

Demostración Inmunohistoquímica de Células de Langerhans en Córnea Humana

EDUARDO SEDANO¹, JOHN VICTORIO², CARLOS NEIRA¹,
CÉSAR ROJAS

¹Departamento Académico de Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, UNMSM. Laboratorio de Procedimientos Histológicos del Departamento de Patológica, Hospital de Apoyo "María Auxiliadora". ²Instituto de Patología, Facultad de Medicina, UNMSM. Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de la Fuerza Aérea del Perú. Col. Alumno de la Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, UNMSM.

RESUMEN

Presentamos en este trabajo la indentificación de células de Langerhans en secciones de epitelio de córnea humana, fijadas en líquido de Zenker e incluidas en parafina, empleando el método inmunohistoquímico de streptavidina-biotina peroxidasa, para demostrar en ellas la presencia de proteína S-100 y muramidasa (lisozima). Las células de Langerhans se distinguieron fácilmente del resto de células epiteliales pues fueron los únicos elementos proteína S-100+ y muramidasa+, las cuales se tiñieron de color marrón claro y mostraron un contorno redondeado, con una o dos prolongaciones. Su población en la zona límbica es numerosa y es nula en la región central.

Palabras claves: Células de Langerhans, Córnea humana, Inmunohistoquímica, Streptavidina-biotina peroxidasa, proteína S-100, muramidasa.

INMUNOHISTOCHEMICAL IDENTIFICATION OF LANGERHANS IN HUMAN CORNEA SUMMARY

We have achieved the identification of Langerhans cells in human cornea epithelium cross sections, fixed in Zenker's liquid and embedded in paraffin, according to streptavidin-biotin peroxidase immunohistochemical method, in order to demonstrate protein S-100 and muramidase (lysozyme) presence in them.

Langerhans cells were identified easily from the rest of epithelial cells because they were the only elements protein S-100+ and muramidase+, which were stained light brown and showed rounded outlines with one or two prolongations. Langerhans cells were numerous in the limbic zone and null in the central region.

Key words: Langerhans cells, Human cornea, Immunohistochemistry, Streptavidin-biotin peroxidase, Protein S-100, Muramidase.

INTRODUCCION

En 1868 Paul Langerhans, describió - empleando un método de impregnación áurica - una nueva población celular localizada entre las células epidérmicas de la piel. Las consideró como integrantes del "sistema sensorial de la epidermis". Luego, Ranvier (1875) al describirlas les asignó origen mesodérmico, probablemente linfático. Masson (1948), halló una similitud de estas células con los melanocitos, sin embargo, constató que carecían de melanina, infiriendo que podían ser melanocitos viejos. Los estudios realizados por Ferreira Márquez (1951)

le permitieron atribuirle un origen neuroectodérmico y determinar que representaban a células de Schwann.

La descripción de su morfología mediante el microscopio electrónico (Birbeck y col., 1961), la caracterización específica de ellas por el método histoquímico, para detectar la enzima adenosintrifosfatasa (ATPasa) en la superficie membranosa (Mustakallio, 1962; Bradshaw y col., 1963) y porque reaccionan, positivamente a las pruebas inmunohistoquímicas que demuestran proteína S-100 (Soler P., Chollet S., Jacque C. y col., 1985) y de manera variable con la pruebas que demuestran muramidasa (Favara et al., 1983), impulsaron diversos estudios para tratar de conocer aspectos morfológicos adicionales, su origen embriológico y su comportamiento funcional.

Las células de Langerhans son células presentadoras de antígenos que fomentan las reacciones cutáneas de hipersensibilidad tardía, proceden de elementos precursores originarios de la médula ósea

Correspondencia:

Lic. T. M. Eduardo Sedano Gelvet.
Laboratorio de Procedimientos Histológicos
Departamento de Patología
Hospital de Apoyo "María Auxiliadora"
Calle Miguel Iglesias s/n. Lima 29 - Perú

hematopoyética, probablemente monocitos, que colonizan los epitelios poliestratificados planos, y órganos linfáticos como el timo (Van Haelst, 1969; Hoshino y col., 1970), ganglios linfáticos (Kondo, 1969; Vernon y col., 1973) y bazo (Brelinska y Pilgrim, 1983). En los epitelios a los que arriban se disponen unas al lado de las otras, extendiendo sus procesos dendríticos entre los queratinocitos, en las tres dimensiones del espacio. De esta manera integran una especie de red celular: «sistema retículo-epitelial» (Shelley y Jublin, 1976 a y b). La capacidad de movimiento y traslación de las células de Langerhans, del tejido subyacente a los epitelios, se puede apoyar porque poseen una extensa red de microfilamentos semejantes a los de actina y un sistema prominente de microtúbulos (Silberberg, 1971; Silberberg-Sinakin y col., 1978) y porque en cultivo de tejidos de epidermis humana y de cobayos (Cruikshank y Cooper, 1975; Fritsh y col., 1973) se observa que estas células exhiben movimientos pseudopódicos y sus prolongaciones dendríticas se retraen y se extienden.

Las células de Langerhans no pueden identificarse en tejidos de mamíferos que han sido fijados, incluidos y coloreados rutinariamente (método de coloración de hematoxilina-eosina). Para su visualización se requiere aplicar procedimientos especiales de impregnación metálica, como la de cloruro de oro (Langerhans, 1868). Aunque este método es de manipulación tediosa, si se efectúa correctamente ofrece resultados excelentes (Breathnach, 1963; Zelickson y Mottaz, 1968). Las células de Langerhans se observan constituidas por un cuerpo poliedrico localizado en los estratos suprabasales de los epitelios poliestratificados planos de los cuales se extienden delicadas prolongaciones dendríticas, orientadas hacia los estratos superiores.

Otros métodos que emplean sales de metales pesados como el yoduro de osmio (Breathnach y Goodwing, 1965) y el yoduro zinc-osmio (Niebauer y col., 1969; Rodríguez y Caorsi, 1978) detectan fácilmente a estas células en los epitelios poliestratificados planos.

La membrana celular de las células de Langerhans se caracterizan por presentar actividad de varias enzimas hidrolíticas, demostradas mediante procedimientos histoquímicos. Estos permiten una visualización selectiva de las células, no solamente en secciones de tejidos obtenidos mediante el criostato, sino también en láminas de epitelios que facilitan un examen cuantitativo. En las células de Langerhans se han identificado adenosinatrifosfatasa (Mustakallio, 1962; Bradshaw y col., 1963), esterasa (Jarret y Riley, 1963), acetilcolinesterasa (Hollis y Lyne, 1972), manosidasa (Elleder, 1975) y fosfatasa alcalina (Khalil y col., 1982).

CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Los distintos estudios realizados para conocer mejor las características morfológicas y funcionales de las células de Langerhans han comprobado que estas células difieren de las otras células epidérmicas porque ellas poseen antígenos y receptores de superficie que están reconocidos como elementos involucrados en la respuesta inmune, semejantes a aquellos que identifican a células de la línea monocito-histiocito-macrófago. Las células de Langerhans tienen receptores de superficie para la fracción Fc de la IgG (Stingl y col., 1977), y receptores para C_{3b} , que es un producto de la activación del tercer componente del complemento (Burke y Gigli, 1980). La utilización de procedimientos inmunohistoquímicos ya sea por anticuerpos conjugados a enzimas (método de la peroxidasa-

antiperoxidasa), streptavidín-peroxidasa y anticuerpos inmunofluorescentes han permitido identificar plenamente a las células de Langerhans y reconocer la presencia de una serie de antígenos de membrana. Así, al igual que otras células presentadora de antígenos, expresan antígenos de histocompatibilidad HLA clase II (HLA-D) en su superficie y OKT₆ (glicoproteína) que pueden detectarse fácilmente tanto en secciones y láminas epiteliales como en órganos y tejidos no epiteliales. Murphy y col., (1981 a, 1981 b y 1982) y Flote y col., (1983) han detectado antígeno OKT₆, empleando anticuerpos monoclonales; mientras que Foster y Holbrook (1985) determinaron inmunológicamente la presencia de células de Langerhans en la epidermis de embriones y fetos humanos mediante el empleo de anticuerpos monoclonales para HLA-DR. Se han descrito métodos que, utilizando partículas de oro coloidal absorbidas en ciertas porciones de anticuerpos específicos (Schmitt y col., 1983, 1985), las identifican especialmente a nivel de microscopía electrónica, haciendo posible cuantificar la densidad de antígenos superficiales de la membrana celular.

Se ha reportado que las células de Langerhans reaccionan positivamente, a las pruebas inmunohistoquímicas que demuestran proteína S-100 (Soler P., Chollet S., Jacque C. y col., 1985) y reaccionan de manera variable con las pruebas que demuestran muramidasa (Favara et al., 1983).

Se distinguen de los monocitos en el hecho de que su capacidad fagocítica es mínima (Kobagashi y Hoshino, 1979; Silberberg-Sinakin y col., 1980), y porque reaccionan negativamente a las pruebas inmunohistoquímicas que demuestran a las enzimas - I-antitripsina, I-antiquimotripsina y lisozima (muramidasa) que rutinariamente permiten detectar en tejidos a los componentes de la serie monocito-histiocito-macrófago (Holden y col., 1982).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes revisados, podemos resumir que:

Las células de Langerhans integrantes de los epitelios poliestratificados planos, timo, ganglios linfáticos y bazo son elementos que tienen origen mesenquimatoso. Sus células antecesoras residen en la médula ósea. En los epitelios donde existen se les identifica fácilmente cuando en ellos se demuestra la presencia de antígeno de proteína S-100 y la enzima muramidasa.

Está comprobado que intervienen activamente en la captación de antígenos de las superficies epiteliales, en su procesamiento y posterior transferencia a las células "T" CD4 para que estas, a su vez, inicien la respuesta inmunológica.

El epitelio de la córnea, como revestimiento externo del globo ocular, y ciertos epitelios que tapizan determinadas cavidades vinculadas con el exterior, intervienen en la defensa del medio interno: actúan como una barrera para impedir la puesta en contacto directo de elementos extraños (biológicos, físicos y químicos) con los tejidos internos de la economía y evitando el desequilibrio funcional del organismo.

Por lo tanto consideramos que:

Las células de Langerhans que existen en el epitelio poliestratificado plano de córnea humana son proteína S-100+ y muramidasa+.

Para poder comprobar lo que hemos expuesto, debemos alcanzar los siguientes objetivos:

1. Adecuar el método inmunohistoquímico de streptavidina-biotina peroxidasa para demostrar la presencia de antígenos de proteína S-100 y aplicarlo sobre el epitelio poliestratificado plano de la córnea humana.
2. Adecuar el método inmunohistoquímico de streptavidina-biotina peroxidasa para demostrar la presencia de enzima muramidasa y aplicarlo sobre el epitelio poliestratificado plano de la córnea humana.
3. Demostrar, utilizando las reacciones inmunohistoquímicas antes mencionadas, la existencia de células de Langerhans en el epitelio poliestratificado plano de la córnea humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los objetivos referidos se alcanzaron empleando los siguientes procedimientos:

La adecuación de los métodos inmunohistoquímicos, (ya que estos permiten de manera específica localizar un determinado tipo de antígeno celular, con exclusión de todas las otras proteínas existentes en las células, basándose en la reacción antígeno - anticuerpo), para demostrar la presencia de proteína S-100 y muramidasa se logró ensayando el método de streptavidina-biotina peroxidasa, cuyo fundamento estriba en la fuerte afinidad de la streptavidina por la biotina. La streptavidina se obtiene de un tipo de *Streptomyces*, usualmente da menos background y tiene más sensibilidad que la avidina derivada del huevo. Cada molécula de streptavidina tiene cuatro sitios de unión para la biotina. Para su efecto, el anticuerpo primario se une al antígeno tisular, luego agregamos un anticuerpo secundario que esta químicamente ligado a la vitamina biotina y finalmente se agrega un complejo de streptavidina que esta ligado a la biotina y peroxidasa.

Como resultado de los ensayos efectuados se estandarizó un procedimiento que se reseñará posteriormente.

Para demostrar la presencia de las células de Langerhans en la córnea, se usaron 12 córneas humanas obtenidas de donaciones para trasplante, pero cuyo tiempo de vida para dicho efecto había caducado (24 horas en refrigeración y sin conservador alguno).

Estas fueron sometidas a los siguientes ensayos:

1. Una vez obtenidas las córneas se fijaron en el líquido de Zenker durante 24 horas, preparado de la siguiente manera:

Agua destilada	100.0 ml
Bicloruro de mercurio	5.0 gr
Dicromato de potasio	2.5 gr

Se adiciona 5.0 mL de ácido acético glacial a 95 mL de líquido de Zenker antes de usar.

2. Después de la fijación, las córneas se lavaron con un chorro continuo de agua de caño durante 12 horas.
3. Luego se sumergieron durante 6 horas en solución de Lugol preparada de la siguiente manera:

Iodo metálico	1.0 gr
Ioduro de potasio	2.0 gr
Agua destilada	100.0 mL

Se cambia esta solución dos veces durante las primeras dos horas y se deja en el tercer cambio.

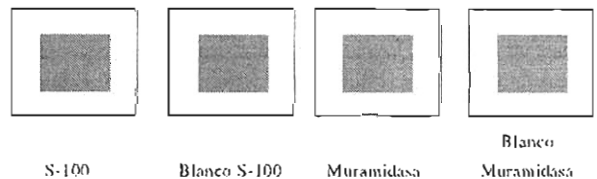
4. Las córneas se lavan en solución acuosa de tiosulfato de sodio al 5% durante 6 horas.
 5. Lavar con un chorro continuo de agua de caño durante 6 horas.
 6. Deshidratar en alcoholes durante 11 horas. realizado de la siguiente manera:
- | | |
|---------------------|---------|
| Alcohol al 70% | 1 hora |
| Alcohol al 80% | 1 hora |
| Alcohol al 96% I | 1 hora |
| Alcohol al 96% II | 1 hora |
| Alcohol al 96% III | 1 hora |
| Alcohol al 100% I | 2 horas |
| Alcohol al 100% II | 2 horas |
| Alcohol al 100% III | 2 horas |

7. Aclareamiento en xiloles durante 4 horas realizado de la siguiente manera:
- | | |
|----------|---------|
| Xilol I | 2 horas |
| Xilol II | 2 horas |

8. Embebido en parafina a 56°C durante 2 horas realizado de la siguiente manera:
- | | |
|-------------|--------|
| Parafina I | 1 hora |
| Parafina II | 1 hora |

9. La siguiente operación es "la formación del bloque". Para ello se usan las placas de Leuckart, que son dos piezas metálicas dobladas en ángulo recto. Las piezas metálicas se colocan sobre una superficie plana de metal, deslizandolas una contra la otra hasta obtener el tamaño deseado. El molde se rellena luego con parafina líquida. Las córneas ya embebidas en parafina se toman con pinzas previamente calentadas y se introducen en la parafina líquida del molde. Han de ser colocadas de tal manera que la superficie a cortar quede paralela al suelo del molde. Una vez que se haya solidificado la parafina del molde, ya está en condición disponible para ser seccionada en el microtomo.

Luego, con el microtomo se obtienen, de cada córnea, 4 secciones de 3 a 4 um de grosor, las cuales tendrán los siguientes rótulos:



Después fueron sometidas al siguiente método estandarizado de streptavidina-biotina peroxidasa:

1. Desparafinar e hidratar las cuatro secciones, más dos láminas control positivo (piel de paciente con vitiligo*), hasta agua destilada.
* En estos pacientes hay aumento de células de Langerhans y ausencia de melanocitos en piel.
2. Eliminar la peroxidasa endógena agregando, a las cuatro secciones y a las láminas control positivo, una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 3% durante 3 minutos. Lavar con buffer fosfato salino (PBS, pH=7,4) y secar.
3. Incubar las 4 secciones más las láminas control + con el reactivo bloqueador durante 5'. Secar el exceso de reactivo pero no lavar.

4. Aplicar el anticuerpo primario anti S-100 en la lámina rotulada con el mismo nombre e incubar durante 30 minutos y en la lámina "blanco S-100" agregar PBS e incubar por el mismo tiempo. Lavar con PBS y secar. Aplicar el anticuerpo primario anti-muramidasa en la lámina rotulada con el mismo nombre e incubar durante 30 minutos y en la lámina "blanco muramidasa" agregar PBS e incubar por el mismo tiempo. Lavar con PBS y secar. Aplicar el anticuerpo primario anti-S-100 y anti-muramidasa a cada lámina control positivo respectivamente, e incubar por el mismo tiempo. Lavar con PBS y secar.
5. Aplicar a todas las secciones y láminas control positivo, el anticuerpo secundario biotilado e incubar durante 30 minutos. Lavar las secciones con PBS y secar.
6. Incubar todas las secciones y láminas control positivo, con el reactivo de streptavidina peroxidasa durante 30 minutos. Lavar con PBS y secar.
7. Preparar el reactivo sustrato de la siguiente manera:

PBS pH=7,4	5 mL
Cromógeno diamino bencidina	0.006 gr
Peróxido de hidrógeno al 3%	4 gotas

 Mezclar bien.
8. Aplicar el reactivo sustrato a todas las secciones y láminas control positivo e incubar durante 6 minutos. Verificar las secciones y láminas control positivo bajo el microscopio para observar un desarrollo adecuado del cromógeno.
9. Lavar todas las secciones y láminas control positivo con agua destilada durante 5 minutos.
10. Colorear todas las secciones y láminas control positivo con hematoxilina de Harris durante 2 a 3 minutos.
11. Diferenciar rápidamente con agua acidulada y virar con agua amoniacal si fuera necesario.
12. Deshidratar, aclarar y montar con bálsamo de Canadá.

RESULTADOS

La adecuación del método inmunohistoquímico de streptavidina-biotina peroxidasa para demostrar la presencia de proteína S-100 y muramidasa en córnea humana se obtuvo introduciendo cambios en los tiempos de incubación, lo que nos permitió:

a) La identificación a plenitud de las células de Langerhans.

Las células de Langerhans se distinguieron fácilmente del resto de células epiteliales, pues fueron los únicos elementos proteína S-100 + (Fig. Nº 1) y muramidasa (lisozima) + (Fig. Nº 2). Las células se tiñieron de color marrón claro, mostrando una forma redondeada con un número variable de prolongaciones.

El epitelio poliestratificado plano de la córnea humana está formado por 5 a 6 capas de células (Fig. Nº 3) que se sostienen sobre una membrana basal prominente (Fig. Nº 4).

Las células de Langerhans se distribuyeron en el epitelio de la córnea de manera bastante característica. En la zona central no se encontró ninguna en todas las secciones (Fig. Nº 5 y Fig. Nº 6).

En la zona límbica la población fue numerosa (Fig. Nº 1 y Fig. Nº 2). Las células presentaban diferentes contornos, predominan-

do las células con perfiles redondeados con una o dos prolongaciones. La distribución de las células en esta zona fue uniforme.

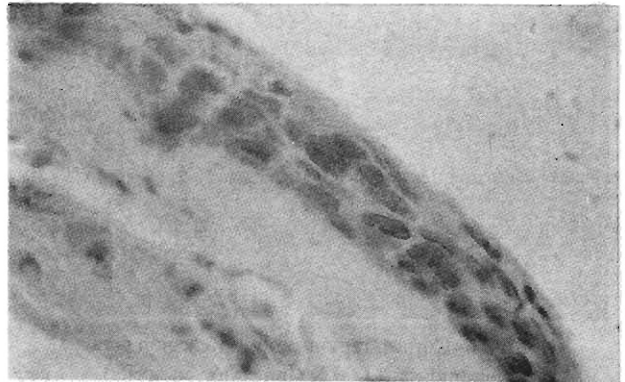


Fig. 1.- Célula de Langerhans en epitelio, región límbica. Proteína S-100+. 1,000 X (Inmersión en aceite). Células con cuerpo redondeado.

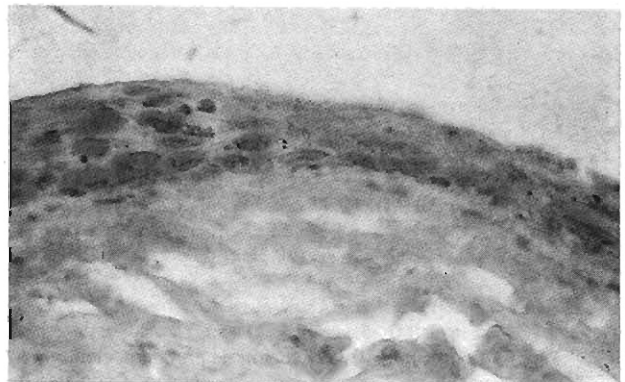


Fig. 2.- Célula de Langerhans en epitelio de córnea humana, región límbica. Muramidasa +. 1,000 X (Inmersión en aceite). Células con cuerpo redondeado

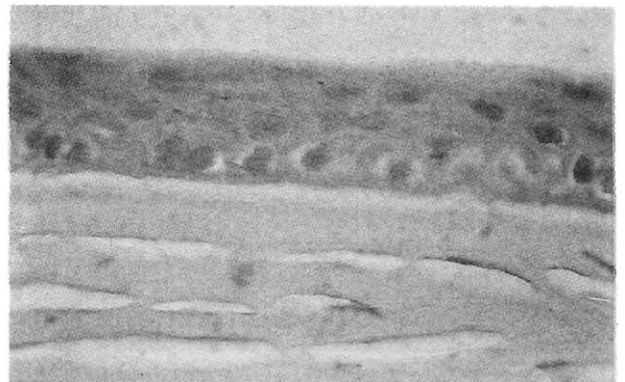


Fig. 3.- Córnea, región central. Reacción para Proteína S-100. 1,000 X (Inmersión en aceite). Ausencia de células de Langerhans.

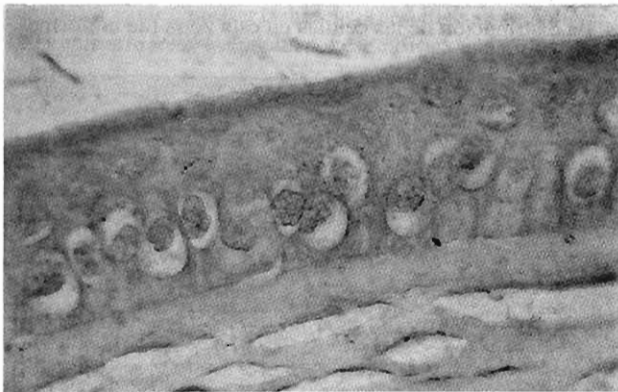


Fig. 4.- Córnea, región central. Reacción para muramidasa. 1,000 X (Inmersión en aceite).
Ausencia de células de Langerhans.

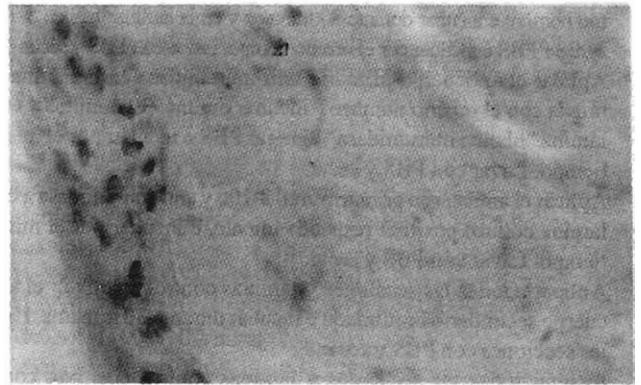


Fig. 7.- Córnea, región límbica. "Blanco S-100". 400 X.

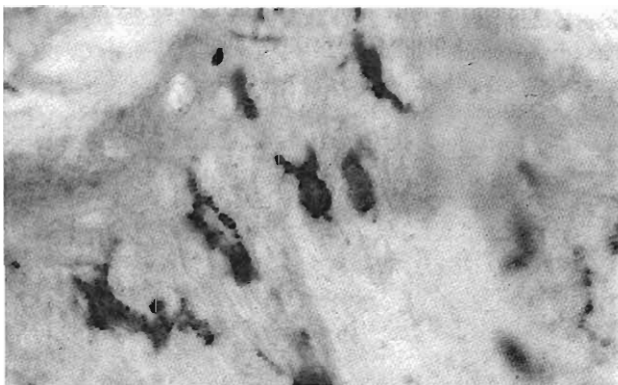


Fig. 5.- Control positivo (Sección de piel de paciente con vitiligo). Reacción para Proteína S-100. 1,000 X (Inmersión en aceite).

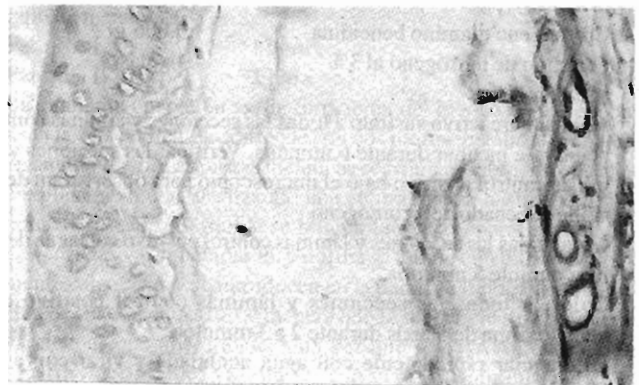


Fig. 8.- Córnea, región límbica. "Blanco muramidasa".
400 X.

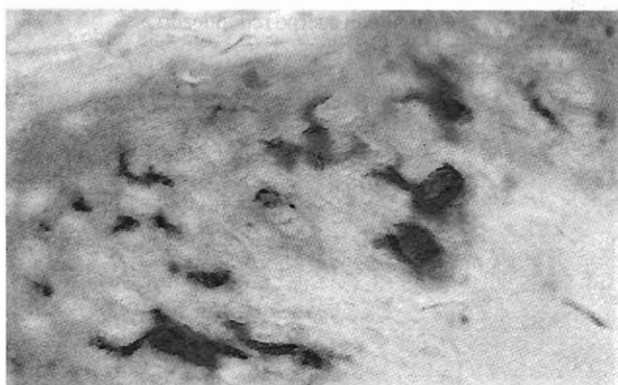


Fig. 6.- Control positivo (sección de piel de paciente con vitiligo). Reacción para muramidasa. 1,000 X (Inmersión en aceite).

DISCUSIÓN

Adecuación de los procedimientos para demostrar la presencia de proteína S-100 y muramidasa (lisozima).

Esta plenamente comprobado que las técnicas inmunohistoquímicas para la demostración de la presencia de proteína S-100 (Soler P., Chollet S., Jacque C. y Col., 1985) y muramidasa (Favara et al., 1983) son sumamente precisas para identificar y caracterizar a las células de Langerhans en los tejidos epiteliales. La especificidad de estos procedimientos aplicados sobre las córneas humanas, se ha corroborado al efectuar la correlación de las láminas problema (láminas rotuladas: S-100 y muramidasa) con las láminas blanco ("blanco S-100", "blanco muramidasa") y láminas control positivo.

Así mismo, otros ensayos inmunohistoquímicos ratifican este criterio, ya que las células de Langerhans de córnea humana presentan antígenos OKT₆ y HLA-DR (Sacks-E., Rutger-J., Jakobiec-FA., Bonetti-F., Knowles-DM., 1986; Asrar-AM., Geboes-K., Missotten-L., Emrah-MH., Maudgal-PC., Desmet-V., 1987 Seto-SK., Gillette-TE., Chandler-JW., 1987; Fraissinette-A., Schmitt-D., Thivolet-J., 1989; Philipp-W., Gottinger-W., 1991; Cavallini-GM., Longanesi-L., De-Pol-A., Cam-

pos-EC., Guerra-R., 1992; Li-Q., He-YL., 1993) considerados igualmente específicos para este tipo de células.

Demostración de las células de Langerhans en el epitelio corneal.

Todas las muestras de córneas procesadas y los controles positivos (Fotos 7 - 8) exhibieron células redondeadas, con una o dos prolongaciones citoplasmáticas, proteína S-100+ y muramidasa+ de color marrón claro, versus las células epiteliales del mismo tejido que no presentaron ningún tipo de reacción.

En contrapartida, las muestras blancas que no se incubaron con el anticuerpo primario, mostraron una reacción negativa (Fotos No. 9 - 10).

En cambio, los hallazgos reportados por Holden y col. (1982) difieren de lo reseñado anteriormente pues afirman que las células de Langerhans son muramidasa (lisozima) negativa; mientras que Favara et al. (1983) sostiene que dan reacción variada.

Las células de Langerhans, al igual que otras células presentadoras de antígenos, también expresan antígenos de histocompatibilidad HLA-DR, por lo tanto, son uno de los primeros elementos responsables en el rechazo de injertos de piel y otros tejidos epiteliales mucosos-escamosos; además, es de aceptación general creer que el éxito de los trasplantes de córneas se debe a la falta de irrigación sanguínea de esta.

Por lo expuesto al inicio del párrafo anterior, quizás debamos considerar también, que el no rechazo se deba a la ausencia o baja cantidad de células de Langerhans en la córnea, lo cual provoca incapacidad de inducir inmunidad cuando se transplanta a un receptor diferente.

Cabe mencionar, además, que en la bibliografía revisada para realizar el presente trabajo no hemos podido encontrar estudios sobre demostración inmunohistoquímica de células de Langerhans en córnea humana que utilicen métodos para determinar la presencia de proteína S-100 y muramidasa.

CONCLUSIONES

1. Las pruebas inmunohistoquímicas para demostrar la presencia de proteína S-100 y muramidasa en córnea humana resultaron efectivas y específicas para caracterizar a las células de Langerhans.
2. A las células proteína S-100+ y muramidasa+ puestas en evidencia en la córnea humana debemos considerarlas células de Langerhans.
3. Las células de Langerhans se encuentran presentes en el epitelio de la córnea humana, pero la población de las mismas difieren notablemente en las diversas regiones de este epitelio. Existen en mayor cantidad en la región lúmbica y están ausentes en la central.

AGRADECIMIENTO

A los Doctores Marcos Copaira Beltran y César Eduardo Montalvo Arenas nuestro eterno agradecimiento por contribuir en nuestro desarrollo en la Histoquímica y en la docencia porque nos enseñaron que los conocimientos no tienen barreras profesionales.

A los Doctores Eleodoro Durand Chocano y Lincoln Lavado, jefes de los departamentos de Patología y Oftalmología del Hospital "María Auxiliadora" respectivamente, por las facilidades brindadas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Birbeck M.S.C., Breathnach A.S. and Everall J. An electron microscopic study of basal melanocyte and high level clear cell (Langerhans cell) in vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 37: 51, 1961.
- 2) Breathnach A.S. The distribution of Langerhans cell within the human hair follicle and some observations on its staining properties with gold chloride. *J. Anat.* 97: 73, 1963.
- 3) Breathnach A.S. and Goodwin D.P. Electron microscopy of non keratinocytes in the basal layer of white epidermis of the recessively spotted guinea pig. *J. Anat.* 97: 377, 1965.
- 4) Brellinska R. and Pilgrin Ch. Macrophages and interdigitatin cell: their relationship to migrating lymphocytes in the white pulp of rat spleen. *Cell tissue Res.* 233: 6/1, 1983.
- 5) Burke K.E. and Gigli L. Receptor for complement of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 75: 66, 1980.
- 6) Cavallini G.M., Longanesi L., De Pol A., Campos E.C., Guerra R. 1992. «Epikeratophakia: histopatological and cultural study». *Int-Ophthalmol.* 16(2): 115-21.
- 7) Cruikshank C.N.D. and Cooper J.R. Langerhans cell in tissue cultures of guinea pig epidermal cell. *Br. J. Dermatol.* 92: 121, 1975.
- 8) El Asrar A.M., Geboes K., Missoten L., Emarah M.H., Maudgal P.C., Desmet V. 1987. «Cytological and immunohistochemical study of the limbal form of vernal keratoconjunctivitis by the replica technique». *Br J Ophthalmol.* 71(11): 867-72.
- 9) Elleder M. Activity of alfa-D-mannosidase in human Langerhans epidermal cells. *Virchows Arch. (Zellipathol)* 19: 93, 1975.
- 10) Favara B.E., McCarthy R.C., Mierau G.W. 1983. «Histiocytosis X». *Hum Pathol* 14: 663-676.
- 11) Ferreyra Márquez J. Systema sensitivum intraepidemicum. Die Langerhansschen Zellen als receptoren deshellenen schuerzes doliriceptores. *Arch. Dermatol. Syphilol.* 193: 191, 1951.
- 12) Flotte T.J., Springer T.A. and Thorbecke G.L. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am. J. Pathol.* 11: 112, 1983.
- 13) Foster C.A. and Holbrook K.A. Ontogeny expression of HLA-DR and OKT6 determinants by human embryonic and fetal Langerhans cells (abstract). *J. Invest. Dermatol.* 84: 327, 1985.
- 14) Ghosh Bimal C., Ghosh Luna. 1987. «Tumor markers and tumor-associated antigens». U.S.A. McGraw-Hill Book Company.
- 15) Holden C.A., Kerdel F.A. and Donald D.M. Lac of lysozime-antitrypsine and antichymotrypsine in normal Langerhans cells. Differentiation form cells of the monocytes-histiocytes-macrophages series. *Acta Dermatovener (Stockholm)* 62: 513, 1982.
- 16) Hollis D.E. and Lyne A.G. Acetylcholinesterase-positive Langerhans cells in the epidermis and wool follicles on the sheep. *J. Invest. Dermatol.* 58: 211, 1972.
- 17) Jarret A. and Riley P.A. Esterase activity in dendritic cells. *Br. J. Dermatol.* 75: 79, 1963.
- 18) Khalil H.M., Nithinai S. and Allen R.J. Alkaline phosphatase positive Langerhans cells in the epidermis of cattle. *J. Invest. Dermatol.* 79: 47, 1982.
- 19) Kobayashi M. and Hoshino T. Cytological and functional differences between Birbeck-granule containing cells (Langerhans cells) and dermal macrophages in the mouse. *J. Electron Microsc.* 28: 285-294, 1979.
- 20) Kondo Y. Macrophages containing Langerhans cells granules in normal lymph nodes of the rabbit. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 98: 506, 1969.
- 21) Langerhans P. Neber die nerven der menschlichen haut. *Virchows Arch. (Pathol Anat)* 44: 325, 1868.
- 22) Li Q., He Y.L. 1993. «An immunohistochemical study of Langerhans' cells (L.C), T-cells and the HLA antigen in human cornea». *Chung-Hua-Yen-Ko-Tsa-Chih* 28(3): 147-9.
- 23) Matus A., Mughal S. 1975. «Immunohistochemical localization of S-100 protein in brain». *Nature* 258: 745-748.
- 24) Montalvo A. César. 1986. «Presencia de células de Langerhans en epitelios planos estratificados y su relación con los procesos de queratinización». UNAM Facultad de Medicina. México D.F. Tesis de Maestría.

- 25) Murphy G. Monoclonal anti-T6 antibody and Langerhans cells. *Br. J. Dermatol.* 107: 487, 1982.
- 26) Mustakallio K. ATPase activity in neural elements of human epidermis. *Exp. Cell. Research* 28: 449, 1962.
- 27) Nakajima T., Watanabe S., Sato Y., Kameya T., Hirota T., Shimosato Y. 1982. «An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissue». *Am J Surg Pathol.* 6: 715-727.
- 28) Nefra M. Carlos, Moutalvo A. César, Sedano G. Eduardo. 1994. «Demostración histoquímica de células de Langerhans en córnea humana». *Revista ALMA MATER* 8: 89-96.
- 29) Niebauer G., Krawczyk W.S., Kidd R.L. and Wilgram G.F. Osmium zinc oxide reactive sites in epidermal Langerhans cell. *J. Cell. Biol.* 43: 80, 1969.
- 30) Philipp W., Gottinger W. 1991. «T6-positive Langerhans cells in diseased corneas». *Invest-Ophthalmol-Vis-Sci.* 32(9): 2492-7.
- 31) Ranvier L. (1875) Citado por BREATHNACH. A. *Journal of Anatomy* 98: 295, 1964.
- 32) Rodríguez E. and Caorsi I. A second look at the ultrastructure of the Langerhans cell on the human epidermis». *J. Ultrastr. Research* 65: 279, 1978.
- 33) Sacks E., Rutgers J., Jakobiec F.A., Bonetti F., Knowles D.M. 1986. «A comparison of conjunctival and nonocular dendritic cells utilizing new monoclonal antibodies». *Ophthalmology* 93(8): 1089-97.
- 34) Schmitt D., Dezutter Dambuyant C. Recent advances of ultrastructural immunocytochemistry of epidermal Langerhans cells. *Br. J. Dermatol.* 113: 2, 1985.
- 35) Seto S.K., Gillette T.E., Chandler J.W. 1987: «HLA-DR+/T6-Langerhans cells of the human cornea». *Invest-Ophthalmol-Vis-Sci.* 28(10): 1719-22.
- 36) Shelley W.B. and Juhlin L. Selective uptake of contact allergens by the Langerhans cell. *Arch. Dermatol.* 113: 187, 1977.
- 37) Silberberg Sinakin I., Gigli I., Baer R.L. Langerhans cell: Role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages. *Immunological Rev.* 52: 203, 1980.
- 38) Soler P., Chollet S., Jacque C. «Immunocytochemical characterization of pulmonary histiocytosis X cells in lung biopsies». *Am J Pathol* 118: 439, 1985.
- 39) Stingl G., Wolf Schreiner E.C., Pichler W.J., Gauchat F., Knapp W. and Wolff K. Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors. *Nature* 268: 245, 1977.
- 40) Van Haelst, U.J.G. Light and electron microscopic study of the normal and pathological thymus of the rat. A mesenchymal type of cell. *Z. Zellforsch* 99: 198, 1969.
- 41) Zeligson A.S. and Mottaz J.H. Localization of gold chloride and adenosine triphosphatase in human Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 51: 365-372, 1968.