

UN METODO HISTOQUIMICO PARA DETECCION DE CELULAS DE LANGERHANS CON AGLUTININA DE MANI

Dr. GABRIEL LANDINI*
Dr. MOTOO KITANO**
Dr. ATSUSHI URAGO***

Palabras clave:

Células de Langerhans - Método de tinción.

INTRODUCCION

Las células de Langerhans (CL) deben su nombre a Paul Langerhans, un estudiante alemán de medicina, quien las descubrió en 1868 en secciones del epitelio de piel humana impregnada con cloruro de oro. Estas células, están presentes en el epitelio de piel y mucosas de roedores y mamíferos y Langerhans sospechó que tenían un origen nervioso.

Las CLa diferencia de las células epiteliales tienen un contorno celular dendrítico, citoplasma pálido (con la tinción de hematoxilina y eosina), carente de desmosomas, tonofilamentos, y núcleo lobulado (5).

En 1961 Birbeck y col. describieron en las CL, un gránulo citoplasmático en forma de raqueta de tenis (gránulo de Birbeck) con una parte globular electrón-lúcida y una parte tubular con estriaciones cruzadas periódicas, también llamada "zipper granule".

* Doctor en Odontología, estudiante del programa de Doctorado en Patología Oral.

** D.D.S., Ph. D., Prof. Adj. Patología Oral.

*** D.D.S., Ph. D., Prof. Patología Oral.
Kagoshima University Dental School
Department of Oral Pathology
Usuki-cho 1208-1, Kagoshima 980, JAPAN.

Más tarde, con la llegada de técnicas inmunohistoquímicas y nuevos métodos para la obtención y purificación de anticuerpos, se descubren nuevos marcadores para las CL.

Muchas de estas técnicas pueden ser aplicadas en secciones de parafina; otras en cambio, requieren cortes por congelación. Además de identificar a las CL por el gránulo de Birbeck, se las puede caracterizar por la expresión fenotípica de ciertos antígenos (no precisamente exclusivos de las CL) intracitoplasmáticos y de membrana: proteína S-100 y sub fracciones, enzima ATP-asa, antígenos de membrana Leu-6(T6) o OKT-6, Leu-M3 y Leu3-T4 (1, 13).

Con el advenimiento de estos métodos diagnósticos y la microscopía electrónica, se pudo comprobar que las células precursoras de las CL se encuentran en la médula ósea (8, 14) y que otras poblaciones celulares con las mismas características ultraestructurales descritas por Birbeck se localizan también en los nódulos linfáticos (células dendríticas reticulares). Los trabajos de Silberberg-Sinakín y col. (12) demostraron con prolina radioactiva, que las CL no forman una población estática, sino que migran desde el epitelio hacia los ganglios linfáticos regionales en las reacciones de hipersensibilidad de contacto.

También dedujeron que células dendríticas reticulares de los ganglios linfáticos y las CL formaban un mismo grupo con origen y función muy diferentes a las propuestas por Paul Langerhans en 1868.

Es así que se ha incrementado el interés por las CL y se ha probado que ejercen la función de presentar antígenos provenientes del exterior a una población especializada de macrófagos y promover la proliferación de linfocitos T.

Se ha demostrado que el número de CL además de aumentar en las reacciones de hipersensibilidad de contacto, también aumenta en procesos infecciosos tales como gingivitis (2), candidiasis (7); líquen plano y otras enfermedades de origen autoinmune de piel y mucosas (13), y en el cáncer oral (carcinoma espinocelular) (9).

Otro interesante descubrimiento es que las CL de piel humana transplantada a animales de laboratorio y expuesta a unidades de luz para resinas fotocurables, decrecen en número y pierden la actividad de la enzima ATP-asa, pudiendo perder también su función inmunológica (4).

Más allá de esta función de detectar y presentar antígenos, se propuso que las CL juegan un rol importante en las lesiones que se agrupan bajo el nombre de Histiocitosis X (H-X) (granuloma eosinófilo, enfermedad de Letterer-Siwe y enfermedad de Hand-Schüller-Christian) (3). Más del 20% al 30% de las células histiocíticas de estas lesiones muestran gránulos

de Birbeck y similitudes en los patrones de tinción anteriormente descriptos (10).

Actualmente, se piensa que estos tipos de H-X son desórdenes proliferativos de las CL, en los cuales hay un disturbio de la regulación de su actividad (una respuesta desmedida ante una noxa en una etapa proliferativa o la ausencia de "feedback" en una etapa regresiva). Algunos autores se refieren a estas lesiones como "Langerhans Cell Histiocytosis".

En 1986, Ree y Kadin proponen como marcador para las CL, la aglutinina de maní (PNA), usando un método inmunohistoquímico (11).

En este artículo describimos una transformación del método de Ree y Kadin, a método histoquímico puro, lo que permite distinguir las CL de macrófagos e histiocitos en lesiones de H-X con igual seguridad, menor tiempo y menor posibilidad de error técnico.

CASO CLINICO

El material patológico para este estudio, granuloma eosinófilo del maxilar inferior, proviene de las fichas del Departamento de Patología Oral de la Facultad de Odontología, Universidad de Kagoshima, Japón.

El paciente, de 11 años de edad, presentaba

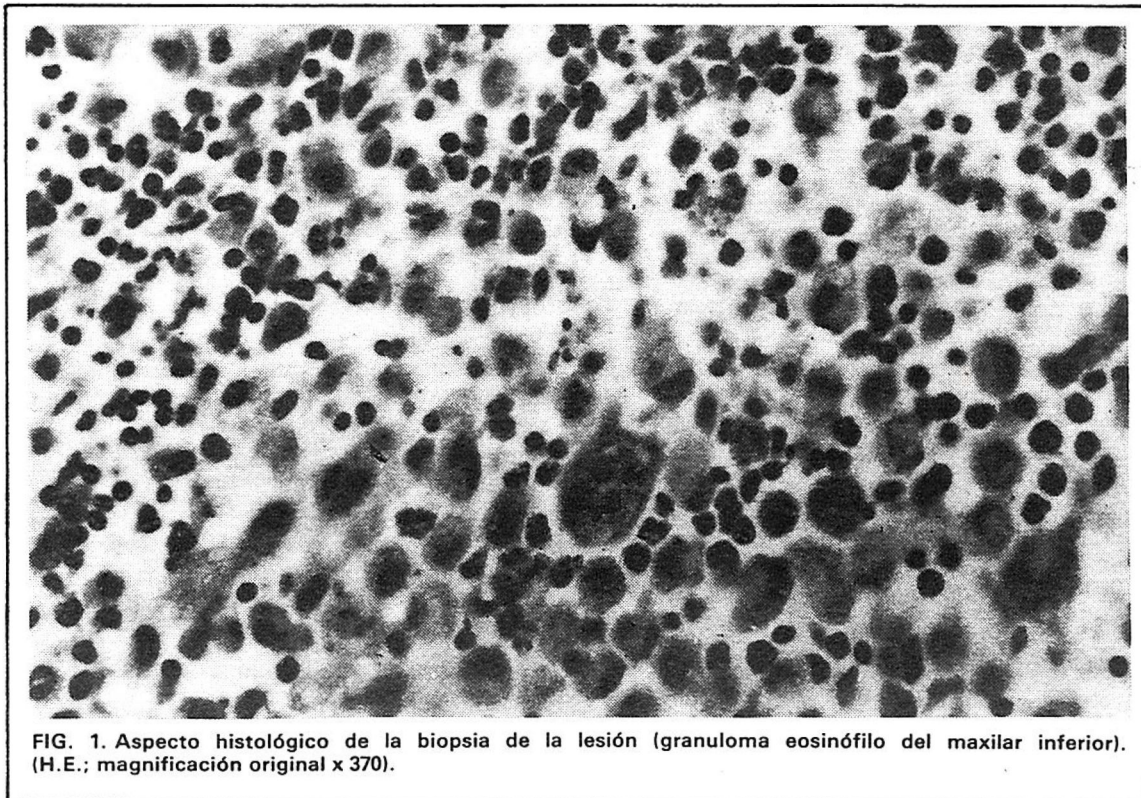


FIG. 1. Aspecto histológico de la biopsia de la lesión (granuloma eosinófilo del maxilar inferior). (H.E.; magnificación original x 370).

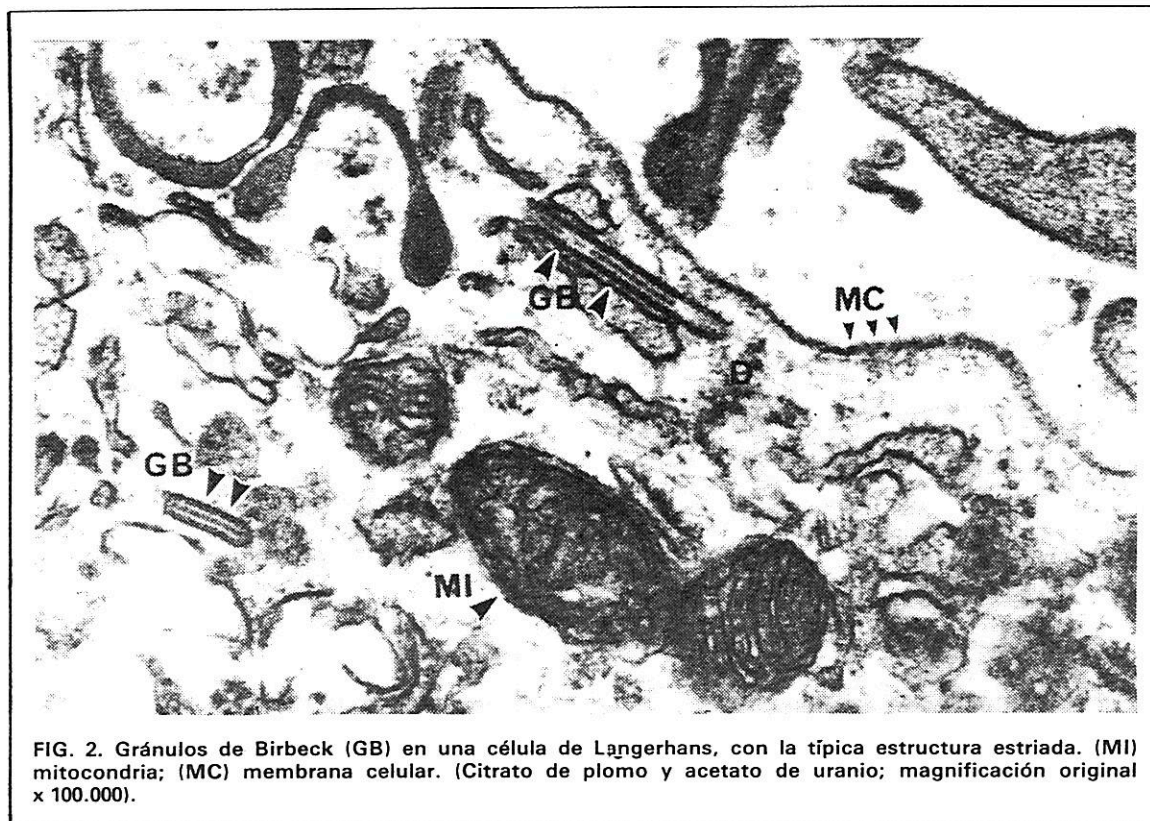


FIG. 2. Gránulos de Birbeck (GB) en una célula de Langerhans, con la típica estructura estriada. (MI) mitocondria; (MC) membrana celular. (Citrato de plomo y acetato de uranio; magnificación original x 100.000).

una tumefacción dolorosa de la zona preauricular izquierda. En el estudio radiográfico, se descubrió un área radiolúcida en el borde de la escotadura sigmoidea de la rama montante del maxilar inferior. La lesión se extendía hacia la apófisis coronoides y el cóndilo articular. Se efectuó una biopsia por vía intraoral que reveló una lesión granulomatosa destructiva, rica en histiocitos, células espumosas, células gigantes multinucleares a cuerpos extraños y una intensa infiltración inflamatoria principalmente de eosinófilos (Fig. 1). El diagnóstico anátomo-patológico fue "granuloma eosinófilo del maxilar inferior".

A pesar de la relativa benignidad del granuloma eosinófilo, se efectuó una resección de la parte superior de la rama montante, por la extensa destrucción ósea. Para devolver en lo posible la función articular, se realizó un autoinjerto de cresta ilíaca. A un año de la intervención, no han aparecido focos secundarios ni recidiva de la lesión.

MATERIALES Y METODO

Para corroborar la presencia de CL en el material biopsico y operatorio en secciones de parafina, utilizamos el método inmunohisto-

químico indirecto Avidin-Biotin Complex (ABC) (VECTOR, Burlingame, CA) con anticuerpos policlonales anti-proteína S-100 bovina (DAKO, Copenhagen, DENMARK) dilución 1/500 y 1/1000 en una cámara húmeda a 4 grados Celsius por 12 hs. El cromógeno para visualizar los productos de la reacción fue 3.3' tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB).

También utilizamos un método modificado del de Ree y Kadin para CL con aglutinina de maní (PNA, Arachis Hypogaea).

Otra parte del material fue procesado para el microscopio electrónico, con las técnicas de rutina, seccionado en el ultramicrotomo y teñido con citrato de plomo y acetato de uranio.

Método de tinción con PNA

1) Montar cortes de parafina de 5 micrómetros de espesor en portaobjetos tratados con solución al 0.2% de neopreno en toluol para facilitar la fijación al vidrio.

2) Deparafinar las secciones en xilol y rehidratar en alcoholes.

3) Incubar a 37 grados Celsius por 30 minutos en buffer de fosfato salino (PBS), pH 7.2 con 0.1% tripsina y 0.1% cloruro de calcio.

4) Lavar en PBS, 2 veces.

5) Sumergir las secciones en peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada por 10 minutos, para bloquear la actividad de la enzima peroxidasa endógena presente en el tejido.

6) Lavar en PBS, 2 veces.

7) Cubrir las secciones con PNA biotinizada (VECTOR) (dilución 1/200 en PBS) por 30 minutos. Luego espolvorear polvo de hígado de ratón (VECTOR) sobre las secciones para evitar reacciones no específicas, e incubar por 30 minutos.

8) Lavar en PBS, 2 veces.

9) Incubar en Avidin-Biotin Complex (ABC) por 20 minutos (dilución 1/100 in PBS).

10) Lavar en PBS, 2 veces.

11) Sumergir las secciones en solución de 3.3' tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) en tris buffer (0.025%) pH 7.0 hasta que los productos de la reacción sean visualizados en el microscopio. Lavar en agua corriente y teñir los núcleos con verde de metilo.

RESULTADOS

A pesar del cuadro histológico típico de granuloma eosinófilo, un escaso número de cé-

lulas histiocíticas resultaron positivas a la reacción con anticuerpos anti-proteína S-100.

En cambio, en el microscopio electrónico fue posible comprobar en muchas células (CL), la existencia de gránulos de Birbeck (Fig. 2), ausencia de tonofilamentos y clivamientos de los núcleos.

Las células gigantes a cuerpos extraños mostraron gran cantidad de partículas fagocitadas. Con la tinción de Berlin blue se evidenció un alto contenido en hierro, posiblemente hemosiderina de focos de micro hemorragias.

La tinción con PNA reveló 2 patrones de tinción, correspondientes a los descritos por Ree y Kadin (Figs. 2 y 3): a) muchas células con depósitos de reacción en la superficie celular y en el área paranuclear, permaneciendo el resto del citoplasma sin teñir; b) las células espumosas y gigantes (histiocitos-macrófagos), mostraron una tinción difusa de todo el citoplasma.

DISCUSION

Hemos podido comprobar la presencia de CL en una lesión de H-X, con PNA y corroborar con el microscopio electrónico, a pesar de que las mismas no mostraron gran reactividad con anticuerpos anti-proteína S-100. En

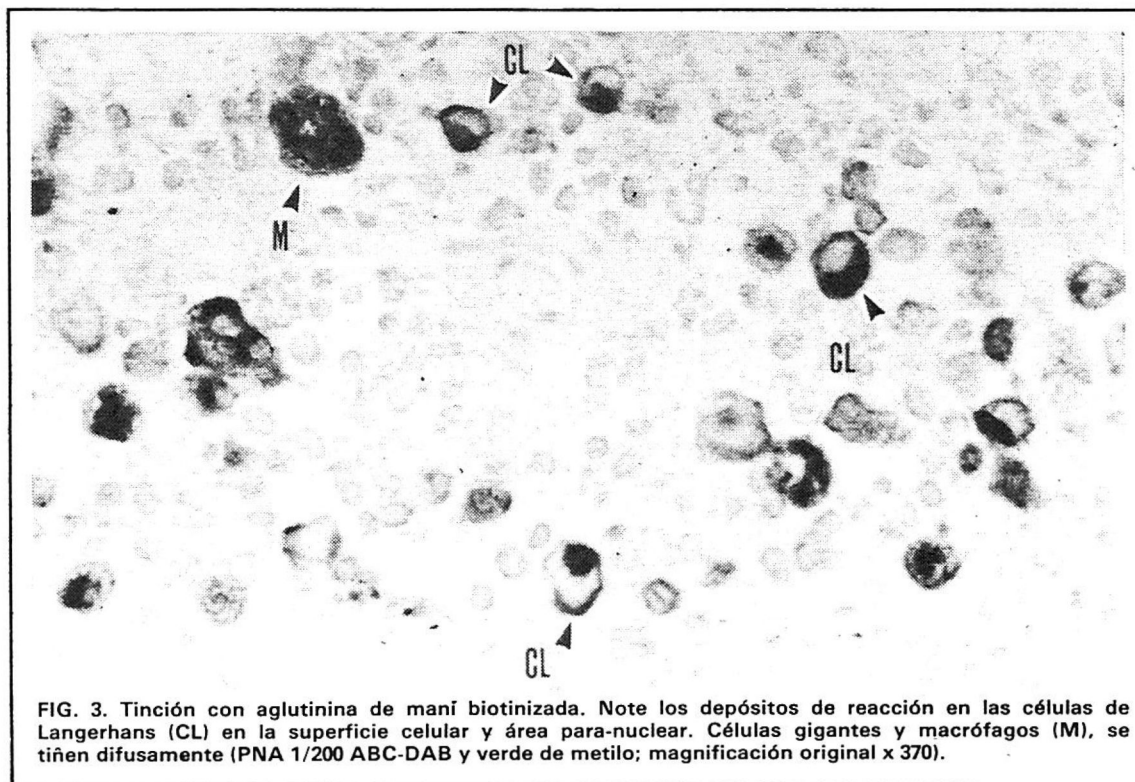


FIG. 3. Tinción con aglutinina de maní biotinizada. Note los depósitos de reacción en las células de Langerhans (CL) en la superficie celular y área para-nuclear. Células gigantes y macrófagos (M), se tiñen difusamente (PNA 1/200 ABC-DAB y verde de metilo; magnificación original x 370).

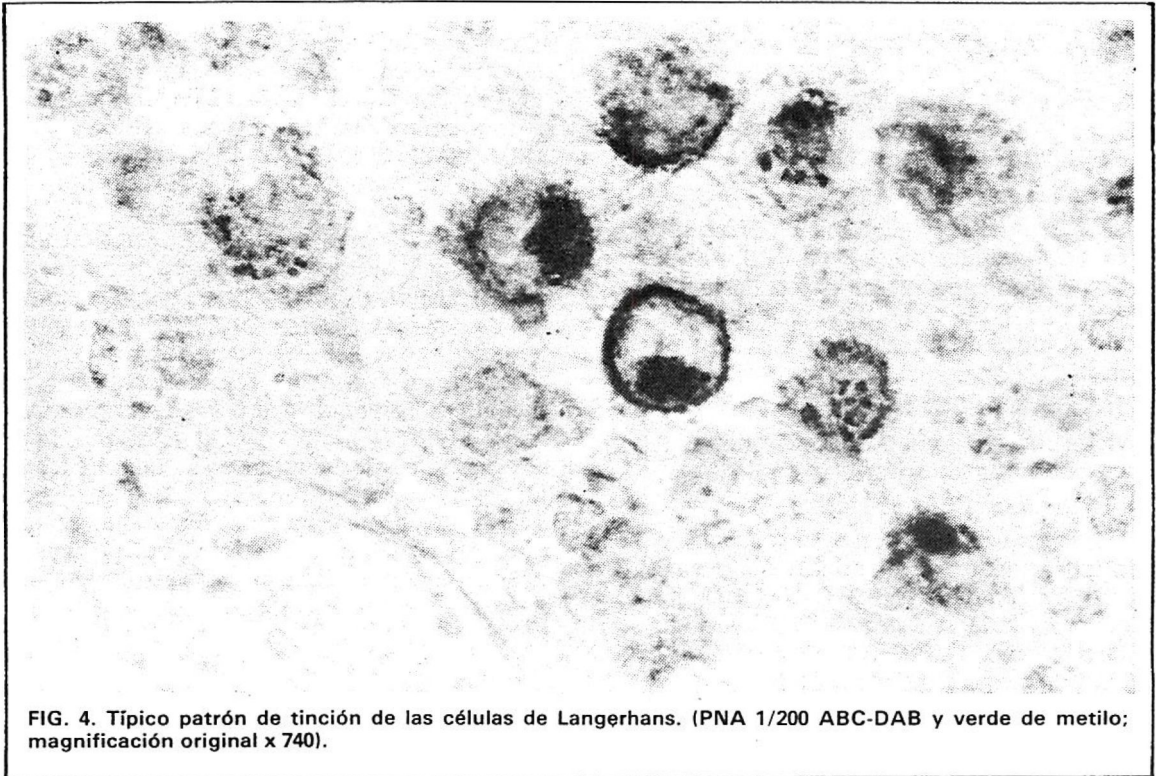


FIG. 4. Típico patrón de tinción de las células de Langerhans. (PNA 1/200 ABC-DAB y verde de metilo; magnificación original x 740).

realidad, esta proteína es uno de los pocos marcadores posibles de usar en secciones de parafina y su presencia en las CL es todavía inexplicable. La proteína S-100 (llamada así por su solubilidad en sulfato de amonio al 100%) es un grupo de 3 proteínas similares, cuyo peso molecular es de aproximadamente 2 Kd con origen y función desconocidas. Fue detectada por primera vez en células nerviosas, y actualmente, se la ha encontrado en muchos otros tejidos normales (cartilago, melanocitos, adipocitos, mioepitelio) (6) y patológicos (melanoma, tumor a células granulosas, adenoma pleomórfico) por lo cual, su importancia en el diagnóstico debe ser considerada detenidamente.

Las técnicas inmunohistoquímicas con lectinas (aglutininas vegetales) han sido usadas exitosamente en la tipificación de células en patología tumoral. Estas técnicas requieren una cadena de reacciones entre: a) tejido y aglutinina, b) aglutinina y anticuerpo primario anti-aglutinina y c) dependiendo del método, entre anticuerpo y complejo-cromógeno (Avidin Biotin Complex, ABC) o, anticuerpo primario y anticuerpo secundario y posteriormente complejo cromógeno (Peroxidasa Anti-Peroxidasa, PAP).

Nuestra modificación a la técnica de Ree y Kadin, consiste en utilizar PNA conjugada con

biotina, lo que permite eliminar los pasos intermedios de reacciones antígeno-anticuerpo, reduciendo el tiempo de la técnica en 2 horas. Es además más económica por no usar anticuerpos primario ni secundario y las reacciones no específicas ("background staining") se reducen a un mínimo.

El mecanismo de tinción con PNA no es claro aún. La PNA tiene gran avidéz por los residuos uni-terminales de galactosa y por el disacárido D-galactosa beta 1-3 D-N acetil galactosamina, que forman parte del grupo de oligosacáridos que se encuentran en la superficie de las membranas celulares (11).

Se especula que las CL de las mucosas, las células dendríticas reticulares de los ganglios linfáticos y las CL en H-X, comparten estos sitios de unión con la PNA en la superficie celular y en el área paranuclear.

Lamentablemente, existe una reacción cruzada con la PNA y los queratinocitos del epitelio, lo que no permite descubrir a las CL de la piel y mucosas, pero consideramos que este método es de gran utilidad en los casos de H-X.

RESUMEN

Describimos un nuevo método histoquímico con aglutinina de maní biotinizada y complejo

cromógeno Avidina-Biotina-DAB para células de Langerhans en un caso de Histiocitosis X. Esta técnica demuestra un patrón de tinción exclusivo para las células de Langerhans, corroborado por medio de microscopía electrónica.

ABSTRACT

We describe a new histochemical method with biotinilated peanut agglutinin and Avidin-Biotin-DAB chromogen complex for Langerhans cells in a case of Histiocytosis X. This method shows an exclusive staining pattern for the Langerhans cells, corroborated by means of electron microscopy.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BARTHELEMY, H.; PELLETIER, M.; LANDRY, D. et al.: *Demonstration of OKT6 antigen on human thymic dendritic cells in culture*. Laboratory Investigation 1986; 55 (5): 540-545.
- 2) BAEUM, V.; FEJERSKOV, O.; DABELSTEEN, E.: *Langerhans cells in oral epithelium of chronically inflamed human gingivae*. Journal of Periodontal Research 1989; 24: 127-136.
- 3) BECKSTEAD, J.; WOOD, G.; TURNER, R.: *Histiocytosis X cells and Langerhans cells: enzyme histochemical and immunologic similarities*. Human Pathology 1984; 15:826-833.
- 4) BONDING, N.; GRAEM, N.; RYGAARD, J.; et al.: *Effects of irradiation with dental light curing units on Langerhans cells in human stratified epithelium in heterotransplanted skin*. Scandinavian Journal of Dental Research 1987; 95:463-466.
- 5) BOS, I.; BURKHARDT, A.: *Interepithelial cells of the oral mucosa. Light and electron microscopic observations in germfree, pathogen-free and conventionalized mice*. Journal of Oral Pathology 1980; 9:65-81.
- 6) CHARBIT, Y.; MONTEIL, R.; HITZIG, C. et al. *S-100 immunolabelling of Langerhans cells in oral epithelium*. Journal of Oral Pathology 1986; 15:419-422.
- 7) DANIELS, T.; SCHWARTZ, V.; LARSEN, E. et al. *Langerhans cells candidal leukoplakia*. Journal of Oral Pathology 1985; 14:733-739.
- 8) KATZ, S.; TAMAKI, K.; SACHS, D.: *Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow*. Nature 1979; 282 (15):324-326.
- 9) KURIHARA, K.; HASHIMOTO, N.: *The pathological significance of Langerhans cells in oral cancer*. Journal of Oral Pathology 1985; 14:289-298.
- 10) MIERAU, G.; FAVARA, B.: *S-100 protein immunohistochemistry and electron microscopy in the diagnosis of Langerhans cell proliferative disorders: a comparative assessment*. Ultrastructural Pathology 1986; 10:303-309.
- 11) REE, H.; KADIN, M.: *Peanut agglutinin. A useful marker for Histiocytosis X and interdigitating reticulum cells*. Cancer 1986; 57: 282-287.
- 12) SILBERBERG-SINAKIN, J.; GIGLI, I.; BAER, R. et al.: *Langerhans cells: role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages*. Immunological Revue 1980; 53:204-223.
- 13) SLOBERG, K.; JONSSON, R.; JONTELL, M.: *Assessment of Langerhans cells in oral lichen planus using monoclonal antibodies*. Journal of Oral Pathology 1984; 13:516-524.
- 14) STINGL, G.; TAMAKI, K.; KATZ, I.: *Origin and function of epidermal Langerhans cells*. Immunological Revue 1980; 53, 149-174.