

## “CUANTIFICACIÓN DE QUERATINOCITOS Y CÉLULAS DE LANGERHANS EN PACIENTES CON QUERATOSIS SEBORREICA”

**Autores:** Juárez Vargas Pablo Alberto<sup>1</sup>, Novo Cordero María Ximena<sup>1</sup>

**Aseores:** Lecuona Rodríguez M.A.<sup>2</sup>, Herrera Enríquez M.<sup>2</sup>, Castell Rodríguez A<sup>2</sup>.

1. Centro Universitario México.
2. Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.

**Área del conocimiento:** Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud.

**Disciplina:** Ciencias de la Salud.

**Tipo de Investigación:** Experimental.

**Lugar:** México D.F. (UNAM)

**Fecha:** 15/02/13

**Clave:** CIN2012A10257





## INTRODUCCIÓN

### LA PIEL

La piel es el órgano que cubre la totalidad de la superficie corporal externa y se continua con las mucosas que revisten a los ojos y oídos, las cavidades nasal y oral, así como al ano y los genitales por su naturaleza histológica y localización no solo funciona como una simple barrera mecánica que delimita y protege al organismo de agresiones físicas, químicas y biológicas del medio ambiente, sino que es una estructura altamente dinámica en términos de su fisiología, jugando un importante papel en distintas funciones como la regulación de la temperatura corporal y balance hidroelectrolítico, secreción, absorción de radiación UV e inmunidad. La piel, al ser un órgano superficial, refleja nuestro estado general de salud así como las emociones.<sup>1</sup>

### Estructura de la piel

Desde el punto de vista histológico, la piel consta de dos capas principales. La capa superficial corresponde a una lámina fina compuesta por tejido epitelial plano estratificado con estrato córneo, a la que se le conoce como epidermis, la cual se divide en cinco estratos celulares: basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo, debido a los cambios morfológicos que sufren las células epiteliales desde su origen en el estrato basal hasta que son descamadas en el estrato corneo. La capa profunda y más gruesa de la piel corresponde a la dermis, que está conformada por tejido conjuntivo laxo en la superficie y denso en la profundidad, esta capa se caracteriza por contar con numerosos anexos cutáneos, como glándulas y folículos pilosos.<sup>2</sup>

En la epidermis residen cuatro tipos celulares distintos, 1) Queratinocitos que corresponden a aproximadamente el 90% del total de las células, las cuáles se originan y proliferan en el estrato basal y a partir de él inician su proceso de diferenciación hacia el estrato corneo. 2) los Melanocitos que son células que residen en el estrato basal y están encargadas de la síntesis y

<sup>1</sup> Amado, S..(2011). LESIONES DE DERMATOLOGÍA. Mendez Editores. México D.F..4-34pp..

<sup>2</sup> Tortora, Derrickson..(2006). PRINCIPIOS DE ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA. Madrid, España, Panamericana. 147-170pp..



distribución de un pigmento parduzco conocido como melanina que característicamente absorbe la radiación UV y protege a los queratinocitos basales de sufrir daño en el ADN correspondiendo solo aproximadamente al 5% de las células epidérmicas. 3) Células de Merkel, que también se localizan en el estrato basal, y tiene como función la percepción de estímulos mecánicos, son únicamente abundantes en aquellas regiones corporales con alta sensibilidad, como lo son labios y pezones y dedos. 4) Células de Langerhans (CL) son el último tipo celular, éstas se localizan en los estratos supra basales de la epidermis, corresponden a células dendríticas presentadoras de antígenos de origen mielóide, y realizan una función de inmunovigilancia, captando y presentando antígenos de diversos orígenes a las células del sistema inmunológico con la finalidad de inducir la generación de respuestas inmunes positivas o negativas dependiendo si el antígeno es inocuo o potencialmente patogénico. <sup>3</sup>

### Inmunovigilancia cutánea

La piel, que es el órgano más grande del organismo, no sólo es un interfaz entre los medios interno y externo proporcionando una defensa mecánica elemental, sino también ha desarrollado un sistema inmune cutáneo que es capaz de responder de una manera enérgica y específica. La función de este sistema de inmunovigilancia cutáneo queda de manifiesto cuando en condiciones de anergia o de debilitamiento del mismo se incrementa la severidad y frecuencia de patologías como infecciones y tumores cutáneos. La regulación del sistema inmunológico de la piel también es crucial, ya que la mala función del mismo está implicada en la patogéna de enfermedad autoinmunes o de hipersensibilidad de contacto.<sup>4</sup>

De esta manera, las investigaciones en inmunobiología cutánea han revelado que la piel constituye un sistema muy complejo, el cual tiene un papel muy importante en el desarrollo de respuestas inmunológicas a diversos antígenos. En ese sentido, las células de Langerhans (CL) han sido el eje

<sup>3</sup> Ibid, p.147-170

<sup>4</sup> Herrera, E., Hernández, T., et. al..(2005).INMUNOVIGILANCIA CUTÁNEA: IMPLICACIONES CLÍNICAS.UNAM. México D.F.. Laborat-acta.41-51pp..



para el establecimiento de los conceptos de tejido linfóide asociado a la piel (SALT) y del sistema inmunológico de la piel (SIS).<sup>4</sup>

En el SALT, las CL están consideradas como el componente más periférico de la rama aferente de la respuesta inmune, ya que cuando un antígeno (Ag) se introduce en la epidermis, las CL lo captan, endocitan y procesan, y finalmente junto con las citocinas derivadas de células epidérmicas, activan a los linfocitos intraepiteliales. Por otro lado, las CL pueden migrar por los vasos linfáticos aferentes hacia la zona paracortical de los ganglios linfáticos regionales donde presentan el Ag a los linfocitos T, resultando en una expansión clonal de linfocitos T específicos. Una vez que se ha formado una línea celular de linfocitos que respondan a ese Ag, éstos alcanzan la circulación general y pueden llegar nuevamente a la piel.<sup>5</sup>

### Células de Langerhans

Morfológicamente las CL se pueden identificar fácilmente ya que tienen citoplasma claro debido a que cuentan con un cito esqueleto con escasos filamentos intermedios, lo que les permite generar numerosas y delgadas proyecciones citoplásmicas, conocidas como dendritas, su núcleo es lobulado, su citoplasma claro, presentan un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi bien desarrollados, pero lo característico de estas células es la presencia en el citoplasma de unos organelos en forma de raqueta conocidos como gránulos de Birbeck.<sup>1</sup> Se evidencian fácilmente con tinciones histológicas basadas en la impregnación con sales argénticas y aúricas, de igual manera es fácil evidenciarlas mediante la utilización de tinciones del tipo histoquímica enzimática, para evidenciar la actividad de enzimas presentes en la membrana de estas células y que están involucradas en los procesos de reconocimiento y captura de antígenos. Otra manera de

---

<sup>5</sup> Ibid, p.41-51.



evidenciarlas en cortes histológicos es la utilización de tinciones inmunohistoquímicas dirigidas contra los distintos marcadores de superficie de esta variedad celular.<sup>6</sup>

Las CL son una variedad de células dendríticas presentadoras de antígenos localizadas en la epidermis y en otros epitelios y expresan grandes cantidades de molécula clase II del MHC, antígenos CD1a, la proteína S100 y las enzimas ATPasa y esterasa inespecífica. Además, estas células poseen una morfología característica que incluye, además de largas prolongaciones citoplásmicas, un citoplasma claro sin monofilamentos y desmosomas, con citoplasma claro, núcleo indentado y un organelo particular en forma de raqueta de tenis llamado gránulo de Birbeck(GCL). En este organelo se localiza una molécula específica para CL llamada Langerina(CD207), que es una lectina tipo C específica para manosa, involucrada en la captación de antígenos y patógenos ya que se ha observado que esta molécula es internalizada en las CL junto con las moléculas que han sido ligadas a ella. Una vez que las CL han captado y procesado Ag endógenos o exógenos en el interior del GCL, los reexpresan en la membrana plasmática junto con moléculas clase I o II, respectivamente; es entonces que se induce en la membrana la presencia de moléculas coestimuladoras como B7-1(CD80) y B7-2(CD86). A continuación, las CL migran y transportan el Ag desde la piel hasta los ganglios linfáticos donde lo presentan de manera muy efectiva, con un carácter MHC-restringido, a linfocitos T en reposo CD4<sup>+</sup>γδ o CD8<sup>+</sup>αβ. Lo anterior está bien establecido, sin embargo, no se sabe si las CL pueden ejercer esta presentación de antígenos con la misma capacidad en la epidermis.<sup>7</sup>

En los tumores cutáneos las CL participan en la iniciación de respuestas inmunológicas contra tumores epidérmicos, mientras que las CD dérmicas y macrófagos lo hacen en la dermis. En los distintos tipos de cáncer la instalación de una respuesta inmunológica contra las células cancerosas es un punto crucial para el progreso de la enfermedad. Diversos autores han analizado el número y función de las

<sup>6</sup> Tortora, Derrickson, Op. Cit. p. 147-170.

<sup>7</sup> Herrera, Miguel. Op. cit. p.41-51.



CD en diferentes cánceres, encontrando una disminución en la densidad de CD en el tumor o la presencia de CD inmaduras para montar respuestas inmunológicas.<sup>8</sup>

### **Cuantificación de células de Langerhans en Queratosis Actínica y carcinoma epidermoide**

En un estudio realizado previamente, se comparó el número de CL presentes en la epidermis de dos tipos de lesiones: una premaligna, la queratosis actínica, y otra maligna, el carcinoma epidermoide. Con la finalidad de demostrar que la variación existente en el número de CL permite el desarrollo de la lesión de queratosis a carcinoma, epidermoide las CL en ambas lesiones fueron comparadas con piel normal fotoexpuesta y no fotoexpuesta de los mismos pacientes. Los resultados de dicho estudio mostraron una disminución significativa en el número de CL en la lesión premaligna así como un aumento en las lesiones malignas, en comparación con el número de CL observadas en piel normal fotoexpuesta y no fotoexpuesta, donde la densidad de CL característicamente es ligeramente mayor en la piel no fotoexpuesta. Esto sugiere que la ausencia de CL durante el desarrollo de una lesión premaligna puede estar brindando un microambiente permisivo para la transformación maligna; sin embargo, cuando se desarrolla la lesión maligna el número de CL vuelven a elevarse probablemente en respuesta a la alta expresión de neoantígenos.<sup>9</sup>

### **Queratosis seborreica**

Las queratosis seborreicas comprenden un grupo de lesiones tumorales benignas de la piel, las cuáles se presentan con mayor frecuencia en personas mayores de 30 años, estas lesiones pueden aparecer en cualquier parte de la superficie corporal, a excepción de las mucosas. Las queratosis seborreicas comienzan típicamente como pequeñas máculas marrones, cuando progresan las lesiones se tornan polipoides, con una superficie irregular. En general muestran un aspecto “verrugoso” con múltiples

<sup>8</sup> Ibid. p. 41-51p.

<sup>9</sup> Herrera, E., Hernández, T., et. al. (2005). CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS DE LANGERHANS EN PACIENTES CON CARCINOMA EPIDERMÓIDE Y QUERATOSIS ACTÍNICA. UNAM. México D.F. Laborat-acta. 77-81pp.



folículos obturados y arborescencias, habitualmente son de color apagado o sin brillo. La prominencia de los folículos es uno de los rasgos distintivos de la queratosis seborreica, que puede deberse tanto a tapones foliculares pálidos dentro de una lesión oscura como a tapones pardos o negros dentro de una lesión más clara. Las lesiones de las queratosis seborreicas tienen en general un aspecto "tachonado" secundario a su morfología de alguna manera polipoidea. El color de estas lesiones es altamente variable, pudiendo ser de color pardo claro con tonos rosados, a pardo oscuro, negro, incluso algunas lesiones de queratosis seborreica pueden ser casi blancas.<sup>10</sup> En nuestro país, la incidencia y prevalencia de distintos tipos de queratosis es considerablemente alta.

Durante el desarrollo y progresión de distintos tipos de neoplasias se ha observado que las poblaciones de células dendríticas residentes de los tejidos involucrados se ven disminuidas, permitiendo posiblemente un ambiente inmuno privilegiado para el crecimiento tumoral, sin embargo también existen escasos reportes de que en algunas lesiones neoplásicas las poblaciones de células dendríticas se ven incrementadas, posiblemente como una respuesta hiperreactiva, lo que ha permitido generar la idea de poder utilizar a la densidad de las poblaciones de CL intra y peritumorales, como factor pronóstico del desarrollo y progresión de distintas lesiones tumorales.<sup>11</sup>

Si bien es cierto que la queratosis seborreica rara y excepcionalmente se transforma en una lesión maligna también es cierto que en un rápido crecimiento puede ser signo de un carcinoma epidermoide en desarrollo, por lo que resulta necesario evaluar en este grupo de lesiones el comportamiento de la población de las células de Langerhans.<sup>12</sup>

En la actualidad, se acepta ampliamente que las neoplasias con buen pronóstico tienen mayores cantidades de CD o CL que las contrapartes con mal pronóstico. ¿Porqué se da este fenómeno? Una de las primeras explicaciones sugería un efecto de lisis tumoral directa mediado por las

<sup>10</sup> Wolf, Goldsmith, Katz, et. al. (2008). FITZPATRICK, DERMATOLOGÍA EN MEDICINA GENERAL. Madrid, España. Mc Graw Hill. 917-920pp.

<sup>11</sup> Herrera, Miguel. Op. Cit. p.41-51.

<sup>12</sup> Ibid. p. 41-51.



CD, lo que parecía poco probable en un principio. Sin embargo, en la actualidad hay datos de modelos experimentales en ratón que sugieren que las CD tienen la capacidad de inducir apoptosis limitada en algunas neoplasias mediante la participación del óxido nítrico. Por otro lado, también es probable que el gran número de CL favorezca la presentación de antígenos tumorales a linfocitos CD4+ Th1 o a linfocitos CD8+, generando así respuestas inmunológicas activadoras anti-neoplásicas.<sup>13</sup>

**Planteamiento del Problema:** En la actualidad existen numerosos estudios en los que se ha determinado el número de CL por unidad de área que se encuentran presentes en piel bajo condiciones normales, así como bajo condiciones de foto exposición, lo que ha permitido comparar los cambios que sufre dicha población celular en condiciones patológicas como lo son las lesiones tumorales.

Como ya hemos mencionado la densidad de CL en lesiones tumorales puede ser utilizada como factor pronóstico en el desarrollo y progresión de las lesiones tumorales, por lo que en el presente estudio tiene como finalidad establecer si en queratosis seborreica la densidad de CL presentes en la piel de lesiones tumorales obtenidas de muestras de pacientes que con queratosis seborreica se modifica de acuerdo al tamaño y tiempo de desarrollo de la lesión.

## HIPÓTESIS

Si en queratosis seborreica el crecimiento y la progresión tumoral es dependiente de una disminución en el número de células de Langerhans intratumorales, entonces al estudiar lesiones con mayor crecimiento se observará una disminución en el número de células de Langerhans.

---

<sup>13</sup> Herrera, Miguel. Op. Cit. p. 77-81.



## OBJETIVO GENERAL

Demostrar que existe una relación inversa entre el número de células de Langerhans y el tamaño o la progresión tumoral de la queratosis seborreica.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar mediante inmunohistoquímicas:

- La población de células de Langerhans en lesiones de Queratosis Seborreica.
- La expresión de queratinocitos en lesiones de Queratosis Seborreica.

## METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

### MATERIAL BIOLÓGICO

Del servicio de patología de distintos hospitales se obtendrán los expedientes y bloques en parafina de 10 casos de pacientes con lesiones de queratosis seborreica. Alternativamente del Servicio de Cirugía Dermatológica del Departamento de Dermatología del Hospital Gea González , SSA, se coleccionarán 10 lesiones tumorales diagnosticadas como queratosis seborreica, mismas que serán enviadas al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, donde serán procesadas mediante técnica histológica en parafina y/o congelación.

### METODOLOGÍA

De cada bloque histológico, se obtendrán varias laminillas con cortes histológicos de 5 a 7 micrómetros de grosor, que serán teñidos de la siguiente manera:

- 1) Un grupo de laminillas serán teñidas con la tinción de Hematoxilina-Eosina para el análisis histopatológico y



- 2) Otro grupo de laminillas serán procesados mediante la técnica de inmunohistoquímica para detectar la presencia de la proteína CD1a y la proteína Langerina (CD207), para evidenciar a las células de Langerhans.

## Inmunohistoquímica

La creciente popularidad y demanda de identificaciones de sustancias específicas por medio de inmunohistoquímicas ha abierto una nueva era de histopatología e histotecnología. Las inmunohistoquímicas son el uso de anticuerpos específicos para identificar (marcar) antígenos específicos. Las pruebas pueden ser extremadamente sensitivas y usualmente pueden detectar sustancias muy pequeñas.<sup>14</sup>

## Anticuerpos y antígenos

Un antígeno es una sustancia que cuando es introducida en el cuerpo va a estimular una respuesta inmunológica (producción de anticuerpos). En una inmunohistoquímica, un antígeno es la sustancia que se intenta demostrar.

Los anticuerpos son diferentes proteínas (inmunoglobinas) que son producidas en respuesta a una sustancia específica (antígenos). En el cuerpo su propósito es el contrarrestar o neutralizar el efecto provocado por un antígeno. En el laboratorio histológico unimos el anticuerpo al antígeno junto con un marcador visual.<sup>14</sup>

<sup>14</sup> Prophet, E., Mills, B., et. al..(1992).LABORATORY METHODS IN HISTOTECHNOLOGY.Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C., 247-255pp.



## Métodos

- Método directo: un marcador visual, ya sea fluorescente o enzimática, es químicamente adherida al anticuerpo primario. El anticuerpo primario es el anticuerpo que esta directamente relacionado con el antígeno que queremos demostrar.<sup>15</sup>
- Método indirecto: el marcador visual es adherido al anticuerpo secundario. Primero el tejido es expuesto al anticuerpo primario y después al secundario, el cual está directamente relacionado con el anticuerpo primario y se unirá a él.<sup>15</sup>

En cada uno de los cortes procesados por inmunohistoquímica se realizará una cuantificación de las CL por milímetro lineal de epidermis, contando 10 campos de cada uno de los casos.

Se evaluara si existe una relación entre el número de células de Langerhans y el crecimiento de la lesión, así como su tiempo de desarrollo y se compara contra lo observado en piel normal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando evaluamos la cantidad de CL presentes en la piel de las lesiones de queratosis seborreica, encontramos que en promedio la población de CL no se modifica significativamente con respecto a la cantidad de CL observadas en piel normal, lo cual es coincidente con los resultados reportados previamente por Melo y cols., 2006, quien comparo la cantidad de CL en distintas lesiones malignas y benignas, y reportó que en el caso particular de algunas lesiones benignas como queratosis actínica, queratosis seborreica, queratoacantoma y tricoepitelioma, el número de CL se encuentra aumentado significativamente con respecto a lo observado en lesiones malignas como carcinoma

---

<sup>15</sup> Ibid.p. 247-255pp..



epidermoide y carcinoma baso celular, pero cuando se comparó a las lesiones benignas con la piel normal la diferencia no fue significativa.<sup>16</sup>

Por otra parte en el presente estudio encontramos que en aquellas zonas de la lesión en donde se observa un mayor grado de hipertrofia del estrato espinoso la cantidad de CL también se vio incrementada, lo cuál puede relacionarse con procesos inflamatorios dentro de las lesiones. Nagayama y cols, en 2011 demostraron que en pacientes con VIH en las lesiones cutáneas verrugosas no inflamatorias, la densidad de CL disminuye significativamente, mientras que en aquellas verrugas con características de inflamación el número de CL no disminuye, de manera similar se comportó la expresión de la citocina MIP-3 producida por lo queratinocitos de las lesiones.<sup>17</sup>

La observación de zonas con mayor densidad de CL dentro de las lesiones de queratosis seborreica, nos permite dirigir nuestra investigación hacia la demostración de citocinas proinflamatorias, con la finalidad de correlacionar la presencia de estas últimas en los queratinocitos con la cantidad de CL.

<sup>16</sup> De Melo, M.J., Araújo, F. JIL. Patu, V.J., Machado, M.C., Mello, L.A. (2006). LANGERHANS CELLS IN CUTANEOUS TUMORS: IMMNOHISTOCHEMISTRY STUDY USING A COMPUTER IMAGE ANALYSIS SYSTEM. J. Mol. Histol. 2006 Nov; 37(8-9): Epud 2006 Nov 2.

<sup>17</sup> Nakatama, Y., Asagoe, K., et. al. (2011). DENDRITIC CELL SUBSETS AND IMMUNOLOGICAL MILIEY IN INFLAMATORY HUMAN PAPILLOMA VIRUS-RELATED SKIN LESIONS. J.Dermatol Sci. 2011, Sep; 63(3); 173-83pp..



## BIBLIOGRAFÍA

1. Amado, S.. (2011). LECONES DE DERMATOLOGÍA, Mendez Editores. México D.F.. 4-34pp..
2. Tortora, Derrickson, (2006). PRINCIPIOS DE ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA. Madrid, España. Panamericana. 147-170pp. y 809-847pp..
3. Herrera, M., Hernández, T., et al.. (2005). INMUNOVIGILANCIA CUTÁNEA: IMPLICACIONES CLÍNICAS. UNAM. México D.F.. Laborat-acta.
4. Herrera, M., Henández, T., et al. (2005). CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS DE LANGERHANS EN PACIENTES CON CARCINOMA EPIDERMÓIDE Y QUERATOSIS ACTÍNICA. UNAM. México D.F.. Laborat-acta.
5. Wolff, Goldsmith, Katz, et al. (2008). FITZPATRICK, DERMATOLOGÍA EN MEDICINA GENERAL. Madrid, España. Mc. Graw Hill. 917-920pp..
- Gartner, W.. (2008). TEXTO ATLAS DE HISTOLOGÍA. México D.F.. Mc Graw Hill. 273-287pp..
6. Prophet, E., Mills, B. et. al.. (1992). LABORATORY METHODS IN HISTOTECHNOLOGY. Armed Forces Institute of Pathology. Washington D.C.. 247-255pp..
- Avrameas, S.. (1970). INMUNOENZYM TECHNIQUES: ENZYMES AS MARKERS FOR THE LOCALIZATION OF ANTIGENS AND ANTIBODIES. Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer. Villejuif, France. 349-385pp..
- Nakane, P. Y Pierce, B., (1966). ENZYME-LABELED ANTIBODIES: PREPARATION AND APPLICATION FOR THE LOCALIZATION OF ANTIGENS. University of Michigan. Estados Unidos, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. Vol. 14, No. 12.
- Nakayama Y, Asagoe K, Yamauchi A, Yamamoto T, Shirafuji Y, Morizane S, Nakanishi G, Iwatsuki K.. (2011). DENDRITIC CELL SUBSETS AND IMMUNOLOGICAL MILIEU IN INFLAMMATORY HUMAN PAPILLOMA VIRUS-RELATED SKIN LESIONS. J Dermatol Sci. 2011 Sep; 63(3):173-83pp.. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.05.006. Epub 2011 Jun 6.
- De Melo MR Jr, Araújo Filho JL, Patu VJ, Machado MC, Mello LA, Carvalho LB Jr.. (2006). LANGERHANS CELLS IN CUTANEOUS TUMOURS: IMMUNOHISTOCHEMISTRY STUDY USING A COMPUTER IMAGE ANALYSIS SYSTEM. J Mol Histol. 2006 Nov; 37(8-9):321-5pp.. Epub 2006 Nov 2.

