

Distribución de las células presentadoras de antígenos en las glándulas salivales

Antigen presenting cells distribution in salivary glands

AUTORES

ZAVALA, Walther David

Doctor en Medicina, Profesor Titular Interino, Cátedra Histología. Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Cuyo. Email: wzavala@fodonto.uncu.edu.ar

FÓSCOLO, Mabel

Técnica del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

CAVICCHIA, Juan Carlos

Doctor en Medicina, Investigador principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ex Profesor Titular Cátedra Histología. Facultad de Odontología y Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

RESUMEN

Las células presentadoras de antígenos profesionales como las células de Langerhans o las células dendríticas intersticiales del tejido conectivo, son las células captadoras de antígenos más importantes del sistema inmune.

En trabajos previos describimos variaciones numéricas y estructurales de las células dendríticas; con especial referencia a las células de Langerhans, en diversos epitelios del tracto digestivo. El propósito de este trabajo fue estudiar la distribución, en forma comparativa, de las células dendríticas en glándulas salivales mayores y menores de la mucosa oral.

Material y métodos: para esta investigación se utilizaron muestras de glándulas salivales mayores y menores tomadas de ratas Wistar. Las muestras fueron procesadas utilizando técnicas de microscopía óptica convencional, electrónica e inmunohistoquímica.

Los resultados muestran numerosas células dendríticas en los conductos salivares excretores (con epitelio estratificado) así como en el parénquima glandular. Aunque no detectamos diferencias estadísticas significativas entre los dos componentes glandulares analizados, nuestros hallazgos sugieren que, debido a su localización, estas células cumplen un rol fundamental en las defensas inmunes de la mucosa oral.

Palabra claves:

Glándulas salivales - inmunidad - células dendríticas.

ABSTRACT

The antigen professional presenting cells (APC), as the Langerhans cells or interstitial dendritic cells of the connective tissue, are the most important antigen uptake cells of the immune system. In previous publications we have described structural and numerical changes, of those cells, in different epithelia of the digestive tract. The purpose of this research was to investigate the distributions of these immune cells in salivary glands including the mayor and minor glands of the oral mucosa.

Material and methods: mayor and minor salivary glands from Wistar rats were used for this research. Samples were processed by optical and electronic microscopy, and immunohistochemistry.

Our results show numerous dendritic cells in salivary ductus (with stratified epithelium) and the parenquima glands. Although we could not detect differences between the two analyzed components in both, the mayor or the minor glands, our findings indicate that these cells play an important roll in the immunological defenses of the oral mucosa

Key words:

Salivary glands - immunity - dendritic cells

Distribución de las células presentadoras de antígenos en las glándulas salivales

INTRODUCCIÓN

La primera línea de defensa de la mucosa oral esta representada por la saliva con su importante actividad inmunosecretora. En ella es posible encontrar enzimas, proteínas antimicrobianas como lisozimas, inmunoglobulina A secretora (IgAs), y otras sustancias presentes en menor cantidad, entre las que se destacan catalasas, lactoperoxidasa y quimiocinas (1).

Histológicamente se describe en las glándulas salivales un parénquima conformado por acinos, conductos y un estroma de tejido conectivo donde se observan células plasmáticas y linfocitos, que son claves en la respuesta inmune (2).

Otros componentes esenciales dentro de la respuesta inmune presente en la cavidad bucal, pero escasamente estudiados en las glándulas salivales, son las células presentadoras de antígenos como las células de Langerhans y las células dendríticas intersticiales. Ambos tipos celulares están encargados de captar antígenos que ingresan a la cavidad bucal y presentarlos, luego de migrar a los ganglios linfáticos regionales, a los linfocitos CD4, a partir de los cuales se inicia la respuesta inmune específica (3).

Aunque existen varios trabajos que describen la presencia de células dendríticas presentadoras de antígenos en las glándulas salivales de ratones, los mismos fueron realizados en modelos experimentales de animales con enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjögren, el cual afecta a glándulas exocrinas como salivales y lagrimales (4,5,6). Recientemente, Stasulis y Hand (2003) describieron estas células en glándulas salivales mayores (parótida, submaxilar y sublingual) de ratones libres de gérmenes (7). En base a estos datos previos, y considerando la importante función que cumple la saliva en la primera barrera defensiva del aparato digestivo, es que realizamos este trabajo cuyo objetivo principal es describir la distribución comparativa de las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, en el estroma de las glándulas salivales mayores y menores y determinar si

hay cambios cuantitativos y/o cualitativos de estas células entre los componentes principales del parénquima: acinos y conductos de la vía excretora glandular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizaron glándulas salivales mayores: parótida -submaxilar y glándulas salivales menores linguales. Las muestras se obtuvieron por disección bajo anestesia general con éter de ocho ratas "Wistar", respetando protocolos de cuidado y uso de animales de laboratorio (8). El material obtenido (8 pares de cada glándula), fue procesado para microscopía óptica convencional, inmunohistoquímica y microscopía electrónica.

Para realizar la técnica de inmunohistoquímica, las muestras de tejido se fijaron en formol tamponado al 10% durante dos horas a temperatura ambiente. Después de la fijación los especímenes fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcoholes e incluidos en parafina. Cortes sagitales seriados de 6 micras fueron rehidratados y colocados en solución buffer de PBS. La actividad de peroxidasa endógena fue bloqueada con solución de agua oxigenada al 3%. Las muestras fueron mantenidas en cámara húmeda por dos horas sumergidas en el primer anticuerpo contra la proteína S-100, diluido 1/100 (S- polyclonal antibody, Dako, USA), luego lavadas con PBS y colocadas en el segundo anticuerpo (anticuerpo anti IgG marcado con biotina). Los inmunocomplejos fueron demarcados por medio del procedimiento de amplificación ABC (avidina-biotina peroxidasa) y revelados con solución de 3,3' diaminobenzidina (9). Los cortes inmunomarcados fueron contrastados con hematoxilina y montados para luego ser fotografiados. En las secciones de control el primer anticuerpo fue omitido o se utilizó un antisero normal de conejo (negative control, Dako, USA)

Para microscopía óptica, varios cortes de cada glándula fueron procesados según técnicas habituales, teñidos con azul de toluidina y montados para su observación.

Microscopía electrónica.

Cortes milimétricos fueron fijados en glutaraldehído 5%, posfijado en tetróxido de osmio 2% e incluidos en resina Spurr. Las muestras fueron cortadas con ultramicrotomo (Leica ultracut R). Los cortes ultrafinos se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo. La observación se realizó con microscopio electrónico Siemens Elmiskop 1 o Zeiss 900.

Procesamiento estadístico de los datos.

Los valores para cada grupo son presentados como promedio \pm error estándar. El test de comparación múltiple Anova fue utilizado para evaluar la interrelación entre las diferentes glándulas y el número promedio de células dendríticas por mm² de parénquima glandular; mientras que para analizar la relación entre el número de células por mm² en la vía excretora, se utilizó la prueba de Student. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como criterio para determinar diferencias estadísticas significativas.

RESULTADOS

Microscopía electrónica

Mientras que en el estroma de las glándulas salivales estudiadas se pudieron observar numerosas células dendríticas de aspecto redondeado con prolongaciones citoplasmáticas emergiendo en algunas zonas del contorno celular (Figura 1), en el conducto excretor de la glándula parótida se observaron células claras elongadas horizontalmente siguiendo la curvatura de la pared ductal y con escasas prolongaciones citoplasmáticas (Figura 2). En ambos casos el núcleo fue de aspecto lobulado y con amplias, aunque poco profundas, escotaduras de la membrana nuclear. La cromatina se observó siempre más condensada en los bordes de la membrana nuclear. En ninguno de los casos analizados se pudo objetivar la presencia de gránulos de Birbeck.

Microscopía óptica convencional

El examen de las muestras teñidas con azul

Area histología



Figura 1: Célula dendrítica intersticial presente en el parénquima de una glándula submaxilar. Obsérvese su aspecto redondeado, núcleo lobulado con cromatina periférica (MET x 5000).

de toluidina (Figura 3), permitió distinguir células con citoplasma escasamente teñido y núcleo lobulado de aspecto triangular o redondeado en el intersticio glandular. Las células dendríticas ubicadas en el epitelio de

la vía excretora fueron claramente diferenciables, dentro del epitelio estratificado, del resto de las células epiteliales por su aspecto característico de citoplasma claro, núcleo lobulado y cromatina condensada en los

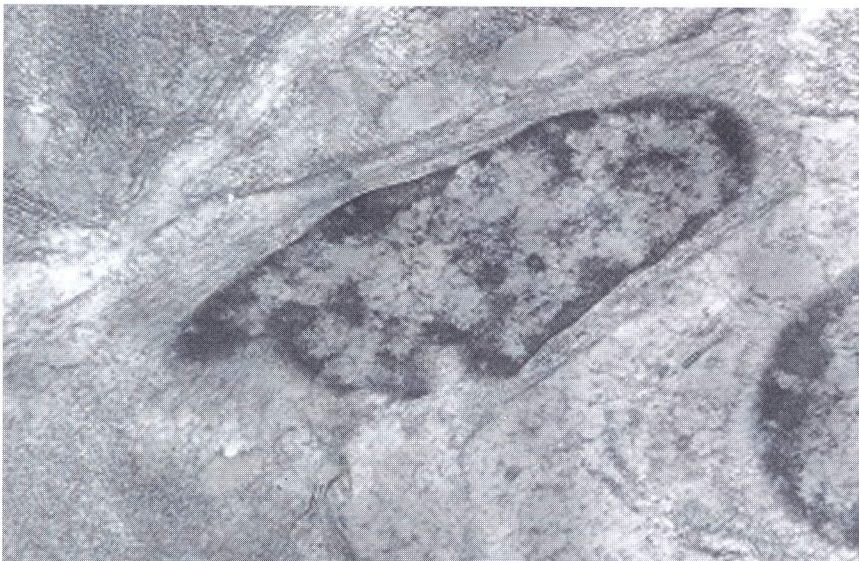


Figura 2: Célula dendrítica de aspecto alargado, núcleo con cromatina periférica y ausencia de tonofilamentos, presente en la pared de la vía excretora de glándula parótida (MET x 5000).

bordes de la membrana nuclear. No se encontraron células dendríticas en las regiones donde el epitelio de la vía excretora presentó epitelio simple, como en los conductos intercalares, estriados o conductos de glándulas linguales menores.

Inmunohistoquímica:

Las células inmunomarcadas S-100+ aparecen de color marrón, con la marcación de diaminobenzidina, distribuidas especialmente en el tejido conectivo que separa los lóbulos principales. En el conducto excretor, claramente se ubican en la capa basal del epitelio estratificado ductal.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados indicó que el número promedio de células por mm² en el intersticio de la glándula parótida fue de $2,3 \pm 1,2$ (promedio \pm error estándar), sin que existieran cambios estadísticamente significativos con el número de células por mm² en la glándula submaxilar ($1,8 \pm 0,89$) o en las glándulas salivales menores de la lengua ($2,5 \pm 1,3$) $p < 0,05$ (Figura 4).

Analizando las células detectadas en la vía excretora principal de parótida y submaxilar el número de células dendríticas promedio por mm² en la glándula parótida fue de $1,75 \pm 0,48$, sin que los cambios hallados fueran estadísticamente significativos en relación con las células de vía excretora de la glándula submaxilar ($1,5 \pm 0,28$ mm², $p < 0,005$) (Figura 5).

DISCUSIÓN

Este trabajo fue realizado con el fin de estudiar la distribución topográfica, en forma comparativa, de las células dendríticas en glándulas salivales mayores y menores de rata. Nuestras observaciones demuestran que las células dendríticas están presentes en el tejido intersticial de las glándulas salivales mayores en una proporción equivalente al número de células encontradas en las glándulas salivales menores.

Inicialmente los hallazgos descriptos

Distribución de las células presentadoras de antígenos en las glándulas salivales

en la literatura fueron controversiales, tal como lo demuestra Matthews et al. en 1985, quienes no encontraron células OKT6 positivas para células de Langerhans, en glándulas salivales labiales (10). Posteriormente Takahashi et al., en 1986, describieron la presencia de células S100 positivas, con características morfológicas similares a las células de Langerhans en el tumor de Warthin, pero no encontraron estas células en glándulas salivales normales (11). Sin embargo, en un trabajo reciente Stasulis y Hand (2003), describen claramente la presencia de células dendríticas intersticiales en el parénquima de glándulas salivales de ratas libres de gérmenes así como de células de Langerhans en la vía excretora (7). Nuestro trabajo corrobora estos hallazgos, sugiriendo que la presencia de estas células en condiciones normales podría cumplir un rol en la fisiología normal de estas glándulas.

Crawford et al., en 1975, describieron a las glándulas salivales menores como la mayor fuente de inmunoglobulina A en la cavidad oral (12), por otro lado existen fuertes evidencias que señalan la acumulación de células dendríticas en las glándulas salivales ante la presencia de algún factor infeccioso, autoinmune, o tumoral (13, 14 y 15). Esta acumulación de células dendríticas se realiza en forma específica en las glándulas agredidas, y dichas células pueden estar localizadas tanto en el parénquima como en relación con la vía excretora. Nuestros hallazgos indicarían que en condiciones normales no existen variaciones en la distribución celular, por lo que es de suponer que las células dendríticas podrían responder a diferentes factores quimiotácticos liberados en el sitio agredido tal como lo demuestran estudios previos (16). Más aún, está probado que la presencia de antígenos en la vía excretora de glándulas salivales mayores resulta en una respuesta local mediada por anticuerpos (17), indican-

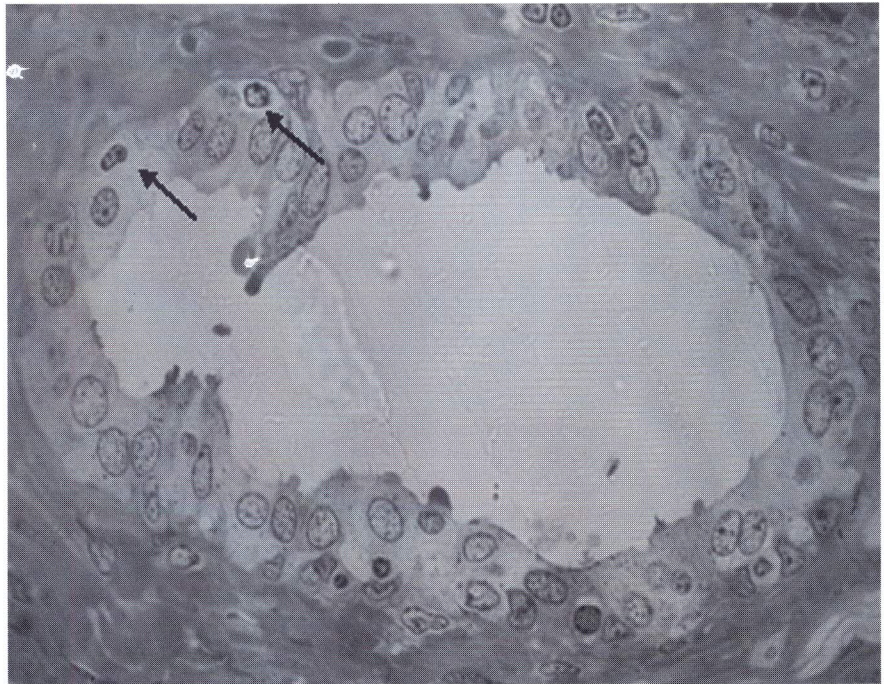
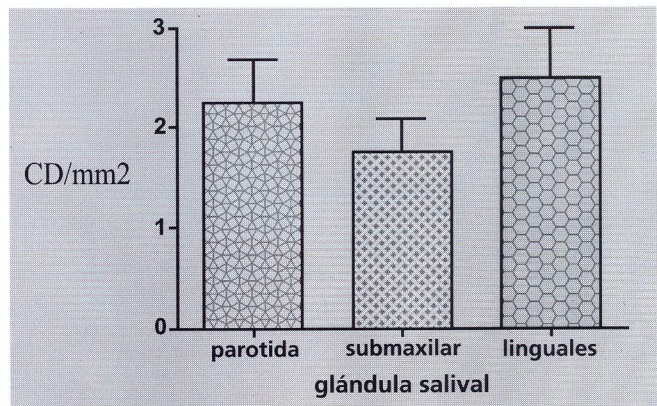


Figura 3: Corte histológico correspondiente al conducto excretor de glándula parótida, donde se observan algunas células dendríticas (flechas) de citoplasma claro, en la región de la capa basal del epitelio estratificado ductal (MO x 150, azul de toluidina)

Figura 4

Distribución de las CD en el intersticio de diferentes glándulas salivales



One-way analysis of variance $p < 0,05ns$

Mean	2,3	1,8	2,5
Std.e.m	1,2	0,89	1,3

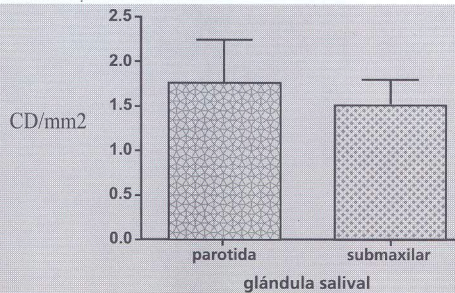
Area histología

do que las glándulas salivales contribuirían en la barrera inmune oral cuando son desafiadas por algún antígeno. Indudablemente, el rol de las glándulas salivales es más complejo de lo imaginado y quedan todavía muchas cuestiones sin resolver.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos especialmente la excelente asistencia técnica de Juana Dora Dávila. Este estudio fue realizado con el aporte financiero y científico de la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado, de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina (proyecto N° OK/044).

Celulas dendríticas en conductos excretores de glándulas salivales



Unpaired t test, $p < 0,05ns$

Mean ± SEM parotida 1.750 ± 0.4787 N=8

Mean ± SEM submaxilar 1.500 ± 0.2887 N=8

Figura 5

BIBLIOGRAFÍA

- VERED M, BUCHNER A, DAYAN D.** *A comparative study of age-related changes between palatal and labial salivary glands.* Med Oral. 2003 Mar-Apr;8(2):91-6.
- KIKUCHI K, AIYAMA S, IKEDA R, SATO S.** *Morphological changes in the rat sublingual gland parenchyma with aging.* Gerontology. 2007;53(1):52-60. Epub 2006 Oct 10.
- BANCHEREA U J, STEINMAN RM.** *Dendritic cells and the control of immunity.* Nature. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
- HUMPHREYS-BEHER MG.** *Animal models for autoimmune disease-associated xerostomia and xerophthalmia.* Adv Dent Res (1996). 10: 73-75.
- HUMPHREYS-BEHER MG, HU Y, NAKAGAWA Y, WANG PL, AND PURUSHOTHAM KR.** *Utilization of the non-obese diabetic mouse as an animal model for the study of secondary Sjögren's syndrome.* Adv Exp Med Biol(1994). 350: 631-636.
- VAN BLOKLAND SC, VAN HELDEN-MEEUWSEN CG, WIERENGA-WOLF AF, DREXHAGE HA, HOOIJKAAS H, VAN DE MERWE JP, VERSNEL MA.** *Two different types of sialoadenitis in the NOD- and MRL/lpr mouse models for Sjögren's syndrome: a differential role for dendritic cells in the initiation of sialoadenitis?* Lab Invest. 2000 Apr;80(4):575-85.
- STASULIS CA, HAND AR.** *Immunohistochemical identification of antigen presenting cells in rat salivary glands.* Arch Oral Biol. 2003 Oct;48(10):691-9.
- TIM ALLEN, MS.** *Information Resources for Institutional Animal Care and Use Committees.* 1999
- ADAMS JC (1992)** *Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains.* J Histochem Cytochem 40:1457-1463
- MATTHEWS JB, POTTS AJ, HAMBURGER J, SCOTT DG.** *T6 antigen-positive cells in human labial salivary glands.* Arch Oral Biol. 1985;30(4):325-9.
- TAKAHASHI H, TSUDA N, TEZUKA F, OKABE H.** *An immunoperoxidase investigation of S-100 protein in the epithelial component of Warthin's tumor.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1986 Jul;62(1):57-62.
- CRAWFORD JM, TAUBMAN MA, SMITH DJ.** *Minor salivary glands as a major source of secretory immunoglobulin A in the human oral cavity.* Science. 1975 Dec 19;190(4220):1206-9.
- OXHOLM P, MANTHORPE R, OXHOLM A, SCHIODT M.** *Langerhans cells in labial minor salivary glands in primary Sjögren's syndrome.* Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]. 1985 Mar;93(2):105-7.
- Sharma M, Ahsan F, Ah-Sae KW, McKean ME, Kain R, Chapman AD.** *Interdigitating dendritic cell sarcoma of the parotid gland.* J Laryngol Otol. 2006 Mar;120(3):244-6. Epub 2005 Dec 14.
- DAVID R, BUCHNER A.** *Langerhans' cells in a pleomorphic adenoma of submandibular salivary gland.* J Pathol. 1980 Jun;131(2):127-35.
- NAIR PN, SCHROEDER HE.** *Local immune response to repeated topical antigen application in the simian labial mucosa.* Infect Immun. 1983 Jul;41(1):399-409.
- HON H, JACOB J.** *Tracking dendritic cells in vivo: insights into DC biology and function.* Immunol Res. 2004;29(1-3):69-80. Review.