina con afinidad por residuos de manosa presentes en diversos antígenos bacterianos y parasitarios.

CL y Langerina. Las CL de los humanos no expresan el receptor de manosa de macrófagos, relacionado con la internalización de proteínas antigénicas manosiladas (Mommaas *et al.* 1999); sin embargo, si expresan Langerina, la cual tiene sitios de unión específica para manosa y podría estar involucrada en la internalización y procesamiento de moléculas con manosa (Valladeau *et al.* 2000).

FUNCIÓN DE LAS CELULAS DE LANGERHANS

Las CL son células presentadoras de antígenos a los linfocitos T. Forman parte de una familia de células presentadoras de Ag altamente especializadas, denominadas células dendríticas, las cuales están localizadas en la frontera entre el organismo y el ambiente y son importantes "centinelas" del sistema inmunológico.

Numerosas evidencias obtenidas de estudios *in vitro* e *in vivo* en humanos y en animales fundamentan el concepto de que las CL son potentes estimuladores de la activación de células T. La mayoría de los estudios *in vitro* han empleado co-cultivos de linfocitos T purificados y suspensiones de células epidérmicas totales o enriquecidas de CL (revisado por Jacob & Udey 1999).

Las principales conclusiones de estos trabajos son:

1. Las CL son células presentadoras de antígenos (CPAg) en respuestas antígeno específicas de células T.
2. Las CL son estimuladoras en las reacciones leucocíticas mixtas alogénicas y autólogas.
3. Las CL son células accesorias en respuestas de células T inducidas por lectinas.
4. Las CL son células accesorias en la generación de linfocitos T citotóxicos alorreactivos y hapteno-específicos.

Los hallazgos que fundamentan estas conclusiones son:

- a) Las CL son más eficientes que los monocitos/macrófagos en estas funciones estimuladoras, las cuales son abolidas cuando las suspensiones de células epidérmicas son depletadas de CL.
- b) Las respuestas de células T se incrementan en paralelo con relación al porcentaje de CL presentes en los cultivos enriquecidos de células epidérmicas (Stingl *et al.* 1978, Braathen *et al.* 1980a, 1980b, Braathen & Kaaman 1983, Bjercke *et al.* 1984, Bagot *et al.* 1985, Inaba *et al.* 1986).

Por otra parte, la primera función explorada *in vivo* de las CL fue la hipersensibilidad por contacto (HC). La afinidad especial de las CL por diferentes alérgenos (Shelley & Juhlin 1978) y la estrecha aposición entre CL y linfocitos observada ultraestructuralmente en la piel con HC, sugirió que aquellas podrían jugar un papel importante en la fase inductiva de la HC (Silberberg 1973).

Posteriormente se demostró que la aplicación epicutánea del hapteno dinitrofluorobenceno (DNFB) en sitios naturalmente deficientes de CL, como la cola del ratón y la "bolsa" bucal del hamster, o artificialmente depletados de CL, como la piel irradiada con UV, no inducía HC sino un estado de tolerancia específica inmunológica (Toews *et al.* 1980, Elmetts *et al.* 1983).

Los injertos de piel de ratón tratada previamente con DNFB, sensibilizan a receptores singénicos pero no a los alogénicos, indicando que los requerimientos inmunológicos asociados a la presentación de un Ag y la inducción de HC, se cumplen dentro de la piel misma (Streilein *et al.* 1984). La aplicación subcutánea de macrófagos haptenizados, induce un estado de sensibilización en el receptor mientras que se provoca una tolerancia específica cuando se aplican por vía intravenosa (Ptak *et al.* 1980). Cuando esto último se realiza conjuntamente con suspensiones celulares enriquecidas con CL haptenizadas, no sólo se induce sensibilización, sino que se revierte o se elimina el efecto tolerizador de los macrófagos haptenizados aplicados por vía intravenosa (Ptak *et al.* 1980, Sullivan *et al.* 1986). Uno de los posibles mecanismos de lo anterior es la generación de células T hapteno-específicas capaces de mediar directamente la fase efectora de la HC (Hauser 1990).

A partir de estudios morfológicos se sugirió que después de la aplicación epicutánea de un sensibilizador, las CL salían de la piel para migrar a los ganglios linfáticos regionales (Revisado en Silberberg-Sinakin *et al.* 1978). La evidencia directa de que estas CL migratorias fueran funcionales apareció poco a poco. La aplicación del sensibilizador isotiocianato de fluoresceína (FITC) en la piel de ratones, va seguida de la aparición de células con el fluorocromo en los ganglios linfáticos regionales y dichas células, 18 a 24 h. después de aplicado el hapteno, son capaces de inducir HC cuando se inyectan en el cojinete plantar de ratones singénicos normales (Thomas *et al.* 1980).

Por otro lado, el cultivo de linfocitos singénicos normales con células FITC positivas aisladas de ganglios linfáticos, origina una fuerte respuesta proliferante de linfocitos T citotóxicos hapteno-específicos (Macatonia *et al.* 1986). Las células responsables de estos efectos se caracterizan por ser radiorresistentes (Thomas *et al.* 1980, Okamoto & Kripke 1987), la positivas (Okamoto & Kripke 1987), de morfología dendrítica (Macatonia *et al.* 1986) y algunas poseen el GCL (Macatonia *et al.* 1987).

En otros estudios se ha enfatizado, con evidencias más directas, que las células la positivas/FITC positivas de los ganglios linfáticos se originan en la piel y migran después de la aplicación de un hapteno. En los trasplantes de piel de ratones C3H a ratones BALB/c desnudos sensibilizados con FITC a través del injerto, se ha observado que las células la positivas/FITC positivas aisladas de los ganglios linfáticos, algunas con GCL, son capaces de inducir HC cuando se transfieren a ratones C3H.

Estos resultados permitieron suponer que las CL y las CD de los ganglios linfáticos son diferentes formas o momentos del mismo tipo celular, cuyo fenotipo y características ultraestructurales dependen del microambiente que las rodea. Un hecho esencial surgido de los experimentos anteriores fue la observación de la capacidad migratoria de las CL, monitoreada directamente en láminas epidérmicas obtenidas de aloinjertos, isoinjertos y explantes, en las que se observó que las CL incrementaban "dramáticamente" su tamaño y la expresión de moléculas clase II mientras que su número disminuía a 1/3 del normal a las 24 h de realizado cualquiera de los tres procedimientos mencionados. A ese mismo tiempo, el mayor número de CL se ubicaba en la unión dermoepidérmica; 3 días después, estas células parecen formar cordones asociados a los vasos linfáticos dérmicos, antes de abandonar la piel.

Otro hallazgo interesante del mismo trabajo fue el incremento espontáneo de células migratorias la positivas en el medio de cultivo, mismas que presentaban un fenotipo heterogéneo y una capacidad inmunoestimuladora superior a la de CD esplénicas, sobre todo a los 3 a 5 días de cultivo (Larsen *et al.* 1990).

En piel humana mantenida en cultivo de órganos se han obtenido resultados similares a los anteriores (Lenz *et al.* 1993, Pope *et al.* 1995, Rambukkana *et al.* 1995, Richters *et al.* 1995, Lukas *et al.* 1996). Esto ha permitido postular que la maduración funcional de las CL comienza en la epidermis y continúa durante su migración (o en el

cultivo) y que no necesitan ser totalmente maduras en fenotipo y función antes de abandonar la piel. Lo anterior fundamenta, con evidencia menos circunstancial, la idea de que las CL tienen capacidad de migrar desde la epidermis a los linfáticos dérmicos y de aquí a los ganglios linfáticos regionales, tanto en condiciones normales como de HC.

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

Se sabe muy bien que las propiedades funcionales de las CL están determinadas por diferentes estados de diferenciación, maduración y activación. Así, las CL *in situ* (intraepidérmicas), al igual que otras CD de los órganos no linfoides, poseen una potencia limitada para estimular linfocitos T en reposo vírgenes, pero son altamente eficientes en la captación de Ag (Romani *et al.* 1989).

Aunque los mecanismos implicados no se conocen del todo, las CL son capaces de captar grandes partículas, desde esferas de látex (Wolff & Konrad 1972) hasta amastigotes de *Leishmania major* (Blank *et al.* 1993). Las CL cultivadas o bien después de ciertos estímulos microambientales, pasan por un proceso conocido como activación o maduración de las CL (Schuler & Steinman 1985). Como consecuencia de ello, las CL pierden la capacidad de captar Ag pero adquieren la capacidad de procesarlos y presentarlos y, con ello, estimular a los linfocitos T en reposo vírgenes para el desempeño de funciones cooperadoras y de citotoxicidad.

Los Ag que son presentados por las CL para la inducción de respuestas inmunológicas primarias incluyen aloantígenos (Aberer *et al.* 1982, Inaba *et al.* 1986), haptenos y Ag proteicos solubles (Hauser & Katz 1988, Hauser 1990), Ag tumorales (Grabbe *et al.* 1991, Celluzi & Faló 1997) y microorganismos (Moll *et al.* 1993, Konecny *et al.* 1999).

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

La función inmunoestimuladora de las CL ha sido estudiada ampliamente hasta el presente y se conoce mucho de los factores moleculares (citocinas, factores de crecimiento, hormonas y péptidos) involucrados en la activación y maduración de estas CD inmaduras de la epidermis. Sin embargo, poco se conoce de las moléculas que mantienen a las CL en su estado inmaduro o que inhiben su migración y con ello, por lo tanto, evitan la expresión funcional de estas células.

Las CL humanas pueden madurar por la acción de LPS, TNF α o IL-1 β , pero la acción de TGF- β 1 (secretado constitutivamente por los queratinocitos y las mismas CL inmaduras) previene esta maduración (Geissman *et al.* 1999). Asimismo, los queratinocitos normales producen pequeñas cantidades de IL-10, misma que se incrementa después de varias dosis bajas de radiación ultravioleta-B y que podría mediar la abolición de la respuesta a la aplicación de sensibilizadores por contacto e inducir tolerancia (Niizeki & Streiling 1997).

En este sentido, IL-10 podría también participar en el mecanismo de evasión inmunológica observado en algunos melanomas (Enk *et al.* 1997). En los humanos, la migración de CL *in vitro* es inhibida por IL-4 a través de la hiporregulación de la expresión del receptor II de TNF (Takayama *et al.* 1999).

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

ANTECEDENTES DIRECTOS

A pesar de que los estudios específicos relativos a la morfología del sistema inmunológico en teleósteos se reducen a unas cuantas especies, actualmente se sabe que los principales tejidos linfoides en estos peces son el riñón, el timo, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas que incluye a la piel, las branquias y al intestino (Press & Evensen 1999). La piel de los peces ha sido revalorada como un sitio en el que se pueden inducir reacciones de HC a extractos alérgicos conocidos (Fletcher *et al.* 1974). Por lo anterior es posible contemplar la posibilidad de encontrar células morfológicamente similares a las CL en los peces, las cuales podrían estar involucradas en las respuestas inmunológicas asociadas a la piel, como ocurre en las otras clases de vertebrados no mamíferos y en mamíferos. En estos, las CL son las únicas CD que poseen la ectoenzima ATPasa dependiente de Ca^{2+}/Mg^{2+} y constitutivamente expresan moléculas clase II del CPH.

Células de Langerhans en vertebrados no mamíferos

Peces. La hipótesis de que la epidermis de los peces óseos podría contener CL se apoya en los descubrimientos de CD en el bazo de la trucha, órgano en el cual se lleva a cabo la hematopoyesis (Zapata 1979; Fänge 1992). Además, la demostración de CL en la epidermis de anfibios, reptiles y en aves, incentiva la búsqueda de CL en la piel de peces.

A pesar de que no existen informes acerca de la presencia de CL en la piel de los peces, se ha especulado que células similares a las CL de los mamíferos podrían ser las responsables de presentar antígenos a los linfocitos en la epidermis de la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Peleteiro & Richards 1985).

La observación histoquímica de CD con actividad de ATPasa dependiente de Mg^{2+} en los elipsoides y en los cúmulos de melanomacrófagos del bazo y en la región anterior del riñón del Salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), (Press *et al.* 1994), probablemente es la primera evidencia de la presencia de CD en peces en zonas de células T. Sin embargo, una evidencia más convincente de la presencia de CD en

peces fue proporcionada a partir de cultivos de suspensiones celulares del bazo de la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Ganassin & Bols 1996). Sin embargo, hasta ahora no existen informes sobre CL en la piel de peces teleósteos.

Anfibios. Los anfibios son vertebrados considerados un puente evolutivo entre los peces y los reptiles, cuyo sistema tegumentario tiene funciones respiratorias, osmorreguladoras, termorreguladoras y de protección física, entre otras. La primera observación de CD ATPasa/ADPasa positivas en la piel de los anfibios se realizó en la epidermis de *Rana pipiens*, *Rana catesbeiana* y *Bufo marinus* (Farquhar & Palade 1966). Aunque fueron consideradas similares a las descritas en los humanos, no se le dio importancia a este hallazgo casi fortuito. En la rana *Xenopus laevis*, también ha sido demostrada la presencia de CD epidérmicas que expresan moléculas clase II del CPH durante una etapa del desarrollo o de la metamorfosis (Du Pasquier & Flajnik 1990). Posteriormente, las CD ATPasa positivas de la epidermis de *Rana catesbeiana* fueron mejor caracterizadas (Carrillo *et al.* 1990) y en *Rana pipiens* se demostró que no sólo la epidermis sino que también el epitelio periférico de la córnea y el de la membrana nictitante contienen CD ATPasa positivas (Castell *et al.* 1999) y células esterasa inespecífica positivas (Castell *et al.* 2001). Alrededor de un 30% de las CD ATPasa positivas de la epidermis coexpresan moléculas clase II del CPH (Castell *et al.* 1999). Las características ultraestructurales de estas CD de los anfibios son similares a las de las CL de los mamíferos; sin embargo, no ha sido posible, hasta ahora, la identificación de un organelo equivalente al GCL.

Reptiles. Una característica distintiva de los reptiles es su piel seca ya que presentan pocas glándulas o definitivamente carecen de ellas. En la piel de los reptiles el epitelio córneo se engruesa y endurece, formándose escamas o escudetes.

Así, la piel de los reptiles parece ser un buen ejemplo de barrera física efectiva entre el medio y el organismo. Tal vez eso explique el poco interés en identificar otros mecanismos de protección relacionados con la inmunidad innata y con la inmunidad adaptativa asociada a la piel de estos vertebrados.

En la lagartija común europea *Lacerta vivipara* se describieron células epidérmicas de la piel de la cola, claramente diferentes de los queratinocitos y de los melanocitos, con todas las características ultraestructurales de las CL, excepto por la

ausencia del GCL. Por lo anterior, se concluyó que estos animales carecían de CL típicas (Breathnach & Poyntz 1966). Por otro lado, se ha demostrado la presencia de CD ATPasa positivas en la epidermis de la piel de la tortuga terrestre *Kinosternum integrum*, que fueron identificadas como CL ya que presentaron todas las características ultraestructurales, incluyendo la presencia de organelos citoplásmicos morfológicamente similares a los GCL (Pérez-Torres *et al.* 1995). Interesantemente, el número de CL en esta especie de tortuga mostró variaciones estacionales, probablemente relacionadas con los patrones de reproducción. Hasta ahora, no existen otros informes de la presencia de CL en las diferentes especies de reptiles.

Aves. La presencia de CL en la piel de las aves había sido negada por algunos investigadores (Reams & Tompkins 1973). Posteriormente, se informó de la presencia de células ATPasa positivas en la epidermis del pollo, pero se consideró que no eran similares a las CL por carecer del GCL (Rowden 1981). Poco después, se demostró que la piel del pollo poseía CD Ia positivas (B-L positivas) similares a las CL de los mamíferos (Hala *et al.* 1984; Wick *et al.* 1984), pero no fueron caracterizadas morfológicamente. La primera demostración formal de la presencia de CL en las aves se realizó en la epidermis del pollo doméstico *Gallus gallus* en donde se observaron CD con características histoquímicas y ultraestructurales similares a las CL, aunque no fueron observados los GCL (Carrillo *et al.* 1991). En un estudio realizado en varias especies de aves, se obtuvieron resultados similares y se corroboró que las CD epidérmicas del pollo y de codornices expresan moléculas clase II del CPH (Akhter *et al.* 1993) aunque no se aportaron evidencias de que las células ATPasa positivas y las Ia positivas de estos animales fueran el mismo tipo celular. Esto se demostró posteriormente al realizarse una doble tinción para ambos marcadores, utilizando láminas epidérmicas (Pérez-Torres & Millán 1994).

La identidad definitiva de las CD de la epidermis del pollo se logró recientemente al demostrarse que poseen organelos morfológicamente similares al GCL (Pérez-Torres & Ustarroz 2001). Estos trabajos se han extendido a las mucosas del pollo y ahora se sabe que los epitelios de la córnea, de la lengua y del esófago contienen CD ATPasa positivas/ moléculas clase II positivas, en las que falta demostrar la presencia de GCL para ser identificadas propiamente como CL (Pérez-Torres *et al.* 2002).

Ubicación taxonómica del bagre *Arius seemanii*

Los peces son la superclase de vertebrados con mayor número de especies. Actualmente se identifican 20,000 especies aproximadamente, de las cuales 50 corresponden a Ciclostomos, unas 535 a peces cartilaginosos y el resto a peces óseos (Torres-Orozco 1991), estos últimos constituyen el grupo de mayor diversidad animal.

Los bagres pueden ser dulceacuícolas o marinos. Se caracterizan por tener el cuerpo sin escamas, una aleta adiposa que sigue a la dorsal, la cabeza deprimida y la boca es inferior y está rodeada de un número variable de barbillas. Los bagres marinos pertenecen a la familia Ariidae. Presentan de cuatro a seis barbillas en el hocico, una aleta adiposa de longitud semejante a la dorsal, y la región occipital está provista de escudos óseos o granulaciones dérmicas (Torres-Orozco 1991). Este último carácter y el tipo de dentición permiten la clasificación taxonómica del grupo. A continuación se presenta la clasificación taxonómica de la especie estudiada en el presente trabajo.

Phylum:	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase:	Pisces
Clase:	Osteichthyes
Subclase:	Actinopterygii
Superorden:	Teleostei
Orden:	Siluriformes
Familia:	Ariidae
Género:	<i>Arius</i>
Especie:	<i>seemanii</i>

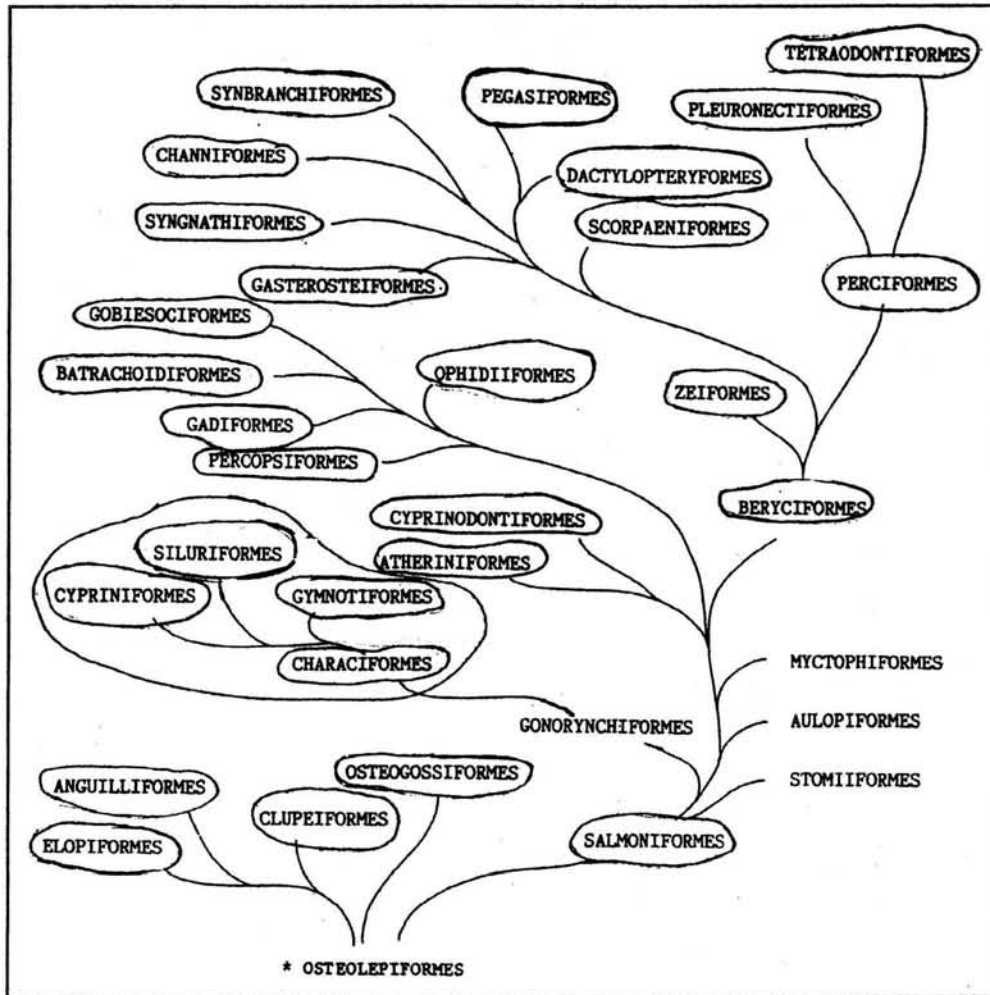


Figura 2.- Árbol filogenético de los teleósteos, (tomado de Vertebrate Paleontology, Romer, A.S. Univ. Chicago Press, 1966).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los bagres son peces teleósteos pertenecientes al Orden Siluriformes, el cual junto con los Cypriniformes (carpas), Gymnotiformes (anguilas eléctricas), y Characiformes, integran el grupo taxonómico denominado Ostariophysii. Este grupo ocupa una posición basal en el árbol filogenético de los teleósteos y por lo tanto intermedia entre los peces cartilagosos o condriictios (tiburones y rayas) y los peces óseos propiamente dichos u osteictios (figura 2). En estos, se ha demostrado que manifiestan respuestas inmunológicas similares a las de otros vertebrados, tales como reacciones de HC contra alérgenos (Fletcher *et al.* 1974) y rechazo a injertos cutáneos, fenómeno dependiente de la disparidad del CPH (Komen *et al.* 1990; Nevid & Meier 1993) y en los cuales se ha involucrado a las CL (Streilein *et al.* 1984). Si consideramos a la piel de estos peces como un sitio de respuestas inmunológicas, innata y adaptativa, el papel de "defensa" deberá estar basado, en parte, en la presencia de CD presentadoras de antígenos, morfológicamente similares a las CL, que vinculen los dos tipos de respuestas (Clark *et al.* 2000; Liu *et al.* 2001; Granucci *et al.* 2003; Reis e Sousa 2004). Por ello, resulta particularmente interesante conocer si existen células parecidas a las CL en la piel de estos vertebrados.

HIPÓTESIS

Si se sabe que los principales órganos linfoides en peces óseos son el riñón, el timo, el bazo y el tejido linfóide asociado a mucosas, como la piel, las branquias y el intestino y además algunas especies de osteictios contienen células dendríticas en el bazo y en la porción anterior del riñón, entonces la piel de estos vertebrados podrían presentar células dendríticas morfológicamente similares a las CL, como ocurre en el resto de los vertebrados.

OBJETIVOS

1. Demostrar la presencia y caracterizar morfológicamente a las células de Langerhans en la piel del bagre *Arius seemanii*, utilizando histoquímica enzimática para ATPasa con microscopía fotónica y microscopía electrónica.
2. Contribuir al conocimiento filogenético de las células de Langerhans en la piel de vertebrados no mamíferos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Por su disponibilidad con los proveedores, se utilizaron ejemplares juveniles de la especie de bagre marino *Arius seemanii* Günther, de entre 10 a 15 cm de tamaño, obtenidos de un acuario comercial. De acuerdo a la descripción taxonómica, realizada por el maestro Abraham Kobelkowsky Díaz del laboratorio de peces de la UAM Iztapalapa, estos animales son originarios del Golfo de México. En general, los animales fueron sacrificados por descerebración el mismo día de la compra o al día siguiente. En este caso, los animales fueron mantenidos en una pecera con agua a temperatura ambiente y con los cuidados sugeridos por el vendedor.

Obtención de muestras. Las muestras de piel, la cual carece de escamas, fueron obtenidas por disección de la región ventral de los ejemplares. Se eligió esta área no pigmentada para disminuir la probabilidad de encontrar melanocitos, los cuales pueden tener un aspecto dendrítico, y así identificar con mayor certeza a las CD ATPasa positivas.

Para el estudio con microscopía fotónica, se cortaron fragmentos de la piel de 1 cm², los cuales fueron fijados en formol amortiguado al 10% durante 24 h y procesados para realizar cortes en parafina de 5 µm y teñirlos con la técnica de hematoxilina-eosina (H-E), para observar la estructura general de la piel, con la técnica de PAS para la demostración de células productoras de moco y membrana basal y con Fontana-Masson para la identificación de melanocitos. Para microscopía electrónica, las muestras de la piel fueron de 10mm x 1mm x 1mm.

Método de separación de láminas epidérmicas. Se probaron algunas modificaciones a los diferentes métodos que han demostrado ser eficientes en la separación de láminas epidérmicas en mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Para el caso de los peces, la separación de láminas epidérmicas se realizó consistentemente con el siguiente método:

1. Fijación en formol cacodilato durante 3 h a 4°C de fragmentos de piel de 2x2 mm

2. Lavados con solución salina balanceada, 3 veces de 5 min cada una.
3. Incubación en solución 20mM de ácido etilendiamino tetraacético en solución salina balanceada (SSB/EDTA), durante 18 h, aproximadamente, a temperatura ambiente.
4. Separación de láminas epidérmicas con el uso del microscopio estereoscópico, dejando las pieles dentro de SSB/EDTA, eliminando, paso a paso, músculo, dermis reticular y dermis superficial. La dermis profunda se identifica como una capa blanca algodonosa y la dermis superficial como un cerrado entramado de fibras con disposición perpendicular entre sí.
5. Lavado de la lámina epidérmica en SSB, 3 veces de 5 min cada uno.

Modificaciones al método de separación de láminas epidérmicas.

1. Una vez obtenidos los fragmentos de piel de 2x2 mm, se dejaron secar al aire para aplicar 1 gota de pegamento de contacto a base de Cyanoacrilato (Kola loka®) en el lado epidérmico de cada fragmento. Inmediatamente después, la piel se colocó entre dos portaobjetos y comprimiéndola suavemente para no dañar el tejido, se dejó secar el pegamento durante 5 a 10 min. Posteriormente, se procedió a la fijación en formol cacodilato por 3 h a 4°C, a los lavados en SSB y a la incubación en SSB + EDTA durante 18 h, a temperatura ambiente.

2. Una variante a este procedimiento fue fijar inicialmente las muestras de piel por 3 h a 4°C y después se hicieron los fragmentos de 2 x 2 mm. Lo anterior fue para darle mayor cohesión a la epidermis, para posteriormente aplicar el pegamento sobre el portaobjetos y comprimir contra éste cada cuadrado de piel. Luego se incubó en SSB + EDTA durante 18 h, a 4°C.

3. Técnica de Tiocianato de Amonio. Los fragmentos de piel de 2x2 mm, fueron incubados en una solución 0.5M de tiocianato de amonio en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.8, se incubaron las muestras durante 20 y 30 min, a 4° C.

4. Incubación en CaCl_2 2M durante 30 a 60 min a temperatura ambiente.

Algunos fragmentos de piel, al final de la respectiva incubación para separar láminas epidérmicas, fueron procesados para hacer cortes en parafina y tinciones con H-E y la técnica de PAS, con el objetivo de tener un control de calidad en las láminas separadas y asegurar que no contenían elementos dérmicos.

La obtención de láminas epidérmicas, en todos los métodos probados, fue realizada con la ayuda de pinzas finas sin dientes o con 2 agujas hipodérmicas, bajo el microscopio estereoscópico.

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

1. Lavado de las láminas epidérmicas en SSB, 3 veces de 5 min cada uno, a temperatura ambiente.
2. Fijación en glutaraldehído al 2% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.4, durante 60 min a 4° C.
3. Lavado en la solución tris-maleato, 3 veces de 5 min cada una, a temperatura ambiente.
4. Incubación en la solución de ATP recién preparada y filtrada, durante 15 min a temperatura ambiente.
5. Lavado en agua destilada, 3 veces de 5 min cada una, a temperatura ambiente.
6. Revelado en sulfuro de amonio al 1%, durante 1 min a temperatura ambiente.
7. Lavado en agua destilada, 3 veces durante 5 min cada una, a temperatura ambiente.
8. Montado de las láminas epidérmicas con el lado dérmico (el más teñido) hacia arriba, utilizando gelatina glicerizada de Kaiser.

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

Soluciones para la técnica de ATPasa en láminas epidérmicas

SSB+EDTA:

NaCl	3.415 g.
KCl	0.10 g.
Na ₂ HPO ₄	0.575 g.
KH ₂ PO ₄	0.10 g.
Agua destilada	500 ml

Solución Tris-Maleato 0.25M, pH 7.2

Tris Salt Buffer	12.10 g.
Ácido maléico	11.60 g.
NaOH	4.0 g.
Agua destilada	400 ml.

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

Solución de Tris-Maleato	10.00 ml.
Agua destilada	12.50 ml.
Mg ₂ SO ₄	2.5 ml.
Pb(NO ₃) ₂	2.75 ml.
Glucosa	1.25 g.
ATP (sal disódica)	0.02 g.

Solución reveladora de sulfuro de amonio al 1%.

Agua destilada	19.8 ml
Sulfuro de amonio	0.2 ml.

Se prepara al momento en campana de extracción.

Gelatina glicerinada de Kaiser

Glicerina	50 g.
Grenetina	7 g.
Ácido Fénico	1 g.
Agua destilada	42 ml.

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

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

Histoquímica enzimática ultraestructural para ATPasa. Para la demostración ultraestructural de ATPasa se empleó la técnica diseñada por Farquhar y Palade (1966), con mínimas variaciones:

1. Obtención de muestras de piel de 10 mm x 1 mm, aproximadamente.
2. Fijación en glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.2, durante 30 min a 4°C.
3. Las muestras fueron cortadas manualmente en fragmentos más pequeños y colocadas en el mismo fijador durante 60 min más a 4°C.
4. Lavado en amortiguador de cacodilato de sodio 0.15M, pH 7.4, adicionando con sacarosa 0.025M y CaCl_2 0.05%, 3 veces durante 10 min cada una, a temperatura ambiente.
5. Incubación en el medio de Robins y Brandon durante 45 min a 37°C.
6. Lavado en amortiguador de cacodilato de sodio 0.15M, pH 7.4 adicionado con sacarosa 0.025M y CaCl_2 0.05%, 3 veces durante 10 min cada una, a temperatura ambiente.
7. Postfijación en OsO_4 al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M, pH 7.2, durante 45 min a 4°C.
8. Lavado como en 6.
9. Deshidratación en alcoholes graduales ascendentes.
10. Infiltración en Araldita 6005-tolueno (1:1) durante 7 días a temperatura ambiente.
11. Polimerización de la Araldita 6005 durante 48 h a 60 °C.
12. Se realizaron cortes de 1 μm y fueron teñidos con azul de toluidina para microscopía fotónica.
13. Los cortes finos se obtuvieron con cuchilla de diamante, contrastados con acetato de uranio al 2% durante 10 minutos.
14. Se realizaron 10 cortes seriados de 20 células dendríticas epidérmicas claras, de muestras controles y de las incubadas en ATP, con el fin de identificar un organelo similar al GCL.
15. Observación con el microscopio electrónico Zeiss EM-109.

Soluciones para ATPasa ultraestructural

Amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M, pH 7.2

Ácido cacodílico	0.2M	100 ml.
HCl	0.2M	5.4 ml.

A partir de esta solución se realizaron las diluciones necesarias.

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

Ácido cacodílico	0.15M	100 ml.
HCl	0.15M	5.4 ml.
Sacarosa		0.855 g.
CaCl ₂		0.05 g

RESULTADOS

Método de separación de láminas epidérmicas. La separación de láminas epidérmicas de la piel del bagre fue el procedimiento más crítico. La obtención de láminas epidérmicas se logró empleando SSB + EDTA como medio de incubación durante 18 h a temperatura ambiente, en los fragmentos de piel previamente fijados en formol cacodilato durante 3 h a 4 °C.

Modificaciones al método de separación de láminas epidérmicas. Los resultados obtenidos utilizando el pegamento de contacto Cyanoacrilato (Kola loka[®]) en sus dos variantes, no fueron satisfactorios, ya que éste no presentó una adherencia homogénea en toda la superficie epidérmica, por lo que al tratar de separarla se obtuvieron láminas fragmentadas y de grosor irregular.

Un tercer método probado fue la incubación de fragmentos de piel de bagre en una solución 0.5M de tiocianato de amonio en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 6.8. Con esta técnica se obtuvieron láminas epidérmicas completamente separadas, con un grado aceptable de calidad, aunque en muchos casos esta sustancia llegó a destruir la propia epidermis, razón por la que se descartó su uso.

La incubación con SSB/EDTA permitió la separación de la epidermis completamente libre de componentes dérmicos (Figura 3b). La piel del bagre teñida con H-E y observada al microscopio óptico presentó el patrón histológico siguiente: la epidermis es un epitelio plano estratificado sin estrato córneo, en el que destacan grandes células eosinófilas suprabasales que corresponden a las llamadas "células de alarma" o "células de sustancias de alarma" (Henrikson & Matolsty 1968; Yoakim & Grizzle 1982; Chapman & Johnson 1997). Otra población de células observadas fueron PAS positivas, localizadas desde el estrato basal hasta la superficie donde liberan su secreción y que corresponden a las células de moco o mucosas (Figuras 3a-d). No se observaron melanocitos o células pigmentadas en los estratos epidérmicos pero si en la dermis superficial, por debajo de la membrana basal (Figura 3a).

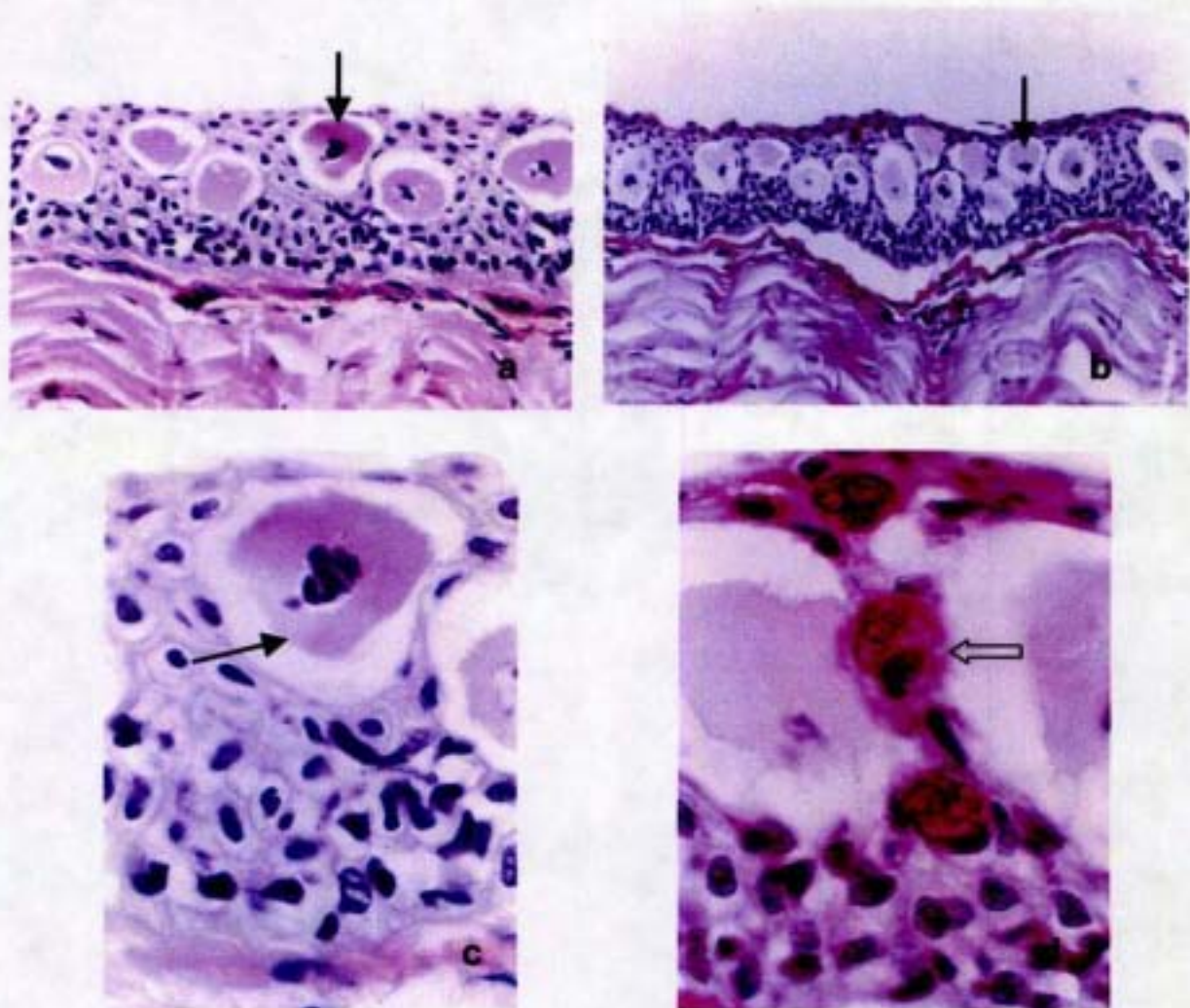


Figura 3a-d. Cortes de piel del bagre *Arius seemanii*. La epidermis es un epitelio plano estratificado sin estrato córneo en el que destacan grandes células eosinófilas suprabasales conocidas como células de alarma (flechas negras, a-c); otras células fuertemente PAS positivas (d, flecha) se localizan desde el estrato basal hasta la superficie y cuya secreción mucosa es vertida en la superficie. En la epidermis no se observaron células pigmentarias, siendo visibles en la dermis superficial (a). En un corte de piel incubada en SSB-EDTA (b) se observa el plano de separación dermoepidérmica. a (200X) y c (1000X), tinción con H & E; b (200X) y d (1000X) tinción con PAS.

Histoquímica enzimática para ATPasa en laminas epidérmicas. Con esta técnica se demostró la presencia de células ATPasa positivas de aspecto poliédrico (Figuras 4a-d y Figuras 5a-d), distribuidas alrededor y debajo de los espacios claros ocupados por las células de alarma (Figura 6a-d). Las células ATPasa positivas no fueron cuantificadas debido a que forman cúmulos muy densos. Estos resultados fueron constantes y no mostraron cambios estacionales. Las células epiteliales no presentaron actividad de ATPasa y se distinguieron claramente de las ATPasa positivas. (Figura 7a-b).

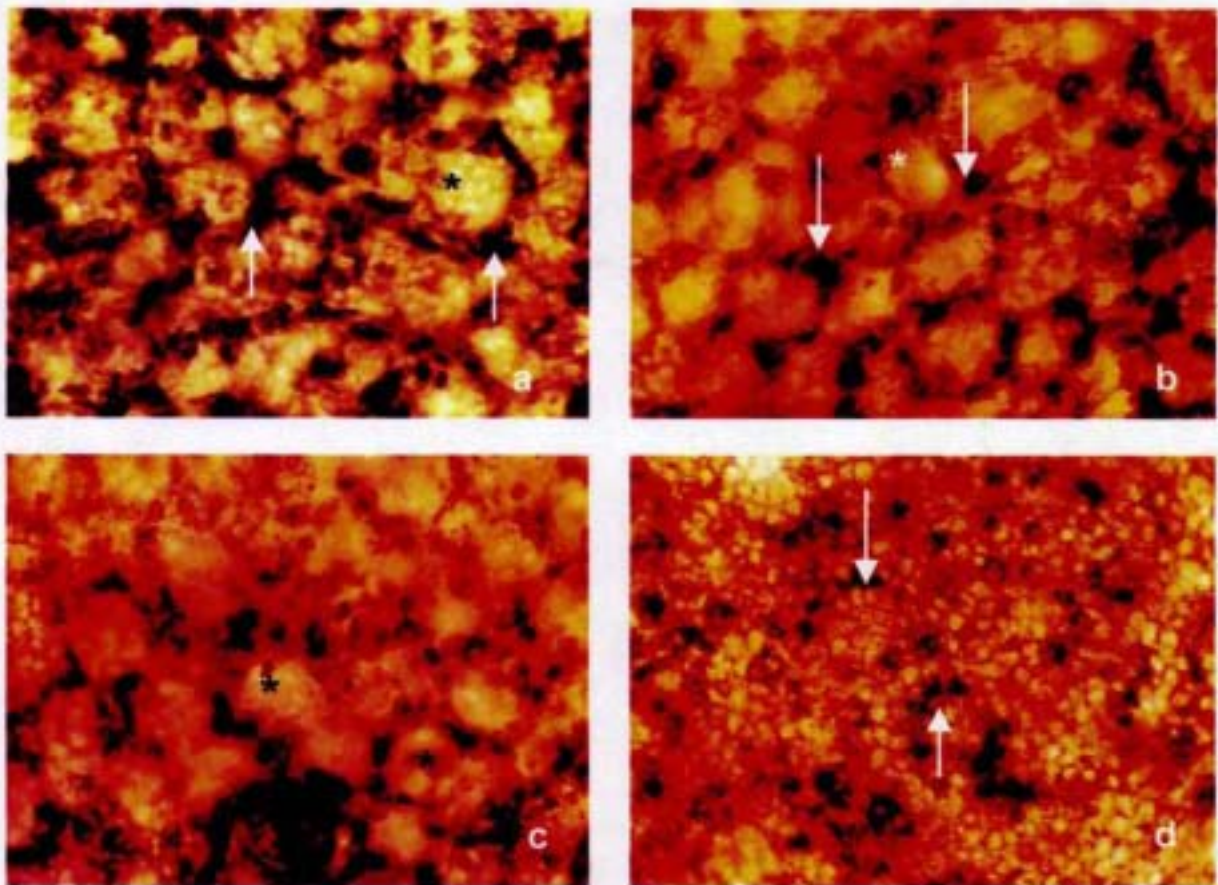


Figura 4a-d. Histoquímica enzimática para ATPasa en láminas epidérmicas del bagre *Arius seemanii*. Obsérvese la presencia de células ATPasa positivas (flechas) alrededor del sitio que ocupan las células gigantes acidofílicas o células de alarma (asteriscos). El resto de las células epidérmicas no muestran actividad a la enzima y forman un fondo amarillo dorado. a – d = 200X

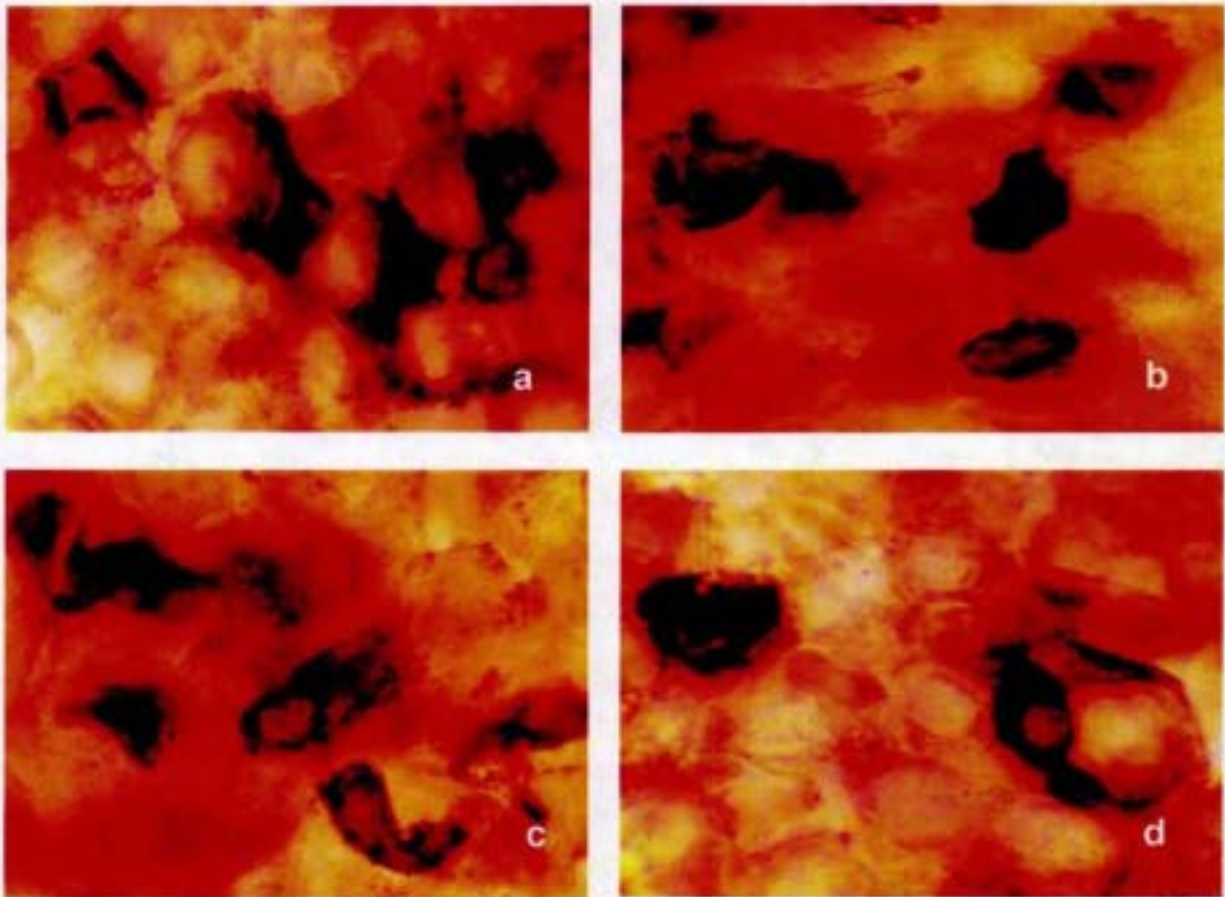


Figura 5a-d. Histoquímica enzimática para ATPasa en láminas epidérmicas del bagre *Arius seemanii*. Las células ATPasa positivas parecidas a las células de Langerhans, poseen prolongaciones citoplásmicas cortas y gruesas lo que les confiere un aspecto poliédrico más que dendrítico. El resto de las células epidérmicas claramente no muestran actividad de la ATPasa. Las láminas epidérmicas controles no mostraron células pigmentarias. Todas las imágenes a 1000X.

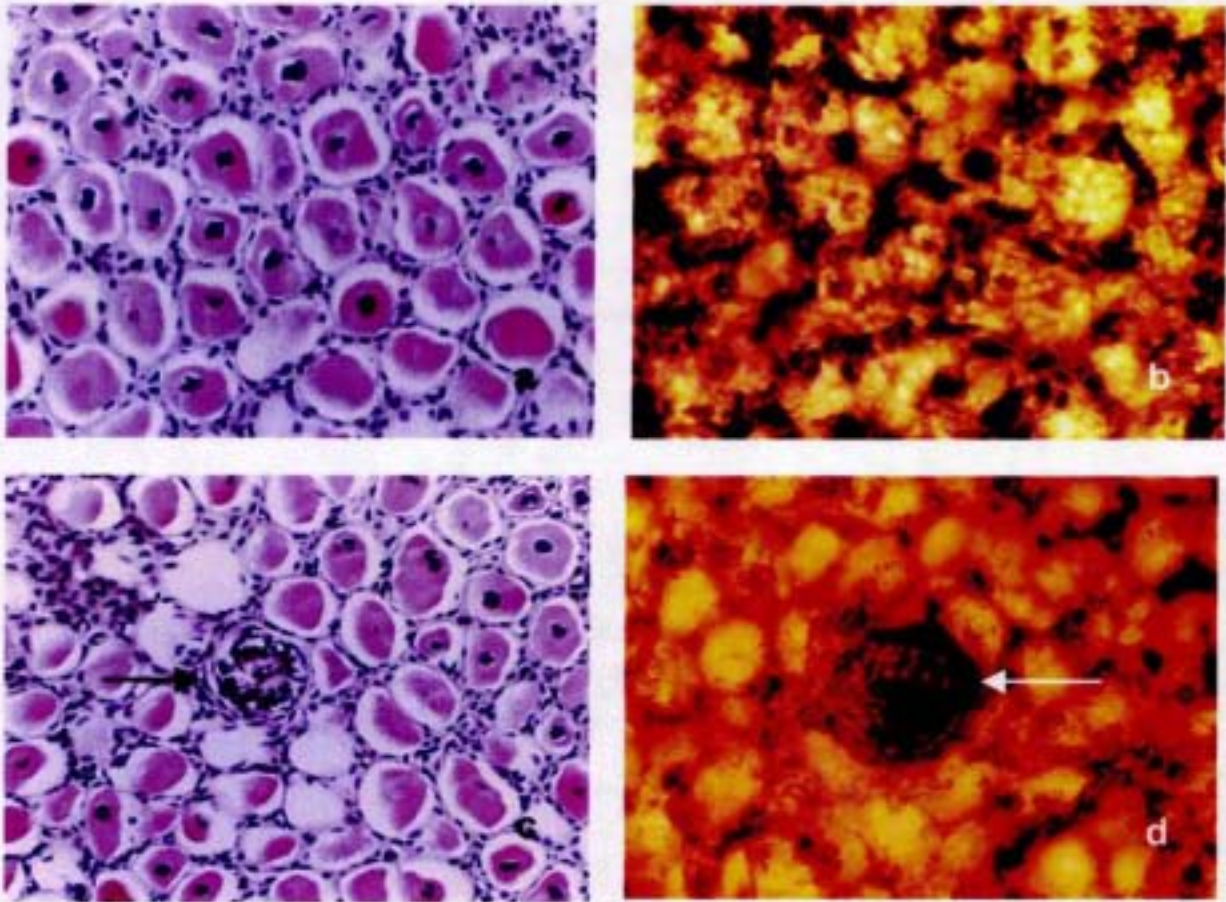


Figura 6a-d. Cortes tangenciales de epidermis teñidas con H & E (a, c) y láminas epidérmicas con histoquímica enzimática para ATPasa (b y d) del bagre *Arius seemanii*. Obsérvese que las células gigantes acidófilas o células de alarma ocupan gran parte de la superficie epitelial. Alrededor y por debajo de estas células se distribuyen las células ATPasa positivas. Frecuentemente se observaron estructuras intraepiteliales que pueden corresponder a neuromastos (Abate *et al.* 2002) (c y d flechas) los cuales son fuertemente ATPasa positivos. a – d 200X.

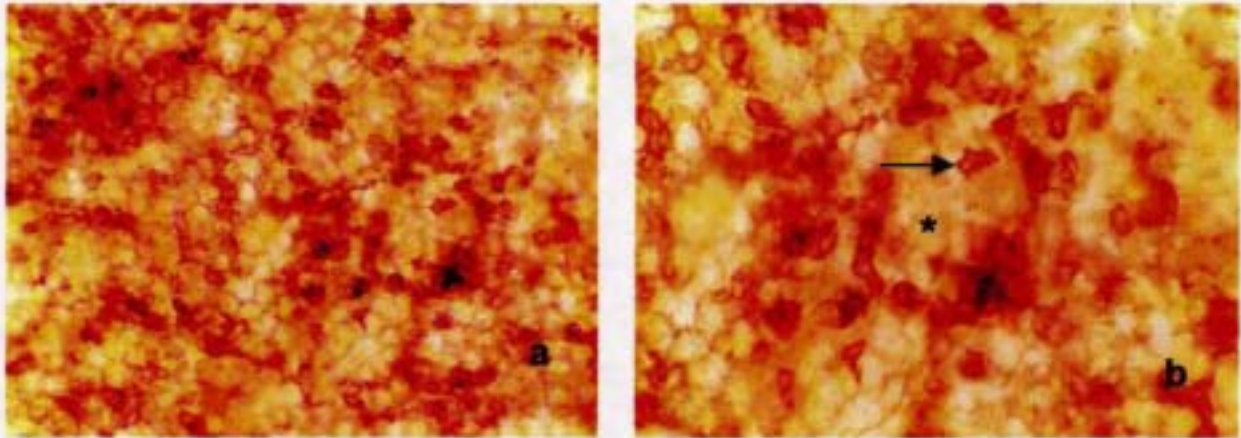


Figura 7a-b. Láminas epidérmicas del bagre *Arius seemanii* con histoquímica enzimática para ATPasa, incubadas en el sustrato durante 15 minutos. La distribución, morfología y densidad de las células ATPasa positivas son idénticas a las observadas con tiempos de incubación de 1 h (Figuras 4 y 5). La tinción de fondo es muy escasa, lo que permite observar células ATPasa positivas subyacentes (b, flecha) al sitio que ocupan las células de alarma (asterisco). a = 200X, b = 400X.

Histoquímica enzimática ultraestructural para ATPasa. La microscopía electrónica de transmisión de piel de bagre y procesadas para ATPasa, demostró, de manera convincente, la presencia de células dendríticas y poliédricas ATPasa positivas, ubicadas suprabasalmente, con un precipitado electrodenso depositado en la membrana plasmática. Se diferenciaron de los queratinocitos por presentar un citoplasma claro, sin tonofilamentos, desmosomas y melanosomas (Figuras 8a, 8b y 9). El perfil de estas células fue irregular debido a la presencia de extensiones citoplásmicas interdigitadas con los queratinocitos de la región basal y suprabasal. No se observaron células parecidas a melanocitos. Algunas células parecidas a granulocitos y a células linfoides se localizaron en la vecindad de las células dendríticas ATPasa positivas (Figura 8a).

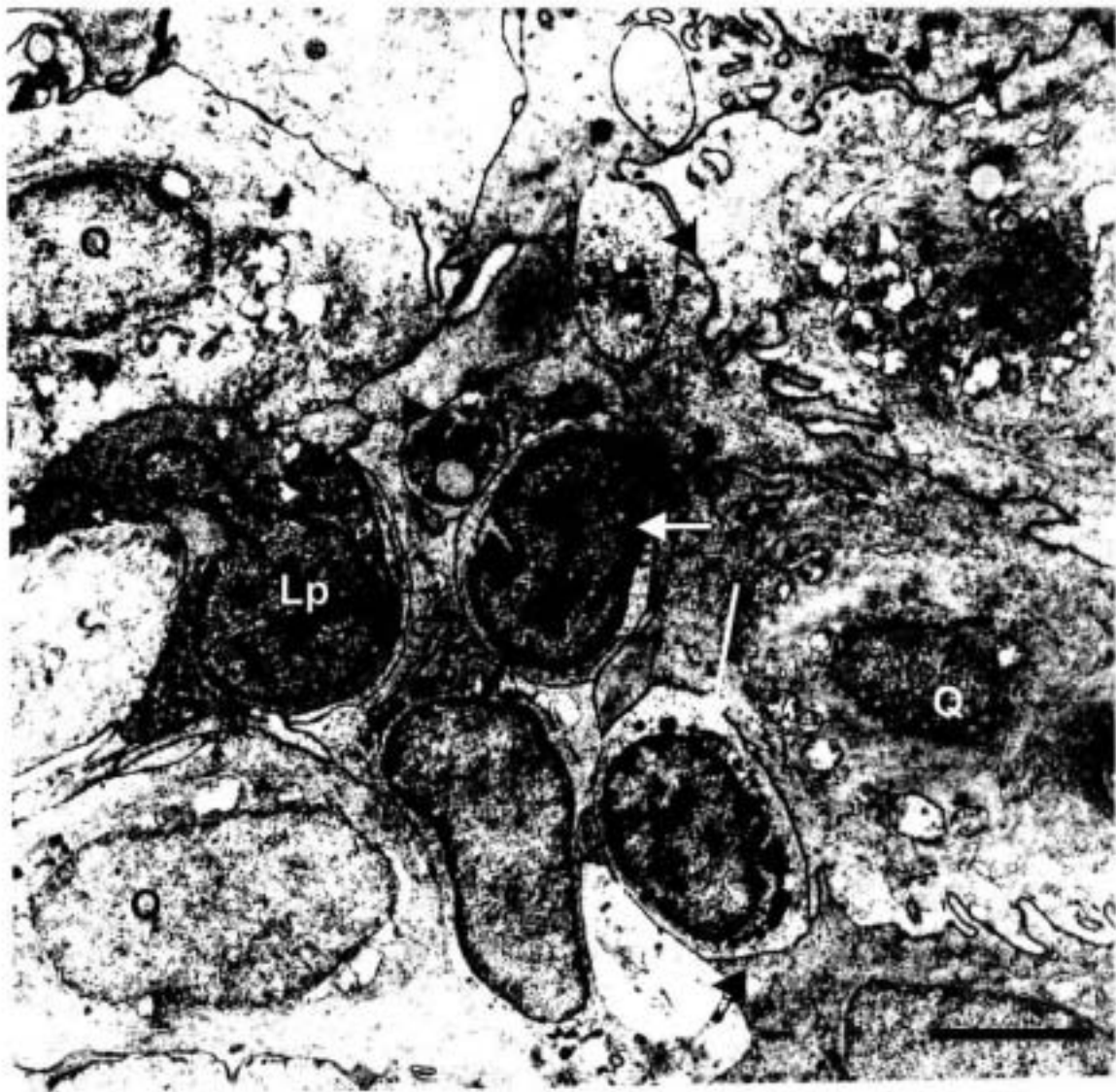


Figura 8a. Histoquímica enzimática para ATPasa ultraestructural en la piel del bagre *Arius seemanii*. Se observan células ATPasa positivas suprabasales, de citoplasma claro, sin desmosomas ni tonofilamentos y con un núcleo indentado (flechas). Las masas de citoplasma con organelos parecidos a lisosomas y cercanas a las células ATPasa positivas podrían corresponder a las prolongaciones dendríticas cortas (cabezas de flecha) observadas en las láminas epidérmicas. El resto de las células son queratinocitos típicos (Q), que carecen del producto electrodenso de la reacción enzimática, al igual que otras células parecidas a leucocitos polimorfonucleares (Lp), observadas frecuentemente. Barra= 10 μ m.

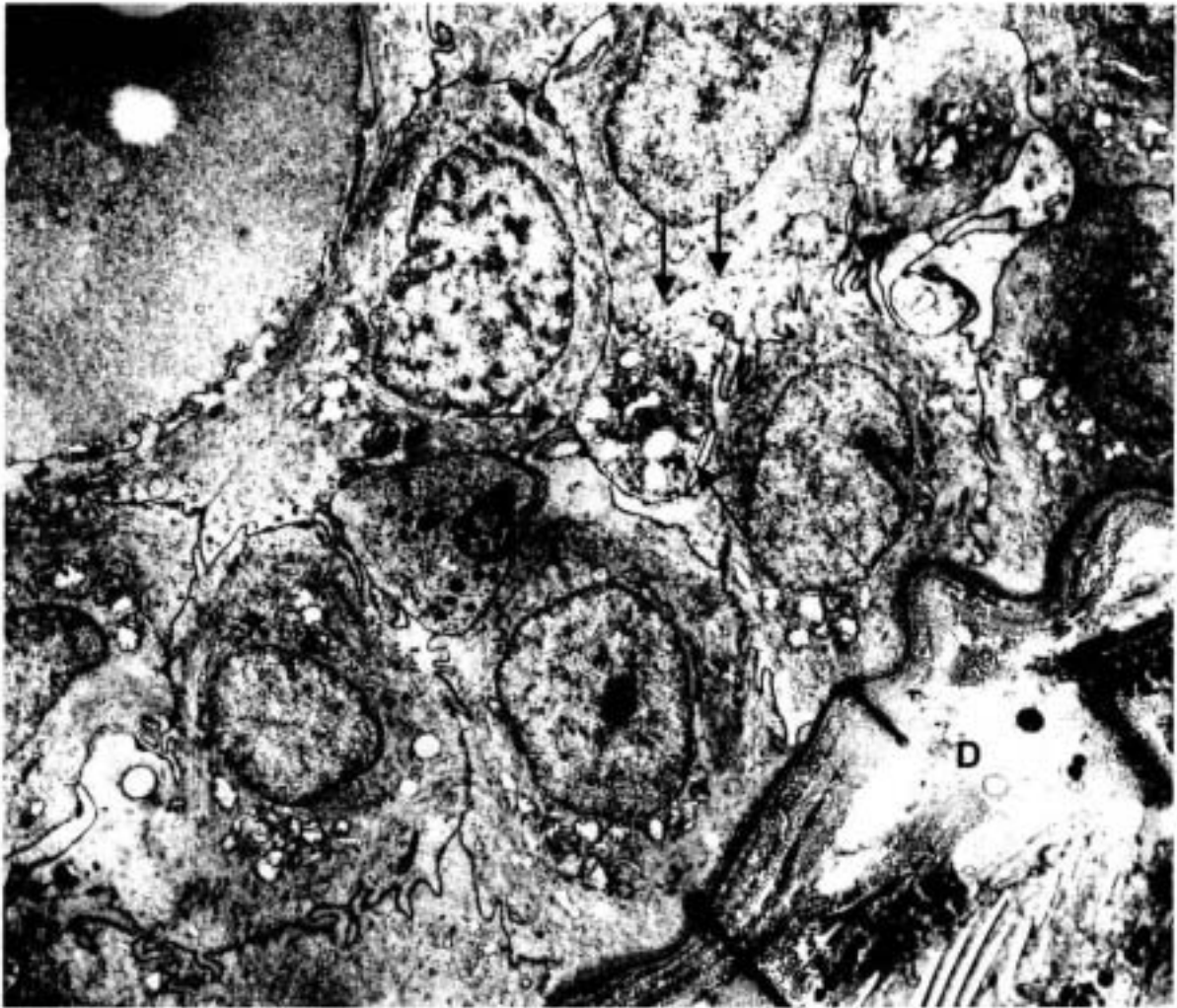


Figura 8 b. Histoquímica enzimática para ATPasa ultraestructural en la piel del bagre *Arius seemanii*. La imagen corresponde al estrato basal y suprabasal de la epidermis, subyacentes a las células gigantes acidófilas o células de alarma (*) observadas en los cortes histológicos (Figuras 3 y 4). Nótese la presencia de una prolongación citoplásmica (flechas), con trazas del producto electrodenso de la reacción enzimática en la membrana plasmática; contiene vesículas claras, lisosomas y lo que puede corresponder al corte longitudinal y tangencial de organelos parecidos al gránulo de las células de Langerhans (ver aumento en Figura 13). En el ángulo inferior derecho se observa la lámina basal y la dermis superficial (D). Barra= 5 μ m.



Figura 9. Micrografía electrónica de piel de bagre *Arius seemanii* procesada para la demostración histoquímica de ATPasa. Se observa una célula dendrítica ATPasa positiva, con el producto de la reacción enzimática depositado en la membrana plasmática y en la cubierta nuclear. El citoplasma es claro, debido a la ausencia de tonofilamentos y melanosomas. El núcleo es indentado y no hay uniones tipo desmosomas con los queratinocitos vecinos. Barra= 2 μ m.

Estas células ATPasa positivas mostraron un núcleo redondeado e indentado (Figuras 9 y 10). En diferentes micrografías electrónicas se observaron células dendríticas suprabasales ATPasa positivas con numerosos organelos que probablemente corresponden a lisosomas (Figura 11).



Figura 10. Micrografía electrónica de la piel del bagre *Arius seemanii*, procesada para la demostración histoquímica de ATPasa. Se observa una célula dendrítica ATPasa positiva con citoplasma claro, carente de tonofilamentos, desmosomas y melanosomas. Algunos queratinocitos vecinos presentan depósito de material electrodenso similar al de la célula dendrítica. Barra= 2 μ m.

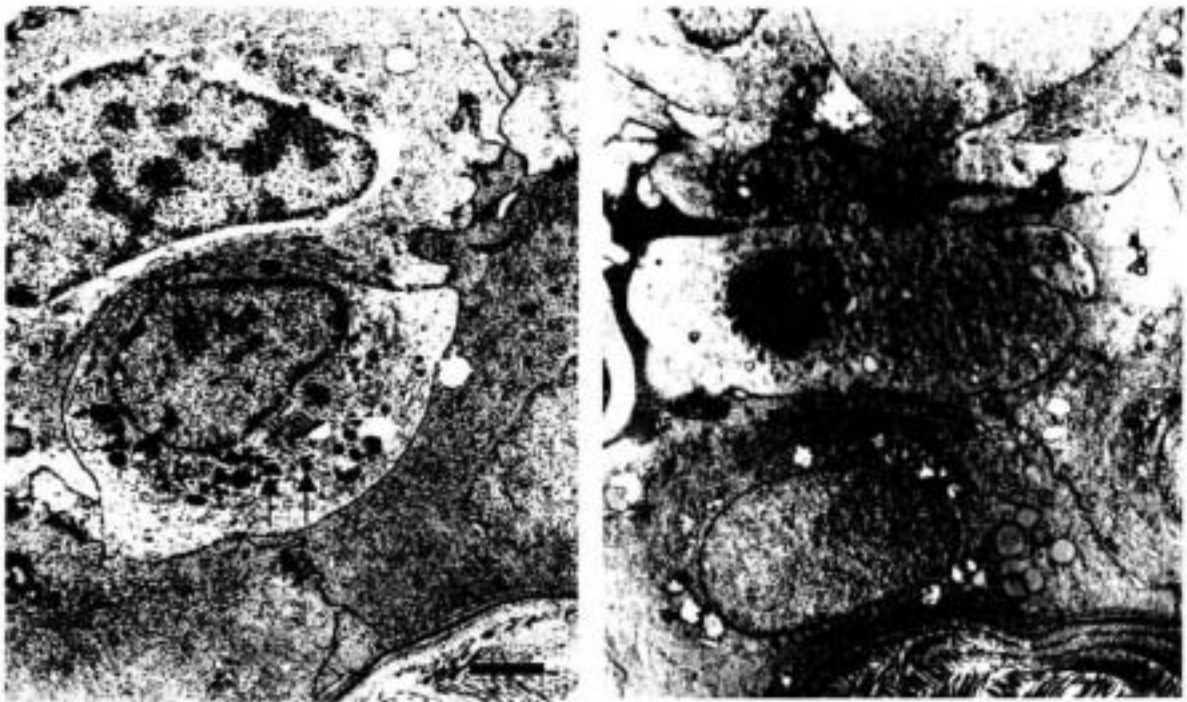


Figura 11.- Micrografías electrónicas de la piel del bagre *Arius seemanii*. Se observan células dendríticas suprabasales de citoplasma claro, sin tonofilamentos, desmosomas y melanosomas, con numerosos organelos que probablemente corresponden a lisosomas (flechas). Abajo a la derecha se observa la lámina basal y la dermis con el arreglo característico de fibras de colágena. Barra= 1 μ m

Dado que las células dendríticas de la epidermis del bagre *Arius seemanii* identificadas en el presente trabajo son similares a las células de Langerhans de otras clases de vertebrados no mamíferos y de mamíferos, se realizó la búsqueda de un organelo citoplásmico similar al gránulo de Birbeck o gránulo de las células de Langerhans. En cortes ultrafinos seriados se logró identificar la presencia de estructuras en forma de bastón con una estriación longitudinal o línea densa central, localizadas cerca de la membrana plasmática de algunas prolongaciones de células ATPasa positivas (Figura 12).

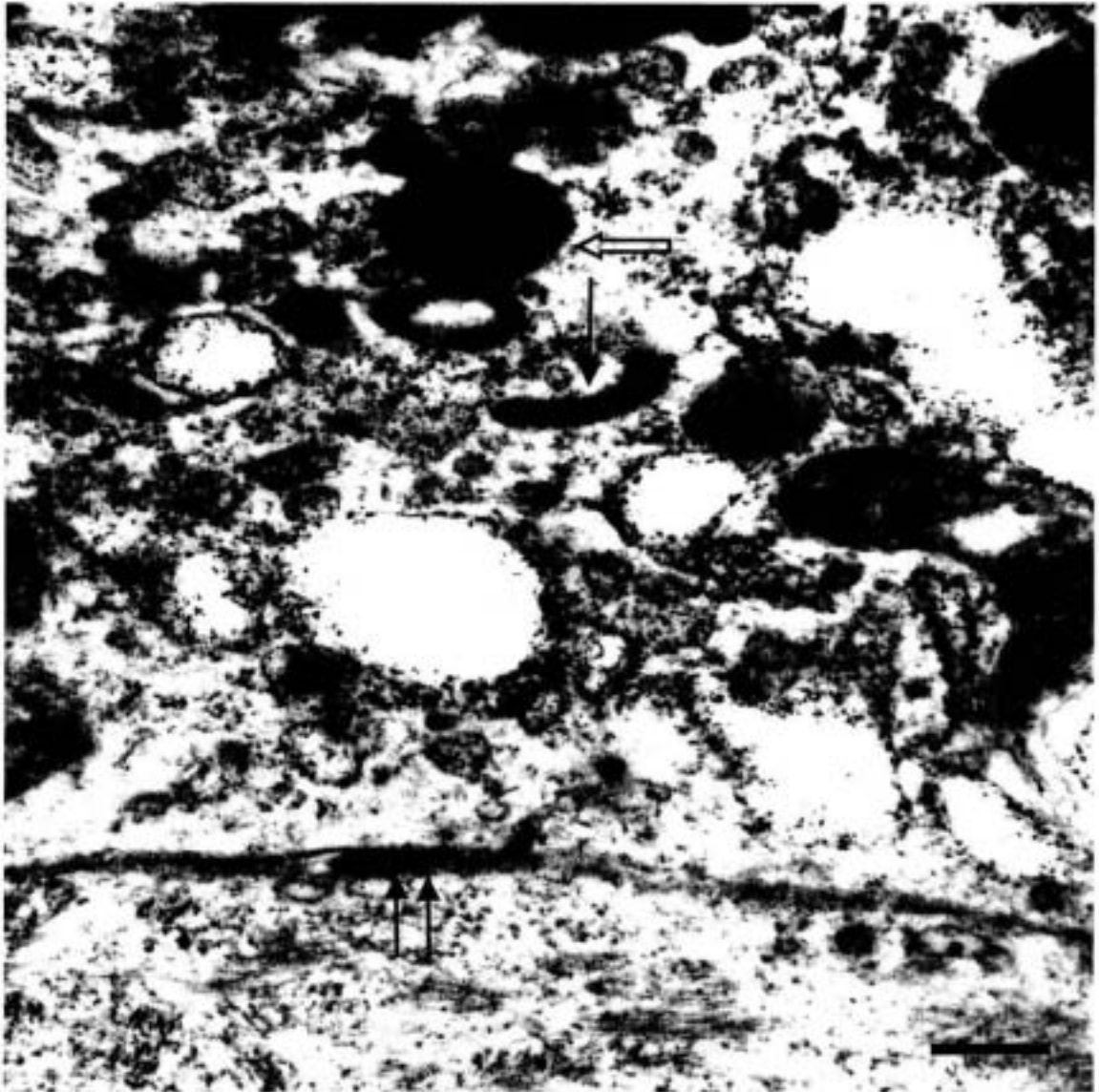


Figura 12.- Micrografía electrónica a mayor aumento del citoplasma de la célula dendrítica de la figura 11. Se observan diversos organelos pero destaca uno en forma de bastón (flecha), con una estriación longitudinal que lo hace muy similar al gránulo de Birbeck de las células de Langerhans de los mamíferos. La imagen del organelo señalado con la flecha abierta recuerda a la de los gránulos de Birbeck cortados tangencialmente. En la membrana plasmática hay depósitos electrodensos de la reacción de ATPasa (doble flecha). Barra= 250nm.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró la presencia de células similares a las CL en la epidermis del bagre marino *Arius seemanii*, utilizando histoquímica enzimática para ATPasa y microscopía electrónica de transmisión. Ambos métodos son ampliamente usados y confiables para identificar CL epidérmicas en mamíferos y en otros vertebrados.

Los resultados obtenidos con la histoquímica para ATPasa en láminas epidérmicas revelan la presencia de células ATPasa positivas distribuidas de manera uniforme en la epidermis, las cuales presentaron prolongaciones citoplásmicas cortas interdigitadas con los queratinocitos. Estas prolongaciones cortas confieren a las células ATPasa positivas una morfología poliédrica más que dendrítica, aunque en algunas preparaciones se identificaron células con prolongaciones más largas.

La microscopía electrónica de transmisión aportó más elementos para identificar a estas células dendríticas ATPasa positivas como equivalentes a las CL ya que reunieron los criterios ultraestructurales necesarios para ello: poseer un núcleo indentado, un citoplasma claro sin tonofilamentos, melanosomas y desmosomas y, de manera destacable, tener organelos similares a los GCL o gránulos de Birbeck, el único criterio confiable para designar a una célula como CL (Birbeck *et al.* 1961). Con base en lo anterior, podemos afirmar que desde el punto de vista morfológico, histoquímico y ultraestructuralmente, estas células son similares a las CL.

Hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia de la presencia de células dendríticas epidérmicas en la piel de teleósteos, las cuales exhiben los marcadores clásicos para identificarlas como CL y son similares a las que se localizan en la piel de mamíferos, aves, reptiles y anfibios.

La piel de los peces presenta numerosos mecanismos de defensa no celulares e inespecíficos como el moco, el cual es continuamente secretado y desechado, actuando como una eficiente barrera física y química. Este moco contiene lisozimas, lectinas, componentes del complemento, enzimas proteolíticas (Alexander & Ingram 1992), así como péptidos y proteínas antimicrobianas (Ellis 1981). Las respuestas inespecíficas incluyen también la participación de una población cutánea de leucocitos

que ejercen respuestas inmunodefensivas locales, que en conjunto, constituirían la primera barrera de protección ante el medio para mantener el estado de salud de los peces. Este concepto puede extenderse a otros órganos como intestinos y branquias ya que en los teleósteos, junto con la piel, forman el tejido linfoide asociado a mucosas, los sitios como mayor contacto directo con el ambiente externo (Dalmo *et al.* 1997).

Los mecanismos de defensa inespecíficos o innatos del tegumento de los peces pueden ser afectados por diversos agentes tóxicos contaminantes tales como metales pesados, detergentes y fenoles, los cuales producen cambios en la cantidad, liberación, estado físico y composición del moco de la piel y también puede inducir lesiones estructurales como el adelgazamiento y la pérdida de la capa epidérmica externa (revisado en Ebran *et al.* 1999). Estos efectos han sido observados en la carpa *Cyprinus carpio* expuesta a un medio con agua acidificada (Bols *et al.* 2001) o en un medio con agua de mar diluida (Iger *et al.* 1994) y en la trucha *Oncorhynchus mykiss* expuesta a una elevación moderada de la temperatura (Abraham *et al.* 2001). Estos cambios del ambiente externo pueden incrementar la susceptibilidad de los peces a agentes infecciosos generales y específicos. La infiltración de la piel con numerosos leucocitos, entre ellos linfocitos, y la penetración epidérmicas de extensiones citoplásmicas ricas en pigmentos, a partir de los melanocitos dérmicos (Bols *et al.* 2001 & Abraham *et al.* 2001) es, probablemente, la respuesta común cutánea contra estos agentes o factores de estrés. Estos cambios de la piel son inmunológicamente relevantes porque la melanina puede poseer una función bactericida (Iger *et al.* 1994; Mackintosh 2001) y la presencia de linfocitos indicaría que la inmunidad innata está ligándose a respuestas de inmunidad adquirida.

La eliminación o descamación de células del epitelio malpighiano podrían ser otro mecanismo cutáneo estratégico de defensa de los peces como ha sido observado en el salmón del Atlántico *Salmo salar*, después de que las células epiteliales se cargan con bacterias fagocitadas. Este mecanismo no es totalmente inespecífico y tiene cierto grado de discriminación, ya que algunas cepas de bacterias son fagocitadas y otras no (Burkhardt-Holm *et al.* 1997). El estudio de los mecanismos que operan en la eliminación de microorganismos infecciosos ha sido de gran utilidad para conocer la reactividad inmunológica de la piel de los peces. En la trucha arcoiris *O. mykiss* se ha

demostrado que el modelo para la eliminación de parásitos cutáneos como *Gyrodactylus salaricus* (Åsbakk 2001) y *G. derjavini* (Bakke 1991) incluye a las células epiteliales, a las células mucosas, a los leucocitos intraepidémicos y a citocinas proinflamatorias como interleucina-1 (IL-1) (Lindenstrøm & Buchmann 2000, Lindenstrøm *et al.* 2003). Esta citoquina puede representar, en la piel de los peces, el primero o uno de los primeros eslabones de una cadena de eventos iniciados por estímulos mecánicos, químicos o antigénicos que preceden al establecimiento de la inmunidad específica y no específica. Los experimentos de inmunización de peces a través de la piel por inmersión hiperosmótica, señalan que IL-1 β es hiperrregulada desde los 10 min y permanece elevada hasta 40 h después del tratamiento hiperosmótico (Huising *et al.* 2003). Aunque aun no está determinada la fuente celular de IL-1 β en la piel de los peces, la células epidérmicas, como en los mamíferos, y los leucocitos residentes o migratorios podrían ser buenos candidatos. La importancia de la producción *in situ* de IL-1 β está en que induce un incremento en la producción de moco (Bakke *et al.* 1991), la liberación de metabolitos reactivos del oxígeno (Titus *et al.* 1991) y de factores del complemento (Buchmann 1998 y 1999; Buchmann & Bresciani 1999). Interesantemente, IL-1 β de la piel de los peces también podría inducir la migración de las CL, estimular linfocitos T y activar neutrófilos y macrófagos (Shornick *et al.* 2001).

Obviamente, una respuesta inmunológica integral en la piel de los peces debe incluir la participación de otras células como las subpoblaciones de linfocitos y granulocitos, y de moléculas como las quimocinas CC y CXC, IL-8, interferones, TGF- β , TNF α , proteínas de fase aguda, etc. (revisado en Magor & Magor 2001).

Además de las células dendríticas ATPasa positivas descritas en el presente trabajo, la piel del bagre *Arius seemanii* también contienen células parecidas a granulocitos, linfocitos y las distintivas células de alarma y mucosas. Todo esto sugiere que la piel de estos animales no sólo podría manifestar respuestas de inmunidad innata ante estímulos mecánicos, químicos y antigénicos, sino que también posee los elementos para dictar respuestas de inmunidad adaptativa. La respuesta innata es filogenéticamente más antigua que la respuesta adaptativa y, por mucho tiempo, había sido considerada la única barrera directa contra microorganismos. Sin embargo, el descubrimiento de la familia de receptores TOLL (TLR), involucrados en el

reconocimiento de patrones característicos de grupos de microorganismos, a conducido a la reevaluación del papel del sistema inmune innato como un sistema discriminatorio (Medzhitov & Janeway Jr. 1997). La unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a los TLR induce la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno y del oxígeno, citocinas proinflamatorias y estimula la expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas presentadoras de antígenos, con lo que se inicia la respuesta adaptativa (Werling & Jungi 2003).

El papel principal de las células dendríticas de mamíferos en la inducción y modulación de la respuesta inmunológica adaptativa hacia los agentes infecciosos ha sido estudiado ampliamente (Steinman 1991; Ibrahim *et al.* 1995) y destaca la importancia de la activación de esta población de células, a la que pertenecen las CL, en la resolución temprana de cualquier signo de infección (Reis e Sousa 2004). Después de la captación de antígenos, las células dendríticas son fundamentales en la inducción de respuestas inmunológicas primarias y secundarias de células T antígeno específicas (Banchereau & Steinman 1998). Adicionalmente, las células dendríticas son esenciales para el desarrollo de respuestas por anticuerpos al activar células B (Dubois *et al.* 1997).

Las células dendríticas están ampliamente distribuidas, especialmente en tejidos ubicados en la frontera con el ambiente externo como los de la piel, el intestino, los pulmones y otras mucosas (de Fraissinette 1989), donde pueden establecer una función como "centinelas" para reconocer patógenos que ingresan y tienen la capacidad de adherirse y activar células del sistema inmune innato y desencadenar una respuesta inflamatoria (Foti *et al.* 1998; Sallusto *et al.* 1998; Fernández *et al.* 1999; Rescigno *et al.* 1999). La captación de patógenos induce un estado de activación que conduce a la migración de la célula dendrítica cargada con antígeno hacia los órganos linfoides, donde las células de la respuesta inmune adaptativa pueden ser activadas (Macatonia *et al.* 1987; Kripke *et al.* 1990; Moll *et al.* 1993). De esta manera, las células dendríticas de la piel y mucosas pueden servir como un puente o modulador entre las respuestas de la inmunidad innata y adaptativa, como ha sido propuesta recientemente (Fernández *et al.* 2001; Rescigno *et al.* 2001). En el contexto de la inmunidad de la piel, las CL epidérmicas y las células dendríticas dérmicas, subpoblaciones de células

dendríticas inmaduras, tienen propiedades morfológicas y funcionales para ser el enlace.

La perspectiva inmediata en el estudio de las CL de la epidermis del bagre descrita aquí, es demostrar que también expresan moléculas clase II del CPH. Estas constituyen uno de los principales elementos del sistema inmune adaptativo, que pueden aportar las propiedades funcionales a estas células para interactuar con la respuesta inmune innata (revisado en Dixon & Stet 2001) o reconocer a las CL del bagre como células presentadoras de antígenos. La disponibilidad de anticuerpos para identificar estas moléculas en peces teleósteos (Van Erp *et al.* 1996; Rodríguez *et al.* 1998; Antao *et al.* 1999; Van Lierop *et al.* 1998), son herramientas prometedoras para establecer la homología de las células descritas en el presente trabajo con las CL de mamíferos y las otras clases de vertebrados. En este sentido, sería importante demostrar que las CL de la piel del bagre tienen la capacidad de captar, procesar y presentar antígenos a las células inmunocompetentes de dicho pez. También es particularmente interesante mencionar que la presencia de células dendríticas ATPasa positivas en el bazo y la región anterior del riñón del salmón del atlántico *Salmo salar* (Press *et al.* 1994) y la demostración de CD esplénicas en la trucha arcoiris (Ganassin & Bols 1996), idénticas a las descritas en el bazo de ratón (Steinman & Cohn, 1973), sugiere la existencia de un sistema de células dendríticas desde uno de los grupos de vertebrados actuales más antiguos como son los peces óseos.

La utilización de la técnica histoquímica para ATPasa, así como la identificación ultraestructural del GCL, resultaron muy confiables para la identificación de CL epidérmicas en la piel del bagre *Arius seemanii*. Es interesante observar que la actividad de la ATPasa, presente en la membrana plasmática de las células epidérmicas, esté filogenéticamente muy conservada en todos los grupos de vertebrados. Aunque no se conoce la importancia funcional de esta enzima, su alta conservación en los vertebrados le confiere un papel evolutivo fundamental.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbate F, Catania S, Germana A, González T, Díaz-Esnal B, Germana G, Vega JA. S-100 protein is a selective marker for sensory hair cells of the lateral line system in teleosts. *Neuroscience lett* 329: 133-136, 2002.
- Aberer W, Stingl G, Stingl-Gazze LA, Wolff K: Langerhans cells as stimulator cells in the murine primary epidermal cell-lymphocyte reaction, alteration by UV-B irradiation. *J Invest Dermatol* 79:129-135, 1982.
- Abraham, M., Iger, Y., and Zhang, L. Fine structure of the skin cells of a stenohaline freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to diluted seawater. *Tissue Cell* 33: 46-, 2001.
- Akhter N, Kobayashi M, Hoshino T: Avian epidermis contains ATPase-and Ia-positive Langerhans-like cells. *Cell Tissue Res* 271:103-106, 1993.
- Alexander, J.B. and Ingram, G.A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis* 2: 249-, 1992.
- Antao, A.B., et al. MHC class I genes of the channel catfish: sequence analysis and expression. *Immunogenetics* 49: 303-, 1999.
- Åsbakk, K. Elimination of foreign material by epidermal malpighian cells during wound healing in fish skin. *J. Fish Biol* 58: 953-, 2001.
- Bagot M, Heslan M, Dubertret L, Roujeau JC, Touraine R, Levy JP: Antigen-presenting properties of human epidermal cells compared with peripheral blood mononuclear cells. *Br J Dermatol* 113(suppl. 28):55-60, 1985.
- Banchereau J; Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252, 1998.
- Bakke, T.A., Jansen, P.A., and Kennedy, C.R. The host specificity of *Gyrodactylus salaricus* Malmberg (Platyhelminthes, Monogenea): susceptibility of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under experimental conditions. *J. Fish Biol* 39: 45-, 1991.
- Bartosik J. Cytoplasmic-derived Birbeck granules transport horseradish peroxidase to endosomal compartment in the human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 99: 53, 1992.
- Basset F, Turiaf J: Identification par la microscopie electronique de particules de nature probablement viral dans les liaisons granuleuses d'une histiocytose « X » pulmonaire. *CR Acad Sci* 261:3701-3703, 1965.
- Berman B, Gigli I: Complement receptors on guinea pig epidermal Langerhans cells. *Clin Res* 27:522A, 1979.
- Bieber T, Ring J: *In vivo* modulation of the high-affinity receptor for IgE (FcεRI) on human epidermal Langerhans cells. *Int Arch Allergy Immunol* 99:204-210, 1992a.
- Bieber T, de la Salle H, de la Salle C, Hanau D, Wollenberg A: Expression of high affinity receptor for IgE (Fcε-RI) on human Langerhans cells: The end of a dogma. *J Invest Dermatol* 92:10S-11S, 1992b.
- Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakim J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, de la Salle C: Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI). *J Exp Med* 175: 1285-1290, 1992c.
- Billingham RF, Medawar PB: A study of the branched cells of the mammalian epidermis with special reference to the fate their division products. *Phyl Trans Roy Soc. B.* 237:151-169, 1953.

- Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD: An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37:51-64, 1961.
- Bjerkke S, Elgo J, Braathen L, Thorsby E: Enriched epidermal Langerhans cells are potent antigen-presenting cells for T cell. *J Invest Dermatol* 83:286-289, 1984.
- Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Rollinghoff M, Moll H: Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* 167:418-425, 1993.
- Bols, N.S., et al. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol* 25: 853, 2001.
- Braathen LR, Thorsby E: Studies on human epidermal Langerhans cells. I. Allo-activating and antigen-presenting capacity. *Scan J Immunol* 11:401, 1980.
- Braathen LR et al.: Studies on human epidermal Langerhans cells. II. Activation of human T lymphocytes to herpes simplex virus. *Acta Dermatovener* 60:381-408, 1980.
- Braathen LR: Studies on human epidermal Langerhans cells.III. Induction of T lymphocyte response to nickel sulphate in sensitized individuals. *Br J Dermatol* 103:517-526, 1980.
- Braathen LR, Kaaman T: Human epidermal Langerhans cells induce cellular immune response to trichophytin in dermatophytosis. *Br J Dermatol* 109:295-300, 1983.
- Bradshaw M, Wachstein M, Spence J, Elias J: Adenosine triphosphatases activity in melanocytes and epidermal cells of human skin. *J Histochem Cytochem* 11:465-473, 1963.
- Breathnach AS: Observations on cytoplasmic organelles in Langerhans cells in human epidermis. *J Anat* 98:265-270, 1964.
- Breathnach AS, Poyntz SV: Electron microscopy of pigment cells in tail skin of *Lacerta vivipara*. *J Anat* 100:549-569, 1966.
- Breathnach AS, Silver WK, Smith S, Heyner S: Langerhans cells in mouse skin experimentally deprived of its neural crest components. *J Invest Dermatol* 50:147-160, 1968.
- Bronstein BR, Murphy GF, Harrist TJ, Ruitter DJ, Mihm Jr. MC, Khan AK: Location of HLA-A, B, C, antigens on dendritic cells of normal human skin : an immunoelectron microscopic study. *J Invest Dermatol* 80:481-484, 1983.
- Buchmann, K., and Bresciani, J. Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitol Res* 84: 17, 1998.
- Buchmann, K. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans—a model. *Folia Parasitol. (Praha)* 46: 1, 1999.
- Buchmann, K. and Bresciani, J. Rainbow trout leucocyte activity: influence on the ectoparasitic monogenean *Gyrodactylus derjavini*. *Dis. Aquat. Organ* 35: 13, 1999.
- Buchmann, K. Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes: Monogenea). *Dis. Aquat. Organ* 32: 195, 1998.
- Burkhardt-Holm P, Escher M, Meier W: Waste-water management plant effluents cause cellular alterations in the skin of brown trout. *J Fish Biol* 50: 744-750, 1997.

- Calabi F, Milstein C: A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. *Nature* 323:540-543, 1986.
- Campo-Aasen I and Pearse AGE. Enzimología de la célula de Langerhans. *Medicina Cutánea*. 1: 35, 1966.
- Cancilla PA: Demonstration of the Langerhans granule by lanthanum. *J Cell Biol* 38:248-252, 1968.
- Caputo R, Peluchetti D, Monti M: Freeze-fracture of Langerhans granules. A comparative study. *J Invest Dermatol* 66:297-301, 1976.
- Carrillo J, Castell A, Pérez A, Rondán A: Langerhans-like cells in amphibian epidermis. *J Anat* 172:39-45, 1990.
- Carrillo J, Pérez A, Castell A, Antuna S: Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). *J Anat* 176:1-8, 1991.
- Castell A, Hernández A, Sampedro E, Herrera M, Alvarez J, Rondán A: ATPase and MHC class II molecules co-expression in *Rana pipiens* dendritic cells. *Dev Comp Immunol* 23:473-485, 1999.
- Castell A, Sampedro E, Herrera M, Rondán A: Non-specific esterase-positive dendritic cells in epithelia of the frog *Rana pipiens*. *Histochem J* 33:311-316, 2001.
- Celluzzi CM, Falo Jr LD: Epidermal dendritic cells induce potent antigen-specific CTL-mediated immunity. *J Invest Dermatol* 108:716-720, 1997.
- Claesson-Welsh L, Scheynius A, Tjernlund U, Peterson PA: Cell surface expression of invariant gamma-chain of class II histocompatibility antigens in human skin. *J Immunol* 136:484-490, 1986.
- Clark GJ, Angel N, Kato M, López A, MacDonald K, Vbuckovic S, Hart DNJ: The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and Infection* 2: 257-272, 2000.
- Concha M, Figueroa CD, Caorsi I: Ultrastructural characteristics of the contact zones between Langerhans Cells and Lymphocytes. *J. Pathol* 156:29-34, 1988.
- Cooper KD, Breathnach SM, Caughman SW, Palini AG, Waxdal MJ, Katz St: Fluorescence microscopic and flow cytometric analysis of bone marrow-derived cells in human epidermis: a search for the human analogue of the murine dendritic Thy-1+ epidermal cell. *J Invest Dermatol* 85:546-552, 1985.
- Chapman GB & Johnson EG. An electron microscope study of intrusions into alarm substance cells of the channel catfish. *J Fish Biol* 51: 503-514, 1997.
- Chu A, Eisinger M, Lee JS, Takezaki S, Kung PC, Edelson RL: Immunoelectron microscopic identification of Langerhans cells using a new antigenic marker. *J Invest Dermatol* 78:177-180, 1982.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K., and Bøgwald, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J. Fish Dis* 20:241, 1997.
- de Fraissinette, A., Schmitt, D., and Thivolet, J. Langerhans cells of human mucosa. *J. Dermatol* 16: 255, 1989.
- de la Salle C, Esposito-Farece ME, Bieber T, Moncuit J, Morales M, Wollenberg A, de la Salle H, Fridman WH, Cazenave JP, Teillaud JL: Release of soluble Fc gamma RII (CD32) molecules by human Langerhans cells: a subtle balance between shedding and secretion? *J Invest Dermatol* 99:15S-17S, 1992.

- Dezutter-Dambuyant C, Cordier G, Schmitt D, Faure M, Laquoi C, Thivolet J: Quantitative evaluation of two distinct cell populations expressing HLA-DR antigens in normal human epidermis. *Br J Dermatol* 111:1-11, 1984.
- Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Faure M, Horisberger M, Thivolet J: Immunogold technique applied to simultaneous identification of T6 and HLA-DR antigens on Langerhans cells by electron microscopy. *J Invest Dermatol* 84:465-468, 1985.
- Dixon, B. and Stet, R.J.M. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol* 25: 683, 2001.
- Dubois, B., et al. Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD-40-activated B lymphocytes. *J. Exp. Med* 185: 941-946, 1997.
- Du Pasquier L, Flajnik M: Expression of MHC class II antigens during *Xenopus* development. *Dev Immunol* 1:85-95, 1990.
- Ebran, N., et al. Pore-forming properties and antibacterial activity of protein extracted from epidermal mucus of fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 122: 181, 1999.
- Ellis, A.E. Non-specific defence mechanisms in fish and their role in disease. *Processes Develop. Biol. Standard* 49: 337, 1981.
- Elmets CA, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Wood PJ, Streilein JW: Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low-dose ultraviolet irradiation. *J Exp Med* 158:781-794, 1983.
- Elofsson R, Andersson A, Falck B, Sjöborg S: Evidence for endocytotic mechanism in the epidermal Langerhans cells. *Acta Dermatol Venereol Suppl* 99:29-35, 1981.
- Engelsma, M.Y., et al. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Vet. Immunol. Immunopathol* 87: 467, 2002.
- Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J: Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73:309-316, 1997.
- Ezekowitz RAB, Sastry K, Bailly P, Warner A: Molecular characterization of a human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 172:1785-1594, 1990.
- Fänge R: Fish blood cells. In: *Fish Physiology XIIB* (W.S. Hoar, D.J. Randall & A.P. Farrell, eds.) Academic Press, San Diego, pp. 2-54, 1992.
- Farquhar M, Palade G: Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. *J Cell Biol* 30:359-379, 1966.
- Fernandez, N.C., et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nat. Med* 5: 405, 1999.
- Fernandez, N.C., et al. NK cells, in *Dendritic cells: Biology and Clinical Applications*, Lotze, M.T. and Thompson, A.W., Eds., Academic Press, London, 2001, chap. 18.
- Fichtelius KF, Groth D and Liden S. The skin, a first level lymphoid organ?. *Int Arch Allergy* 37: 607, 1970.

Fithian F, Kung P, Goldstein G, Rubinfeld M, Fenoglio C, Edelson R: Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2541-2544, 1981.

Fletcher TC, Baldo BA: Immediate hypersensitivity responses in flat fish. *Science* 185:360-361, 1974.

Flotte TJ, Murphy GF, Bhan AK: Demonstration of T200 on human Langerhans cell surface membranes. *J Invest Dermatol* 82:535-537, 1984.

Foti M., et al. Upon dendritic cells activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of dendritic cells at inflammatory site. *Int. Immunol* 11: 979, 1998.

Frelinger JG, Hood L, Hill S, Frelinger JA: Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* 282:321-323, 1979.

Gairns FW: A modified gold chloride method for demonstration of nerve ending. *Quart J Micr Sci* 74:151-154, 1930.

Ganassin RC, Bols NC: Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells. *Fish & Shellfish immunology* 6:17-34, 1996.

Geissmann F, Revy P, Regnault A, et al.: TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 162: 4567-4575, 1999.

Gielen V, Schmitt D, Thivolet J: HLA class I antigen (heavy and light chain) expression by Langerhans cells and keratinocytes of the normal human epidermis: ultrastructural quantification using immunogold labeling procedure. *Arch Dermatol Res* 280:131-136, 1988.

Grabbe S, Bruvers S, Gallo RL, Knisely TL, Nazareno R, Granstein RD: Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J Immunol* 146:3656-3661, 1991.

Granucci F, Zanoni I, Feau S, Ricciardi-Castagnoli: Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *EMBO J* 22: 2546-2551, 2003.

Guo M, Gong S, Maric S, Misulovin Z, Park M, Mahnke K, Nussenzweig MC, Steinman RM: A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Hum Immunol* 61:729-738, 2000.

Haines KA, Flotte TJ, Springer TA, Gigli I, Thorbecke GJ: Staining of Langerhans cells with monoclonal antibodies to macrophages and lymphoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3448-3451, 1983.

Hala K, Wick G, Boyd RL, Wolf H, Bock G, Ewert DL: The B-L (Ia-like) antigens of the chicken. Lymphocytes plasma membrane distribution and tissue localization. *Dev Comp Immunol* 8:673-682, 1984.

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

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

Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Stampf JL, Garaud JC, Bieber T, Grosshans E, Benezra C and Cazenave JP. Human epidermal Langerhans cells internalize by receptor mediated endocytosis T6 (CD1

- "NH 34") surface antigens. Birbeck granules are involved in the intracellular traffic of the antigens. *J Invest Dermatol* 89: 172,1987b.
- Hashimoto K, Tarnowski WM: Some new aspects of the Langerhans cell. *Arch Dermatol* 97:450-464, 1968.
- Hashimoto K: Lanthanum staining of Langerhans cell. Communication of Langerhans cell granules with extracellular space. *Arch Dermatol* 102:280-290, 1970.
- Hauser C, Katz SI: Activation and expansion of hapten- and protein-specific T helper cells from nonsensitized mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5625-5628, 1988.
- Hauser C: Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity. *J Invest Dermatol* 95:436-440, 1990.
- Henrikson RC & Matoltsy AG. The fine structure of teleost epidermis. III. Club cells and other cell types. *J Ultrastruct Res* 21: 222-232, 1968.
- Hoefsmit ECM: Macrophages, Langerhans cells, interdigitating and dendritic accessory cells: A summary. *Adv Exp Med Biol* 149:463-468, 1982.
- Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD: Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 363:159-163, 1993.
- Huising, M.O., et al. Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. *Vaccine*, In press, 2003.
- Ibrahim, M.A.A., Chain, B.M., and Katz, D.R. The injured cell: the role of the dendritic cells system as a sentinel receptor pathway. *Immunol. Today* 6: 181, 1995.
- Iger, Y., Jenner, H.A., and Wendelaar Bonga S.E. Cellular responses in skin of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to temperature elevation. *J. Fish Biol* 44: 921, 1994.
- Inaba K, Schuler G, Witmer MD, Valiasky J, Atassi B, Steinman RM: Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J Exp Med* 164:605-613, 1986.
- Ishii M, Terao Y, Kitajima J, Hamada T: Sequential production of Birbeck granules through adsorptive pinocytosis. *J Invest Dermatol* 82:28-29, 1984.
- Jakob T, Udey MC: Epidermal Langerhans cells: from neurons to nature's adjuvants. *Adv Dermatol* 14:209-258, 1999.
- Jarret A, Riley PA: Esterase activity in dendritic cells. *Br J Dermatol* 75:79-81, 1962.
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman R, Nussenzweig MC: The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151-155, 1995.
- Kaplan G, Nusrat A, Witmer MD, Nath I, Cohn Z: Distribution and turnover of Langerhans cells during delayed immune responses in human skin. *J Exp Med* 165:763-766, 1987.
- Kato M, Neil TK, Clark GJ, Morris CM, Sorg RV, Hart DN: cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells. *Immunogenetics* 47:442-450, 1998.

Katz SI, Tamaki K, Sachs DH: Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282:324-326, 1979.

Kaufman JF, Aufray C, Korman AJ, Shakleford DA, Strominger J: The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 36:1-13, 1984.

Klareskog L, Malmnas-Tjerlund U, Forsum U, Peterson PA: Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268:248-250, 1977.

Komen J, Van den Dobbelsteen PJ, Slierendrecht WJ, Van Muiswinkel WB: Skin grafting in gynogenetic common carp (*Cyprinus carpio*, L.). The development of histocompatible clones. *Transplantation* 49: 788-792, 1990.

Konecny P, Stagg AJ, Jebbari H, English N, Davidson RN, Knight SC: Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation *in vitro*. *Eur J Immunol* 29:1803-1811, 1999.

Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G: Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163:981-987, 1986.

Kripke, M.L., et al. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol* 145: 2833, 1990.

Langerhans P: Ueber die Nerven der Menschlichen Haut. *Archiv Pathol Anat Physiol Klin Med* 44:325-337, 1868.

Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM: Migration and maturation of langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 172:1483-1493, 1990.

Leibl H, Hutterer J, Jorschan H, Schuler G, Tani M, Tschachler E, Romani N, Wolff K, Stingl G: Expression of the Ly-5 alloantigen system on epidermal cells. *J Invest Dermatol* 84:91-95, 1985.

Lenz A, Heufler C, Rammensee HG, Glassl H, Koch F, Romani N, Schuler G: Murine epidermal Langerhans cells express significant amounts of class I major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7527-7531, 1989.

Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N: Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest* 92:2587-2596, 1993.

Lindenstrøm, T., and Buchmann, K. Acquired resistance in rainbow trout against *Gyrodactylus derjavini*. *J. Helminthol* 74: 155, 2000.

Lindenstrøm, T., Buchmann, K., and Secombes, C.J. *Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin. *Fish and Shellfish Immunol* 15: 107, 2003.

Liu HH, Schroeter AL, Muller SA: OKT-6 is not superior to HLA-DR or ATPase as a marker for Langerhans cells in normal human epidermis. *Clin Exp Dermatol* 11:229-237, 1986.

Liu YJ: dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106: 259-262, 2001.

Lukas M, Stossel H, Hefel L, Imamura S, Fritsch P, Sepp NT, Schuler G, Romani N: Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessel in a skin organ-culture model. *J Invest Dermatol* 106:1293-1299, 1996.

- Macatonia SE, Edwards AJ, Knight SC: Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 59:509-514, 1986.
- Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P: Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med* 166:1654-1667, 1987.
- Mackensen A, Herbst B, Köhler G, Wolff-Vorbeck G, Rosenthal F, Veelken H, et al: Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitors cells in vitro. *Blood* 86:2699-2707, 1995.
- Mackenzie IC, Squier CA: Cytochemical identification of ATPase-positive Langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. *Br J Dermatol* 92:523-533, 1975.
- Mackintosh JA. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *J theor Biol* 211: 101-113, 2001.
- Magor B.G. and Magor K.E. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Dev. Comp. Immunol* 25: 651, 2001.
- Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM: The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen-presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151:673-683, 2000.
- Masson P: Pigment cells in man. In: *The Biology of melanosomes*. Ed. M. Gordon. Spec Publ NY Acad Sci 4:15-51, 1948.
- Medzhitov R. and Janeway Jr. C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol* 9: 4, 1997.
- Medzhitov R. and Janeway, Jr., C.A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295, 1997.
- McDermott R, Ziyhan U, Spehner D, Bausinger H, Lipsker D, Mommaas M, Cazenave JP, Raposo G, Goud B, de la Salle H, Salamero J, Hanau D: Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates. *Mol Biol Cell* 13:317-335, 2002.
- Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghof M: Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 23:1595-1601, 1993.
- Mommaas AM, Mulder AA, Jordens R, Out C, Tan MC, Cresswell P, Kluin PM, Koning F: Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol* 29:571-580, 1999.
- Murphy GF, Bhan AK, Sato S, Harrist TJ, Mihm MC Jr: Characterization of Langerhans cells by the use of monoclonal antibodies. *Lab Invest* 45:465-468, 1981.
- Mustakallio K: Adenosine triphosphatase activity in neural elements of human epidermis. *Exp Cell Res* 28:449-451, 1962.
- Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ: Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 151:6535-6540, 1993.

- Nevid NJ & Meier AH: A day-night rhythm of immune activity during scale allograft rejection in the gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Dev Comp Immunol* 17:221-228, 1993.
- Niebauer G, Krawczyk WS, Kidd RL, Wilgramm GF: Osmium Zinc Iodide reactive sites in the epidermal Langerhans cells. *J Cell Biol* 43:80-89, 1969.
- Niizeki H, Streiling JW: Hapten-specific tolerance induced by acute, low dose ultraviolet B radiation of skin is mediated via interleukin-10. *J Invest Dermatol* 109:25-30, 1997.
- Okamoto H, Kripke ML: Effector and supressor circuits of the immune response are activated in vivo by different mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3841-3845, 1987.
- Peleteiro MC & Richards RH: Identification of lymphocytes in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 8:161-162, 1985.
- Pérez-Torres A, Millán Aldaco D: Ia antigens are expressed on ATPase-positive dendritic cells in chicken epidermis. *J Anat* 184:591-596, 1994.
- Pérez-Torres A, Millán D, Rondán A: Epidermal Langerhans cells in the terrestrial turtle, *Kinosternum integrum*. *Dev Com Immunol* 19:225-236, 1995.
- Pérez-Torres A, Ustarroz-Cano M: Demonstration of Birbeck (Langerhans cells) granules in the normal chicken epidermis. *J Anat* 199:493-497, 2001.
- Pérez-Torres A, Ustarroz-Cano, Millán-Aldaco D: Langerhans cells-like dendritic cells in the cornea, tongue and oesophagus of the chicken (*Gallus gallus*). *Histochem J* 34: 507-515, 2002.
- Pope M, Betjes MG, Hirmand H, Hoffman N, Steinman RM: Both dendritic cells and memory T lymphocytes emigrate from organ cultures of human skin and form distintive dendritic-Tcell conjugates. *J Invest Dermatol* 104:11-17, 1995.
- Porcelli SA, Modlin RL: The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17:297-329, 1999.
- Press C. McL, Dannevig BH, Landsverk T. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Fish & Shellfish Immunol* 4:79-93, 1994.
- Press C. McL., Evensen O. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish immunol* 9: 309-318, 1999.
- Prigozy TI, Sieling PA, Clemens D, Steward PL, Behar SM, Porcelli SA, Brenner MB, Modlin RL, Kronenberg M: The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* 6:187-297, 1997.
- Pruneiras M: Inteactions between keratinocytes and dendritic cells. *J Invest Dermatol* 52:1-17, 1969.
- Ptak W, Rozycka D, Askenase PW, Gershon RK: Role of antigen-presenting cells in the development and persistence of contact hypersensitivity. *J Exp Med* 151:362-375, 1980.
- Rambukkana A, Bos JD, Irik D, Menko WJ, Kapsenberg ML, Das PK: In situ behavior of human Langerhans cells in skin organ culture. *Lab Invest* 73:521-531, 1995.
- Rawles ME: Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. *Physiol Zool* 20:248-266, 1948.

- Reams WM, Tompkins SP: A development study of murine epidermal Langerhans cells. *Dev Biol* 31:114-123, 1973
- Reis e Sousa C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 16: 21-25, 2004.
- Rescigno, M., et al. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. Today* 20: 200, 1999.
- Rescigno, M., et al. Interaction of dendritic cells with bacteria, in *Dendritic cells: Biology and Clinical Applications*, Lotze, M.T. and Thompson, A.W., Eds., Academic Press, London, 2001, chap. 34.
- Richters CD, Hoekstra MJ, Vaan Baane J, Du Pont JS, Hoefsmit EC, Kamperdijk EW: Migratory properties and functional capacities of human skin dendritic cells. *Br J Dermatol* 133:721-727, 1995.
- Rieger A, Binghe W, Kilgus O, Ochiai K, Mauerer D, Fodinger D, Kinet SP, Stingl G: Fc epsilon RI mediates IgE binding to Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 99:30s-32s, 1992.
- Robins PG. and Brandon DR. a modification of the adenosine triphosphates method to demonstrate epidermal Langerhans cells. *Stain Technology*. 50: 87, 1981.
- Rodríguez EM, Caorsi I: A second look at the ultrastructure of the Langerhans cell of the human epidermis. *J Ultrastruct Res* 65:279-295, 1978.
- Rodríguez, P.N., et al. Expresión and temperature-dependent regulation of the beta2-microglobulin (*Cyca-B2m*) gene in a cold-blooded vertebrate, the common carp (*Cyprinus carpio* L). *Dev. Immunol* 5: 263, 1998.
- Romani N, Stingl G, Tschachler E, Witmer MD, Steinman RM, Shevach EM, Schuler G: The Thy-1 bearing cell of murine epidermis. A distinctive leukocyte perhaps related to natural killer cells. *J Exp Med* 161:1368-1383, 1985.
- Romani N, Lenz A, Glassl H, Stössel H, Stanzl U, Majdic O, Fritsch P, Schuler G: Culture Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 93:600-609, 1989.
- Romani N, Schuler G, Fritsch P: Identification and phenotype of epidermal Langerhans cells. In: Schuler G (Ed). *Epidermal Langerhans cells*. Boca Ratón. CRC Press, capitulo 3, pp 49-86, 1991.
- Romer AS, *Vertebrate Paleontology*. The Univerty of Chicago Press, Chicago and London 468, 1966
- Rowden G, Lewis MG, Sullivan AL: Ia antigens on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268:2470-248, 1977.
- Rowden G: The Langerhans cell. *CRC Critical Reviews in Immunology* 3:95-180, 1981.
- Runge W, Younger B, Zelickson AS: Optical transforms of epidermal Langerhans cell granules. *J Invest Dermatol* 77:421-429, 1981.
- Sagebiel RW, Reed TM: Serial reconstruction of the characteristic granules of the Langerhans cell. *J cell Biol* 36:595-602, 1968.
- Sallusto, F., et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expresión during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol* 28: 2760, 1998.
- Schmitt DA, Dezutter-Dambuyant C, Brochier J, Thivolet J: Subclustering of CD1 monoclonal antibodies based on the reactivity on human Langerhans cells. *Immunol letters* 12:231-235, 1986.

Schmitt DA, Bierber T, Cazenave JP, Hanau D: Fc receptors of human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 94 (Suppl): 15s-21s, 1990.

Schuler G, Steinman RM: Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 161:526-546, 1985.

Schuler G: Epidermal Langerhans cells. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp 1-324, 1991.

Shelley WB, Juhlin L: Langerhans cells form a reticuloepithelial trap for external contact antigens. *Nature* 261:46-47, 1978.

Shornick, L.P., Bisarya, A.K., and Chaplin, D.D. IL-1 β is essential for Langerhans cell activation and antigen delivery to the lymph nodes during contact sensitization: evidence for a dermal source of IL-1 β . *Cell. Immunol* 211: 105, 2001.

Silberberg I: Apposition of the mononuclear cells to Langerhans cells in contact allergic reactions. An ultrastructural study. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 53:1-12, 1973.

Silberberg-Sinakin I, Baer RL, Thorbecke GJ: Langerhans cells. A review of their nature with emphasis on their immunologic functions. *Prog Allergy* 24:268-294, 1978.

Silvers WK: A histological and experimental approach to determine the relationship between gold-impregnated dendritic cells and the melanocytes. *Am J Anat* 100:225-240, 1957.

Sontheimer RD, Stastny P, Nunez G: HLA-D region antigen expression by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 87:707-710, 1986.

Steinman, R.M. Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-1161, 1973.

Steinman, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol* 9: 271, 1991.

Stingl G, Wolff-Schreiner EC, Pichler WJ, Gschnait F, Knapp W, Wolff K: Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268:245-246, 1977.

Stingl G, Katz SI, Clement L, Green I, Shevach EM: Immunologic Functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 121:2005-2013, 1978.

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

Streilein JW, Wood PJ, Lonsberry LW, Bergstresser PR: Hapten-derivatized skin grafts induce H-2 restricted contact hypersensitivity. Evidence that the immunological signal includes H-2 determinants derived from skin. *Transplantation* 37:195-201, 1984.

Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Kromer E, Elbe A, Maurer D, Stingl G: Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87:1292-1302, 1996.

Sullivan S, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Streilein JW: Induction and regulation of contact hypersensitivity by resident, bone marrow-derived, dendritic epidermal cells: Langerhans cells and Thy-1+ epidermal cells. *J Immunol* 137:2460-2467, 1986.

Swiggard WJ, Mirza A, Nussenzweig MC, Steinman RM: DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cell Immunol* 165:302-311, 1995.

- Takahashi S, Hashimoto K: Derivation of Langerhans cell granules from cytomembrane. *J Invest Dermatol* 80:345A, 1986.
- Takayama K, Yokozeki H, Ghoreishi Msatoh T, Katayama I, Umeda T, Nishioka K: IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through downregulation of TNF receptor II expression. *J Invest Dermatol* 113:541-546, 1999.
- Takigawa M, Iwatsuki K, Yamada M, Okamoto H, Imamura S: The Langerhans cell granule is an adsorptive endocytic organelle. *J Invest Dermatol* 85:12-15, 1985.
- Tamaki K, Stingl G, Gullino M, Sachs DH, Katz SI: Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cells. *J Immunol* 123:784-787, 1979.
- Thomas WR, Edwards AJ, Watkins MC, Asherson GL: Distribution of immunogenic cells after painting with the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate and oxazolone. Different sensitizers form immunogenic complexes with different cell populations. *Immunology* 39:21, 1980.
- Titus, R.G., Sherry, B., and Cerami, A. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunol. Today* 12: 13, 1991.
- Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW: Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* 124:445-453, 1980.
- Torres-Orozco BR. 1991. Los peces de México, AGT Editor S.A. México 235 p.
- Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S, Saeland S: Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12:71-81, 2000.
- Van de Rijn M, Lerch PG, Bronstein BR, Knowles RW, Bhan AK, Terhorst C: Human cutaneous dendritic cells express two glycoproteins T6 and M241, which are biochemically identical to those found on cortical thymocytes. *Human Immunol* 9:201-210, 1984.
- Van Erp, S.H.M., et al. Identification and characterization of a novel MHC class I gene from carp (*Cyprinus carpio* L). *Immunogenetics* 44: 49, 1996.
- Van Lierop, J.C., et al. Production and characterization of an antiserum raised against recombinant rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) MHC class II beta-chain (MhcOnmy-DAB). *Fish and Shellfish Immunol* 8: 231, 1998.
- Volc-Platzer B, Stingl G, Wolff K, Hintenberg W, Schneden W: Cytogenetic identification of allogeneic epidermal Langerhans cells in bone marrow graft recipient. *N Eng J Med* 310:1123-1124, 1984.
- Watts C: Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15:821-850, 1997.
- Werling D, Jungi TW. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91:1-12, 2003.
- Wick G, Hala K, Wolf H, Boyd RL, Schavenstein K: Distribution and functional analysis of B-L/Ia-positive cells in the chicken: expression of B-L/Ia antigens on thyroid epithelial cells in spontaneous autoimmune thyroiditis. *Mol Immunol* 21:1259-1265, 1984.

- Witmer-Pack MD, Valinsky J, Olivier W, Steinman RM: Quantification of surface antigens on culture murine epidermal Langerhans cells: rapid and selective increase in the level of surface MHC products. *J Invest Dermatol* 90:387-394, 1988.
- Wolff K: Zur Enzymaktivität in den Langerhansschen zellen. *Arch Klin Exp* 218:446, 1964.
- Wolff K: The fine structure of the Langerhans cell granule. *J Cell Biol* 35:468-473, 1967.
- Wolff K, Winkelmann RK: Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 48:50-54, 1967.
- Wolff K, Konrad K: Phagocytosis of latex beads by epidermal keratinocytes *in vivo*. *J Ultrastruct Res* 39:262-280, 1972.
- Wood J, O'Mahony JB, Palder SB, Rodrick ML, D'Eon P, Mannic KJA: Circulating T6 antigen positive cells. *J Invest Dermatol* 82:387-388, 1984.
- Yoakim EG & Grizzle JM. Ultrastructure of alarm cells in the epidermis of the channel cat fish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J Fish Biol* 20: 213-221, 1982.
- York IA, Rock KL: Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-396, 1996.
- Zapata, A. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol* 3: 55, 1979.
- Zeng AH, Castano AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA: Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 277:339-345, 1997.