

Identificación de las células de Langerhans en epidermis de vertebrados no mamíferos por medio de las impregnaciones de yoduro de zinc-tetróxido de osmio y de cloruro de oro.

Pérez Alvarado Luis Raymundo, Facultad de Química, UNAM

23/12/2020

Resumen

El estudio de células de Langerhans, en vertebrados no mamíferos, es reducido, una de las causas es la falta de técnicas capaces de identificarlas de forma específica en la mayoría de las especies de vertebrados, el analizar las impregnaciones ZIO y cloruro de oro como técnica general de identificación de células de Langerhans, proveerá herramientas para su estudio en vertebrados no mamíferos, se realizaron impregnaciones ZIO, cloruro de oro y la histoquímica enzimática para ATPasa en las especies pollo *Gallus gallus*, rana *Lithobates* y pez *Bagre marinus* con diferentes condiciones de pH, temperatura, tiempo de reacción y concentración de reactivos; se comparó la morfología obtenida entre las impregnaciones y la histoquímica como técnica de referencia, además se determinó si hay diferencia significativa entre la densidad celular calculada de cada impregnación y la histoquímica por medio de la prueba t Student.

Palabras clave: célula de Langerhans, impregnación ZIO, impregnación de cloruro de oro, histoquímica enzimática para ATPasa, vertebrados no mamíferos.

Introducción

Las células dendríticas epidérmicas conocidas como células de Langerhans (CL) desempeñan un papel determinante en el desarrollo de la respuesta inmune, ya que tiene como función la detección, transporte y presentación de antígenos a los linfocitos B vírgenes, los cuales se encargan de llevar a cabo la respuesta inmune adaptativa (Romero-Palomo,).

Las CL se localizan en la capa más externa de la piel la epidermis, su identificación es realizada por medio microscopía óptica en muestras de piel procesadas con tinciones histológicas especializadas, donde se observa su morfología celular, la cual consta de un soma de contorno irregular del cual proceden prolongaciones alargadas que le dan forma estrellada.

Se han realizados estudios en piel de mamíferos contribuyendo a su caracterización y análisis, sin embargo las técnicas disponibles no son capaces de la

identificación de forma general definir CL debido a la disponibilidad, existencia y elevado precio de reactivos e instrumentos en todos los vertebrados, el estudio de CL en *vertebrados no mamíferos* es un paso para la integración de la respuesta innata y adaptativa (Pérez Torres Armando,).

Las impregnaciones metálicas son técnicas de tinción que se basan en reacciones de precipitación, en las cuales se presentan interacciones atractivas del producto de reacción con la superficie celular de una o más células de forma específica en un tejido, las *impregnaciones yoduro de zinc-tetróxido de osmio* (ZIO) (Niebauer, Krawczyk, Kidd, y Wilgram,) y *cloruro de oro* (Langerhans,) han sido empleadas en la identificación de CL en mamíferos Figura 1 y 2, las condiciones de reacción tienden a ser poco definidas, y han caído en desuso pese a buenos resultados que se obtienen.

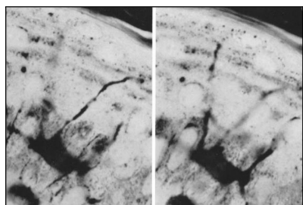


Figura 1: CL en piel de humano con la impregnación ZIO.

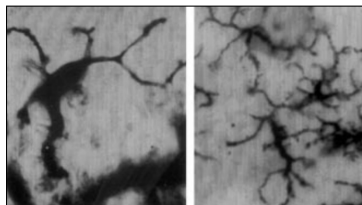


Figura 2: CL en piel de humano con la impregnación de cloruro de oro.

Las técnicas ZIO y cloruro de oro no han sido empleadas en otros vertebrados que no sean mamíferos, pero se espera que la interacción entre el producto de reacción de dichas impregnaciones y las CL en vertebrados no mamíferos sea favorable, debido al parecido en la composición de su superficie celular.

El analizar las impregnaciones ZIO y cloruro de oro como técnicas capaces de la identificación de CL, definir las condiciones óptimas de reacción y compararla con una técnica confiable como la *histoquímica enzimática* para ATPasa (Baker y Habowsky,), lo cual proveerá técnicas específicas, confiables y repetibles para el estudio de las CL en los vertebrados no mamíferos.

Materiales y Métodos

Obtención de muestras

Se seleccionaron tres especies de vertebrados no mamíferos: pollo *Gallus gallus*, rana *Lithobates* y pez *Bagre marinus*.

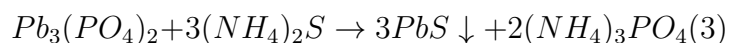
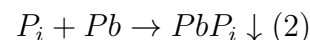
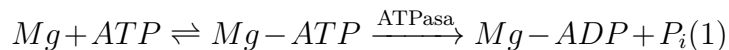
Se realizó el sacrificio de los especímenes (Secretaría de Agricultura,) y la obtención de muestras de piel de los especímenes, el tejido fue fijado en una solución de formol-cacodilatos durante 24 horas.

Las muestras fueron sumergidas en una solución de $CaCl_2 2M$ durante 15 min a $37^\circ C$ (Ogura, Knox, y Griffin,), con un microscopio estereoscópico se realizó la separación de la epidermis mediante el uso de agujas de disección, las muestras de epidermis fueron lavadas y conservadas en solución salina balanceada (SSB).

Histoquímica enzimática para ATPasa

Las muestras fueron lavadas tres veces en SSB, después fueron transferidas a un buffer de Tris-maleato

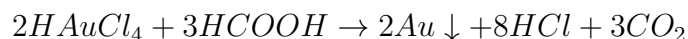
con pH 7.4 durante 15 min, posteriormente dos muestras son transferidas a la solución de $ATP_{control}$ y las demás a la solución de ATP donde se llevan a cabo las reacciones (1) y (2) (LW.,), estuvieron 1 hora a $37^\circ C$, las muestras se revelaron con una solución al 1 $\% \frac{m}{v}$ de $(NH_4)_2S$ al 22 $\% \frac{m}{v}$ (3); las muestras de esta técnica fueron procesadas en menos de una semana por el tiempo de vida de la enzima ATPasa.



Impregnación Cloruro de oro

Las muestras se tratan con solución buffer de citratos a pH 3-3.5 por 10 min, se transfieren a una solución de $AuCl_3 \cdot 3H_2O$, se probaron diferentes concentraciones las cuales fueron de 0,25, 0,5, 0,75 y 1 $\% \frac{m}{v}$, cada una a diferentes tiempos de impregnación de 5, 10, 20, 30 min, 1 y 2 horas, estas pruebas fueron realizadas a temperaturas de 4, 25, 30 y $35^\circ C$.

Después se procedió la reducción del $HAuCl_4$ (3) formado en medio ácido (Pacławski K.,), las muestras se transfirieron a una solución de $HCOOH$ al 20, 25 y 30 $\% \frac{m}{v}$ los tiempos de impregnación fueron de 30 min, 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas a 4, 25, 30 y $35^\circ C$, estas condiciones se realizaron para la impregnación de ZIO.



Impregnación ZIO

Las muestras son transferidas a un buffer Tris con pH de 7.4 durante 10 min, después se pasan a la solución de ZIO, preparada al momento mezclando 4 volúmenes una solución de ZnI_2 al 3 $\% \frac{m}{v}$ con uno de OsO_4 al 2 $\% \frac{m}{v}$, donde el producto de reacción es el $ZnOsO_4$ (Gilloteaux y Naud,).

Identificación de CL

Las muestras después de su procesamiento fueron montadas con resina sintética y estas fueron observadas en el microscopio óptico, las laminillas de ATP y

$ATP_{control}$ fueron comparadas para saber que la reacción enzimática se llevó a cabo, se observó la morfología de las CL en los especímenes seleccionados y posteriormente se realizó interpretación de las laminillas procesadas con las impregnaciones.

Análisis estadístico

Se tomaron microfotografías de zonas aleatorias de las laminillas con el microscopio óptico-digital, asegurando que la variable sea aleatoria, se obtuvo un área de $3mm^2$ de cada técnica realizada y se realizó el conteo de CL en cada imagen, con los datos obtenidos se realizó la comparación de la densidad de CL empleando la prueba estadística t de Student.

Costos

Se usaron los precios de Sigma-Aldrich para los siguientes reactivos ATP (5g 2,926 pesos), $HAuCl_4$ (1g 4,742 pesos) y OsO_4 (1g 6,952 pesos), y el microscopio óptico-digital (1 unidad 20,000 pesos), considerando el tiempo de uso del microscopio de 24 a 48 horas se considera un aproximado de 500 pesos, considerando el precio de los especímenes como el de una rata wistar que es 200 pesos por espécimen, contemplando un total de 30 especímenes sería de 6000 pesos, por lo que se cotiza un total 21,120 pesos.

Tratamiento de residuos

Los residuos de la solución de ATP, $(NH_4)_2S_2$, osmio y cloruro de oro fueron almacenados y rotulados en frascos, las muestras biológicas de los especímenes fueron almacenados en bolsas amarillas para RPBI con las etiquetas correspondientes para la entrega a la comisión de bioseguridad de la Facultad de Medicina de la división de investigación.

Resultados

Reacción ATPasa positiva

Se contrastó la histoquímica enzimática positiva con su respectivo control usando el objetivo 4x.

Morfología de la CL

Se observó la morfología típica de las CL empleando el objetivo 40x.

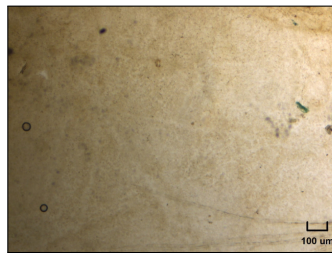


Figura 3: Histoquímica control de pollo.

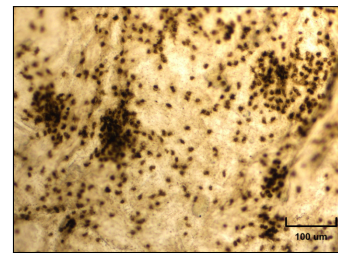


Figura 4: Histoquímica experimental de pollo.

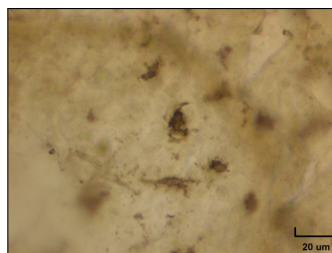


Figura 5: CL de pollo en epidermis de ala.

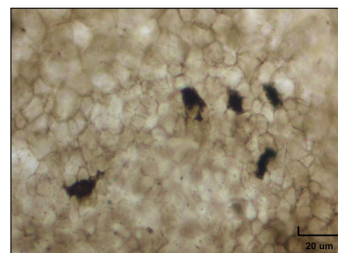


Figura 6: CL de pollo en epidermis de cuello.

Discusión

La histoquímica enzimática para ATPasa muestra la distribución de las CL en epidermis de piel (Figura 4), la cual es irregular, donde se pueden apreciar zonas con una mayor concentración de CL (cúmulos de CL) y otras donde se apreció un arreglo ordenado y homogéneo.

Comparando las figura 3 y 4 se contrastan dos escenarios de interés, el primero es la muestra control, que muestra como es la epidermis en condiciones normales, donde no es posible identificar a las CL sin una tinción específica para CL y el segundo que es la experimental, la cual muestra la especificidad que debe tener una técnica para la correcta identificación, ya que el producto de reacción presenta afinidad hacia las CL y no a otros componentes celulares.

Al observar las CL a mayor aumento (Figuras 5 y 6) se logró identificar las características morfológicas típicas de las CL, de las cuales destacan su soma alargado e irregular y sus múltiples y largas prolongaciones que forman redes entre ellas.

Con la información recabada de la histoquímica enzimática para ATPasa se podrá llevar a cabo una interpretación correcta de las muestras procesadas con las impregnaciones ZIO y cloruro de oro.

Conclusiones

Se determinaron las condiciones óptimas para la obtención de la epidermis de los especímenes.

Se observó la morfología normal de las células de Langerhans en vertebrados no mamíferos con ayuda de la técnica histoquímica enzimática para ATPasa.

Referencias

- Baker, K. W., Habowsky, J. E. (1983). Edta separation and atpase langerhans cell staining in the mouse epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 80(2), 104 - 107. doi: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12531712>
- Gilloteaux, J., Naud, J. (2004). The zinc iodide-osmium tetroxide staining-fixative of maillet. nature of the precipitate studied by x-ray microanalysis and detection of ca²⁺-affinity sub-cellular sites in a tonic smooth muscle. *Histochemistry*, 63, 227-243.
- Langerhans, P. (1868). Ueber die nerven der menschlichen haut. *Archiv f. pathol. Anat*, 44, 325-337.
- LW., T. (1969). Lead-adenosine triphosphate complexes in adenosine triphosphatase histochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 17(2), 85-94. Descargado de <https://doi.org/10.1177/17.2.85> doi: 10.1177/17.2.85
- Niebauer, G., Krawczyk, W., Kidd, R. L., Wilgram, G. (1969). Osmium zinc iodide reactive sites in the epidermal langerhans cell. *The Journal of Cell Biology*, 43, 80 - 89.
- Ogura, R., Knox, J. M., Griffin, A. C. (1960). Separation of epidermis for the study of epidermal sulfhydryl. *Journal of Investigative Dermatology*, 35(4), 239 - 243. doi: <https://doi.org/10.1038/jid.1960.112>
- Paclawski K., S. T. (2015). Kinetics and mechanism of the reaction of gold(iii) chloride complexes with formic acid. *Journal of Mining and Metallurgy*, 51(2), 133-142. doi: <https://doi.org/10.2298/JMMB141024017P>
- Pérez Torres Armando, A. C. A. (2004). Las células de langerhans en vertebrados no mamíferos. *Laborat acta*, 16, 125-129.

Romero-Palomo. (2011, 01). Funciones y clasificación de las células dendríticas. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. ISSN: 1130-2534, 24, 167-192.

Secretaría de Agricultura, D. R. P. y. A., Ganadería. (s.f.). *Nom-033-sag/zoo-2014*. Descargado de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015