

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

31/10/2020

Resumen

El estudio de las células de langerhans en vertebrados no mamíferos es reducido y 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 a las impregnaciones ZIO y cloruro de oro como técnicas generales de identificación de células de langerhans, lo cual proveerá herramientas para su estudio en los 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 concentraciones de reactivos, se comparó la morfología obtenida entre las impregnaciones y la histoquímica como técnica de referencia, así una comparación estadística de la densidad celular por medio de una prueba T Student, por medio de la histoquímica se observó la morfología y distribución normal de las células de Langerhans en los especímenes de estudio.

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, 2011).

Las CL se localizan en la capa más externa de la piel la epidermis, su identificación se realiza 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 identificar de forma general a las CL en todos los vertebrados, el estudio de las CL en *vertebrados no mamíferos* es un paso para la integración de la respuesta innata y adaptativa (Pérez Torres Armando, 2004), debido a la disponibilidad, existencia y elevado precio de reactivos e instrumentos el estudio de CL en vertebrados no mamíferos se ve limitado.

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, 1969) y *cloruro de oro* (Langerhans, 1868) han sido empleadas en la identificación de CL en mamíferos Figura 1

y 2, sin embargo las condiciones de reacción tienden a ser poco definidas, por lo han entrado en desuso pese a los buenos resultados que pueden ser obtenidos.

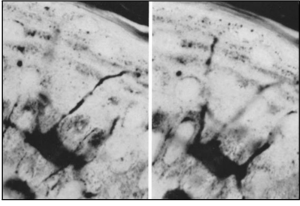


Figura 1: CL en piel de pollo con la impregnación ZIO.

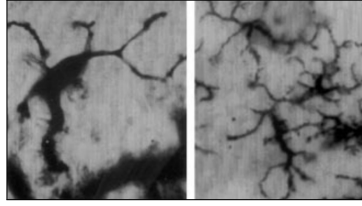


Figura 2: CL en piel de humano con la impregnación de cloruro de oro.

Las técnicas ZIO y cloruro de oro no han sido empleadas en otros vertebrados, pero se espera que las 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, 1983), 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

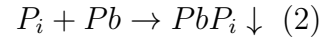
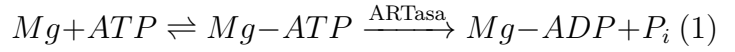
Se seleccionaron tres especies de vertebrados no mamíferos: pollo *Gallus gallus*, rana *Lithobates* y pez *Bagre marinus*.

Se realizó el sacrificio de los especímenes (Secretaría de Agricultura, s.f.) 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 $CaCl_2$ durante 15 min a $37^\circ C$ (Ogura, Knox, y Griffin, 1960), con el microscopio estereoscópico se realizó la separación de la epidermis mediante el uso agujas de disección, las muestras de epidermis fueron lavadas y conservadas en solución salina balanceada (SSB).

Histoquímica enzimática para ATPasa

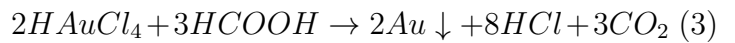
Las muestras fueron lavadas tres veces en SSB, después fueron transferidas a una solución de buffer de TRIS maleato con pH 7.4 durante 15 min, posteriormente a la solución de ATP (1) y (2) (LW., 1969) y $ATP_{control}$ respectivamente, estuvieron 1 hora a $37^\circ C$, las muestras se revelaron con una solución al 1 $\% \frac{m}{v}$ de $(NH_4)_2S$ al 22 $\% \frac{m}{v}$, 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 pasan a una solución buffer de citratos a pH 3-3.5 por 10 min, se transfieren a una solución de $AuCl_3 \cdot 3H_2O$ a concentraciones de 0,25, 0,5, 0,75 y 1 $\% \frac{m}{v}$ a tiempos 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 (Paławski K., 2015), 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, la cual es 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, 2004).

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, de la cual 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, por lo que se cotiza un total 15,120 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 ámbar para su posterior tratamiento por la Facultad de Química.

Resultados

Reacción ATPasa positiva

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

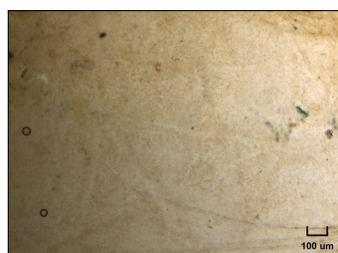


Figura 3: Histoquímica control de pollo.

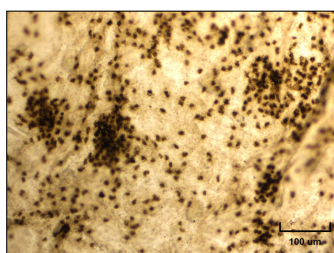


Figura 4: Histoquímica experimental de pollo.

Morfología de la CL

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

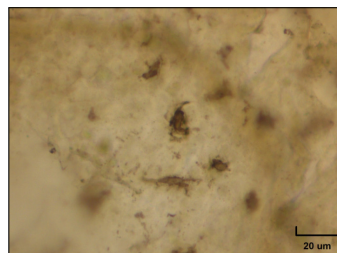


Figura 5: CL de pollo en epidermis de ala.

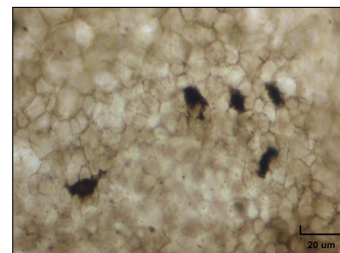


Figura 6: CL de pollo en epidermis de cuello.

Discusión

La histoquímica enzimática para ATPasa nos 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 más ordenado y homogéneo.

Comparando la Figura 3 y 4 se contrastan dos escenarios de interés, el primero es la muestra control, que nos 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 nos muestra la especificidad que debe tener una técnica para una 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 lograron 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 la interpretación correcta de las muestras procesadas con las impregnaciones ZIO y cloruro de oro.

Referencias

Baker, K. W., y Habowsky, J. E. (1983). Ed-ta 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., y Naud, J. (2004). The zinc iodide-osmium tetroxide staining-fixative of maillet. nature of the precipitate studied by x-ray microanalysis and detection of Ca^{2+} -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., y 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., y 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*.