

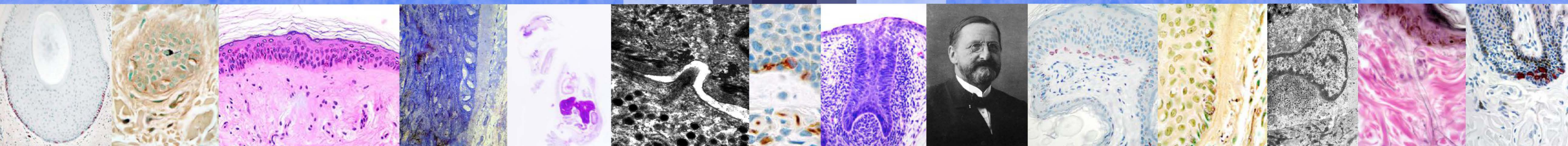
TESIS DOCTORAL

Estudio de las Células Neuroendocrinas Cutáneas  
(Células de Merkel) en el Perro

TESIS DOCTORAL

Estudio de las Células  
Neuroendocrinas Cutáneas  
(Células de Merkel)  
en el Perro

Gustavo A. Ramírez Rivero



## **Anexo II**

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

Departamento: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado: Sanidad y Patología Animal

### **Título de la Tesis**

**“ESTUDIO DE LAS CÉLULAS NEUROENDOCRINAS CUTÁNEAS  
(CÉLULAS DE MERKEL) EN EL PERRO”**

Tesis Doctoral presentada por Don Gustavo A. Ramírez Rivero

Dirigida por el Dr. Don Antonio Espinosa de los Monteros y Zayas  
Co-dirigida por el Dr. Don Francisco Rodríguez Guisado

**El Director**

**Co-Director**

**El Doctorando**

Las Palmas de Gran Canaria, Noviembre de 2015





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**  
**DIVISIÓN DE HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA ANIMAL**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO DE SANIDAD Y PATOLOGÍA ANIMAL**

**“ESTUDIO DE LAS CÉLULAS NEUROENDOCRINAS CUTÁNEAS  
(CÉLULAS DE MERKEL) EN EL PERRO”**

**GUSTAVO A. RAMÍREZ RIVERO**  
**LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, NOVIEMBRE DE 2015**





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**  
**DIVISIÓN DE HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA ANIMAL**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO DE SANIDAD Y PATOLOGÍA ANIMAL**

**“ESTUDIO DE LAS CÉLULAS NEUROENDOCRINAS CUTÁNEAS  
(CÉLULAS DE MERKEL) EN EL PERRO”**

*Tesis Doctoral presentada por D. Gustavo A. Ramírez Rivero para optar al grado de Doctor en  
Veterinaria.*

*Fdo: Gustavo A. Ramírez Rivero*

**LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, NOVIEMBRE DE 2015**





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA



**ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEROS Y ZAYAS, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA U.L.P.G.C.**

**INFORMA:**

Que **D. Gustavo A. Ramírez Rivero**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “**Estudio de las células neuroendocrinas cutáneas (células de Merkel) en el perro**”, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

**FDO: DR. ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEROS Y ZAYAS**

**LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, NOVIEMBRE DE 2015**





**FRANCISCO RODRÍGUEZ GUIADO, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL  
ÁREA DE CONOCIMIENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA  
COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA FACULTAD DE  
VETERINARIA DE LA U.L.P.G.C.**

**INFORMA:**

Que **D. Gustavo A. Ramírez Rivero**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “**Estudio de las células neuroendocrinas cutáneas (células de Merkel) en el perro**”, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

**FDO: DR. FRANCISCO RODRIGUEZ GUIADO**

**LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, NOVIEMBRE DE 2015**



*“Hazlo, o no lo hagas, pero no lo intentes.”*

A mi madre y hermanos,  
A Ingrid, mi esposa, y a mi hijo Abián,  
Y a ti, padre.



# **AGRADECIMIENTOS**

AGRADECIMIENTOS



Que estas líneas sirvan para expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han colaborado en la realización del presente trabajo.

A mi Director, Antonio Espinosa de los Monteros, por su inagotable paciencia, la serenidad con la que me ayudaba a enfrentar y resolver todas aquellas dificultades que han ido surgiendo y por su orientación, buen hacer, seguimiento y supervisión.

A mi co-Director, Francisco Rodríguez, por el interés mostrado por el trabajo y las sugerencias recibidas, siempre acertadas que han incrementado la calidad de este trabajo.

Al Dr. Pedro Herráez, director en la sombra, por sus buenas y frescas ideas, por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

A los tres, les debo gran parte de mi vocación y pasión por la Anatomía Patológica, fueron una base fundamental en mi formación antes de crear mi propio camino. Gracias, además, porque este tiempo no sólo he sido un doctorando, sino un amigo.

Especial reconocimiento merece el Dr. Antonio Fernández, espejo en el que mirarse para conseguir la excelencia investigadora, con el que me encuentro en deuda por la confianza en mí depositada. Gracias a la Dra. Marisa Andrada, ejemplo de esfuerzo y superación y a los Dres. J. Radúan Jaber, Miguel Rivero, Jorge Orós, José Vilar y María José Caballero, por sus muestras de apoyo.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros de Departamento y del Instituto Universitario de Sanidad Animal, por haber sido una piña durante mucho tiempo, porque sin ellos todo hubiera sido mucho más aburrido, Manolo, Eva, Ayoze, Óscar, Héctor, Alejandro, Ana, Javier, Mariña, gracias. Especial recuerdo a “Inmunoman” y “Pipetaman”, sin ellos las largas jornadas de inmunohistoquímica hubieran sido demasiado tediosas. Y al personal técnico, por su asesoramiento y colaboración, Pedro, Ani, Águeda y Jose.

Mi especial agradecimiento a la colaboración del Dr. Tomás García-Caballero, por la cesión desinteresada de algunos de los anticuerpos, a la Unidad de Obstetricia y Reproducción



Animal de la ULPGC, en la figura del Dr. Miguel Batista, por la cesión de los fetos, y al Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba, por permitirme el acceso a sus equipos e instalaciones para la realización del estudio ultraestructural.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos, en especial a mi madre por su continuo interés en el estado de este trabajo.

A mi esposa Ingrid, por la infinita paciencia y comprensión al final de la realización de este proyecto. Por su apoyo y ánimos, por su positividad inagotable, por siempre hacerme ver las cosas desde otro punto de vista, por ser, en definitiva, la persona que me completa.

Finalmente, gracias a mi orgullo y mi gran motivación, Abián, porque me impulsas cada día a superarme, porque has conseguido inyectarme de la fuerza necesaria para completar este trabajo, porque sin aún saberlo tú has triunfado donde antes otros no pudieron.





<b>1. Introducción: Antecedentes históricos y Estado actual del tema.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Justificación del Estudio y Objetivos.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Revisión Bibliográfica .....</b>	<b>13</b>
3.1. Estructura y Función de la piel del perro.....	15
3.1.1. Anatomía .....	15
3.1.2. Fisiología.....	15
3.1.3. Anatomía Microscópica .....	16
A. Tipos de Piel.....	10
B. Estructura Microscópica de la Piel Gruesa .....	19
C. Estructura Microscópica de la Piel Delgada .....	26
3.2. Células de Merkel en la Etapa Adulta .....	37
3.2.1. Características Morfológicas de las Células de Merkel con Microscopía Óptica .....	37
A. Perfil Histoquímico .....	38
B. Perfil Inmunohistoquímico.....	42
3.2.2. Ultraestructura de las Células de Merkel .....	66
3.2.3. Morfometría de las Células de Merkel.....	74
3.2.4. Subpoblaciones de Células de Merkel .....	78
3.2.5. Localización, Densidad y Distribución de las Células de Merkel .....	81
A. Localización y Organización en los Epitelios .....	81
B. Densidad en las Diferentes Localizaciones Anatómicas .....	83
C. Distribución en la Piel de los Mamíferos.....	84
3.2.6. Origen de las Células de Merkel.....	92
3.2.7. Respuesta Fisiológica y Función de las Células de Merkel .....	95
A. Función Mecanorreceptiva.....	95
B. Función Endocrina.....	97
3.2.8. Otros Aspectos Biológicos de las Células de Merkel .....	101
A. Proliferación.....	101
B. Diferenciación .....	102
B. Desarrollo y Supervivencia .....	102
3.3. Células de Merkel en la Etapa Fetal y Perinatal .....	104
3.3.1. Morfología y Localización de las Células de Merkel Durante el Desarrollo .....	104
3.3.2. Perfil Inmunohistoquímico de las Células de Merkel Durante el Desarrollo.....	105
3.3.3. Distribución de las Células de Merkel Durante el Desarrollo .....	108
3.3.4. Desarrollo Fetal de Células de Merkel.....	110
3.3.5. Función de las Células de Merkel Durante la Embriogénesis y el Desarrollo Fetal .....	114

<b>4. Relación de Estudios Realizados.....</b>	<b>117</b>
4.1. Identificación de las Células de Merkel en la Piel Canina Mediante Métodos Histoquímicos. ....	119
4.2. Hallazgos Morfológicos e Inmunohistoquímicos de las Células de Merkel en el Perro .....	129
4.3. Caracterización Ultraestructural de las Células de Merkel en el Perro .....	143
4.4. Correlación Entre los Hallazgos Inmunohistoquímicos y Ultraestructurales de las Células de Merkel en el Perro.....	157
4.5. Análisis Comparativo de Cinco Anticuerpos Comerciales Para Identificación Inmunohistoquímicos y Ultraestructurales de las Células de Merkel en el Perro .....	167
4.6. Distribución Anatómica y Recuento de las Células de Merkel en la Piel y Mucosa Normal del Perro.....	187
4.7. Estudio de las Células de Merkel Durante el Periodo Fetal y Perinatal en el Perro: Apariencia, Densidad y Distribución .....	217
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>233</b>
<b>6. Resumen.....</b>	<b>237</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>241</b>
<b>8. Futuras Líneas de Investigación .....</b>	<b>245</b>
<b>9. Listado de Abreviaturas .....</b>	<b>249</b>
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>253</b>
<b>11. Anexo.....</b>	<b>289</b>

# 1 **INTRODUCCIÓN:** **ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA**

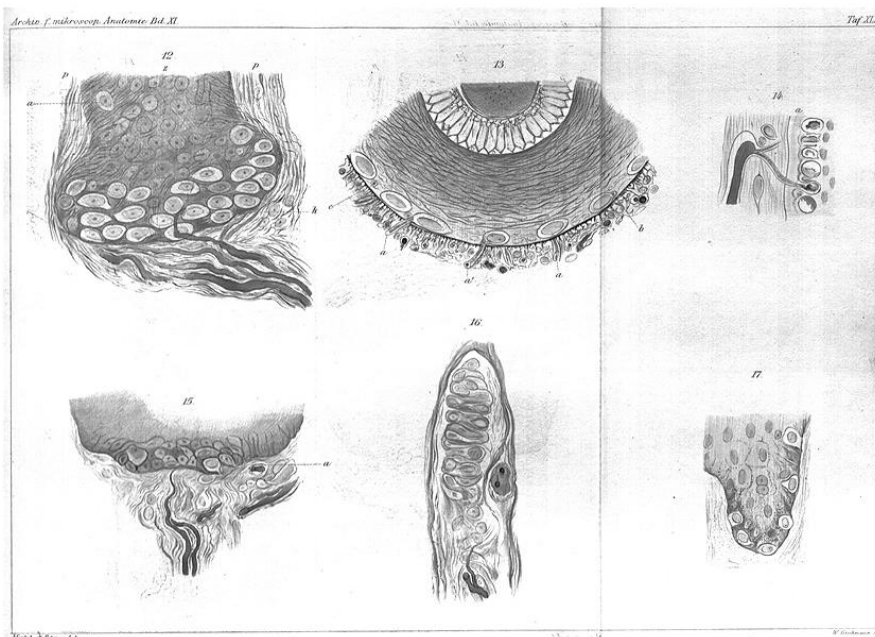
---







Las *células de Merkel* (CMs) o *células neuroendocrinas cutáneas* fueron descritas en 1875 por Friedrich Sigmund Merkel, anatomista y fisiólogo alemán (1845-1919), como “*células epidermales con inervación específica*” (Merkel, 1875). Estas células se caracterizaban por poseer un cuerpo celular vesicular de gran tamaño con un núcleo grande, alargado y pálido. Se localizaban en el estrato basal de la epidermis de las pieles pilosas y lampiñas de varios tipos de mamíferos domésticos, unidas a terminaciones nerviosas. Merkel no tuvo dudas acerca de la participación de estas células en la percepción del tacto, de ahí que las denominara “*Tastzellen*” (*células táctiles*), mientras que a los grupos de terminaciones nerviosas unidas a sus respectivas CMs los llamó “*Tastscheiben*” (*corpúsculos táctiles*) (Merkel, 1875). Con el cambio de siglo, las “*Tastzellen*” de Merkel pasaron a llamarse simplemente *células de Merkel* después de que varios autores comenzaran a utilizar este término. Muchas son los términos usados a lo largo del tiempo para referirse a este tipo celular: *corpúsculos de Merkel* (Cauna, 1962), *complejo célula de Merkel-neurita* (Munger, 1965; Halata y cols., 2003), *complejo CM-axón* (Winkelman y Breathnach, 1973; Gould y cols., 1985), *complejo neurocelular de Merkel* o *terminación (nerviosa) de Merkel* (Halata 1975; Halata y cols., 2003).



Dibujos originales de F. S. Merkel extraídos de su publicación en 1875 (Arch Mikr Anat 11:636-652, 1875).



A partir de su descubrimiento, las CMs fueron objeto de estudio por diferentes disciplinas científicas. Algunas de las primeras investigaciones fueron poco afortunadas y contribuyeron a que algunos aspectos más notables permanecieran ocultos durante un largo tiempo. La aplicación de la tecnología a la ciencia permitió posteriormente el esclarecimiento de muchos de sus aspectos.

La presunción de Merkel acerca de la participación de estas células en la percepción del tacto fue posteriormente apoyada por la descripción de los *discos (táctiles) epidérmicos* (*discos táctiles pilosos, almohadillas tilótricas o "haarscheibens"*) por Pinkus en 1902. Pero no fue hasta la década de los años sesenta del siglo XX, con la publicación de las primeras imágenes obtenidas por microscopía electrónica en la piel humana (Cauna, 1962), cuando se daba un salto cualitativo y cuantitativo en el estudio de las CMs. El conocimiento de las características ultraestructurales de esta tan desconocida población celular supuso un gran avance en cuestiones tales como su origen, biología, función y distribución. A finales de la década de los 60 y principios de los años 70, por medio de estudios que combinaban microscopía electrónica con electrofisiología, se introdujo el concepto de la CM como *mecanorreceptor de adaptación lenta de tipo I* ("*slowly adapting type I mechanorreceptor*": SA1), dada la existencia de potenciales de acción en los complejos neurocelulares de Merkel en respuesta a estímulos mecánicos (Iggo y Muir, 1969; Winkelmann y Breathnach, 1973).

El descubrimiento a finales de los años 70 de varios neuropéptidos en los gránulos de las CMs indujo a la suposición de funciones neuroendocrinas para este tipo celular (Hartschuh y cols., 1979; Hartschuh y Grube, 1979). Al mismo tiempo, un tipo de cáncer de piel altamente agresivo, denominado inicialmente como *Carcinoma Trabecular*, fue descrito por Toker en 1972. El hecho de que este tumor estuviese constituido por células con características morfológicas muy similares a las CMs provocó que rápidamente se especulase acerca de una transformación neoplásica de esta población celular. Surgiría así el concepto de *Carcinoma de células de Merkel* (CCM) (o *carcinoma neuroendocrino cutáneo*).

En los años 80 y 90, la introducción y el desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas, unido a la obtención de anticuerpos específicos, permitieron el descubrimiento de una amplia cantidad de moléculas en las CMs. En esta línea, la demostración inmunohistoquímica de

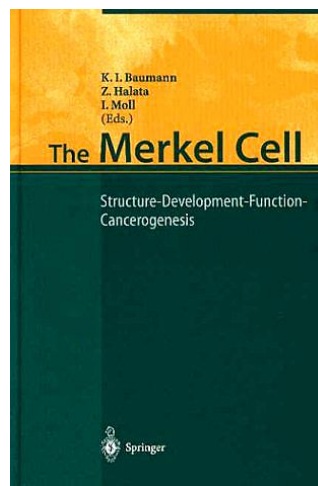
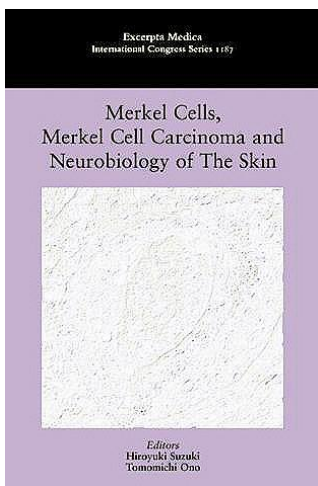
citoqueratinas en las CMs, unido a otros hallazgos ultraestructurales propios de células de origen epitelial, acrecentó la idea de que derivaban de precursores epidermales (Moll I. y cols., 1986; Moll I. y Moll R., 1992), en detrimento de un desarrollo a partir de la cresta neural (Winkelmann, 1977). Esta derivación epidermal ya había sido sugerida por algunos autores a partir de observaciones en la piel de mamíferos fetales y recién nacidos (Munger, 1965; Lyne y Hollis, 1971; English, 1974), pero es en este periodo cuando toma una mayor fuerza. Sin embargo, y a pesar de la multitud de estudios realizados al respecto, la cuestión del origen de las CMs continúa sin aclararse completamente (Szeder y cols., 2003a; Tilling y cols., 2014). Paralelamente al desarrollo inmunohistoquímico, como CMs también se han agrupado algunas células con una apariencia muy similar, sin conexión con terminaciones nerviosas (Tachibana, 1995; Tachibana y Nawa, 2000, 2002). Este hallazgo ha alimentado la idea de que existen diferentes subtipos celulares dentro de las CMs, a los que se atribuyen ciertas funciones endocrinas/paracrinas.

La mayor parte de los estudios actuales se centran en las funciones paracrinas atribuidas a las CMs, en clarificar su origen, en revelar su papel en la transducción mecánica (conversión de señal mecánica a electroquímica) y en su transformación maligna, la cual ha sido vinculada recientemente a la infección por un tipo de poliomavirus (*Merkel cell polyomavirus*, Feng y cols., 2008). En las últimas dos décadas, el avance en las técnicas de detección, diagnóstico y tratamiento del carcinoma de CMs ha contribuido a su mejor conocimiento en la especie humana y, especialmente, a su mejor caracterización histológica. Esto ha desencadenado que aumente el número de descripciones de este tipo de cáncer en la literatura científica y ha minimizado los diagnósticos erróneos con otras neoplasias de características morfológicas similares, concepto especialmente importante si se tiene en cuenta que es un tipo de cáncer muy agresivo donde un diagnóstico precoz es de vital importancia en el pronóstico de la enfermedad. En el ámbito veterinario, este tipo de neoplasia es mucho menos frecuente. En la literatura especializada, sólo existe un total de 29 casos en la especie canina (Glick y cols., 1983; Nickoloff y cols., 1985; Whiteley y Leininger, 1987; Konno y cols., 1998; Gil da Costa et al. 2009; Joiner et al. 2010). Cabe destacar que las primeras descripciones mostraban lesiones que morfológicamente se asemejan a otras neoplasias caninas, como histiocitomas atípicos, plasmocitomas o tumores basales sólidos, por lo que muy posiblemente fueran diagnósticos erróneos (Glick y cols., 1983; Nickoloff y cols., 1985; Whiteley y Leininger, 1987). Poco a

poco, se incorporan al diagnóstico diferencial de las neoplasias caninas cutáneas (Gross y cols., 2005; Miller y cols., 2013).

**Cronología de los principales descubrimientos en el área de estudio de las CMs.**

<b>Descubrimiento</b>	Merkel, 1875
<b>Ultraestructura</b>	Cauna, 1962
<b>Fisiología</b>	Iggo y Muir, 1969
<b>Hipótesis del origen epidermal</b>	Munger, 1965; Lyne y Hollis, 1971; English, 1974; Moll I. y cols., 1986
<b>Hipótesis del origen neural</b>	Iggo y Muir, 1969; Winkelmann, 1977
<b>Carcinoma de CMs</b>	Toker, 1972
<b>Funciones neuroendocrinas</b>	Winkelmann, 1977; Hartschuh y Grube, 1979; Pearse, 1980
<b>Inmunohistoquímica</b>	Schmechel y cols., 1978; Hartschuh y cols., 1979; Moll R. y cols., 1984a; Navone, 1986; Gauweiller y cols., 1988
<b>Carcinoma de CMs canino</b>	Nickoloff y cols., 1985
<b>Subpoblaciones de CMs</b>	Tachibana, 1995; Tachibana y cols., 1997; Tachibana y Nawa, 2000
<b>Carcinoma de CMs otras especies</b>	Patnaik y cols., 2001 (gato)
<b>Poliomavirus en CCM humano</b>	Feng y cols., 2008



Monográficos que recogen los avances científicos en el estudio de las CMs y sus patologías

## **2** JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---





Las *células de Merkel* (CMs) se conocen desde 1875 (Merkel, 1875), si bien representan el tipo celular epidérmico menos estudiado hasta el punto que muchas de las cuestiones básicas acerca de su biología no se conocen o no han sido descritas hasta recientemente, como su origen, parte de sus funciones o su participación en la homeostasis y en condiciones patológicas de la piel.

En humanos, se ha verificado su vinculación con algunos trastornos cutáneos, incluyendo condiciones inmunológicas como el pénfigo vulgar o el rechazo donante-receptor, condiciones hiperplásicas o displásicas como el eritema *ab-igne* o la dermatosis actínica, y condiciones neoplásicas como varios tumores foliculares benignos (Wollina and Mahrle, 1992; Hartschuh and Schulz, 1997; Boulais y cols., 2009b). Una de las alteraciones más reconocidas en este tipo celular es el tumor neuroendocrino cutáneo o *carcinoma de células de Merkel*, neoplasia reconocida en humanos, perros y gatos (Konno et al., 1998; Patnaik et al., 2001; Bagnasco et al., 2003; Gil da Costa et al., 2010; Wang et al., 2011). No obstante, mientras que esta neoplasia está bien caracterizada en el hombre, el diagnóstico de esta neoplasia en pequeños animales es ocasional. Además, examinando la literatura, algunas de las primeras descripciones en el perro parecen, morfológicamente, neoplasias de otros tipos celulares, tales como histiocitomas atípicos, plasmocitomas o tumores sólidos de células basales, o podrían representar metástasis cutáneas de carcinomas endocrinos/neuroendocrinos originados en órganos internos (Glick y cols., 1983; Nickoloff y cols., 1985; Whiteley y Leininger 1987; Joiner y cols., 2010). Esta tendencia al diagnóstico erróneo se debe a la ausencia de caracterización morfológica e inmunofenotípica de este tipo celular en la especie canina.

Debido a la gran ausencia en la literatura de referencias acerca de las características de las CMs en el perro y a la existencia de diferencias interespecie en cuanto a las características morfológicas, contenido de neuropéptidos, expresión de moléculas y características funcionales de esta población celular, nos ha sido razonable plantear como objetivo general del presente trabajo comprobar y verificar si las CMs en la especie canina comparte los rasgos descritos en la literatura científica para otras especies. La determinación de sus características morfológicas e inmunofenotípicas en diferentes etapas del desarrollo, desde la vida fetal a la vida adulta, así como el conocimiento de su distribución y localización anatómica, nos permitirá mejorar el

conocimiento de la estructura de la piel en el perro y dilucidar el papel funcional que este tipo celular tiene en la homeostasis cutánea en esta especie. Esto nos permitirá, también, sentar las bases para proyectar estudios acerca de su papel en el desarrollo y la evolución de diferentes condiciones patológicas cutáneas, incluido el reconocimiento, diagnóstico y caracterización del tumor neuroendocrino cutáneo primario (de células de Merkel) en el perro.

Los objetivos específicos de la presente Tesis doctoral fueron:

**1.** Estudiar y determinar la utilidad de las técnicas histoquímicas rutinarias para la identificación y caracterización de las células de Merkel en el perro.

**2.** Determinar la morfología y el perfil inmunohistoquímico de las células de Merkel en la especie canina, incluyendo la localización de los productos inmunorreactivos, en condiciones normales y en muestras de diferentes áreas cutáneas fijadas en formol e incluidas en parafina.

**3.** Determinar aquellos marcadores más útiles para la identificación de las células de Merkel en el perro, en términos de intensidad de inmunorreacción y de recuento celular.

**4.** Describir los rasgos ultraestructurales de las células de Merkel en el perro, incluyendo valores morfométricos.

**5.** Estudiar la correlación entre los hallazgos morfológicos e inmunohistoquímicos en las células de Merkel en el perro, determinando su posible significado en la(s) función(es) de este tipo celular en esta especie.

**6.** Realizar un estudio de la presencia, distribución y densidad de las células de Merkel en la piel y mucosa normal del perro, investigando además si existen cambios significativos en función de la edad, el sexo, la raza, el tipo de capa y la presencia o ausencia de pigmentación.

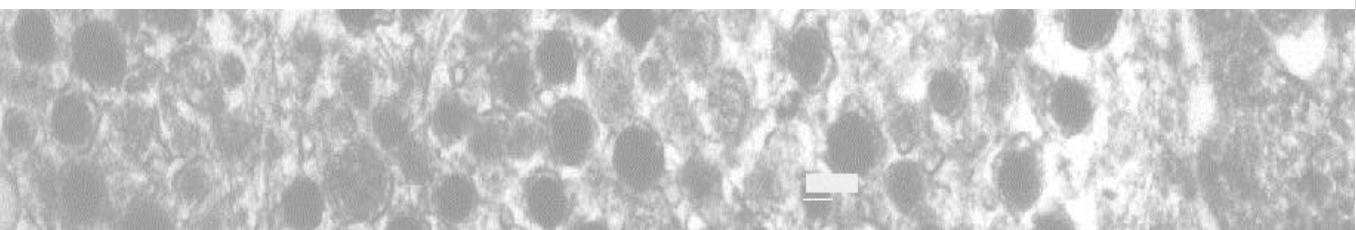
- 7.** Determinar cuándo las células de Merkel aparecen en la piel del perro durante el desarrollo fetal, realizando una aproximación acerca de su densidad y estudiando los patrones de distribución en los diferentes tipos de piel y su relación con el desarrollo de las diferentes estructuras cutáneas. Intentar dilucidar el origen de las células de Merkel en la especie canina.





# 3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---





### 3.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PIEL CANINA

En este capítulo se hace un resumen breve de la estructura de la piel canina, introduciendo algunos conceptos y términos que serán utilizados a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo representando una barrera anatómica y fisiológica entre animal y ambiente. Es un órgano de vital importancia, de compleja estructura y con múltiples funciones. Pero la piel no es sólo un órgano con sus propios patrones de reacción sino que también es un espejo que pone de manifiesto el medio interior y, al mismo tiempo, es un reflejo del mundo exterior al que es expuesta (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

#### 3.1.1. ANATOMÍA

---

La piel de los carnívoros domésticos es el mayor órgano del animal y el más evidente. Cubre toda la superficie corporal y en los labios, nariz, párpados, ano y vulva se continúa con las membranas mucosas por medio de las uniones mucocutáneas. El grosor disminuye cráneo-caudalmente y dorso-ventralmente oscilando entre 0,5 y 5 mm en el perro, sin incluir el panículo adiposo. Así, las zonas de mayor grosor cutáneo son la frente, la zona dorsal del cuello, el tórax y la región del tercio posterior, mientras que las más delgadas se sitúan sobre los pabellones auriculares y en las áreas axilar, inguinal y perianal (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

#### 3.1.2. FISIOLOGÍA

---

La misión principal de la piel es *la protección y el mantenimiento de la integridad del individuo* evitando la deshidratación y haciendo posible la vida terrestre. Protege contra todas aquellas agresiones producidas por agentes químicos, físicos o biológicos. A lo largo de la evolución, la piel ha ido incrementando la complejidad de su estructura y adoptando nuevas funciones, algunas de ellas de gran importancia. Participa activamente en la *termorregulación* del cuerpo de los mamíferos mediante mecanismos de disipación del calor (sudor,

vasodilatación) y mecanismos de aislamiento térmico (pelaje, panículo adiposo). No menos importante es su papel en la **recepción de estímulos sensoriales del exterior**. En la piel se han integrado numerosos receptores y terminaciones nerviosas que perciben frío, calor, tacto, presión, dolor y prurito. Actúa como un **órgano secretor**, eliminando numerosas sustancias al exterior por mediación de las glándulas sudoríparas y sebáceas. Además, participa activamente en la **síntesis de varias moléculas**, entre ellas la vitamina D<sub>3</sub>, y es un **almacén de diferentes productos**, como los lípidos (Ferrer, 1994; Hargis y Ginn, 2012; Miller y cols., 2013).

Una de las funciones más importantes que se le ha reconocido es **la respuesta inmunitaria**. Se ha desarrollado un nuevo concepto al considerarla como un órgano inmunológico y no meramente un órgano con funciones protectoras. Ahora sabemos que contiene diferentes tipos celulares que responden frente a antígenos que desde el exterior entran en contacto con el organismo. La función inmunológica estaría establecida por células de Langerhans, células dendríticas dermales, macrófagos y linfocitos residentes, queratinocitos, fibroblastos, las unidades microvasculares dermales y los linfonodos regionales. Todos estos elementos integran el **complejo celular de reconocimiento y defensa inmunológica** (Ross y cols., 1995; Ginn y cols., 2007; Hargis y Ginn, 2012).

### 3.1.3. ANATOMÍA MICROSCÓPICA

---

La piel posee una estructura microscópica muy compleja debido a la gran cantidad de funciones que desempeña. Está constituida por células con diferentes orígenes: **ectodérmicas**, como los queratinocitos; de la **cresta neural**, como los melanocitos; y **mesodérmicas** como las células de Langerhans y los elementos celulares dérmicos (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

Está integrada por 3 capas complejas (figura 1 y 2): la **epidermis** (del griego *epi* = encima y *derma* = piel), la **dermis** o capa interna (también llamada **corion** en el hombre) y la **hipodermis** (del griego *hypo* = inferior y *derma* = piel) o tejido subcutáneo responsable de la movilidad de la piel. En estas capas se integran los anejos cutáneos, que incluyen los complejos pilosebáceos, las glándulas sudoríparas y otras estructuras especiales como las glándulas especializadas (glándulas circumanales o hepatoides, glándulas mamarias), las uñas, los cuernos y los cascos (Ferrer, 1994).

## A. TIPOS DE PIEL

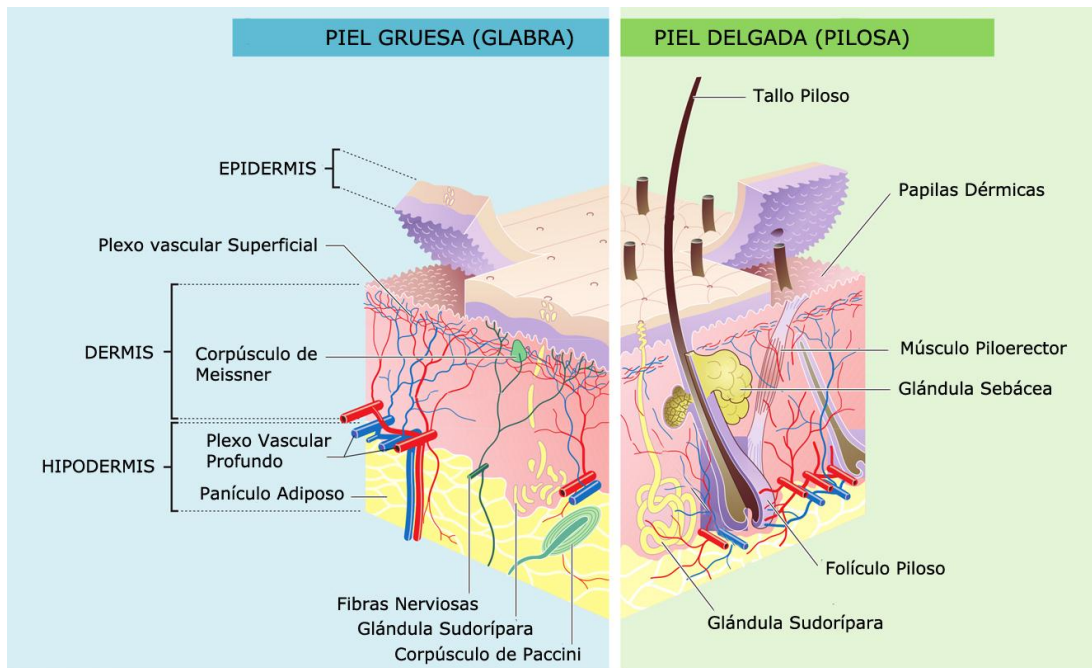
En los carnívoros pueden distinguirse básicamente dos zonas con diferente estructura cutánea (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013):

1) la piel con pelo o *piel pilosa*, que cubre la mayor parte del cuerpo, con una epidermis delgada sin papilas epidérmicas o con pocas y muy cortas, sin estrato lúcido, y dermis con abundantes pelos y glándulas;

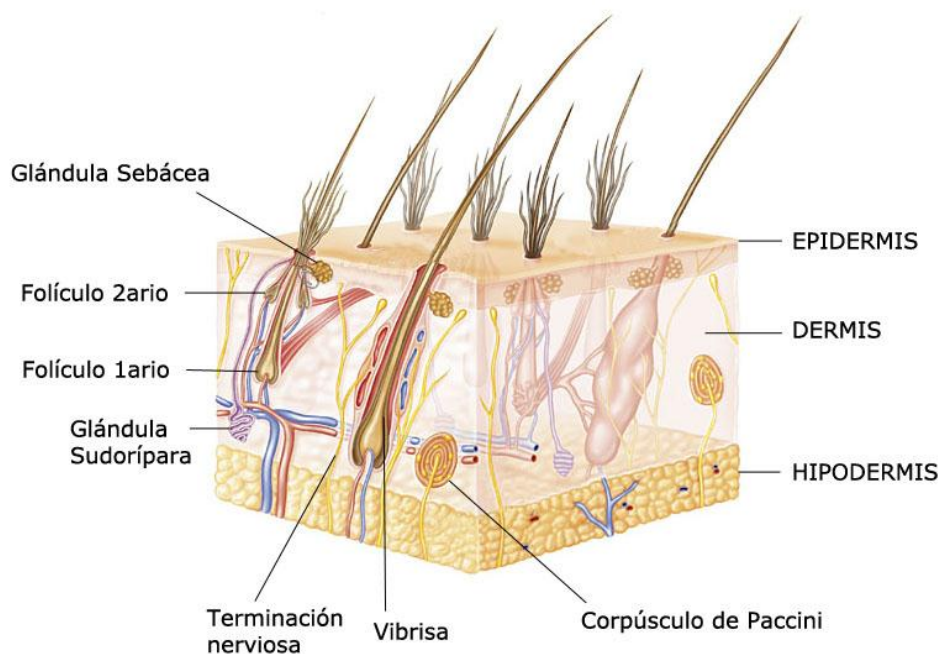
2) la piel sin pelo o *piel glabra o lampiña*, que incluye a su vez:

- los *cojinetes plantares* o *almohadillas*, la cual está sujeta a la mayor abrasión por lo que presenta una epidermis muy gruesa con papilas y crestas epidérmicas profundas en la dermis (piel crestada o *ridged skin* en inglés), estrato córneo de gran grosor, estrato lúcido, sin complejos pilosebáceos y con glándulas ecrinas
- El *plano nasal* y la *trufa*, mostrando una epidermis gruesa con papilas amplias (piel papilar o *pegged skin* en inglés), estrato granuloso ausente o muy delgado, estrato córneo laminado y sin complejos pilosebáceos.

Por su estructura microscópica, la primera también se conoce como *piel delgada* y la última como *piel gruesa*. Obviamente, también existen zonas de transición entre los diferentes tipos de piel de un animal.



**Figura 1.** Diagrama de la apariencia microscópica de la piel gruesa o glabra y la piel fina o pilosa humana.

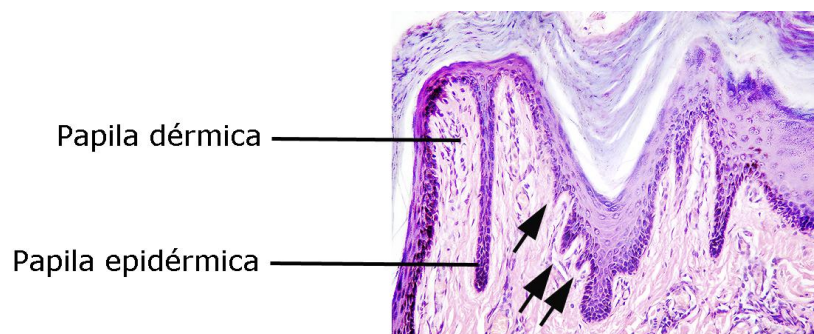


**Figura 2.** Diagrama de la apariencia microscópica de la piel canina (modificado de <http://www.scientific-art.com/portfolio%20vetmed%20pages/dogskin.htm>).

## B. ESTRUCTURA MICROSCÓPICA DE LA PIEL GRUESA

La piel gruesa canina y humana se caracterizan a simple vista por dos hechos: la ausencia de folículos pilosos y la presencia de arrugas epidérmicas. Las *arrugas epidérmicas* se constituyen al seguir la epidermis los contornos de las *crestas dérmicas* subyacentes. Tales arrugas se pueden estudiar en los cortes perpendiculares de piel (figura 3). Las crestas de la epidermis penetran en la parte más alta de cada cresta dérmica primaria, dividiéndolas en dos pliegues. Por el aspecto que presentan en estos cortes perpendiculares reciben el nombre de *papilas dérmicas* y, en consecuencia, el crecimiento epidérmico entre cada par de papilas recibe el nombre de *papila epidermal*. Pero estas papilas no son en realidad de forma cónica, ya que si fueran verdaderas papilas sólo se verían cuando el plano de corte atravesara una de tales estructuras. El hecho de que aparezcan constantemente en los cortes microscópicos demuestra que en realidad son pliegues o crestas, aunque a veces son inconstantes en su trayecto (Ham y Cormack, 1985; Ross y cols., 1995).

En las almohadillas, las papilas epiteliales no son simples. Múltiples crecimientos descienden desde la epidermis para penetrar en la cresta dérmica primaria dividiéndola en varias papilas dérmicas (figura 3). Esto se puede atribuir a un intento de aumentar el anclaje de la epidermis a la dermis debido a la fricción a la que está sometida la piel de esta zona. Además, los conductos de las glándulas ecrinas presentes en la dermis profunda e hipodermis se abren al exterior no por la zona más alta de los clavos epidermales como ocurre en humanos, sino por la parte más inferior de los surcos papilares.

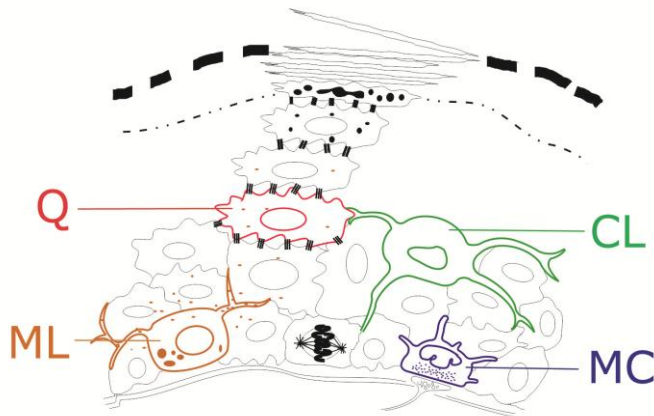


**Figura 3.** Corte histológico de almohadilla canina (piel gruesa). Nótese las múltiples pequeñas papilas epidérmicas secundarias (flechas). HE.



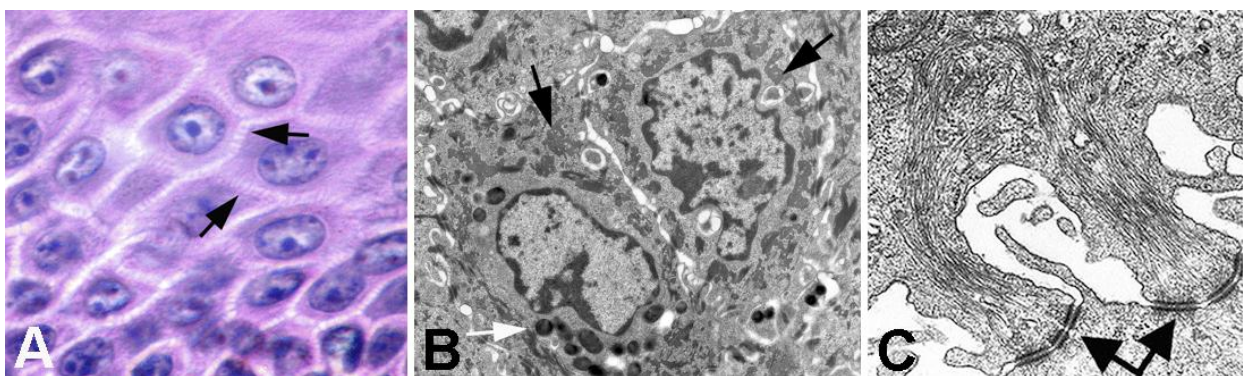
## Epidermis de la Piel Gruesa

La capa más externa de la piel es un epitelio estratificado plano queratinizado de origen ectodérmico. Existen cuatro tipos celulares principales en este epitelio (figura 4):



**Figura 4.** Diagrama de los cuatro tipos de células que componen la epidermis canina. Q = queratinocito; CL = célula de Langerhans; ML = melanocito; CM = célula de Merkel.

Los **QUERATINOCITOS (Qs)** constituyen aproximadamente el 85% de las células de la epidermis. Permanecen unidos entre sí mediante un tipo de unión intercelular muy resistente que se denomina *desmosoma* y permanecen unidos a la membrana basal por medio de *hemidesmosomas*. De estos desmosomas y hemidesmosomas parten abundantes *tonofibrillas* constituidas por filamentos proteicos (*citoqueratinas*) que ocupan buena parte del citoplasma (figura 5) (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

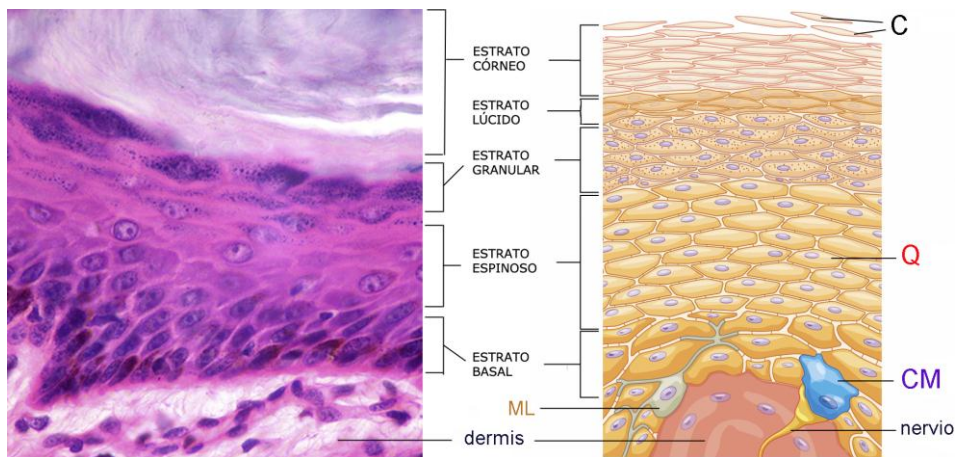


**Figura 5.** (A) Queratinocitos epidérmicos bajo microscopio óptico y tinción de HE. Nótese las marcadas conexiones intercelulares características del estrato espinoso (flechas). (B) Queratinocitos al microscopio electrónico. Nótese los característicos gruesos agregados de citoqueratinas o tonofilamentos (flechas negras) y los gránulos de melanina transferidos (flecha blanca). (C) detalle de desmosomas en los procesos citoplasmáticos de los queratinocitos (flechas).

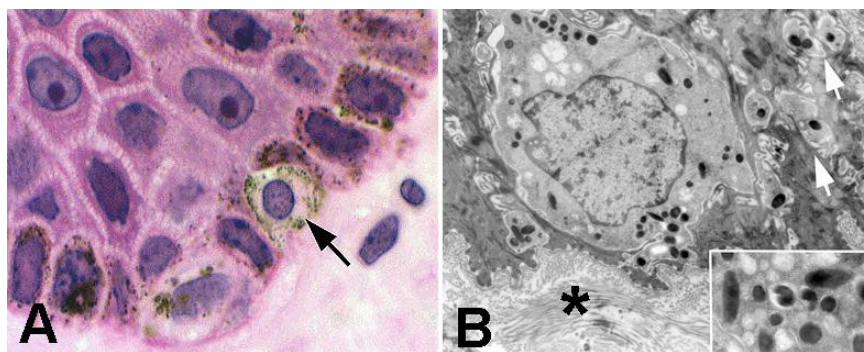
Los Qs se originan por la división continua de células germinales situadas en la capa basal del epitelio. Las células recién formadas se desplazan lentamente hacia la superficie aumentando de tamaño y diferenciándose, al tiempo que acumulan en su citoplasma cantidades crecientes de queratina (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013). Este proceso de continua maduración y queratinización confiere a la epidermis una estructura clásica en estratos (figura 6):

- El más interno es el **estrato basal**, formado por células de morfología cúbica que descansan sobre la membrana basal. Estas células son las encargadas de renovar la epidermis (de ahí también el nombre de *estrato germinativo*).
- Sobre el estrato basal aparece el **estrato espinoso** constituido por capas de Qs de aspecto sutilmente aplanado y con marcadas uniones intercelulares (figura 5A).
- A continuación el **estrato granuloso**, formado por una o dos capas de células considerablemente más aplanadas y dispuestas con el eje celular mayor paralelo a la superficie cutánea, con característicos gránulos de queratohialina que se ven intensamente basófilos en los cortes histológicos (figura 6).
- Sobre el estrato granuloso se encuentra el denominado **estrato lúcido**, una capa intensamente eosinofílica constituida por una mezcla del fosfolípido *eleidina* y de proteínas. Este estrato está presente sólo en zonas muy queratinizadas y sin pelo.
- Más externamente se halla el **estrato córneo**. En los cortes histológicos convencionales aparece formado por dos o tres capas de células anucleadas, totalmente cornificadas y eosinófilas (*corneocitos*). En las capas más externas, las células muertas se separan unas de otras y se descaman terminando de esta forma el proceso de renovación epidérmica.

**Figura 6.** Corte histológico de una almohadilla canina (HE) y diagrama representativo de los diferentes estratos o capas de la epidermis (modificado de <http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46060.html>). Diferentes estratos son reconocibles en la epidermis. (B). C = Corneocito; Q = Queratinocito; CM = Células de Merkel; ML = Melanocito.

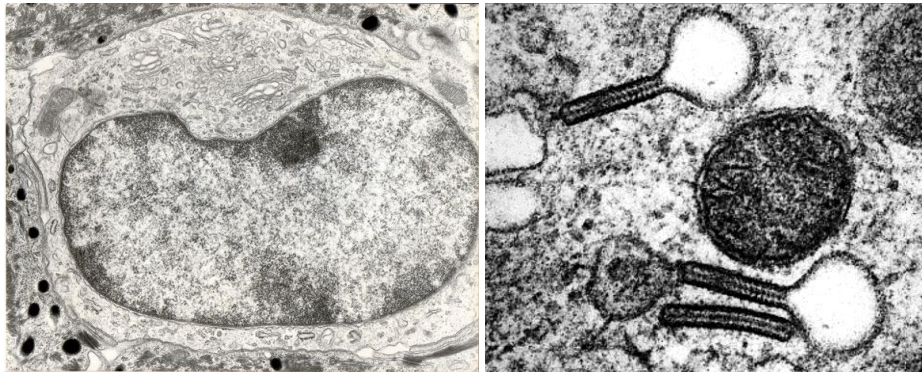


Los **MELANOCITOS (MLs)** son células derivadas de la cresta neural, que migran a la epidermis en el periodo embrionario y que, básicamente, son sintetizadoras de pigmento: la *melanina*. La principal función de la melanina es la de proteger contra los efectos nocivos de la radiación solar ultravioleta (UV), absorbiéndola e inhibiendo los radicales libres que se producen por su efecto. Los MLs suponen alrededor del 5% del total de las células epidérmicas y en los cortes histológicos convencionales aparecen como células claras situadas en el estrato basal, distribuidas de forma homogénea a lo largo de toda la epidermis (figura 7a). También se encuentran en la vaina epitelial externa de los folículos pilosos y en la matriz del pelo, en las glándulas sebáceas y en los conductos de las glándulas sudoríparas. Su citoplasma contiene numerosos *melanosomas*, vesículas delimitadas por una membrana en las cuales se sintetiza la melanina (figura 7b). Los melanosomas son transferidos al citoplasma de los Qs vecinos en los extremos de las dendritas, lo que explica que la mayor parte de la melanina observada en los cortes histológicos se corresponde con melanina transferida a los Qs (Ferrer, 1994; White y Yager, 1995; Miller y cols., 2013).



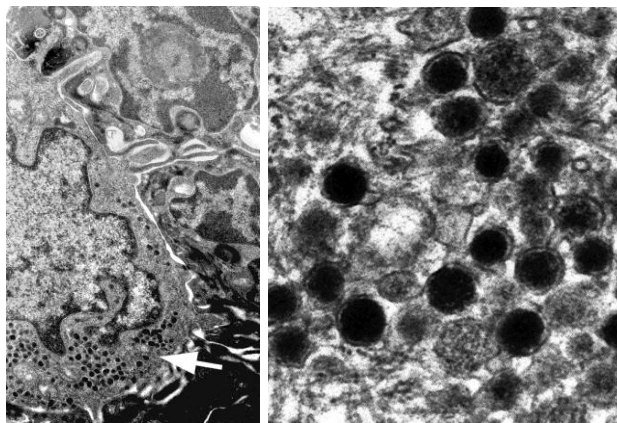
**Figura 7.** Melanocito (flecha) bajo microscopio óptico y tinción de HE (A), y bajo microscopio electrónico (B) \* = dermis; flechas blancas = secciones transversales de prolongaciones citoplasmáticas (dendritas) de los melanocitos entre los queratinocitos. Inset: detalle de los gránulos de melanina.

Las **CÉLULAS DE LANGERHANS (CLs)** son células del sistema mononuclear fagocitario. Suponen alrededor del 3-8% de las células de la epidermis. Proceden de la médula ósea y son transportadas por la sangre hasta la dermis, desde donde emigran a la epidermis en un proceso que continúa durante toda la vida. Su principal función es la presentación de antígenos. Situadas en la epidermis, se encuentran en una situación privilegiada para contactar con antígenos exógenos que entren en contacto con la piel. En los cortes histológicos aparecen como células claras situadas en el estrato espinoso de la epidermis, aunque también en menor proporción en el basal. En humanos, cerdo, gato, vaca y caballo muestran, al microscopio electrónico, unos característicos gránulos citoplásmicos en forma de raqueta llamados *gránulos de Birbeck* (figura 8) (Ferrer, 1994; White y Yager, 1995; Miller y cols., 2013).



**Figura 8.** A la izquierda, célula de Langerhans de la epidermis humana al microscopio electrónico (imagen tomada de [http://biologiedelapeau.fr/spip.php?page=forum&id\\_article=5&lang=en](http://biologiedelapeau.fr/spip.php?page=forum&id_article=5&lang=en)). A la derecha, detalle de los característicos gránulos de Birbeck en forma de raqueta (imagen tomada de <https://www.studyblue.com/notes/n/dr-jassim-derm-path-iib/deck/9378612>).

El cuarto tipo celular que se encuentra en la epidermis son las **CÉLULAS DE MERKEL (CMs)**. Se distribuyen a lo largo de toda la superficie cutánea, especialmente en regiones altamente sensibles. Suponen aproximadamente el 2% de las células epidermales. Están conectadas a terminaciones desnudas de fibras nerviosas mielínicas y tienen importancia como receptores del tacto. En los cortes histológicos convencionales también aparecen como células claras situadas en las zonas basales de la epidermis, si bien su distribución es muy heterogénea en comparación con las otras células claras de la epidermis (MLs y CLs). Contrariamente a los MLs y a las CLs, se unen a los Qs por medio de desmosomas y presentan gránulos citoplasmáticos electrodenso de aspecto neurosecretor (figura 9) (Ferrer, 1994; White y Yager, 1995; Halata y cols., 2010; Miller y cols., 2013).



**Figura 9.** A la izquierda, detalle de una célula de Merkel canina al microscopio electrónico, con sus característicos gránulos en porciones basales del citoplasma (flecha). A la derecha, detalle de los característicos gránulos de núcleo denso limitados por membrana (neurosecretores).

**Tabla 1. Diferencias entre los tres tipos de células claras de la epidermis canina.**

	<b>CMs</b>	<b>CLs</b>	<b>MLs</b>
<b>Localización en la epidermis</b>	Estrato basal/parabasal	Alta en la epidermis	Generalmente basal
<b>Disposición en la epidermis</b>	Aislada o en grupos	Aislada	Aislada
<b>Forma</b>	Ovalada y/o dendrítica	Dendrítica	Dendrítica
<b>Núcleo</b>	Lobulado	Muy invaginado	Generalmente redondo
<b>Espinas citoplasmáticas</b>	Si	No	No
<b>Procesos citoplasmáticos (dendritas)</b>	Si, con gránulos neurosecretores	Si	Si, con gránulos de melanina
<b>Desmosomas</b>	Si	No	No
<b>Conexión nerviosa</b>	Si (en ocasiones no)	No	No
<b>Melanosomas</b>	Ocasionalmente	En ciertas patologías	Si
<b>Gránulos citoplasmáticos</b>	Electrodensos (80-120 nm), de núcleo denso y con membrana. Homogéneos.	Gránulos de Birbeck (15-50 x 4 nm), en forma de raqueta. No en perros.	Melanosomas, limitados de membrana y electrodensos (0.6-1.1 µm). Heterogéneos.
<b>Polaridad de los gránulos</b>	Si	No	No
<b>Filamentos intermedios</b>	CKs y (Nf)	Vim	Vim
<b>Marcadores IHQ</b>	CKs, Nse, CgA, Syn, CGRP, PGP9.5, (Nf)	MHC II, CD11, CD18	S100, HMB-45, MelanA, PNL2
<b>Función</b>	Mecanorreceptor	Presentación de antígenos	Síntesis de melanina, Protección UV
<b>Localización cutánea</b>	Generalizada, heterogénea	Generalizada, homogénea	Generalizada, homogénea

### **Unión dermoepidérmica y membrana basal**

La *unión dermoepidérmica* o *zona de la membrana basal* es una estructura compleja y altamente especializada caracterizada al microscopio óptico como una lámina eosinófila situada por debajo de la epidermis. La **membrana basal** (*mb*) tiene tan sólo un grosor de 40-60 nm y una arquitectura molecular compleja. Con el microscopio electrónico se distinguen la *lámina lúcida* (electrolúcida) y la *lámina densa* (electrodensa), de la cual parten numerosas fibras de colágeno que se distribuyen por la dermis subyacente. Las funciones principales de la *mb* son permitir la diferenciación de los Qs, regular el transporte de nutrientes entre dermis y epidermis, y mantener unidas las dos estructuras (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

### **Dermis en la piel gruesa**

La dermis es un tejido conectivo de origen mesodérmico con abundante vascularización e innervación, que sirve de soporte a la epidermis y a los anejos cutáneos. La composición de la dermis canina es compleja (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013):

1. **Sustancia fundamental amorfa**, constituida por *glucosaminoglucanos* y *proteoglucanos*, fundamentalmente;
2. **Fibras de colágeno** (87% *colágeno de tipo I*, 10% *colágeno tipo III* y 3% *colágeno tipo V*) y **fibras elásticas** (con *elastina* y *microfibrillas*), cuya función fundamental es conferir resistencia y elasticidad a la piel.
3. **Células conectivas** de diferentes tipos:
  - *fibroblastos*, células mesenquimatosas fusiformes con capacidad de división y encargadas de la síntesis y degradación de los glucosaminoglucanos y de las fibras dermales.
  - *macrófagos* o *histiocitos*, células derivadas de los monocitos sanguíneos que tienen como principales funciones la fagocitosis y la secreción de citoquinas.
  - *mastocitos* o *células cebadas*, células derivadas de la médula ósea con numerosos gránulos citoplásmicos ricos en mediadores de la respuesta inflamatoria (*histamina*, *heparina*, *factor de necrosis tumoral  $\alpha$* ).

4. **Melanocitos**, se pueden ver cerca de la dermis superficial y alrededor de los bulbos pilosos en perros de capas oscuras, como Doberman pinscher.

Histológicamente, se distinguen dos zonas en la dermis: la **dermis superficial** (*dermis papilar* en la especie humana) y la **dermis profunda** (*dermis reticular* en la especie humana).

**Tabla 2. Principales diferencias entre dermis superficial y profunda en el perro (modificada de Ferrer, 1994)**

Característica	Dermis superficial	Dermis profunda
Organización de la matriz	Laxa, fibras finas de colágeno	Densa, fibras gruesas de colágeno
Tipos de colágeno	I, III, V, VI, procolágeno tipo I	I, III, V, VI
Celularidad	Elevada	Baja
Morfología de los fibroblastos	Células jóvenes (secreción activa)	Células maduras (fibrocitos)
Proliferación de los fibroblastos	Elevada proliferación	Baja proliferación

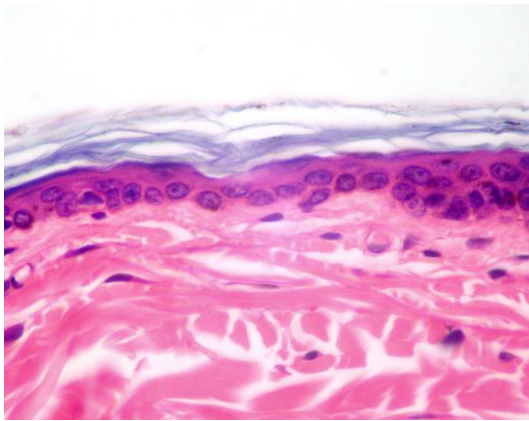
En la piel del plano nasal y de la trufa, la demis presenta un gran grosor en comparación con la piel de los cojinetes plantares donde es más delgada. No presenta folículos pilosos ni otros anejos cutáneos, a excepción de las glándulas ecrinas en la dermis profunda e hipodermis de los cojinetes plantares (Ferrer, 1994).

### **C. ESTRUCTURA MICROSCÓPICA DE LA PIEL DELGADA**

La piel delgada canina cubre todo el cuerpo del animal con excepción de los cojinetes plantares, el plano nasal y la trufa. Difiere de la piel gruesa en que contiene los folículos pilosos, más densos y desarrollados según la zona cutánea, las glándulas sudoríparas apocrinas y las glándulas sebáceas (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

#### ***Epidermis en la piel delgada***

Tiene menos capas que en la piel gruesa. El estrato germinativo es parecido, pero el estrato espinoso es más delgado. El estrato granuloso no llega a formar una capa separada y continua, sino que está constituido por gran número de células granuladas esparcidas en la zona donde debiera hallarse esta capa. No existe el estrato lúcido. El estrato córneo es relativamente delgado (figura 10) (Monteiro-Riviere, 1998).



**Figura 10.** Corte histológico de la piel abdominal canina (piel delgada). La diferenciación entre los estratos es menos evidente que en la epidermis de la piel gruesa. HE.

### El “haarscheibe” o disco táctil epidermal

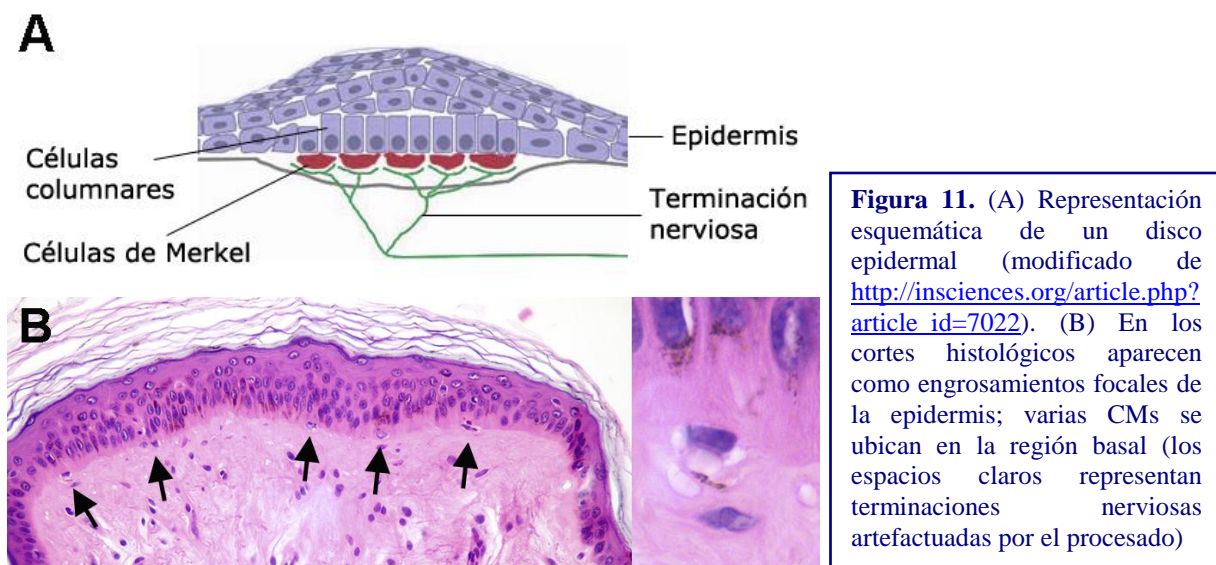
En 1902, Felix Pinkus describió unas estructuras epidermales características compuestas por unos diminutos engrosamientos de la piel, de unos 0.5 mm de diámetro, con una morfología similar a la de un disco. Debido a su proximidad con los folículos pilosos recibieron el nombre de “*Haarscheiben*” o *discos táctiles del pelo* (“*hair discs*”). Otros términos comúnmente utilizados son *corpúsculos táctiles*, *almohadillas táctiles*, *corpúsculos de Pinkus* o *almohadillas tilótricas* (Iggo y Muir, 1969; Smith, 1977).

Todos los mamíferos muestran discos táctiles en la piel pilosa, muy similares estructuralmente. En algunas especies, como la rata, ratón o cobaya, mantienen una relación constante con el pelo y señalan ciertos movimientos direccionales del mismo (Smith, 1977). La presión del pelo al moverse sobre el disco es la forma más normal de estímulo (Smith, 1970). No se han encontrado en la piel glabra. Su densidad y tamaño puede variar entre las especies y entre las diferentes partes del cuerpo (Smith, 1977; Zelená, 1994). En humanos, una estimación grosera sitúa a la piel del cuello, abdomen y brazos entre las localizaciones de mayor densidad, sin embargo son más prominentes y se pueden observar más fácilmente en la piel del abdomen (Smith, 1970, 1977). La estructura de estos discos en el perro fue descrita en detalle por Narita y cols. (1986) y no mostraba diferencias significativas con la de otros mamíferos.

Su superficie externa constituye pequeñas elevaciones o eminencias sobre la epidermis de morfología redondeada o poligonal, en ocasiones con una pigmentación diferente a la de la



piel circundante (English, 1977). La epidermis del disco está compuesta de un epitelio más grueso que la epidermis circundante, con células especializadas columnares que se extienden desde las células basales y se orientan perpendicularmente a la superficie cutánea (figura 11). Estos Qs especiales presentan un programa de diferenciación diferente a la epidermis adyacente, especialmente en su perfil de citoqueratinas, lo que les permite ciertas propiedades funcionales para una óptima percepción sensitiva (Moll I. y cols., 1993b). En su base existen grupos de CMs asociadas a terminaciones nerviosas dermales. La unión dermo-epidérmica es altamente circunvalada con prominentes crestas y engrosamientos epidérmicos, sobre todo demarcando el borde del disco. Contrasta en gran medida con la unión lisa vista normalmente en la piel de alrededor. Debajo existe una papila dermal ancha y elevada, más densa y resistente a la presión que la dermis de alrededor. Un sistema eréctil de capilares dentro de esta papila también afecta al tamaño del disco dependiendo de si los capilares se llenan o se vacían (English, 1977a; Moll I. y cols., 1993b).



Estos diminutos órganos cutáneos representan *mecanorreceptores de adaptación lenta de tipo I*. La ligera deformación por presión genera una descarga irregular y mantenida; este tipo de descarga no puede ser evocada fácilmente cuando el estímulo es aplicado fuera del perímetro del disco (Iggo y Muir, 1969; Smith, 1970, 1977; English, 1974, 1977a, b). La inervación del disco táctil proviene de gruesos nervios mielinizados de la dermis que se dividen en múltiples ramas en la dermis papilar, inmediatamente debajo del disco del pelo. La mielina

de esas fibras nerviosas sólo se extiende hasta unas pocas micras antes de la epidermis, después de lo cual las fibras penetran desnudas en la membrana basal para finalizar como expansiones terminales, con forma de disco, bajo las CMs (Smith, 1977; Moll I. y cols., 1993b). Un nervio mielinizado abastece de uno a tres haarscheiben y un disco no posee más de un nervio mielinizado (Iggo y Muir, 1969; Smith, 1977; Zelená, 1994).

El disco también tiene cierta capacidad para responder a cambios termales, especialmente frente al frío, por medio de un incremento en el número de potenciales de acción a partir de un estímulo de presión dado. Es decir, que el disco es capaz de enviar mensajes acerca de la temperatura sólo cuando una presión aplicada a la vez desencadena un estímulo (Iggo y Muir, 1969; Smith, 1977).

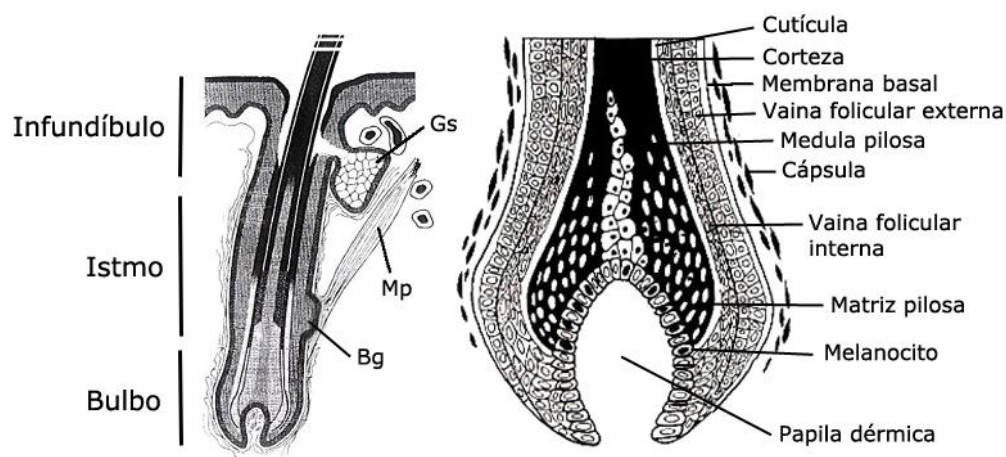
### ***Dermis en la piel delgada***

La dermis de la piel delgada canina se proyecta en la epidermis en forma de papilas, menos pronunciadas y más simples que en la piel gruesa. Su grosor es muy variable dependiendo del área corporal; por ejemplo, la dermis del cuello es más gruesa que la del abdomen (Monteiro-Riviere, 1998).

Los folículos pilosos, los músculos piloerectores, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas apocrinas constituyen los anejos cutáneos.

Los **FOLÍCULOS PILOSOS** son invaginaciones tubulares de la epidermis y de la membrana basal hacia la dermis en las que se forman los pelos. Anatómicamente, los folículos pilosos en la piel canina suelen estar colocados en un ángulo de 30-60° con respecto a la superficie cutánea. Se dividen en tres segmentos (figura 12): el **infundíbulo** o porción superficial, que se extiende entre la desembocadura del conducto excretor de las glándulas sebáceas y la superficie epidérmica; el **istmo** o segmento central, que se extiende desde la entrada del conducto sebáceo a la inserción del músculo piloerector; y el segmento inferior o **bulbo** del pelo, que se presenta desde la inserción del músculo piloerector hasta la papila dérmica (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013). La histología del folículo piloso es muy compleja y está integrada por numerosos componentes que se disponen ordenadamente (figura 12):

1. la **papila dérmica**: tejido conjuntivo muy vascularizado situado en la base del folículo que se encarga de nutrir a las células proliferantes de la matriz.
2. la **matriz del pelo**: formación epitelial bulbosa en forma de copa que rodea a la papila en la base del folículo, compuesta por Qs basales y MLs. Es la encargada de producir el pelo y la vaina folicular externa.
3. la **vaina folicular externa**: se extiende desde la matriz hasta la epidermis. Es muy gruesa cerca de la epidermis y gradualmente reduce su espesor hacia el bulbo del pelo. En la zona de inserción del músculo piloerector, bajo la glándula sebácea, la vaina folicular externa sufre un engrosamiento denominado **PROTUBERANCIA** (“*bulge area*”) (figura 12). La vaina folicular externa está rodeada por otras dos estructuras: una *zona de membrana basal*, continuación de la membrana basal epidérmica, y una cápsula de tejido conectivo denso o *vaina folicular fibrosa*.
4. la **vaina folicular interna**: constituye una envoltura protectora del pelo en formación.
5. el **pelo**: también se forma en la matriz pilosa y se compone de tres estratos: la *cutícula*, formada por escamas queratinizadas anucleadas entrelazadas formando una capa externa; la *corteza*, formada por queratina dura, normalmente pigmentada con melanina lo que da al pelo su color; la *médula*, compuesta por hileras longitudinales de células degeneradas cuboidales o aplanadas ricas en diferentes proteínas.



**Figura 12.** Diagrama de las diferentes partes del folículo piloso (modificado de Miller y cols., 2013). Gs = glándula sebácea; Mp = Músculo piloerector; Bg = región de la protuberancia folicular.

En los carnívoros domésticos se observan tres tipos distintos de pelos: los *PELOS DE COBERTURA* o *de guarda*, los *PELOS INFERIORES* (también conocidos como *lanosos* o “*borra*”) y los *PELOS ESPECIALIZADOS*. A diferencia de los que ocurre en el caballo, en la vaca o en el hombre, en los carnívoros los folículos pilosos se agrupan formando complejos en los que se distingue un *folículo principal* y varios *folículos secundarios*. Los folículos primarios producen pelos gruesos, con médula (de cobertura). Los secundarios producen pelos finos, con médula discontinua o sin médula (lanosos). Cada pelo primario puede estar acompañado de 5-20 pelos secundarios (figura 2). Cada folículo primario presenta como estructuras asociadas glándulas sebáceas, sudoríparas y un músculo erector del pelo en sus proximidades. Por el contrario, los folículos secundarios sólo presentan asociadas glándulas sebáceas. Los pelos primarios emergen de forma independiente a través de poros separados, en tanto que los pelos secundarios lo hacen mediante un poro común (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

Los pelos especializados tienen función táctil y son de dos tipos. Los *pelos sinusales* o *vibrisas* (también llamados “bigotes”) se encuentran en el hocico, labios, párpados, cara y sobre la cara palmar del carpo en los gatos. Estos pelos son gruesos, inflexibles y afilados hacia el extremo distal. Presentan un seno sanguíneo revestido por un endotelio interpuesto entre la vaina folicular externa y la cápsula de tejido conectivo denso que rodea al folículo piloso (figura 13). Los músculos esqueléticos se fijan a la vaina externa del folículo permitiendo cierto control voluntario. Presenta numerosos fascículos nerviosos que atraviesan la vaina folicular externa. Las fibras nerviosas dentro del pelo pueden terminar en dos variedades diferentes de mecanorreceptores: en *terminaciones nerviosas libres* y en *terminaciones nerviosas de Merkel* (complejo CM y axón). Se considera que estos pelos son importantes para la orientación espacial y el reconocimiento táctil del entorno más inmediato (Halata, 1975; Rice y cols., 1993; Ebara y cols., 2003). Los *pelos tilótricos* se encuentran distribuidos entre los pelos normales, son grandes folículos primarios que presentan un anillo de tejido neurovascular a nivel de la glándula sebácea (English, 1977a; Ginn y cols., 2007). Aparecen asociados (según la especie animal) a los *discos epidermales táctiles* o *tilótricos* (Smith, 1977; Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).



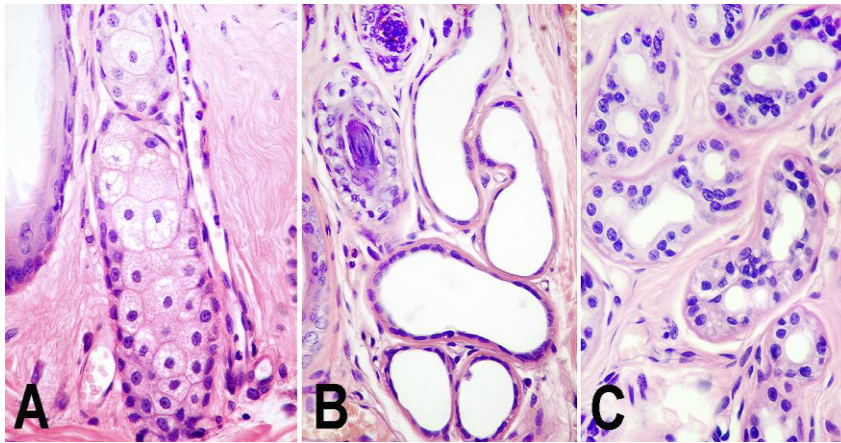
**Figura 13.** (a) Corte histológico de una vibrisa canina, con el característico seno vascular rodeando el folículo (\*). HE.

Unidos a la vaina de tejido conectivo que rodea al folículo piloso hay uno o más haces de fibras de músculo liso que forman el **MÚSCULO PILOERECTOR**, de origen mesenquimatoso. Nace en la dermis superficial y se inserta en la vaina fibrosa folicular, en la región de la protuberancia. Se cree participa en la termorregulación y en la eliminación del producto de secreción de las glándulas (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

Por último, en la piel canina existen dos tipos de glándulas. Las **GLÁNDULAS SEBÁCEAS** son glándulas alveolares compuestas, de *secreción holocrina* (toda la célula secretora se transforma en producto de secreción) (figura 14a). En los animales domésticos están más desarrolladas que en el hombre y están distribuidas por toda la superficie corporal, excepto en los cojinetes plantares y en el plano nasal. Su tamaño es máximo en las uniones mucocutáneas, en los espacios interdigitales, en el dorso del cuello, en el mentón y en el dorso de la cola. Su producto de secreción es el sebo, una mezcla de lípidos en la que predominan los triglicéridos y los ácidos grasos libres. La secreción sebácea se mezcla con la secreción sudorípara y constituye una película oleosa que confiere elasticidad y flexibilidad a la piel, la mantiene hidratada y, probablemente, juega un papel regulador en el crecimiento de la flora bacteriana (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

El segundo tipo de componente glandular cutáneo es el sudoríparo, que a su vez, en los carnívoros domésticos, se divide en dos tipos de estructuras. Las **GLÁNDULAS SUDORÍPARAS EPITRIQUIALES** (asociadas al pelo), cuya secreción se produce mediante la

liberación a la luz glandular de fragmentos del citoplasma apical de las células epiteliales (secreción apocrina). Son las más abundantes y están distribuidas por toda la superficie cutánea excepto los cojinetes plantares y el plano nasal. Tienden a ser más grandes en áreas donde la densidad folicular es mínima (cerca de las uniones mucocutáneas y en los espacios interdigitales). Se trata de glándulas contorneadas cuyo conducto excretor termina en el istmo del canal folicular. La porción secretora de las glándulas es más profunda y está formada por una monocapa de células epiteliales cilíndricas rodeadas externamente por una capa de células mioepiteliales (figura 14b). Las **GLÁNDULAS SUDORÍPARAS ATRIQUIALES** (no asociadas al pelo, secreción ecrina) se encuentran localizadas exclusivamente en los cojinetes plantares. Son glándulas de pequeño tamaño, contorneadas, localizadas en la dermis profunda y tejido subcutáneo y cuyo largo conducto excretor termina en la superficie epidérmica. La porción secretora consiste en una monocapa de células epiteliales cúbicas o cilíndricas rodeadas por una capa de células mioepiteliales (figura 14c). En el hombre, las glándulas sudoríparas ecrinas son las más abundantes, están distribuidas por todo el cuerpo y juegan un papel importante en la termorregulación. Es probable que en los carnívoros estas glándulas tengan también un discreto papel termorregulador (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).



**Figura 14.** Secciones histológicas de los diferentes tipos glandulares de la piel canina. (A) Glándula sebácea. (B) Glándula sudorípara epitriquial (apocrina). (C) Glándula sudorípara atriquial (ecrina). HE.

### *Hipodermis*

Es la capa más profunda de la piel y sujeta la dermis al músculo o al hueso subyacente. Está constituida por un entramado de fibras de colágeno y fibras elásticas que soportan

estructuras vasculares y nerviosas, permitiendo la flexibilidad y el movimiento libre de la piel. También presenta tejido adiposo formando un cojín o almohadilla de grasa llamada **PANÍCULO ADIPOSO**, abundante e importante en los cojinetes plantares (donde se conoce como *colchón plantar*) para proporcionar una deformación amplia y soportar impactos mecánicos (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

### **Vascularización e inervación cutánea**

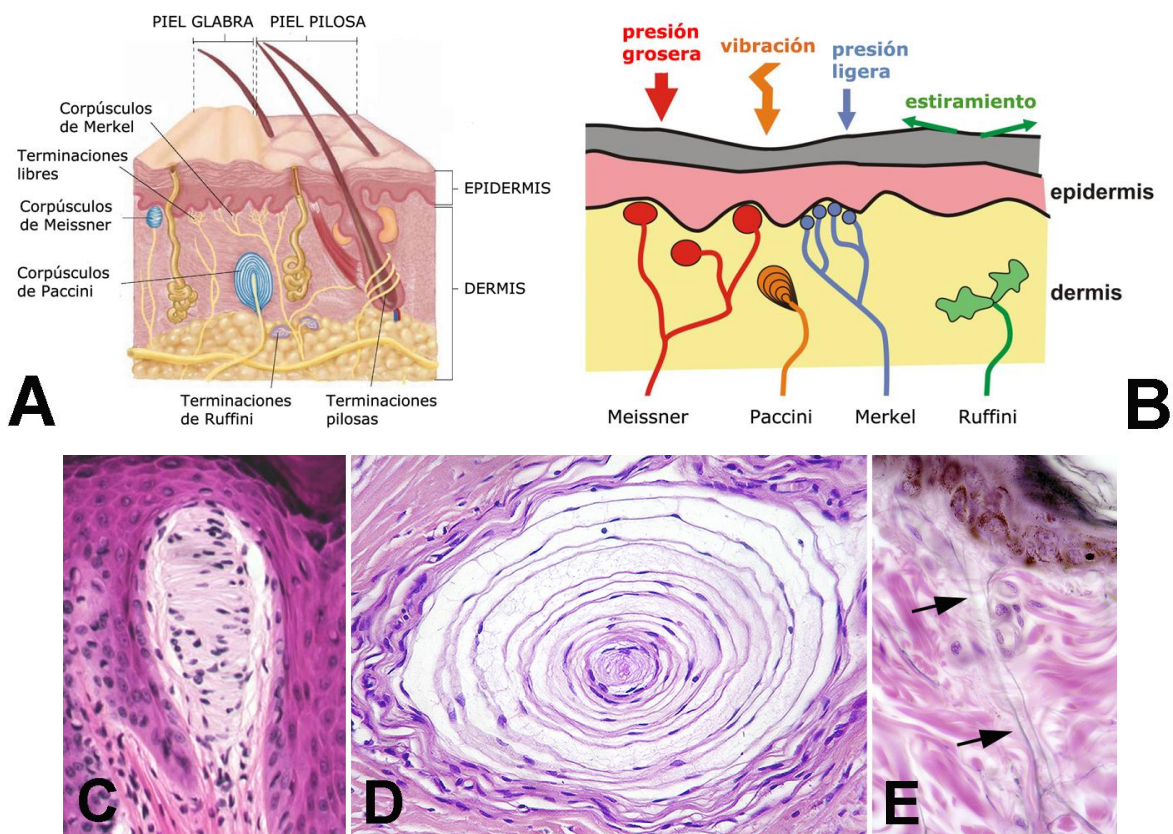
La piel es un órgano intensamente vascularizado. Existe un **plexo vascular superficial** dispuesto próximo a la unión dermoepitelial y encargado de nutrir a la epidermis. El **plexo profundo** discurre a la altura de la unión entre la dermis y el tejido subcutáneo. Se encarga de nutrir al segmento inferior de los folículos pilosos, a las glándulas sudoríparas apocrinas y al panículo adiposo (figuras 1 y 2). Existe un tercer plexo denominado **plexo medio**, de menor importancia, que discurre a la altura de las glándulas sebáceas y de los músculos piloerectores. Los tres plexos están intensamente anastomosados. Paralelamente a los plexos sanguíneos se distribuye una red de vasos linfáticos que, tras sucesivas anastomosis, drena a un plexo linfático subcutáneo (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

La red nerviosa dérmica canina es más extensa en la piel glabra que en la pilosa y se constituye por fibras nerviosas sensoriales o sensitivas y fibras nerviosas simpáticas, que se organizan en receptores especializados o terminaciones nerviosas libres (figura 15) (Miller y cols., 2013):

- Los **RECEPTORES TÁCTILES ESPECIALIZADOS** pueden ser de varios tipos en los mamíferos: 1) **Corpúsculos de Meissner**, son pequeños receptores sensoriales de morfología ovalada, encapsulados, que se encuentran en la dermis superficial, especialmente en los pulpejos, los pezones, los párpados, los labios y los genitales. Son mecanorreceptores de adaptación rápida que responden a la vibración y presión grosera; 2) **Corpúsculos de Pacini** son grandes receptores sensitivos de adaptación rápida, encapsulados, que responden a la presión y a la vibración. Se localizan en la piel, en los ligamentos y cápsulas articulares, en algunas serosas, en el páncreas felino y en algunas zonas erógenas; 3) **Terminaciones de Ruffini**, mecanorreceptores de adaptación lenta de

tipo 2 responsables de la recepción de la tensión y responde a estiramientos de la piel; 4) **Corpúsculos de Merkel** (unión CM y axón en la piel glabra, *discos epidérmicos* en la piel pilosa), mecanorreceptores de adaptación lenta de tipo 1 que intervienen en la discriminación táctil y la recepción del tacto fino.

- Las **TERMINACIONES NERVIOSAS LIBRES** son la forma más sencilla de receptor sensitivo, pequeñas ramas terminales de fibras nerviosas aferentes penetrando en la epidermis. En los folículos existen diversas organizaciones de terminaciones nerviosas libres que actúan como receptores táctiles, de las cuales la más compleja es la asociada con los bigotes o *vibrisas* (mecanorreceptores de adaptación lenta) y con los *folículos pilosos tilótricos*, (mecanorreceptor de adaptación rápida).



**Figura 15.** (A) Diagrama de los diferentes receptores táctiles cutáneos (modificado de [https://online.science.psu.edu/bisc004\\_activeup002/node/5406](https://online.science.psu.edu/bisc004_activeup002/node/5406)). (B) Cada receptor responde a un tipo de estímulo táctil (modificada de [http://www.pc.rhul.ac.uk/staff/J.Zanker/PS1061/L6/PS1061\\_6.htm](http://www.pc.rhul.ac.uk/staff/J.Zanker/PS1061/L6/PS1061_6.htm)). (C) Corte histológico de un corpúsculo de Meissner en la dermis superficial humana, HE (imagen tomada de [http://missinglink.ucsf.edu/lm/IDS\\_101\\_histo\\_resource/skin\\_glands.htm](http://missinglink.ucsf.edu/lm/IDS_101_histo_resource/skin_glands.htm)). (D) Corte histológico de un corpúsculo de Pacini en perro, HE (E) Terminaciones nerviosas libres en piel de perro, OsO<sub>4</sub> y HE.



**Tabla3. Receptores sensoriales cutáneos (según Zelena, 1994).**

<b>TIPO</b>	<b>LOCALIZACIÓN</b>
<b>Piel glabra o lampiña</b> Corpúsculo de Merkel Corpúsculo de Meissner Terminación libre Corpúsculo de Pacini Corpúsculo de Ruffini	Epidermis basal Dermis superficial Epidermis y dermis Dermis y tejido subcutáneo Dermis y tejido subcutáneo
<b>Piel pilosa</b> Disco táctil epidermal Penicilado Terminación libre Corpúsculo de Pacini Corpúsculo de Ruffini	Epidermis basal Dermis superficial Epidermis y dermis Dermis y tejido subcutáneo Dermis y tejido subcutáneo
<b>Uniones mucocutáneas</b> Terminación libre	Dermis subpapilar

En los pelos comunes (primarios y secundarios), los vasos sanguíneos penetran la pared del folículo hasta la proximidad de la membrana basal de la vaina folicular interna. En las vibrisas, los vasos sanguíneos forman senos notables y la sangre no entra en contacto con la vaina epitelial ni con parte alguna del pelo, se extravasa el plasma cerca de la membrana basal. Las fibras nerviosas, por su parte, penetran por debajo de las glándulas sebáceas y también por la papila, atraviesan la cápsula conectiva del folículo, la membrana basal y llegan hasta el epitelio de la vaina folicular interna. En las vibrisas penetran entre las células epiteliales (Ferrer, 1994; Miller y cols., 2013).

## 3.2. LA CÉLULA DE MERKEL EN LA ETAPA ADULTA

### 3.2.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS DE MERKEL CON MICROSCOPIA ÓPTICA

La CM es un tipo celular de difícil identificación al microscopio óptico en las secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina (HE) puesto que realmente no llama la atención sobre las otras células claras de la epidermis, los melanocitos (MLs) y las células de Langerhans (CLs). Es necesario recurrir a técnicas inmunohistoquímicas o de microscopía electrónica, aunque existen algunas técnicas histoquímicas que pueden ayudar a tal fin.

Morfológicamente, las CMs son de gran tamaño, normalmente mayor que los Qs, con una típica forma alargada y oval, si bien en las últimas dos décadas se ha descrito polimorfismo dependiendo de la localización corporal y de la unión o no a terminaciones nerviosas (Ramieri y cols., 1992; Tachibana, 1995; Hillinges y cols., 1996; Tachibana y Nawa, 2000, 2002). Presentan un citoplasma muy claro con un núcleo oval marcadamente lobulado o indentado; esta apariencia clara es debida a la escasez en filamentos intermedios. Sus ejes longitudinales se disponen paralelos a la superficie de la piel y las terminaciones nerviosas asociadas se disponen por debajo del cuerpo celular, orientadas hacia la lámina basal (Winkelmann y Breathnach, 1973; Halata y cols., 2003, 2010; Moll I. y cols., 2005).

Muchas moléculas se han identificado histoquímica e inmunohistoquímicamente en las CMs. Algunas de ellas se hallan en los gránulos neurosecretorios, mientras que otras están localizadas en el citoplasma celular, en la membrana plasmática o incluso en el núcleo (tabla 4) (Tachibana, 1995; Moll I. y cols., 2005).

**Tabla 4. Localización de las sustancias quimio- e inmunorreactivas en las CMs**

CITOPLASMA	NÚCLEO	GRÁNULOS NEUROSECRETORES	VESÍCULAS CLARAS	MEMBRANA PLASMÁTICA
Citoqueratinas Neurofilamentos Proteína S100 PGP9.5 Pancreastatina Somatostatina Villina R-orexinas Proteínas G $\alpha$ P2Y2 $\beta$ -galactosidasa NT-3 Bcl-2	Proteína S100 Brn-3c HATH1 p27	Serotonina Cromogranina A Neuropéptidos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Metencefalina</li> <li>• Dinorfina A</li> <li>• VIP</li> <li>• CGRP</li> <li>• Sustancia P</li> <li>• Neuroquinina A</li> <li>• PHI</li> <li>• Neuropéptido Y</li> <li>• Bombesina</li> <li>• Prepro-orexina</li> <li>• proteína 7B2</li> <li>• LAPasa</li> </ul>	Sinaptofisina	EMA Proteínas desmosomales EpCAM E-cadherina NCAM GAP-43 NGF-R mGluR5 VGLUT1 VGLUT2 VGLUT3 Receptores 5-HT Transportador 5-HT IP3R-I, IP3R-II P2Y2

## A. PERFIL HISTOQUÍMICO

Algunas técnicas histoquímicas enzimáticas y no enzimáticas se muestran útiles para identificar CMs (tabla 5), pero los problemas metodológicos y la amplia variabilidad de especies sobre las que se han testado han impedido su estandarización (Gould y cols., 1985; Moll I. y cols., 2005).

La CM se demostró por vez primera mediante una técnica no-específica de *ácido de osmio* en la cual los bloques de tejido eran teñidos durante 24 horas (Merkel, 1875). Esta técnica también identificaba los nervios mielinizados presentes en la dermis. Posteriormente, Ranvier (1877) usó el *cloruro de oro* para demostrar células similares en la epidermis del hocico del cerdo. Las técnicas de *azul de metileno* utilizadas por Retzius (1894), Dogiel (1903) y Miller y colaboradores (1958) también mostraban las CMs y su innervación, pero no permitía la diferenciación con otras células dendríticas intraepiteliales como las CLs. Botezat (1908), Boeke (1925) y Winkelmann (1960) introdujeron *técnicas de plata* las cuales son capaces de discriminar entre los MLs, las CLs y las CMs innervadas. Posteriormente, Lyne y Hollis (1971) describieron reacción positiva a la técnica del *ácido peryódico de Schiff* (PAS) en las CMs

fetales de la oveja, pero no en las CMs de la piel de individuos recién nacidos ni de adultos. Winkelmann (1977, 1982) afirmó haber encontrado reacción positiva a la *acetilcolinesterasa* y a la *leucina-aminopeptidasa* en las CMs del conejo y a la *fosfatasa alcalina* en el gato y en el cobaya.

Realmente, todas estas técnicas no siempre demuestran la CM propiamente dicha, sino que muestran la expansión axonal intraepitelial en contacto con ella. La célula es observada sólo como un halo claro sobre el disco axonal teñido (Winkelmann y Breathnach, 1973).

**Tabla 5. Técnicas histoquímicas usadas para la identificación de las CMs recopiladas de la literatura.**

Osmio	Cloruro oro	Azul metileno	Plata	PAS	Grimelius	LAPasa	AchE	FA	Harmalina	Quinacrina	Uranafina	REFERENCIAS
•												Merkel, 1875
	•											Ranvier, 1877
		•										Retzius, 1894
		•										Dogiel, 1903
			•									Botezat, 1908
			•									Boeke, 1925
		•										Miller y cols., 1958
			•									Winkelmann, 1960
				•								Lyne y Hollis, 1971
					•							Tateishi y cols., 1974
						•	•	•				Winkelmann, 1977, 1982
										•		Tweedle, 1978
									•			Hartschuh y Grube, 1979
										•		Nurse y cols., 1983
											•	Beiras y cols., 1986, 1987a

Osmio	Cloruro oro	Azul metileno	Plata	PAS	Grimelius	LAPasa	AchE	FA	Harmalina	Quinacrina	Uranafina	REFERENCIAS
					•							Zaccone, 1986
						•						Tachibana y cols., 1989
											•	Toyoshima y Shimamura, 1991
										•		Vos y cols., 1991
										•		Yamashita y cols., 1993
										•		Hansson y cols., 2000
										•		Tazaki y cols., 2000a

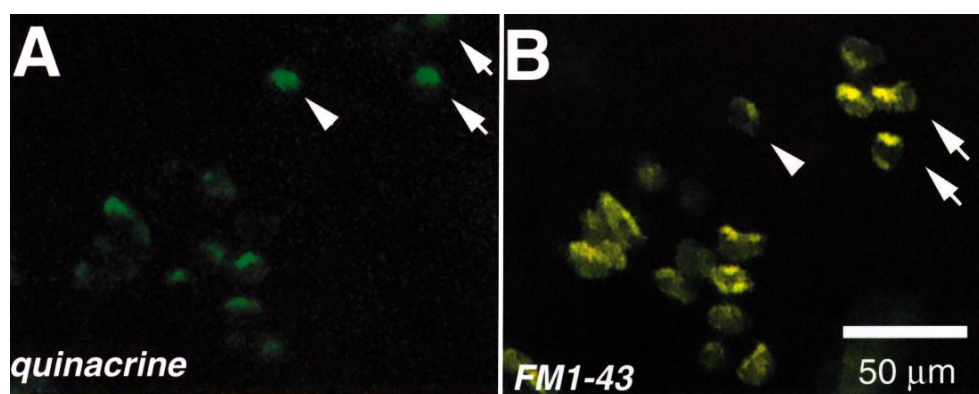
### **MÉTODO HISTOQUÍMICO DE GRIMELIUS**

La técnica argirofílica de Grimelius (Grimelius, 1968) es la técnica histoquímica que mejores resultados ha mostrado para la identificación de las CMs, tanto normales como neoplásicas (Tateishi y cols., 1974; Gould y cols., 1985; Zaccone, 1986). Demuestra gránulos argirófilos uniformes en tamaño en el citoplasma, de coloración marrón oscuro a negro.

### **COLORANTES FLUORESCENTES**

Los colorantes fluorescentes permiten discernir entre las CMs y otras células epidermales (Fukuda y cols., 2003). Así, mediante el empleo de **quinacrina** se ha estudiado exitosamente la distribución topográfica de las CMs en la piel normal adulta y en desarrollo de varios mamíferos y anfibios (Tweedle, 1978; Nurse y cols., 1983; Diamond y cols., 1988; Vos y cols., 1991; Yamashita y cols., 1993; Hansson, y cols., 2000). Este marcaje por fluorescencia se describe tanto en células *in vivo* como *in vitro*, pero en cualquier caso es necesario que las células estén vivas para que puedan “secuestrar” el colorante (Hansson y cols., 2000). Esta sustancia se une al *adenosín trifosfato* (ATP) en los gránulos de Merkel (Tweedle, 1978; Nurse y cols., 1983; Yamashita y cols., 1993).

Otros colorantes específicamente absorbidos por las CMs y con poder de fluorescencia son la *harmalina* (Hartschuh y Grube, 1979) y los basados en el estiril-piridinio como el *FM1-43* (Tachibana, 1995; Fukuda y cols., 2003). Éste último se revela como el colorante fluorescente más útil puesto que su marcaje es más intenso y más fácilmente identificable, se distingue mejor la morfología celular y persiste más tiempo en el interior de la célula (Fukuda y cols., 2003).



**Figura 16.** CMs en almohadilla de rata teñidas con colorantes fluorescentes (imagen tomada de Fukuda y cols., 2003).

### NUCLEÓTIDOS DE ADENINA

La *reacción histoquímica de uranafina* (UR) permite la localización de nucleótidos de adenina en las organelas celulares (Richards y Da Prada, 1977). No es propiamente una técnica de microscopía óptica, pues requiere de la visualización de las estructuras marcadas con el microscopio electrónico. Se ha demostrado que las CMs de mamíferos y aves pueden teñirse positivamente con la UR (Beiras y cols., 1986, 1987a; Toyoshima y Shimamura, 1991). Muestran una reacción positiva en los gránulos neurosecretores, ribosomas y cromatina nuclear. Curiosamente, la UR no tiñe la membrana que rodea a los gránulos neurosecretores sino solamente a los núcleos densos de éstos, lo que puede explicarse por su alta concentración en AMP, ADP o ATP (Beiras y cols., 1986, 1987a).

## B. PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO

Las técnicas histoquímicas utilizadas tradicionalmente para el estudio de las CMs se han sustituido en la actualidad por marcadores inmunológicos: las *técnicas de inmunohistoquímica*. Los estudios inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de una amplia variedad de moléculas de naturaleza muy diversa en las CMs, que pueden ser clasificados en tres grandes grupos: marcadores epiteliales, neuronales/nerviosos y endocrinos.

### MARCADORES EPITELIALES

Las *CITOQUERATINAS* (CKs) son una familia compleja de polipéptidos codificada por varios genes, solubles al agua y con pesos moleculares entre 40-68 kDa (Moll R. y cols., 1982, 1990, 1992). Se conocen hasta 20 CKs distintas que forman el citoesqueleto de las células epiteliales. La expresión de una u otra en un epitelio depende del tipo de célula, del grado de diferenciación y desarrollo embriológico, del medio ambiente en el que se lleva a cabo el crecimiento celular y, para el caso de células neoplásicas, del grado de diferenciación (Moll R. y cols., 1982, 1992; Moll R., 1991). Las CKs se dividen en dos subfamilias: 1) las *CKs ácidas o de Tipo I* (CK9, CK10, CK11, CK12, CK13, CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19, CK20), de menor peso molecular y pH inferior a 5.5; y 2) las *CKs neutras-básicas o de tipo II*, (CK1, CK2, CK3, CK4, CK5, CK6, CK7, CK8) con mayor peso molecular y pH igual o mayor a 6.0.

Por lo general, los llamados epitelios queratinizados y estratificados (EpE) presentan CKs de medio y alto peso molecular mientras que los epitelios simples y glandulares (EpS) poseen CKs de bajo peso molecular (Tabla 6) (Moll R. y cols., 1982, 1992; Moll R., 1991).

**Tabla 6. Localización de los diferentes polipéptidos de CKs en tejidos normales (modificado de Moll R. y cols., 1982).**

CITOQUERATINA	TEJIDOS EN LOS QUE SE EXPRESA
CK1 (EpE) CK2 (EpE)	Epidermis queratinizada de diversas áreas corporales Epitelio del canal anal y exocérvix
CK3 (EpE)	Córnea
CK4 (EpE)	Epitelios escamosos estratificados no queratinizados (p.e. lengua) Epitelio traqueal Glándulas sudoríparas y apocrinas de la piel Glándula mamaria

CITOQUERATINA	TEJIDOS EN LOS QUE SE EXPRESA
<b>CK5 (EpE)</b> <b>CK6 (EpE)</b>	Epitelios escamosos estratificados no queratinizados (p.e. lengua) Epitelio de la tráquea Glándulas sudoríparas y apocrinas de la piel Glándula mamaria Epidermis y folículos pilosos Mesotelio reactivo
<b>CK7 (EpS)</b>	Epitelio traqueal Urotelio y epitelio transicional de la vejiga urinaria Glándulas complejas (epitelio mamario) Zonas de epitelio en pulmón Epitelios ductales Epitelio biliar
<b>CK8 (EpS)</b>	Epitelio no estratificado del tracto digestivo Hígado, páncreas, vesícula biliar (y ductos) Epitelio traqueal, bronquial, neumocitos Epitelio tubular, urotelio y epitelio transicional de la vejiga urinaria Glándulas complejas (mama, salivares y sudoríparas) Epitelio embriológico temprano Mesotelio Epitelio folicular del tiroides CMs
<b>CK9 (EpE)</b> <b>CK10 (EpE)</b> <b>CK11 (EpE)</b>	Epidermis
<b>CK12 (EpE)</b>	Córnea
<b>CK13 (EpE)</b>	Epitelios escamosos estratificados no cornificados (lengua) Epitelio del canal anal Epitelio traqueal
<b>CK14 (EpE)</b> <b>CK15 (EpE)</b> <b>CK16 (EpE)</b> <b>CK17 (EpE)</b>	Epidermis y folículos pilosos Epitelios estratificados no cornificados Epitelio traqueal Epitelios glandulares
<b>CK18 (EpS)</b>	Epitelio no estratificado del tracto digestivo Hígado, páncreas, vesícula biliar (y ductos) Epitelio traqueal, árbol bronquial y alvéolos Túbulos renales, urotelio y epitelio transicional de la vejiga urinaria Glándulas complejas (mama, salivares y sudoríparas) Epitelio embriológico temprano Endometrio, endocérvix CMs
<b>CK19 (EpS)</b>	Componente mayor en epitelios simples Componente menor de epitelios estratificados (no epidermis) Epitelio traqueal Glándulas complejas (mama, salivares y sudoríparas) CMs
<b>CK20 (EpS)</b>	Urotelio Epitelio gástrico e intestinal CMs



Estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos han revelado que los filamentos intermedios de las CMs son CKs de epitelio simple, concretamente la **CK8** (52,5 kDa, tipo II neutra-básica), **CK18**, **CK19** y **CK20** (45, 40 y 46 kDa respectivamente, tipo I ácido) (Moll R. y cols., 1982, 1984, 1992; Moll I. y cols., 1995). La **CK7** (54 kDa), también de epitelio simple, se ha demostrado igualmente en las CMs pero con una gran variabilidad de expresión (Lundquist y cols., 1999; García-Caballero y cols., 2003b). Estas CKs difieren marcadamente con las presentes en los Qs, más propias de los epitelios estratificados. La **CK20**, en particular, en la piel sólo marca las CMs (Moll I. y cols., 1995), hecho que la hace *marcadamente específica y útil en el estudio de las CMs normales y neoplásicas* (Moll I. y cols., 1995).

La inmunorreacción resultante en las CMs es homogénea y localizada por todo el citoplasma celular (Moll R. y cols., 1984; Saurat y cols., 1984b; Moll R. y cols., 1992; Narisawa y cols., 1992a; Moll I. y cols., 1995, 2005), si bien, en ocasiones (sobre todo en neoplasias derivadas de CMs) se aprecia concentrada focalmente en la periferia nuclear, fenómeno conocido como reacción perinuclear o “*dot-like pattern*” (Johansson y cols., 1990; Scott y Helm, 1999; Moll I. y cols., 2005).

Las CMs de los mamíferos también expresan otras moléculas propias de los tejidos epiteliales, como las **PROTEÍNAS DESMOSOMALES** (Ortonne y Darmon, 1985; Rickelt y cols., 2011) y el **ANTÍGENO DE MEMBRANA EPITELIAL** (EMA) (Narisawa y cols., 1992a). A diferencia de las CKs que presentan un patrón de inmunorreacción citoplasmático, estas proteínas se expresan en la membrana plasmática de las CMs en todas las etapas del desarrollo (Narisawa y cols., 1992a). Se ha descrito también en las CMs de la piel humana varias moléculas de adhesión: la **MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR EPITELIAL** (EpCAM), glicoproteína transmembrana de 38 kDa presente en los epitelios simples, estratificados y de transición (García-Caballero y cols., 2003a, b; Kurzen y cols., 2003); la molécula de membrana **MUC-1**, presente en epitelios glandulares y en los carcinomas de células escamosas (Kurzen y cols., 2003); y la **E-CADERINA**, molécula asociada a uniones celulares no desmosomales (uniones adherens celulares) (Moll I. y cols., 2005).

## **MARCADORES NEUROENDOCRINOS**

Las CMs expresan los marcadores usados habitualmente para la caracterización de las células neuroendocrinas, tales como la enolasa neuronal específica, la proteína producto del gen 9.5, la sinaptofisina y la cromogranina A. Además, los gránulos electrodensos de las CMs muestran inmunoreactividad para una amplia variedad de neuropéptidos y aminas biógenas como la serotonina. Muchas de esas sustancias se han propuesto como candidatas a neurotransmisores o neuromoduladores en la unión entre la CM y la terminación nerviosa (Tachibana 1995; Tachibana y Nawa, 2002)

### ***Monoaminas***

La *SEROTONINA* (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una catecolamina producida en las células gastrointestinales, las plaquetas, el cerebro y la médula espinal. Actúa como neurotransmisor en las uniones sinápticas, hormona y mitógeno. Zaccane (1986) fue el primero en detectar inmunohistoquímicamente reacción positiva a serotonina en las CMs de la epidermis en vertebrados, concretamente del congrio. García-Caballero y colaboradores (1989c) fueron los primeros en demostrar serotonina en mamíferos, en las CMs del hocico del cerdo. La serotonina se localiza en los gránulos de núcleo denso. Reacciones similares fueron observadas posteriormente en los discos epidermales táctiles de la rata (English y cols., 1992). El papel de la serotonina en las CMs es participar en la transducción del estímulo recibido desde la célula a la terminación nerviosa, actuando como una neurohormona o como un mediador sináptico.

Tachibana y colaboradores (2005) demostraron que las terminaciones nerviosas en los complejos neurocelulares de Merkel expresan inmunorreacción positiva para *RECEPTORES DE SEROTONINA* (5-HT<sub>1A</sub> y 1B). Además, tanto los axones como las propias CMs son positivos para anticuerpos contra el *TRANSPORTADOR DE SEROTONINA*. Estos resultados sugieren que la serotonina es liberada por las CMs hacia el espacio sináptico generando así el impulso necesario en la terminación nerviosa.

## ***Cromograninas***

Las cromograninas son una familia de proteínas acídicas halladas por primera vez en los gránulos secretores de células de la médula adrenal y en vesículas adrenérgicas. Posteriormente se han demostrado en co-expresión con otras moléculas en una amplia gama de células endocrinas y neuroendocrinas en diferentes especies animales (Rindi y cols., 1986). Se han identificado hasta tres tipos distintos: *cromogranina A*, *cromogranina B* (también conocida como secretogranina I) y la *cromogranina C* (llamada también secretogranina II) (Rindi y cols., 1986; Fujita, 1989).

La *CROMOGRANINA A* (CgA) es una proteína de 50 kDa y uno de los elementos principales de la matriz proteica soluble de los gránulos secretores de las células neuroendocrinas. Puede servir como precursor de hormonas o neuropéptidos en los gránulos neurosecretores. Se ha reconocido además actividad antimicrobiana similar a la  $\beta$ -defensina. Hartschuh y Weihe (1988, 1989a, b) y Gauweiler y colaboradores (1988) fueron los primeros en mostrar CgA en las CMs, tanto en la edad adulta como fetal, y en co-expresión con otros neuropéptidos. La expresión inmunohistoquímica está restringida al citoplasma, puede ser granular o difusa y es frecuentemente intensa en la porción basal del citoplasma de las CMs, región donde se encuentran los gránulos neurosecretores (Hartschuh y cols. 1989a, b, 1990; Cheng-Chew y Leung, 1991, 1994; Horsch y cols., 1992). Se cree que la CgA en las CMs podría ejercer importantes funciones adicionales a la mecanorreceptiva, como factor trófico o de regulación sobre varios tejidos diana o como sustancia captadora de  $\text{Ca}^{2+}$  desempeñando un papel activo durante el periodo de estímulo-secreción (Hartschuh y cols., 1989b, 1990; Weihe y cols., 1991b). Además, podría participar en la generación de péptidos bioactivos (Weihe y cols., 1991b).

La *SECRETAGRANINA V* o *PROTEÍNA 7B2* es un polipéptido de 21 kDa presente también en los gránulos de núcleo denso de células neuronales y paraneuronales. Las CMs epidermales y de las vibrisas del cerdo expresan también esta proteína, la mayor intensidad de reacción es en el lado citoplasmático basal. La microscopía inmunoelectrónica (con partículas de oro) demuestra la asociación de esta proteína con los gránulos electrodensos (García-Caballero y cols., 1997).

### **Proteínas neuronales**

Las enolasas son enzimas homo- o heterodímeras de las tres subunidades  $\alpha$  (46kDa),  $\beta$  (44 kDa) y  $\gamma$  (44kDa). La *ENOLASA NEURONAL ESPECÍFICA* (NSE) (isoforma  $\gamma\gamma$ ) en un principio se creyó que únicamente se encontraba en neuronas (de ahí su nombre), pero posteriormente se identificó en otros tejidos y en especial en las células neuroendocrinas de los mamíferos, también llamadas células APUD. Su presencia en las CMs podría estar relacionada con funciones similares a las neuronales; presenta propiedades neurotróficas y neuroprotectoras (Hartschuh y Grube, 1979; Gu y cols., 1981; Fujita, 1989; Fujita y Yoshie, 2000). Gu y colaboradores (1981) fueron los primeros en detectar NSE en las CMs de los mamíferos, concretamente en el gato y la rata. Posteriormente, se demostraría también en las CMs de la piel humana adulta y fetal (Warner y cols., 1983; Gould y cols., 1985; Masuda y cols., 1986; Dalsgaard y cols., 1989; Fantini y Johansson, 1995). No sólo marca las CMs sino también las terminaciones nerviosas en contacto con ellas y los nervios mielinizados dermales (Gu y cols., 1981). Algunos trabajos señalan además su co-existencia con serotonina en las CMs de pequeños vertebrados (Hirata y Nada, 1975; Zaccone, 1986; Toyoshima y Shimamura, 1988). Ambos son componentes bioactivos que están localizados no sólo en neuronas sino en paraneuronas endocrinas, de lo que se deduce que las CMs pertenecen al sistema neuroendocrino difuso (Sistema APUD o paraneuronal).

La *SINAPTOFISINA* (Syn) o *proteína p38* (38 kDa) es una glicoproteína ácida homooligomérica integral de membrana, aislada originariamente a partir de vesículas presinápticas de neuronas de rata y bovino. Es una proteína captadora de  $\text{Ca}^{2+}$  (ligado al dominio citoplasmático de la molécula), por lo que juega un papel fisiológico importante en el proceso de exocitosis regulada en neuronas. Está presente en casi todas las neuronas del cerebro, médula espinal y retina, así como también en las uniones neuromusculares de varias especies de mamíferos, en la médula adrenal, en las células del páncreas, en las células C del tiroides y en una amplia variedad de células neuroendocrinas (Wiedenmann y Franke, 1985; Navone y cols., 1986; Gould y cols., 1986) y sus neoplasias (Gould y cols., 1986; Miettinen, 1987). Se ha demostrado en las CMs de mamíferos como el cerdo, el conejo y el hombre (Ortonne y cols., 1988; García-Caballero y cols., 1989b). En las CMs epidermales, la reacción se localiza principalmente en la cara superficial o epidermal de la célula, si bien en las vibrisas se sitúa en la cara dermal. Es

decir, la Syn se encuentra en el lado de la CM contrario a la unión con la terminación nerviosa. Su patrón de inmunorreacción es citoplasmático y con un aspecto punteado o granular fino (Navone y cols., 1986; Ortonne y cols., 1988; García-Caballero y cols., 1989b).

Los *NEUROFILAMENTOS* (NF) pertenecen a la familia de los filamentos intermedios y son elementos estructurales del citoesqueleto neuronal. Se componen de tres subunidades que suponen proteínas distintas pero relacionadas entre si: *NF-L* (70 kDa), *NF-M* (150-160 kDa) y *NF-H* (200 kDa). Durante el desarrollo neuronal embrionario se co-expresan las subunidades NF-L y NF-M, mientras que la activación de la subunidad NF-H se pospone hasta el periodo postnatal (Schlaepfer, 1987). La expresión de NF está bien documentada en las CMs neoplásicas (Miettinen y cols., 1983; Leff y cols., 1985; Sibley y Dahl, 1985; Moll R. y cols., 1986; Miettinen, 1987). Sin embargo, los estudios respecto a su presencia en las CMs normales son contradictorios. Algunos autores describen inmunorreacción citoplasmática ocasional en CMs humanas, aproximadamente en el 5,9% de la población total, sugiriendo además que su expresión podía ser un signo de cambios carcinomatosos en las células (Narisawa y cols., 1994c; Fantini y Johansson, 1995; Hartschuh y cols., 2000; Moll I. y cols., 2005). Contrariamente a estos resultados, existen multitud de experimentos negativos, tanto en la vida adulta como en etapas fetales (Moll R. y cols., 1984; Saurat y cols., 1984a; Gould y cols., 1985; Moll I. y cols., 1995, 1996b).

Las *MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DE CÉLULAS NEURALES* (NCAM, CD56) son una familia de glicoproteínas asociadas a la membrana celular que median en las uniones neurona-neurona y juegan un importante papel en el crecimiento de las neuritas, en la migración neuronal y en el desarrollo del sistema nervioso. Existen tres isoformas principales de 120 kDa, 140 kDa y 180 kDa (Gallego y cols., 1995). A pesar de que inicialmente fue identificada en el tejido nervioso, se encuentra en diferentes tipos celulares incluyendo células sensoriales, endocrinas y neuroendocrinas (Gallego y cols., 1995). Aunque previamente Moll I. y colaboradores (1993) observaron un débil marcaje en algunas CMs de los discos táctiles epidermales humanos, la presencia de NCAM no fue demostrada claramente hasta Gallego y colaboradores (1995) en muestras de piel digital humana y de piel del hocico del cerdo. Por el contrario, Moll I. y colaboradores (1996b) afirmaron no encontrar inmunorreacción para NCAM en la piel y en los

folículos pilosos de varias localizaciones en ratones. Se muestra como un marcador que presenta claras diferencias de expresión entre especies. Todas las CMs presentan un patrón de inmunomarcaje de membrana. Las fibras nerviosas también son positivas a NCAM.

Bajo la denominación *PROTEÍNA S100* se engloban una familia de 19 proteínas de bajo peso molecular (entre 9 y 13 kDa) expresadas en muchos tipos celulares (células gliales del sistema nervioso central y periférico, subpoblaciones neuronales, melanocitos, condrocitos, adipocitos, fibras musculares cardíacas, fibras del músculo esquelético, células epiteliales salivares y células renales). Son proteínas fijadoras de  $Ca^{2+}$ , relacionadas con su control en el retículo endoplásmico y la regulación de diversas actividades intracelulares, como la fosforilación de proteínas, la proliferación celular (incluidas las transformaciones neoplásicas) y la diferenciación (Gould y cols., 1985). Se encuentra en las CMs de diferentes especies de mamíferos, incluyendo el cerdo, el ratón y el hombre (Hartschuh y Weihe, 1988; Moll I. y cols., 1996b; García-Caballero y cols., 2003b), de manera aislada o en co-expresión con CK20 (Barret y cols., 2000). Su marcaje es citoplasmático y nuclear. Presenta amplia variabilidad de expresión en las CMs entre especies, además de entre diferentes localizaciones cutáneas dentro de una misma especie. Además, puede marcar otros tipos celulares en la epidermis, como los melanocitos.

La *PROTEÍNA PRODUCTO DEL GEN 9.5* (PGP9.5) es una proteína citosólica de 24,8 kDa expresada en las neuronas de los vertebrados, en todos los tipos de fibras nerviosas aferentes y eferentes y en las células neuroendocrinas, en las que constituye entre un 1 y un 5% de las proteínas solubles totales (Dalsgaard y cols., 1989). La PGP9.5 se ha identificado en las CMs de humanos y animales con un patrón de inmunorreacción citoplasmático y granular. Se han demostrado en las CMs epidermales (Dalsgaard y cols., 1989; Crivellato y cols., 1994; Fantini y Johansson, 1995), en las CMs foliculares (Rice y cols., 1993), en las CMs de la mucosa oral (Ramieri y cols., 1992; Hilliges y cols., 1996; Tachibana y cols., 2000; Tadokoro y cols., 2002) y en las CMs de la mucosa vaginal (Hilliges y cols., 1995), bien de una manera aislada o bien en co-expresión con NSE, NF y CGRP. Al igual que sucede con la S100, no es específica de las CMs en la epidermis ya que puede llegar a expresarse en CLs de manera muy ocasional (Dalsgard y cols., 1989; Crivellato y cols., 1994).

La *PROTEÍNA ASOCIADA AL CRECIMIENTO 43* (GAP-43) es una proteína de membrana del sistema nervioso central y periférico que sólo se expresa en altos niveles durante el desarrollo, si bien es producida nuevamente en el tejido nervioso adulto dañado y en regeneración (Verzé y cols., 2003). La presencia en las CMs se ha descrito sólo en humanos, con un patrón de tinción homogéneo y en co-expresión con la PGP9.5. También marca las fibras nerviosas subepidermales y las terminaciones nerviosas asociadas con CMs (Verzé y cols., 2003).

El *FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO* (NGF) es un péptido importante para el desarrollo, diferenciación y supervivencia de las neuronas y de los demás elementos del sistema nervioso central y periférico. Su acción es mediada por la unión a dos receptores de superficie celular, el receptor p140<sup>prototrkr</sup> y el receptor p75<sup>NGFR</sup> (Narisawa y cols., 1992b). Los estudios acerca de la expresión de este factor de crecimiento en la población de CMs son contradictorios dependiendo de las condiciones de estudio. Así, sólo se ha demostrado en las CMs *in vitro* (Vos y cols., 1991), mientras que varios autores sugieren que las CMs no expresan NGF *in vivo* (English y cols., 1994; Moll I., 1994; Moll I. y cols., 1995). Por otro lado, el *RECEPTOR p75<sup>NGFR</sup>* sí está presente en las CMs de la rata adulta así como en las terminaciones nerviosas de tipo I que las inervan (Ribeiro-da-Silva y cols., 1991; English y col., 1994). Aún así, la expresión del NGFr en las CMs de los mamíferos es más reconocida en los estadios fetales (Narisawa y cols., 1992b).

### **Neuropéptidos**

Varios autores han demostrado que tanto las CMs como los nervios sensoriales cutáneos son fuentes de *PÉPTIDOS OPIOIDES ENDÓGENOS*. Las encefalinas son una de las tres familias mayores de péptidos opioides endógenos. La *metencefalina* es un pentapéptido con una metionina terminal implicado en el alivio del dolor y con función inmunomoduladora. Está distribuida ampliamente por el sistema nervioso central y periférico, en las células de la médula adrenal y en las células neuroendocrinas. Hartschuh y colaboradores (1979) fueron los primeros en describir la presencia de metencefalina en las CMs de las vibrissas de ratas. La expresión más intensa se localizaba en el citoplasma basal y yuxtaaxonal de la célula, especulándose si la metencefalina podría estar localizada en los gránulos electrodensos, como ocurre con otros

muchos neuropéptidos. Cheng-Chew y Leung (1991, 1992, 1994), por medio de técnicas de microscopía inmunoelectrónica, pudieron confirmar más tarde este hecho mediante la observación de que las partículas de oro estaban asociadas a los gránulos de núcleo denso. Lo más llamativo de la metencefalina en las CMs es la marcada variabilidad de su expresión entre las especies animales, incluyendo diferentes mamíferos y peces (Hartschuh y cols., 1979; Weber y cols., 1980; Weihe y cols., 1983; Zaccone y cols., 1989; Vega y cols., 1990; Cheng-Chew y Leung, 1992, 1994). Así pues, la presencia de metencefalina en las CMs no parece ser un fenómeno general.

Weihe y colaboradores (1998) demostraron una fuerte inmunorreacción al péptido opioide *dinorfina A* en las CMs epidermales y foliculares de ratas. Esto identifica a las CMs como una fuente celular periférica de esta sustancia que, como otros opioides endógenos presentes en la piel, tiene importantes funciones mediadoras en la inflamación y en la analgesia.

El *POLIPÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO* (VIP) es un péptido de 28 aminoácidos que pertenece a la misma familia que el glucagón. Originalmente aislado del duodeno porcino, presenta una amplia variedad de acciones biológicas entre las que destaca su propiedad vasodilatadora y su actividad en el sistema nervioso periférico. Actúa también como neurotransmisor y modula la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. En la piel, el VIP tiene un potente efecto en la liberación de histamina por parte de los mastocitos tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que puede estar implicado en los procesos inflamatorios cutáneos (Hartschuh y cols., 1984). Es un hecho probado su presencia en las CMs de diferentes localizaciones cutáneas en muchas especies animales, incluido el hombre, cerdo, perro, gato, roedores y determinados peces (Hartschuh y cols., 1983, 1984; Álvarez y cols., 1988; Gauweiler y cols., 1988; Zaccone y cols., 1989; Lazarov, 1994; Fantini y Johansson, 1995; Cheng-Chew y Leung, 1996). Su expresión es mayor en aquellas áreas citoplasmáticas de la célula que contactan con las terminaciones nerviosas intraepiteliales, que a su vez no se marcan. La identificación inmunohistoquímica de VIP en coexistencia con otros neuropéptidos, y en especial con el péptido genéticamente relacionado con la calcitonina (CGRP), es un hallazgo relativamente constante en las CMs (Álvarez y cols., 1988; Cheng-Chew y Leung, 1996). Además de la expresión inmunohistoquímica, Leung y Wong (2000) han demostrado molecularmente la existencia de genes que codifican para VIP en las CMs de vibrisas de ratas.



El *PÉPTIDO GENÉTICAMENTE RELACIONADO CON LA CALCITONINA* (CGRP) es un péptido de 37 aminoácidos codificado por el gen de la calcitonina pero que no está químicamente relacionado con ésta. Se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y periférico y en el sistema endocrino y neuroendocrino difuso. Es un potente vasodilatador y puede modular la presentación de antígenos por parte de las CLs. Además, actúa como neurotransmisor (García-Caballero y cols., 1989a; Cheng-Chew y Leung, 1996). La distribución del CGRP en las CMs se ha estudiado también en varias especies, presentando siempre un patrón de inmunotinción citoplasmático. La inmunorreacción obtenida es intensa y virtualmente todas las células aparecen marcadas para este antígeno. Las CMs epidermales muestran la mayor reacción inmunohistoquímica en el citoplasma más próximo a la membrana basal, mientras que las CMs de las vibrisas en el citoplasma más cercano a la luz del folículo. Esto se explica mediante microscopía inmunoelectrónica y técnicas de inmunomarcaje con oro, donde las partículas inmuno-oro-CGRP están asociadas a los gránulos electrodensos (Gauweiler y cols., 1988; Álvarez y cols., 1989; García-Caballero y cols., 1989a; Cheng-Chew y Leung, 1993, 1996; Fantini y Johansson, 1995; Tachibana y cols., 2000).

Las *TAQUININAS* son moléculas que en la piel actúan como mediadores de los fenómenos inflamatorios neurogénicos. La *sustancia P* es un péptido de 11 aminoácidos con propiedades hipotensoras y de neurotransmisión presente en el intestino, encéfalo, ganglios de las raíces dorsales, fibras nerviosas cutáneas y médula espinal. Se expresa en las CMs de gatos, cerdos, ratones y hombre adulto (Gauweiler y cols., 1988; Hartschuh y Weihe, 1988; Weihe y cols., 1991a; Lazarov, 1994; Fantini y Johansson, 1995). Una particularidad respecto a la sustancia P en las CMs es su expresión dependiendo de la estructura cutánea a la que se asocian las células. Mientras la gran mayoría de las CMs de las vibrisas presentan una fuerte positividad asociada a los gránulos secretores, las CMs epidermales no muestran ninguna o sólo una extremadamente escasa y débil inmunorreacción (Weihe y cols., 1991a). Por otro lado, se ha demostrado la presencia de la maquinaria genética necesaria para su síntesis en las CMs murinas (Leung y Wong, 2000). Su papel funcional es desconocido, aunque podría actuar como neurotransmisor o neuromodulador en la sinapsis química que se establece entre la CM y la terminación nerviosa como ocurre con otros neuropéptidos. La *neuroquinina A* es otro péptido de la familia de las quininas cuya expresión inmunohistoquímica se ha descrito en las CMs del

hombre de manera puntual por Fantini y Johansson (1995). Al igual que la sustancia P, se encuentra en los gránulos neurosecretores de la célula.

El *PÉPTIDO HISTIDINA-ISOLEUCINA* (PHI) es un péptido de 27 aminoácidos con una composición química que varía entre especies. Se encuentra en el sistema nervioso central y periférico (fibras nerviosas cutáneas) y presenta un amplio rango de acciones biológicas, similares a las del VIP. Se ha encontrado en las CMs del hombre, gato, ratón y cerdo (Gauweiler y cols., 1988; Fantini y Johansson, 1995).

El *NEUROPÉPTIDO Y* (NPY) es un neurotransmisor y neuromodulador peptídico de 36 aminoácidos muy abundante en el encéfalo y en el sistema autónomo. En la piel es secretado por las fibras nerviosas y sólo existe una descripción de su expresión en las CMs de la piel humana adulta (Fantini y Johansson, 1995).

La *BOMBESINA* es una neurohormona peptídica que estimula la división celular y la liberación de hormonas. Puede también inducir hipertermia y está implicada en respuestas inmunes. Por su localización en varias áreas del sistema nervioso, se cree que puede participar de neurotransmisor. Se ha descrito principalmente en las neoplasias derivadas de las CMs, existiendo sólo escasas referencias de su expresión en CMs normales, en fetos humanos (Gould y cols., 1985) y en el gato (Lazarov, 1994).

Beiras-Fernández y colaboradores (2004) describieron en las CMs del cerdo adulto receptores para las *OREXINAS A* y *B* (33 y 28 aa, respectivamente) y de su precursor, la *PREPRO-OREXINA*. Las orexinas son neuropéptidos distribuidos en el sistema nervioso y en los tejidos periféricos, incluyendo las glándulas endocrinas, como la adrenal y la pituitaria. Juegan un papel importante en la regulación del comportamiento alimentario y en el equilibrio hormonal. La distribución de los productos inmunorreactivos en las CMs es citoplasmática, más intensa en la porción citoplasmática basal que contiene los gránulos electrodensos. El hallazgo conjunto de orexinas y sus receptores en las CMs sugiere una función autocrina (Beiras-Fernández y cols., 2004).

## **OTROS MARCADORES EXPRESADOS EN LAS CMs**

Las CMs del hombre y del cerdo en todas las etapas del desarrollo expresan inmunorreacción positiva para *PANCREASTATINA*, péptido bioactivo derivado de la CgA e implicada en la regulación y liberación de la insulina en el páncreas. Su inmunorreacción es homogénea por todo el citoplasma y se observa en co-expresión con la CgA (Hartschuh y Weihe, 1989; Horsch y cols., 1992).

La *SOMATOSTATINA* es una de las siete hormonas polipeptídicas conocidas producidas en el páncreas. Está ampliamente distribuida por todo el cuerpo y funciona como reguladora del sistema neuroendocrino y nervioso, inhibiendo la actividad secretora y actuando como neurotransmisor y neuromodulador. Las CMs normales de la especie humana expresan inmunorreacción positiva para anticuerpos anti-somatostatina (Wollina y Mahrle, 1992; Fantini y Johansson, 1995).

La *VILLINA* es una proteína calcio-regulada, aislada y caracterizada a partir de las microvellosidades intestinales. Acopla los filamentos de actina entre sí en el esqueleto axial de las microvellosidades, favoreciendo su crecimiento y la polaridad epitelial. Resulta ser un excelente marcador de las CMs y, más concretamente, de sus proyecciones citoplasmáticas y bordes celulares (Toyoshima y cols., 1998, 2000).

La *PERIFERINA* (57 kDa) es una proteína filamento intermedio presente en poblaciones celulares progenitoras neuronales y con diferentes funciones sensoriales. Se ha identificado en las CMs del hocico del cerdo (Baudoin y cols., 1993).

También se ha encontrado en los gránulos de las CMs de ratón, rata y mono inmunorreacción positiva a la *LEUCINA-AMINOPEPTIDASA* (Tachibana y cols., 1989).

El *BCL-2* es un gen que codifica para las proteínas *bcl-2 $\alpha$*  y *bcl-2 $\beta$*  que bloquean o interrumpen la muerte celular programada o apoptosis. Moll I. y colaboradores (1996c) observaron una débil y heterogénea inmunorreacción para *bcl-2* en las CMs de la piel pilosa y

glabra humana. Por otro lado, la expresión de proteínas que promueven la apoptosis como la *p27* también se ha observado en las CMs de roedores (Tachibana y cols., 2000).

Las *PROTEÍNAS G* son miembros de una superfamilia de GTPasas que regulan varias vías de transducción de señal. Las CMs de la piel y mucosa oral y sus terminaciones nerviosas poseen diferentes *isoformas* de la *subunidad Ga* (Tachibana y cols., 2001).

El *GLUTAMATO*, *ATP* y el *INOSITOL-(1,4,5)-TRIFOSFATO* (IP3) actúan como importantes neurotransmisores en las terminaciones de Merkel. En las CMs existen receptores específicos (mGluR5) y transportadores vesiculares (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3) responsables de cargar el glutamato en el interior de los gránulos de núcleo denso, además de receptores para el ATP y el IP3 (P2Y2, IP3R-I e IP3R-II, respectivamente) (Fagan y Cahusac, 2001; Tachibana y cols., 2003; Hitchcock y cols., 2004; Nunzi y cols., 2004)

Las CMs también expresan varios *FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PRONEURONALES Y PRONEUROENDOCRINOS*. Así, las CMs humanas y murinas expresan *Brn-3c* y *HATH1* (*MATH1* en ratones), factores de transcripción críticos en el desarrollo adecuado de mecanorreceptores y en la diferenciación de células postmitóticas (Leonard y cols., 2002).

Se ha descrito la expresión citoplasmática de la *NEUROTROFINA-3* (NT-3) y sus receptores, proteína que forma parte de la familia de los factores neurotróficos que controlan la supervivencia y la diferenciación de las neuronas de los mamíferos, el desarrollo de neuritas y la diferenciación de mecanorreceptores (Szeder y cols., 2003 b; Sieber-Blum y cols., 2004).

Por último, las CMs humanas expresan *INTEGRINAS*, y más específicamente la *integrina  $\beta 1$* , un receptor para las proteínas de matriz extracelular y que podría funcionar como soporte de las CMs con la membrana basal. Además, esta integrina podría participar en la elaboración de la morfología de la CM, de un modo similar a como se ha demostrado para neuronas. También, las integrinas se han implicado en la regulación de la exostosis, actuando a varios niveles. Es pausable, por lo tanto, que la integrina  $\beta 1$  pueda participar en la regulación de la secreción de péptidos por las CMs (Tilling y cols., 2014).

**Tabla 7. Resumen de las principales proteínas expresadas por las CMs en las diferentes especies animales.**

ESPECIE	Ck7 Ck8 Ck18 Ck19 Ck20 EMA Prot. Desm. EpCAM E-Catherina VMAT-1 Serotonina CgA NSE Syn NF NCAM S100 PGP9.5 GAP43 NGF NGF-R Metencefalina Dinorfina A VIP CGRP Sustancia P Neuroquinina A PHI NPY Bombesina Orexinas Pancreastatina Somatostatina Proteína 7B2 Vilina LAPasa Proteínas G $\alpha$ Glutamato Brn-3 HATH-1 Otros	REFERENCIA
Lamprea	•	Fujita y Yoshie, 2000
Caimán	•	Yoshie y cols., 1999
Anfibios	•	Hirata y Nada, 1975
	• •	Toyoshima y Shimamura, 1988
	•	Yoshie y cols., 2003
	•	Hamasaki y cols., 1998
Congrio	• •	Zaccone, 1986
Pez gato	• •	Zaccone y cols., 1989
Ratón	• • • •	Gauweiler y cols., 1988
	•	Tachibana y cols., 1989
	•	Cheng-Chew y Leung, 1992
	•	Crivellato, 1994
	•	Moll I. y cols., 1995
	•	Narisawa y cols., 2000
	•	Szeder y cols., 2003 ( $\beta$ -galactosidasa)
	•	Szeder y cols., 2003b (NT-3 y sus receptores)

ESPECIE	Ck7 Ck8 Ck18 Ck19 Ck20 EMA Prot. Desm. EpCAM E-Cadherina VMAT-1 Serotonina CgA NSE Syn NF NCAM S100 PGP9.5 GAP43 NGF NGF-R Metencefalina Dinorfina A VIP CGRP Sustancia P Neuroquinina A PHI NPY Bombesina Orexinas Pancreastatina Somatostatina Proteína 7B2 Villina LAPasa Proteínas Gα Glutamato Brn-3 HATH-1 Otros	REFERENCIA
	•	Sieber-Blum y Grim, 2004 (β-galactosidasa)
		• Sieber-Blum y cols., 2004 (NT-3 y sus receptores)
		• Nunzi y cols., 2004
<b>Rata</b>		• Hartschuh y cols., 1979
		• Weber y cols., 1980
		• Gu y cols., 1981
		• Weihe y cols., 1998
		• Tachibana y cols., 1989
		• Ribeiro-da-Silva y cols., 1991
		• Vos y cols., 1991
		• English y cols., 1992
		• English y cols., 1994
		• Tachibana y cols., 1997
		• Tachibana y Nawa, 2000
		• Tachibana y cols., 2000
		• Narisawa y cols., 2000
		• Tachibana y cols., 2001

ESPECIE	Ck7 Ck8 Ck18 Ck19 Ck20 EMA Prot. Desm. EpCAM E-Cadherina VMAT-1 Serotonina CgA NSE Syn NF NCAM S100 PGP9.5 GAP43 NGF NGF-R Metencefalina Dinorfina A VIP CGRP Sustancia P Neuroquinina A PHI NPY Bombesina Orexinas Pancreastatina Somatostatina Proteína 7B2 Villina LAPasa Proteínas Gα Glutamato Brn-3 HATH-1 Otros	REFERENCIA
	•	Tachibana y cols., 2003 (IP3R, P2Y2, mGluR5)
	•	Hitchcock y cols., 2004 (VGLU1 y VGLU2)
	•	Tachibana y cols., 2005 (receptor y transportador 5HT)
Cobaya	•	Weber y cols., 1980
	•	Weihe y cols., 1983
	•	Hartschuh y Weihe, 1988
	•	Narisawa y cols., 2000
Gerbo	•	Tachibana y cols., 1997
Conejo	•	Weber y cols., 1980
	• • •	Saurat y cols., 1984a
	• • •	Saurat y cols., 1984b
	• • •	Ortonne y Darmon, 1985
	•	Ortonne y cols., 1988
	•	Merot y Mooy, 1989
	•	Toyoshima y cols., 1998
Perro	•	Hartschuh y cols., 1983

ESPECIE	Ck7 Ck8 Ck18 Ck19 Ck20 EMA Prot. Desm. EpCAM E-Cadherina VMAT-1 Serotonina CgA NSE Syn NF NCAM S100 PGP9.5 GAP43 NGF NGF-R Metencefalina Dinorfina A VIP CGRP Sustancia P Neuroquinina A PHI NPY Bombesina Orexinas Pancreastatina Somatostatina Proteína 7B2 Villina LAPasa Proteínas Gα Glutamato Brn-3 HATH-1 Otros	REFERENCIA
	•	Hartschuh y cols., 1984
	•	Cheng-Chew y Leung, 1992
	•	Cheng-Chew y Leung, 1993
	• •	Cheng-Chew y Leung, 1996
Gato	•	Weber y cols., 1980
Gato	•	Gu y cols., 1981
Gato	•	Hartschuh y cols., 1983
Gato	•	Warner y cols., 1983
Gato	•	Hartschuh y cols., 1984
Gato	• • • •	Gauweiler y cols., 1988
Gato	• •	Álvarez y cols., 1988
Gato	•	Vega y cols., 1990
Gato	• • •	Lazarov, 1994
Gato	•	Cheng-Chew y Leung, 1996
Gato	• •	Tadokoro y cols., 2002
Cerdo	•	Hartschuh y cols., 1983
Cerdo	•	Hartschuh y cols., 1984
Cerdo	• • •	Ortonne y Darmon, 1985
Cerdo	• • • •	Gauweiler y cols., 1988



ESPECIE	Ck7 Ck8 Ck18 Ck19 Ck20 EMA Prot. Desm. EpCAM E-Cadherina VMAT-1 Serotonina CgA NSE Syn NF NCAM S100 PGP9.5 GAP43 NGF NGF-R Metencefalina Dinorfina A VIP CGRP Sustancia P Neuroquinina A PHI NPY Bombesina Orexinas Pancreastatina Somatostatina Proteína 7B2 Villina LAPasa Proteínas Gα Glutamato Brn-3 HATH-1 Otros	REFERENCIA
	•	Ortonne y cols., 1988
	•	Hartschuh y Weihe, 1988
		Hartschuh y Weihe, 1989
	•	Hartschuh y cols., 1989a
	• •	Hartschuh y cols., 1989b
	• • • • •	García.Caballero y cols.,1989a
	•	García.Caballero y cols.1989b
	•	García.Caballero y cols.,1989c
	•	Hartschuh y cols., 1990
		Weihe y cols., 1991a
		Baudoin y cols. 1993 (periferina)
	•	Gallego y cols., 1995
	•	Moll I. y cols., 1995
		García-Caballero y cols, 1997
	•	García-Caballero y cols,2003b
		Beiras-Fernandez y cols, 2004
Mono rhesus	•	Warner y cols., 1983
		Tachibana y cols., 1989
		Tachibana y cols., 2001

ESPECIE	Ck7 Ck8 Ck18 Ck19 Ck20 EMA Prot. Desm. EpCAM E-Cadherina VMAT-1 Serotonina CgA NSE Syn NF NCAM S100 PGP9.5 GAP43 NGF NGF-R Metencefalina Dinorfina A VIP CGRP Sustancia P Neuroquinina A PHI NPY Bombesina Orexinas Pancreastatina Somatostatina Proteína 7B2 Villina LAPasa Proteínas Gα Glutamato Brn-3 HATH-1 Otros	REFERENCIA		
<b>Hombre</b>	• • •	Moll R. y cols., 1982		
		•	Hartschuh y cols., 1983	
		•	Warner y cols., 1983	
			Hartschuh y cols., 1984	
	• • •		Moll R. y cols., 1984	
	• • •		Gould y cols., 1985	
	• • •		Ortonne y Darmon, 1985	
		•	Masuda y cols., 1986	
		•	Ortonne y cols., 1988	
			•	Hartschuh y Weihe, 1989
			•	Dalsgaard y cols., 1989
			•	García.Caballero y cols., 1989a
		•	Hartschuh y cols., 1989a	
	• • •		Moll I. y cols., 1990b	
		•	Weihe y cols., 1991b	
	• • • •		Moll R. y cols., 1992	
			•	Ramieri y cols., 1992
		•	Boot y cols., 1992	
		•	•	Horsch y cols., 1992
	• • • • •		Narisawa y cols., 1992a	





**Tabla 8. Otras proteínas expresadas en las CMs (extraído de Boulais y Misery, 2007).**

Proteins	Main function and putative function in Merkel cells
AMPA	Ionotropic glutamate receptor involved in neurotransmission; postsynaptic ligand-activated cation channel
AP-2 beta	Neuronal DNA-binding protein needed for many important biologic functions
BK beta-1	Regulatory subunit of potassium channels opened by depolarization or increase of calcium concentration; involved in baroreflex sensitivity
Cadps	Neuroendocrine-specific calcium-dependent activator for secretion of the dense-core granules
Carboxy-peptidase E	Cleavage of the C-terminal residue of a prohormone; localized in secretory granules
Carcinoembryonic antigen Cck	Type 1 membrane protein of the immunoglobulin superfamily Hormone activity affecting neuron migration; component of axons; expressed in sensory cells of the developing olfactory epithelium
Cholecystokinin 8	Peptide hormone; may induce release of peptides
Complexin 1	Functions in synaptic vesicle exocytosis
Dach1	Transcription factor found in premigratory, migratory, and some postmigratory neural crest cells
Beta-defensin-3	Antimicrobial activity against Gram+/- bacteria, fungi, and viruses; expressed in Langerhans cells; chemoattracts monocytes
Espin	Concentrated in the microvilli of a number of types of sensory cells
Galanin	Regulates growth hormone release, involved in adult sensory neuron outgrowth; may function as a neurotransmitter
Gfi 1	Transcription factor playing a role in auditory receptor cell differentiation, acts in mechanosensory behavior
HCN 2	Hyperpolarization-activated cation channel expressed in excitable cells
Histidine decarboxylase	Histidine decarboxylase synthesizes histamine from histidine in mammals
Hes6	Transcription cofactor activity, promotes neuronal differentiation
Insm1	Associated with neuroendocrine cell differentiation
Islet-1	Up-regulated in the differentiating sensitive epithelia of the inner ear region and sensory neurons
Kv8.1/1.4/4.2	Neuronal voltage-gated potassium channel; found in excitable membranes
Lhx3	Neuronal transcription factor expressed in cells derived from neuroepithelium; activates the alpha-glycoprotein gene
Mash1	Role in the development of specific neural lineages; expressed in the neuroepithelium at embryonic day 8.5
Math-1	Proneural transcription factor involved in the developing nervous system and sensory epithelium in the cochlea
Neurexin1	Presynaptic cell surface protein linking postsynaptic cell surface proteins in synapse junctions; coupled with calcium channels in the presynaptic machinery
Neuroendocrine convertase-2 (PC2)	Endopeptidase activity to release many hormones and neuropeptides from their precursors

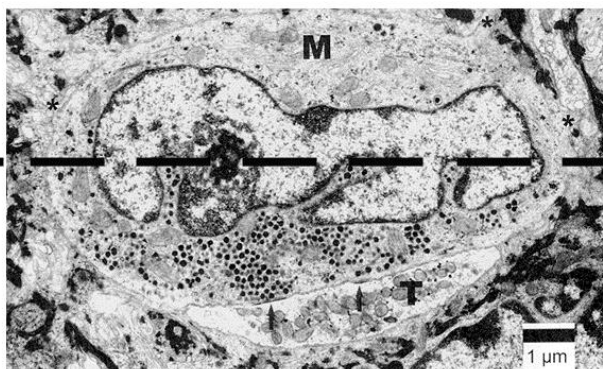
<b>Proteins</b>	<b>Main function and putative function in Merkel cells</b>
Nhlh1	May be involved in cell-type determination within the developing nervous system
NMDA	Glutamate-gated ion channel mediated by glycine; may play a role in the development of dendritic spines
Phospholipase C-beta1	Mobilizes intracellular calcium via activation of IP3 and produces the second messenger diacylglycerol
Piccolo	Involved in presynaptic vesicle trafficking and exocytosis; associates with the cytoskeletal matrix of the presynaptic active zone
PNMT	Methyl-transferase for adrenaline biosynthesis normally expressed with high tissue specificity
Rab3c	GTPase protein involved in vesicular traffic and regulated exocytosis; may control the calcium-triggered exocytosis in neuroendocrine cells
Rim2	Role unclear in calcium sensing; interacts with Rab3; regulation of exocytosis of neurotransmitters
Snap25	Neural-specific protein implicated in the synaptic vesicle docking and fusion process
Sox2	Inhibits neural differentiation in self-renewing cells but is principally expressed in the brain and retina in adults
Synapsin II	Neural protein that coats synaptic vesicles and may regulate neurotransmitter release
Synaptogyrin	Among the most abundant transmembrane protein of synaptic vesicles; normally only detectable in the brain
Synaptotagmin 1 and 7	Regulation of synaptic vesicle trafficking; may interact with calcium at the active zone of the synapse for exocytosis of vesicles present in brain and endocrine cells
Syntaxin	Potentially involved in docking and trafficking of synaptic vesicles at the presynaptic active zone
Trk C	Expressed after birth; mediates NT-3 signalling
TRPV4	Role in pressure sensation; osmoreceptor; nonselective cation channel probably involved in osmotic sensitivity and mechanosensitivity
VGlut	Vesicular glutamate transporter integral to membrane binding of vesicles
Wnt-1	Restricted to the neural cell lineage during embryogenesis; important in CNS development; induces sensory neuronal fate in a beta-catenin-dependent manner

### 3.2.2. ULTRAESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS DE MERKEL

Los rasgos ultraestructurales fundamentales de las CMs son más o menos comunes en todos los vertebrados, con cierta variabilidad dependiendo de la especie respecto a formas, tamaños o frecuencias de aparición de los diferentes orgánulos y estructuras celulares. De forma resumida, las CMs se caracterizan ultraestructuralmente por los siguientes hallazgos: 1) *gránulos citoplasmáticos electrodensos* frecuentes en el citoplasma más basal; 2) *complejo de Golgi y vesículas claras* en el citoplasma opuesto a estos gránulos; 3) *espinas o proyecciones citoplasmáticas digitiformes* que se extienden desde la superficie celular; 4) *filamentos intermedios* formando agregados laxos; 5) *desmosomas* de pequeño tamaño; 6) un *núcleo lobulado* de aspecto claro con marcadas invaginaciones y 7) *contacto con un axón terminal* (no es constante).

Al microscopio electrónico, las CMs se localizan generalmente individualizadas o en nidos celulares en el estrato basal de la epidermis. Son del mismo tamaño o ligeramente más grandes que los Qs de alrededor. Presenta una morfología oval o alargada, con el eje mayor paralelo a la superficie cutánea, aunque también se han descrito formas más redondeadas. Ocasionalmente protruye hacia la dermis, pero bien la terminación nerviosa asociada o bien prolongaciones del citoplasma de Qs adyacentes la separan de la membrana basal epitelial (Winkelmann y Breathnach, 1973; Halata y cols., 2003).

El núcleo ovoide de las CMs divide el citoplasma en dos zonas: el *citoplasma supranuclear, parabasal, epidermal* o *zona anti-neurita*, que contiene el CG y numerosas vesículas claras, y el *citoplasma subnuclear, basal, dermal* o *zona de contacto sináptico* con el axón terminal, caracterizado por un alto contenido en gránulos neurosecretores (Figura 17).



**Figura 17.** El núcleo divide virtualmente la CM (M) en porción citoplasmática supranuclear y porción citoplasmática subnuclear en contacto con la terminación nerviosa (T) y donde se concentran los gránulos electrodensos (imagen tomada de Halata y cols., 2003).

## MEMBRANA CELULAR

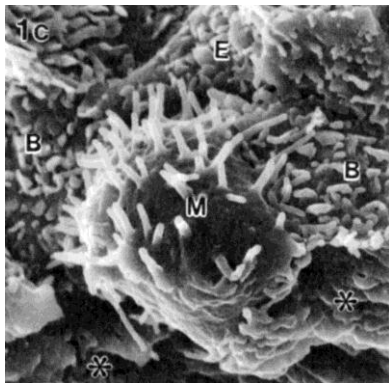
La superficie de las CMs está caracterizada por numerosas *PROLONGACIONES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA* que presentan una amplia variabilidad morfológica y de tamaño en función de la especie o incluso dentro del mismo tejido. Se han descrito hasta tres tipos de procesos citoplasmáticos:

1) **Procesos espinosos**, que se originan en la membrana plasmática del lado parabasal. Consisten en una base ancha con un núcleo de citoplasma en su interior, un mástil con un eje filamentoso compuesto de *villina* y un vértice redondeado. Estas espinas se interdigitan con los Qs de alrededor uniéndose a ellos mediante desmosomas presentes en la base (Winkelmann y Breathnach, 1973; Beiras y cols., 1987c; Tachibana, 1995). Son numerosas, pudiendo llegar a 50 o más por célula (figura 18), y están implicadas en la función mecanorreceptiva de los complejos neurocelulares de Merkel (Diamond y cols., 1988; Ogawa, 1996, 2000; Fagan y Cahusac, 2001).

2) **Procesos intersticiales**, que se originan en las superficies laterales de las CMs. No presentan eje filamentoso ni desmosomas, pero sí gránulos neurosecretorios (Gould y cols., 1985; Beiras y cols., 1987c; Tachibana, 1995). Mientras algunas CMs sólo muestran procesos cortos, otras muestran procesos más gruesos y prominentes, dendríticos, los cuales penetran y se introducen entre los Qs basales y suprabasales vecinos, especialmente en la piel fetal humana (Moll R. y cols., 1984), en anfibios (Whitear, 1989), en la mucosa oral adulta de roedores y humanos (Tachibana y Nawa, 2000, 2002) y en los folículos pilosos (Narisawa y cols., 1994a; Taira y cols., 2002). Con microscopía electrónica de barrido se aprecia que realmente son procesos membranosos con una morfología aplanada (Takahashi-Iwanaga, 2003). Su función está relacionada con supuestas capacidades paracrinas de las CMs sin inervación sensitiva (Gould y cols., 1985; Tachibana, 1995).

3) **Microvellosidades o procesos cortos** dirigidos hacia los Qs o los espacios intercelulares, de pequeña longitud (Beiras y cols., 1987c; Takahashi-Iwanaga, 2003).



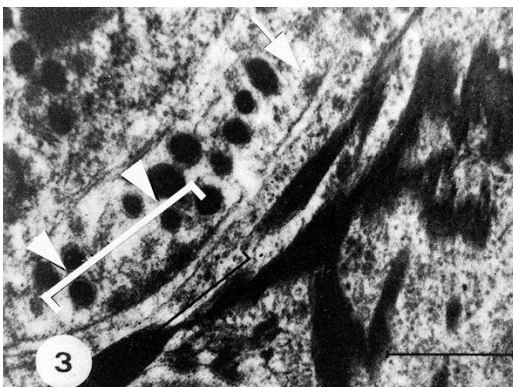


**Figura 18.** Imagen de microscopía electrónica de barrido demostrando la presencia de procesos espinosos en una CM en el paladar murino. M = Células de Merkel; B = células basales; E = células epitelial superficial; asterisco = membrana basal (imagen tomada de Takahashi-Iwanaga, 2003)

### *Relaciones de las CMs con otras células epidermales*

Las CMs están unidas a los Qs que las rodean por *DESMOSOMAS* localizados en el cuerpo celular y ocasionalmente en los procesos espinosos. Son pequeños y relativamente escasos en comparación con los hallados entre los Qs. En el lado citoplasmático de estos desmosomas es muy frecuente observar pequeños y delgados agregados de filamentos intermedios asociados del mismo modo que en los Qs, pero en mucha menor proporción (Winkelmann y Breathnach, 1973; Beiras y cols., 1987c; Rickelt y cols., 2011).

Aparte de los mencionados desmosomas, existen *BANDAS ELECTRODENSAS* y *DENSIDADES FOCALES AISLADAS* en la cara interna de la membrana plasmática de las CMs en contacto con los Qs (figura 19) (García-Caballero y cols., 1988). También se han descrito densidades simétricas en las regiones de unión entre las membranas plasmáticas de la CM y el ML (García-Caballero y cols., 1988; Moll I. y cols., 2005).



**Figura 19.** Relaciones entre una CM y un queratinocito contiguo. En la membrana de la CM se distingue un área de densidad focal (flecha) y una banda electrodensa (corchete) (imagen tomada de García-caballero y cols., 1998).

## CITOPLASMA

Las CMs muestran una característica matriz citoplasmática de baja densidad con variable número de orgánulos y un citoesqueleto compuesto de filamentos intermedios dispuestos de manera dispersa. La mayoría de estas estructuras citoplasmáticas se encuentran en una posición supranuclear (Winkelmann y Breathnach, 1973; Winkelmann, 1977; Halata y cols., 2003).

Los *FILAMENTOS INTERMEDIOS* están tanto asociados con los desmosomas como esparcidos por el citoplasma y son mucho más escasos y finos que los tonofilamentos de los Qs (Frigerio y cols., 1983). Esta dispersión es la responsable de que el citoplasma de las CMs aparezca claro en comparación con el de los Qs. Los filamentos intermedios pueden ser abundantes en ocasiones, especialmente en la región perinuclear, pero aún así carecen de la disposición típica de los tonofilamentos queratinocíticos en haces compactos (Gould y cols., 1985). Estos filamentos han sido identificados inmunohistoquímicamente como citoqueratinas de epitelio simple de bajo peso molecular (Moll R. y cols., 1984; Moll I. y cols., 1995b) y como neurofilamentos (Narisawa y cols., 1994c; Moll I. y cols., 2005).

El *RETÍCULO ENDOPLÁSMICO RUGOSO* está poco desarrollado normalmente, pero los *RIBOSOMAS LIBRES* y los *POLIRRIBOSOMAS* son numerosos (Winkelmann y Breathnach, 1973; Frigerio y cols., 1983). Las *MITOCONDRIAS* presentan una gran variabilidad dependiendo de la especie de estudio, aunque generalmente no son muy numerosas. Las membranas y vesículas del *COMPLEJO DE GOLGI* (CG) son fácilmente distinguibles pero tampoco son muy numerosas. Se ha descrito además gran cantidad de *VESÍCULAS CLARAS CITOPLASMÁTICAS*, partículas de *GLUCÓGENO* y grandes *VACUOLAS DENSAS* similares a lisosomas (Winkelmann, 1977; Gould y cols., 1985). Raramente se han citado *CENTRIOLOS* en las CMs (Winkelmann y Breathnach, 1973). También se pueden encontrar *MELANOSOMAS* limitados por membrana y *GRÁNULOS MADUROS DE MELANINA* transferidos (Winkelmann y Breathnach, 1973; Gould y cols., 1985; Beiras y cols., 1987b; García-Caballero y cols., 1988). Ocasionalmente, se observan *CUERPOS MULTIVESICULARES* citoplasmáticos conteniendo vesículas y material del mismo tamaño y densidad electrónica que los gránulos neurosecretorios. Los cuerpos multivesiculares de este tipo se llaman *cuerpos crinofágicos* y están considerados

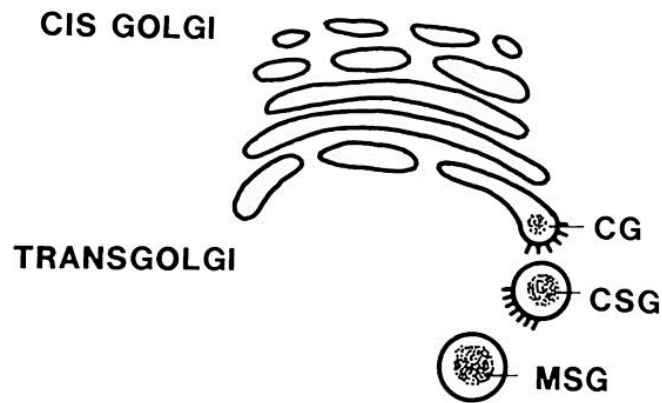
como lisosomas secundarios. Esta observación sugiere que también en la CM ocurren *procesos de crinofagia o granulolisis*, como en otras células endocrinas (Salomon y cols., 1987).

El hallazgo más distintivo en las CMs respecto a cualquier otra célula epidermal son los característicos *GRÁNULOS ELECTRODENSOS o DE NÚCLEO DENSO*, similares a los gránulos secretores de las células endocrinas. La apariencia de los gránulos es, por lo general, muy similar entre los mamíferos. Están constituidos por un núcleo o corazón electrodenso rodeado por una membrana simple, separados entre sí por un espacio claro. Su tamaño puede variar entre 70 y 180 nm de diámetro. Se concentran típicamente en el espacio citoplasmático subnuclear, en el citoplasma adyacente a la terminación nerviosa asociada y remotos a la localización del CG. Ocasionalmente se pueden observar en cualquier otra parte de la célula, principalmente en las áreas laterales del citoplasma celular, pero su notable polaridad por la porción citoplasmática asociada al nervio es un hallazgo común en las CMs de todas las especies (Iggo y Muir, 1969; Winkelmann y Breathnach, 1973; Hartschuh y Grube, 1979; Halata y cols., 2003, 2010). Estos gránulos son heterogéneos respecto a la configuración y densidad electrónica de una célula a otra (Winkelmann y Breathnach, 1973; Beiras y cols., 1987a, b).

### ***Formación de los Gránulos de Merkel***

La microscopía electrónica ha sido útil en el estudio del origen de los gránulos de las CMs. La vía de formación de estos gránulos es similar a la de otras células endo y exocrinas en un proceso de condensación, empaquetado y maduración en las cisternas *trans* del Complejo de Golgi y en el citoplasma celular (figura 20) (Salomon y cols., 1987; Nindl y cols., 1990). De hecho, la organización citosólica de la CM es la misma que la presente en las células endocrinas o exocrinas secretoras.

**Figura 20.** Diagrama tomado de Salomon y cols., 1987 que ilustra el proceso de formación propuesto para los gránulos de las CMs: 1) el gránulo comienza a formarse por la acumulación de material electrodenso en el extremo terminal de las cisternas *trans* del complejo de Golgi, que se recubren de unidades de *clatrina*; 2) desprendimiento del gránulo recién formado, inmaduro, aún con cobertura de clatrin ("coated secretory granule", CSG). 3) maduración del gránulo en el citoplasma con pérdida de la envoltura (mature secretory granule, MSG).



### *Contenido y significado de los gránulos de las CMs*

Cada una de las sustancias que han sido detectadas en los gránulos de Merkel puede ser un candidato a transmisor químico. La mayoría de las CMs forman complejos con terminaciones axonales sensoriales y los gránulos de la CM en este complejo se acumulan normalmente en el sitio sináptico del citoplasma. En ocasiones se ha citado que la membrana de los gránulos de Merkel se fusionaba con la membrana plasmática de la CM y su contenido parecía ser descargado dentro del espacio intercelular (Tachibana y cols., 1984; Tachibana, 1995). Esto implicaría que la sensación táctil desempeñada por la CM está mediada por la liberación del contenido de los gránulos electrodensos dentro de las estructuras especializadas sinápticas (Cheng y cols., 1973; Mihara y cols., 1979; Hartschuh y Weihe, 1980). Los neuropéptidos y monoaminas en las CMs podrían funcionar además como mediadores autocrinos o paracrinos. Así, se han descrito evidencias ultraestructurales de una actividad secretora hacia los Qs (García-Caballero y cols., 1988).

Así pues, mientras que algunas de las sustancias neurosecretoras funcionan como neurotransmisores otras se han demostrado como promotoras del crecimiento y de la diferenciación de varios tipos celulares cutáneos (como veremos más adelante). El conocimiento de la naturaleza de esos gránulos es esencial para dilucidar la/s función/es de las CMs.

## ***NÚCLEO DE LA CÉLULA DE MERKEL***

Normalmente, el núcleo de las CMs presenta una morfología ovalada con el eje longitudinal orientado en el mismo sentido de la célula, es decir, paralelo a la superficie cutánea. Tiende a tener perfiles lisos y está marcadamente hendido o multilobulado (Winkelmann y Breathnach, 1973; Halata y cols., 2003, 2010). Presenta un aspecto claro debido a la disposición dispersa de la cromatina y contiene pocos nucléolos (Tachibana, 1995; Tachibana y Nawa, 2002; Toyoshima y cols., 2000).

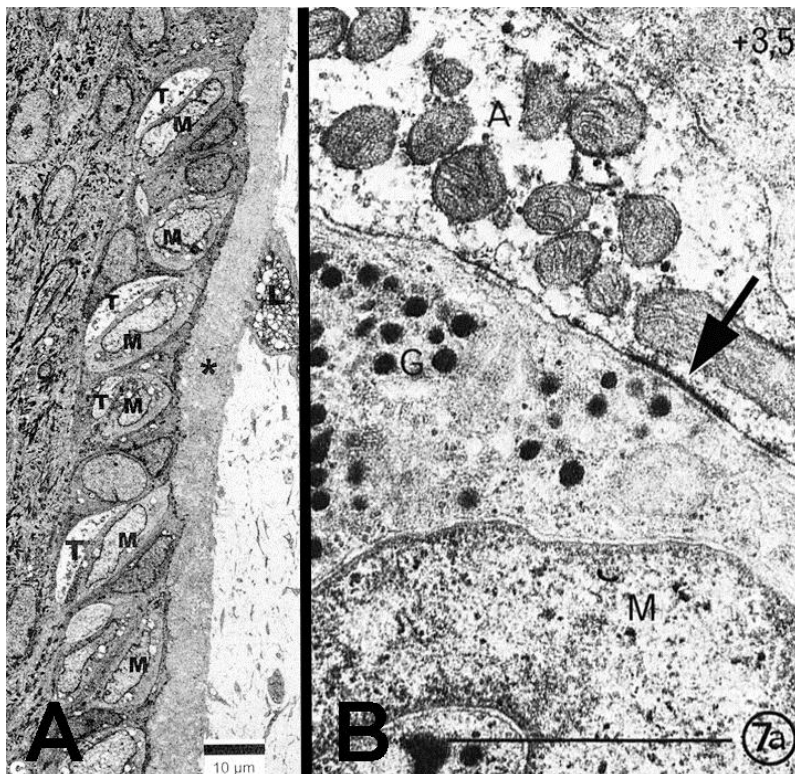
Se ha descrito de manera muy ocasional *INCLUSIONES INTRANUCLEARES* de aspecto fibrilar y con morfología de varilla (*rodlet* en inglés) en algunas CMs humanas y en el conejo. Se localizan libres en la porción más clara del nucleoplasma y están compuestas de filamentos dispuestos irregularmente, muy cerca los unos de los otros, con un material de aspecto granular entre ellos que actúa a modo de enlaces filamento-filamento. Están formadas de proteínas y lípidos (Fortman y Winkelmann, 1973; Straile y cols., 1975; Winkelmann, 1977). Se cree que estos filamentos pueden ser los responsables de contraer y agitar el núcleo marcadamente plegado de las CMs. Parecen ser idénticas a las inclusiones intranucleares observadas en numerosos tipos de células neuroendocrinas y neuronales (Gould y cols., 1985).

## ***CONEXIÓN CON EL AXÓN TERMINAL***

La asociación íntima de las CMs con las fibras nerviosas se conoce desde su descubrimiento (Merkel, 1875). Estas uniones representan mecanorreceptores de adaptación lenta. Las terminaciones derivan de largas fibras mielinizadas aferentes de tipo 1. Una CMs puede recibir más de un axón terminal y una fibra puede suplir a más de una CM (Iggo y Muir, 1969; Smith, 1977; Mihara y cols. 1979; Ogawa, 1996). El nervio pierde su vaina de mielina próximo a la epidermis continuando como un axón no mielinizado rodeado por porciones de citoplasma de células de Schwann y la membrana basal. La fibra axonal termina como un menisco aplanado que contacta directamente con el aspecto basal o dermal de la CM. Está repleto de mitocondrias, gran cantidad de vesículas claras, vesículas electrodensas y cuerpos lipídicos (Munger, 1965; Winkelmann y Breathnach, 1973; Halata y cols., 2003). En los discos

táctiles de la piel, el axón es adyacente a la lámina basal y termina bajo la CM, en su lado dermal. En las vibrisas, las terminaciones nerviosas no presentan esta disposición sino que contactan con el lado celular epitelial de la CM; esto es, las CMs yacen interpuestas entre la lámina basal y el disco axonal (figura 21A) (Hartschuh y Weihe, 1980; García-Caballero y cols., 1989c).

El área de contacto con la fibra nerviosa asociada se caracteriza por ser una estructura similar a una sinapsis, donde los gránulos de Merkel están concentrados cerca de la membrana plasmática, que presenta proyecciones electrodensas en su cara interna. La membrana de la neurita en contacto está engrosada en estas zonas (figura 21B) (Chen y cols., 1973; Mihara y cols., 1979; Hartschuh y Weihe, 1980). Esto se corresponde con la estructura característica de una sinapsis química: un engrosamiento de membrana postsináptico (axón) y proyecciones densas en la membrana presináptica (CM). Lo que no está claro es si esta transmisión sináptica es unidireccional (desde la CM al axón) o recíproca (Mihara y cols., 1979).



**Figura 21.** (A) Sección ultrafina de una vibrisa en la que se muestra cómo se disponen las CMs (M), longitudinalmente entre la membrana basal (\*) y la terminación nerviosa (T) (imagen tomada de Halata y cols., 2003). (B) Detalle de la unión entre una CM (arriba) y el axón adyacente (abajo). La flecha indica la zona de contacto sináptico (imagen extraída de Hartschuh y Weihe, 1980).

### 3.2.3. MORFOMETRÍA DE LAS CÉLULAS DE MERKEL

La inmensa mayoría de trabajos se han realizado mediante *microscopía electrónica de transmisión*. El tamaño de las CMs en los mamíferos se sitúa entre  $6.9 \pm 1.3 \mu\text{m}$  y  $16 \mu\text{m}$  de diámetro mayor (Moll R. y cols., 1984; Beiras y cols., 1987c; Halata y cols., 2003; Zelená y cols., 1994). En vertebrados inferiores existen algunas referencias que hablan de  $16 \mu\text{m}$  de diámetro mayor en la salamandra y de  $4\text{-}6 \mu\text{m}$  de diámetro mayor en peces teleósteos (Whitear, 1989). Las espinas citoplasmáticas son las estructuras con una mayor similitud entre las diferentes especies animales, con unas medidas cercanas a  $1.5 \mu\text{m}$  de largo por  $0.3 \mu\text{m}$  de diámetro. Los gránulos electrodensos son las estructuras celulares que presentan mayor variabilidad morfométrica, probablemente determinada por la etapa de desarrollo, la especie animal bajo estudio o, incluso, las técnicas de observación utilizada. El diámetro medio en los mamíferos oscila entre  $80\text{-}120 \text{ nm}$  (Tachibana, 1995; Tachibana y Nawa, 2002; Moll I. y cols., 2005).

Yamashita y colaboradores (1993) y Takahashi-Iwanaga (2003) introdujeron un nuevo aspecto en el estudio de la morfometría ultraestructural de la CM, permitiendo una nueva visión más completa y real: la *microscopía electrónica de barrido*. Se ha comprobado sobre piel de ratas que la CM presenta una forma elipsoidal-alargada con un tamaño de  $3.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$  de diámetro menor y  $6.9 \pm 1.3 \mu\text{m}$  de diámetro mayor. Los procesos citoplasmáticos realmente presentan una morfología alargada-aplanada. Las espinas y microvellosidades varían de  $0.1$  a  $0.25 \mu\text{m}$  de diámetro, alcanzando un máximo de  $3 \mu\text{m}$  de longitud.

La tabla 9 muestra las características morfométricas de las CMs extraídas de los diversos estudios en diferentes especies animales.

Tabla 9. Morfometría de la CM en las diferentes especies recopilada de la literatura disponible.

	LAMPREAS	ANFIBIOS	PECES	ROEDORES	DIVERSOS MAMÍFEROS	HOMBRE
<b>Diámetro celular</b>	6-9 $\mu\text{m}$ (Whitear, 1989)	16 $\mu\text{m}$ salamandra 12 $\mu\text{m}$ urodelos 8 $\mu\text{m}$ anuros (Whitear, 1989)	7.5 $\mu\text{m}$ teleósteos (Tachibana y cols., 1984) 4-6 $\mu\text{m}$ (Whitear, 1989)	3.9 $\pm$ 0.6 $\mu\text{m}$ $\emptyset\text{m}$ 6.9 $\pm$ 1.3 $\mu\text{m}$ $\emptyset\text{M}$ (Yamashita y cols., 1993)	10-15 $\mu\text{m}$ (Halata y cols., 2003) 3.9 $\pm$ 0.6 $\mu\text{m}$ $\emptyset$ 6.9 $\pm$ 1.3 $\mu\text{m}$ $\emptyset\text{M}$ (Yamashita y cols., 1993) 9-16 $\mu\text{m}$ (Zelená, 1994)	11 $\pm$ 2 $\mu\text{m}$ (Moll R. y cols., 1984) 8.09 $\pm$ 0.82 $\mu\text{m}$ (Beiras y cols., 1987c)
<b>Perímetro celular</b>						26.51 $\mu\text{m}$ (Beiras y cols., 1987c)
<b>Área celular</b>						36.87 $\mu\text{m}^2$ (Beiras y cols., 1987c)
<b>Diámetro nuclear</b>					9.5-10 $\mu\text{m}$ (Tachibana e Ishizeki, 1981)	5.08 $\mu\text{m}$ (Beiras y cols., 1987c)
<b>Perímetro nuclear</b>						18.74 $\mu\text{m}$ (Beiras y cols., 1987c)
<b>Área nuclear</b>						12.54 $\mu\text{m}^2$ (Beiras y cols., 1987c)



	LAMPREAS	ANFIBIOS	PECES	ROEDORES	DIVERSOS MAMÍFEROS	HOMBRE
<b>Diámetro granular</b>	120 nm (Whitear, 1989)	120 nm (Whitear, 1989)	100 nm (Whitear, 1989) 70 nm (Zaccone y cols., 1986)	64±17.9 nm CMsA 118±34.3 nm CMsF (Ochiai y Suzuki, 1981)	80-120 nm (Iggo y Muir, 1969; Zelená, 1994; Tachibana, 1995; Tachibana y Nawa, 2002; Moll I. y cols., 2005) 80-100 nm (Winkelmann, 1973, 1977; Toyoshima y cols., 2000) 80-130 nm (Gould y cols., 1985) 50-110 nm (Halata y cols., 2003, 2010) 93.30 nm; 63.95 nm (Beiras y cols., 1986)	70 - 200 nm (Winkelmann y Breathnach, 1973; Pearse, 1980) 75-130 nm (Moll R. y cols., 1984) 110 nm (Warner y cols., 1983) 94.23 nm (Beiras y cols., 1987c) 61.4±12.5 nm CMsF; 69.1±23.65nm CMsA (Beiras y cols., 1987a) 89±18 nm (Frigerio y cols., 1983)
<b>Densidad granular</b>						7.02 gránulos/μm <sup>2</sup> (Beiras y cols., 1987c)
<b>Área granular</b>					6,411 nm <sup>2</sup> 2,148 nm <sup>2</sup> (Beiras y cols., 1986)	5020.05 nm <sup>2</sup> (Beiras y cols., 1987c) 2699.8±1003.36 nm <sup>2</sup> CMsF 3637±1347.75 nm <sup>2</sup> CMsA (Beiras y cols., 1987a)
<b>Espacio núcleo - membrana granular</b>					8-10 nm (Winkelmann, 1973, 1977)	
<b>Espinas</b>		1-5 μm (Whitear, 1989)		0.1-0.25 μm Ø 2.5 μm long (Yamashita y cols., 1993) 2-3 μm long (Takahashi-Iwanaga, 2003)	1.5 μm long 0.3 μm Ø (Iggo y Muir, 1969) 0.1-0.25 μm Ø 2.5 μm long (Yamashita y cols., 1993)	1.58x0.26 μm (Beiras y cols., 1987c)

	LAMPREAS	ANFIBIOS	PECES	ROEDORES	DIVERSOS MAMÍFEROS	HOMBRE
<b>Procesos intersticiales</b>		+ de 4 $\mu\text{m}$ (Whitear, 1989)				1.39x0.25 $\mu\text{m}$ (Beiras y cols., 1987c)
<b>Microvellosidades</b>						0.35x0.25 $\mu\text{m}$ (Beiras y cols., 1987c)
<b>Desmosomas</b>						286.9 nm (Beiras y cols., 1987c)
<b>Bandas electrodensas</b>						800 nm largo máx 90 nm grosor máx (García-Caballero y cols., 1988)
<b>Inclusiones intranucleares</b>						1.6x0.4 nm (Fortman y Winkelmann, 1973)
<b>Filamentos intermedios</b>		10nm (Whitear, 1989)		4.6±0.1 nm (Ochiai y Suzuki,1981)		10 nm (Warner y cols., 1983; Frigerio y cols., 1983; Beiras y cols, 1987c)
<b>Densidad numérica granular</b>				0.42-0.45 (Ochiai y Suzuki,1981)	3.18±0.15 (Tachibana e Ishizeki, 1981) 8.11±2.51 (Beiras y cols., 1986)	
<b>Terminación nerviosa</b>					8-10 $\mu\text{m}$ Ø 1-3 $\mu\text{m}$ grosor (Iggo y Muir, 1969; Smith, 1977; Zelená, 1994)	

### 3.2.4. SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DE MERKEL

Las observaciones morfológicas clásicas y los estudios moleculares más recientes sugieren que las CMs son muy heterogéneas y componen diferentes subtipos: 1) *CMs de tipo dendrítico* y *CMs ovales*, morfológicamente; 2) *CMs innervadas* y *CMs no innervadas*, según conexión a terminaciones nerviosas; 3) *CMs estables* y *CMs lábiles*, según la dependencia neural; 4) *CMs mecanorreceptivas* y *CMs paracrinas*, según su función (Tachibana y Nawa, 2000, 2002; Tachibana y cols., 2001; Halata y cols., 2003; Takahashi-Iwanaga, 2003). Además, la expresión de diferentes proteínas en diferentes localizaciones de un mismo animal también apoya la existencia de subtipos (Eispert y cols., 2009).

#### ***POLIMORFISMO DE LAS CMS EN LA PIEL DE LOS MAMÍFEROS***

En aquellas áreas donde se encuentran normalmente las CMs, en el estrato basal de la epidermis, se observan células con algunas particularidades morfológicas diferentes a las típicas. Presentan núcleos ovalados con muchos poros nucleares y carecen de contacto con terminaciones nerviosas. Establecen pocos y pequeños desmosomas con los Qs de alrededor o hemi-desmosomas con la lámina basal y carecen de procesos citoplasmáticos. Los gránulos electrodensos se localizan en diferentes partes del citoplasma, sin polaridad (Halata y cols., 2003). Takahashi-Iwanaga (2003) y Nakafusa y colaboradores (2006) también encontraron, en las vibrisas y en los discos táctiles epidermales de la piel dorsal de ratas, CMs “atípicas” caracterizadas por cuerpos celulares redondeados y largos procesos citoplasmáticos que se extienden a lo largo de los espacios intercelulares del epitelio. Similares CMs de morfología irregular también se han encontrado en neoplasias cutáneas, especialmente foliculares (Hartschuh y Shultz, 1995; Shultz y Hartschuh, 1995, 1997). Estas células recuerdan a otras del sistema endocrino difuso, principalmente del epitelio intestinal y bronquial.

#### ***POLIMORFISMO DE LAS CMS EN LA MUCOSA ORAL DE LOS MAMÍFEROS***

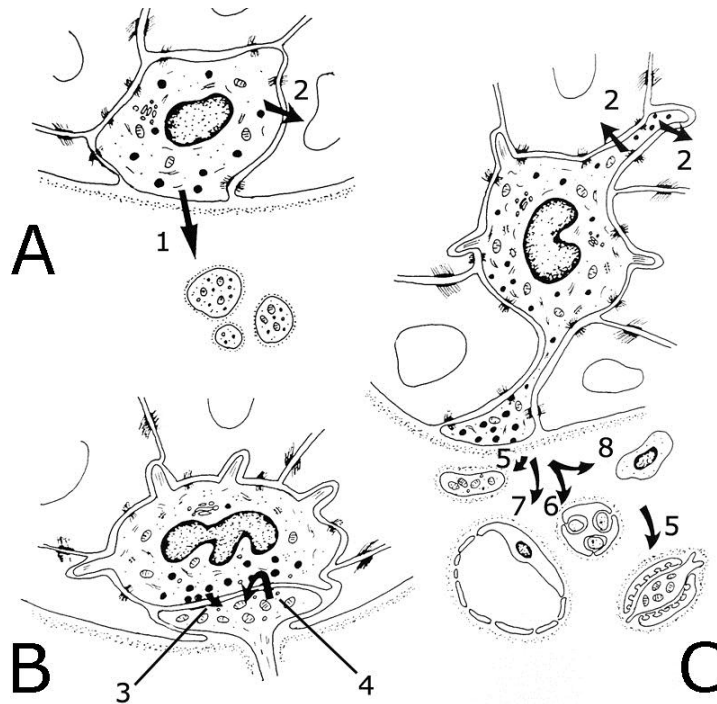
Las CMs de la mucosa oral han mostrado algunas características únicas y diferentes a las típicas CMs de la piel pilosa y lampiña. Podemos encontrar dos tipos de CMs: *esféricas con unión a un axón terminal* y *dendríticas no innervadas*. Las CMs esféricas normalmente están en

contacto íntimo con terminaciones nerviosas terminales, si bien la concentración de gránulos no está polarizada al lado sináptico. Las células de morfología dendrítica presentan largos procesos citoplasmáticos, los cuales contienen gran cantidad de gránulos electrodensos y pueden contactar con la membrana basal, donde raramente se observan imágenes de exocitosis. Las primeras parecen estar implicadas en la percepción mecánica, mientras que las segundas tienen más bien una función secretora. La gran mayoría de estas CMs residen en el estrato basal del epitelio, si bien algunas células similares se localizan en estratos superiores (Ramieri y cols, 1992; Tachibana, 1995; Hillinges y cols., 1996; Tachibana y Nawa, 2000, 2002). En la mucosa humana normal son más numerosas que en la mucosa humana patológica y que en la mucosa de roedores (Tachibana, 1995; Tachibana y cols., 1997; Tachibana y Nawa, 2000).

Ramieri y colaboradores (1992) y Hillinges y colaboradores (1996) también encontraron CMs no invadidas, aunque sin dendritas. Tazaki y colaboradores (2000b), en el hámster, encontraron CMs de tipo dendrítico que hacían contacto con terminaciones nerviosas. Otros autores señalan, sin embargo, que no existen CMs con esta morfología en la papila incisiva de la cabra (Halata y cols., 1999) y del mono (Halata y Baumann, 1999).

Por último, se ha demostrado que las yemas gustativas de los vertebrados inferiores contienen células similares a las CMs (Toyoshima y Shimamura, 1988; Withear, 1989). También presentan gránulos intracitoplasmáticos de núcleo denso, aunque difieren de las típicas CMs en que no forman un complejo con el axón terminal. A pesar de que estas células pueden estar relacionadas con la diferenciación de las yemas gustativas en las etapas tempranas del desarrollo, su función real en las yemas gustativas completamente desarrolladas aún se desconoce. Tachibana (1995) sugirió que estas células pueden probablemente representar otra subpoblación de las CMs.

No se puede decir con certeza si estamos hablando de poblaciones celulares con diferente o mismo origen, o si, particularmente en epitelios expuestos a fuerte carga mecánica como el oral, el mismo tipo de célula puede tener diferentes formas y funciones (diferentes estados de diferenciación) a lo largo de su vida (Halata y cols., 2003; Eispert y cols., 2009).



**Figura 22.** Resumen esquemático de las funciones propuestas para las diferentes subpoblaciones de CMs. (A) Durante el desarrollo cutáneo, sustancias estimuladoras o tróficas pueden liberarse hacia los nervios en desarrollo (1) y los queratinocitos (2). En el complejo maduro CM-neurita, la CM puede liberar neurotransmisores o factores neurotróficos (3), o neuromoduladores (4) hacia la terminación nerviosa. (C) La CM no invadida en la piel madura puede ayudar a la normal diferenciación de los queratinocitos (2) o a la normal función de las diferentes estructuras nerviosas (5, 6). La célula también puede liberar sustancias bioactivas sobre los vasos sanguíneos (7) o sobre las células del tejido conjuntivo (8). Diagrama modificado de Tachibana, 1995.

### 3.2.5. LOCALIZACIÓN, DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL

Una de las técnicas tradicionalmente más utilizadas en el estudio de las CMs ha sido la microscopía electrónica. Sin embargo, el microscopio electrónico no permite estudios de distribución a gran escala o en áreas extensas de piel. Esto únicamente es posible desde la introducción de los marcadores inmunohistoquímicos que han permitido una precisa identificación de las CMs bajo el microscopio óptico, más fácil y manejable metodológicamente.

#### A. LOCALIZACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LAS CMs EN LOS EPITELIOS

Las CMs se hayan presentes en la piel y mucosas de todos los vertebrados incluyendo peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Tabla 10).

**Tabla 10. Localización de las CMs filogenéticamente.**

<b>Lampreas (ciclóstomos)</b>	Epidermis Yemas gustativas? (células similares)
<b>Anfibios</b>	Epidermis Epitelio oral Yemas gustativas? (células similares)
<b>Peces</b>	Epidermis Epitelio oral Yemas gustativas? (células similares)
<b>Reptiles</b>	Dermis Subepiteliales en paladar y lengua Yemas gustativas? (células similares)
<b>Aves</b>	Dermis (corpúsculos de Merkel, corpúsculos de Grandry)
<b>Mamíferos</b>	Epidermis Epitelio de mucosas derivadas del ectodermo Folículos pilosos Dermis (ocasionalmente)

Su *LOCALIZACIÓN* normal incluye el estrato basal de la epidermis de la piel pilosa y glabra, la vaina epitelial externa de los folículos pilosos y el epitelio de la mucosa originada del ectodermo (labios, boca y canal anal) (Merkel, 1875; Halata y Baumann, 1999, 2000; Halata y

cols., 2003, 2010). De manera ocasional, se han visto CMs dermales en algunos mamíferos, especialmente en el hombre (Moll R. y cols., 1984; Moll I. y cols., 1986).

Según Lacour y colaboradores (1991), se pueden observar tres patrones diferentes de *ORGANIZACIÓN*: 1) el primero consiste en grandes grupos o **agregados de CMs**; 2) el segundo es un patrón de **organización linear y arciforme**; y 3) el tercero no es más que **CMs de manera aislada y dispersa**, sin vinculación con otras CMs. Estas agrupaciones de CMs son particularmente llamativas en determinadas áreas especializadas que se encuentran tanto en la piel pilosa (*discos táctiles epidermales*) como en la piel glabra (*corpúsculos de Merkel*). Esta organización es similar a otras células neuroendocrinas, como las de la mucosa bronquial donde también se disponen en grupos (cuerpos neuroepiteliales) y aisladas (Gould y cols., 1985).

El epitelio de estas estructuras siempre se dispone de manera que permite una óptima transferencia de presión a la terminación nerviosa de Merkel (Halata y Baumann, 2000). De hecho, se ha sugerido que las terminaciones nerviosas son un requisito para que las CMs presenten una uniforme y correcta disposición en el epitelio (Tachibana y cols., 1983). Así pues, la *ORIENTACIÓN* de las CMs en el epitelio que las alberga depende en gran medida de la dirección de la presión, bajo condiciones fisiológicas, sobre la terminación nerviosa:

- 1) En las crestas y papilas epidermales de la piel pilosa y glabra, el eje longitudinal de las CMs discurre paralelo a la superficie cutánea mientras que la presión aplicada golpea la superficie perpendicularmente. Es por esto que el axón es adyacente a la lámina basal y yace bajo la CM (Hartschuh y Weihe, 1980; Halata y cols., 2003).
- 2) Por el contrario, en los folículos pilosos las CMs se disponen en la vaina folicular externa en una dirección oblicua con respecto a los Qs. Esto es porque al doblarse el pelo la presión es ejercida sobre la membrana basal en el lado cóncavo, la cual a su vez presiona contra las CMs. De ahí que las CMs estén interpuestas entre la lámina basal y el axón (Hartschuh y Weihe, 1980; Halata y cols., 2003).
- 3) En la mucosa oral la posición parece depender del comportamiento alimentario del animal, es decir, de cómo y en qué dirección mueva el alimento en el interior de su boca y golpee la mucosa. Así, en el mono rhesus las CMs se disponen perpendiculares a la superficie de la

mucosa (Halata y Baumann, 1999) mientras que en la cabra son paralelas (Halata y cols., 1999), en línea con los estímulos mecánicos experimentados durante la ingesta.

En resumen, *la CM está siempre posicionada entre la dirección del estímulo mecánico y la terminación nerviosa*. Este concepto es fundamental para que las CMs cumplan de una manera óptima su función mecanorreceptiva (Halata y Baumann, 2000).

## B. DENSIDAD DE LAS CMs EN LAS DIFERENTES LOCALIZACIONES ANATÓMICAS

La población total de CMs en la piel de los mamíferos adultos es baja, siendo la población celular epidermal menos abundante. Su número varía en función de la localización anatómica. De forma constante entre especies, las CMs son mucho más numerosas en las áreas de piel glabra y en la mucosa oral que en la piel pilosa). La región donde son menos numerosas es la piel genital. El patrón de distribución parece coincidir con muchas de las regiones que están implicadas en la percepción táctil, apoyando una función sensorial-receptora de las CMs. Así, es fácil encontrarlas en las vibrisas y el hocico en los animales, la piel glabra de los extremos de los dedos en humanos, el borde labial del mentón y el paladar duro o rugoso de todos los mamíferos (Lacour y cols., 1991; Boot y cols., 1992; Moll I. y cols., 1993, 2005; Moll I., 2000; Halata y cols., 2003).

Lacour y colaboradores (1991) distinguieron en la especie humana diferentes regiones cutáneas en función de su densidad en CMs. Así, existen *áreas densas en CMs* (>50 CMs/mm<sup>2</sup>), *áreas de densidad media* (20-50 CMs/mm<sup>2</sup>) y *áreas de densidad baja* (<20 CMs/mm<sup>2</sup>).

**Tabla 11. Clasificación de la piel y mucosas humanas en función de su densidad en CMs según Lacour y cols. (1991).**

DENSIDAD EN CMs	PIEL	MUCOSA
>50 CMs/mm <sup>2</sup>	Labios, palmas, puntas de los dedos, pliegues proximales unguales, dorso del pie	Paladar duro
20-50 CMs/mm <sup>2</sup>	Nariz, lóbulos de las orejas, carrillos, cuello, aspecto anterior del tronco, aspecto dorsal del dedo medio, muslos, rodillas, planta del pie, talón, aspectos ventrales y dorsales de los dedos del pie	Mucosa de los carrillos
<20 CMs/mm <sup>2</sup>	Cuero cabelludo, frente, párpados, espalda, pezón, axila, abdomen, pecho, glúteos, escroto, prepucio, brazos, antebrazos, aspectos dorsales de las manos y de las piernas	Lengua, encías, glande



Las CMs también son más densas en la piel fetal y postnatal temprana que en la piel de los adultos, y son más densas en la epidermis de los dedos de la mano que en la de los pies (Winkelmann y Breathnach, 1973; Moll R. y cols., 1984).

Es importante señalar que ante diversas condiciones patológicas se pueden apreciar variaciones en el número normal de CMs. En la piel expuesta al sol son dos veces más numerosas que en la piel no expuesta (Moll I. y cols., 1990b) y también ven incrementado su número en ciertos tumores cutáneos con diferenciación folicular (Hartschuh y Schultz, 1995; Collina y cols., 1998; Hartschuh y Schulz, 1999; Hartschuh y cols., 2000). Además, se ha descrito que el número de CMs en los discos táctiles del pelo incrementa o disminuye según la fase del ciclo piloso (Nakafusa y cols., 2006).

### **C. DISTRIBUCIÓN DE LAS CMs EN LA PIEL DE LOS MAMÍFEROS**

---

La distribución de las CMs en los mamíferos no es homogénea, sino que depende de la localización y del grado de especialización táctil del área estudiada.

#### ***TERMINACIONES NERVIOSAS DE MERKEL EN LA PIEL PILOSA***

##### ***CÉLULAS DE MERKEL EN EL DISCO TÁCTIL EPIDERMAL***

Numerosas CMs se ubican intercaladas a intervalos frecuentes entre las células columnares basales del disco y la membrana basal. Esas CMs pueden presentar varios tamaños y formas, si bien normalmente son alargadas, están orientadas transversalmente y presentan procesos citoplasmáticos que interdigitan con la base de las células columnares del disco. En contacto con la base de las CMs se observan neuritas, que normalmente aparecen bajo el microscopio óptico como un área clara, vacuolizada, debido a tumefacción artefactual (figura 11) (Smith, 1970, 1977; Moll I. y cols., 1993, 2000). En general, existe una correlación positiva entre el tamaño del *haarscheibe* y el número de CMs que contiene (Zelená, 1994). Al principio se pensaba que cada CM hacía contacto en su porción basal con una terminación nerviosa en uniones similares a sinapsis, sin embargo no todas las CMs de la piel y de los folículos pilosos están inervadas. Entre un 70 a un 80% de las CMs están en contacto íntimo con axones

epiteliales terminales según Hartschuh y Weihe (1980). Según Gottschaldt y Vahle-Hinz (1981) este porcentaje es menor, de un 50 a un 70%.

### *CÉLULAS DE MERKEL EN LA PIEL INTERFOLICULAR*

En la piel humana, las CMs también se observan en el estrato basal de la epidermis fuera de los límites de los discos táctiles, aunque es un hallazgo bastante raro (Lacour y cols., 1991). Sus características morfológicas son muy similares al resto de CMs epidermales de la piel pilosa. Bajo ciertas circunstancias patológicas, su densidad se ve incrementada y su localización dentro de la epidermis puede variar (Merot y Mooy, 1989; Moll I. y cols., 1990b; Wollina y Mahrle, 1992; Hartschuh y Schulz, 1995; Schulz y Hartschuh, 1995).

### *CÉLULAS DE MERKEL EN LOS FOLÍCULOS PILOSOS*

#### *Folículos pilosos Primarios y Secundarios*

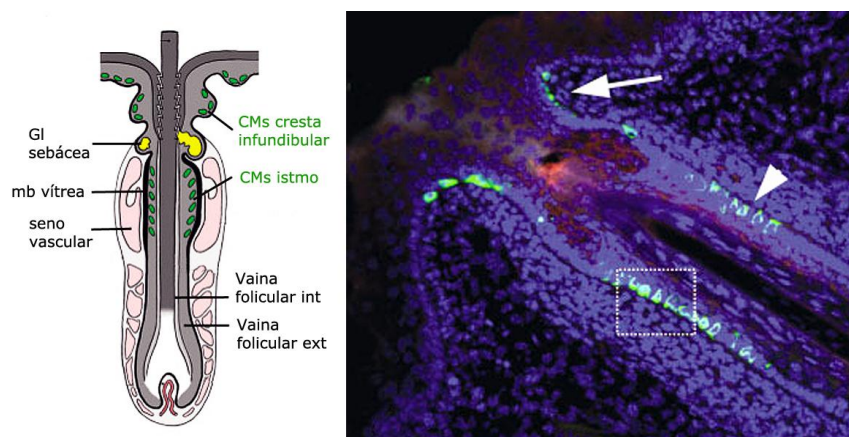
En los *FOLÍCULOS PRIMARIOS* las CMs se encuentran en la *región prominente (bulge area* en inglés), un engrosamiento del epitelio de la vaina externa del folículo bajo la desembocadura de la glándula sebácea, bien desarrollada en los folículos en estados embrionarios y poco marcada en adultos. Esta parte del folículo es un nicho de células precursoras de la epidermis y no cambia su forma durante el ciclo del pelo. Además, esta parte del folículo sirve como punto de anclaje del músculo piloerector, por lo que se ha especulado acerca de la posibilidad que las CMs concentradas aquí tengan algún papel en el desarrollo y orientación de estas unidades musculares (Moll I., 1994; Narisawa y cols, 1994a, b; Moll I. y cols., 1995; Tanaka y Narisawa, 2000; Sieber-Blum y Grim, 2004; Pascucci y cols., 2006). También muy cerca de la superficie de la piel, en la región infundibular, se pueden observar CMs con una disposición a modo de anillo o collar, especialmente en la especie humana. Las CMs están ausentes en los *FOLÍCULOS SECUNDARIOS* o aparecen dispersas entre las otras células epiteliales (Moll I., 1994; Narisawa y cols, 1994a, b; Zelená, 1994).

Esta distribución no es constante por toda la superficie cutánea. Así, los folículos pilosos de la piel de la cara y alrededor de la boca presentan un número de CMs más alto que los de

otras localizaciones (Moll I. y cols., 1996b; Tanaka y Narisawa, 2000; Uchigasaki y cols., 2000). También los folículos del cuero cabelludo del hombre presentan numerosas CMs (Moll I. y cols., 1993; Narisawa y cols., 1994a). Al igual que en la epidermis y en la mucosa oral, existen CMs foliculares inervadas y CMs foliculares sin contacto a axón terminal. Muchas de ellas exhiben procesos dendríticos que aparentemente contactan los unos con los otros (Moll I., 1993; Narisawa y cols., 1994a; Tanaka y Narisawa, 2000; Uchigasaki y cols., 2000; Taira y cols., 2002).

### **Folículos pilosos especializados: Vibrisas y Pelos Tilótricos**

En los cortes histológicos, las CMs de las *VIBRISAS* se disponen como “hojas en una pila” en el estrato basal del epitelio del folículo, oblicuas a la lámina basal (Winkelmann y Breathnach, 1973; Moll I. y cols., 1996b; Halata y cols., 2003, 2010). Tridimensionalmente, las células se disponen a modo de *manguito o cinturón celular* alrededor del folículo, cubriendo toda la superficie de la porción más gruesa (figura 23). Frecuentemente, presentan prolongaciones citoplasmáticas a modo de procesos dendríticos (Tanaka y Narisawa, 2000). Se ha demostrado, además, la existencia de un intrincado patrón de inervación: los axones mielinizados pierden su vaina de mielina al penetrar la lámina basal y tras ramificarse varias veces, un axón puede inervar a más de 50 CMs. Se ha estimado hasta 3000 CMs por vibrisa (Rice y cols., 1993; Ebara y cols., 2003).



**Figura 23.** Localización de las CMs en las vibrisas. Se reconoce una agrupación en las crestas infundibulares, cerca de la superficie epidérmica (flecha) y otra, más numerosa, en la porción engrosada, bajo la glándula sebácea (cabeza de flecha). Marcaje inmunofluorescente con NT-3. Modificado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.10403/pdf>

Se puede distinguir un segundo tipo de agrupación de CMS en las vibrisas de los mamíferos. Se encuentra en la base de las crestas epiteliales del infundíbulo, cerca de la penetración del pelo (figura 23). Su disposición aquí es idéntica a la piel pilosa, con su eje longitudinal paralelo a la membrana basal pero formando una especie de *collar celular* a modo de malla en el epitelio externo del infundíbulo (Halata y cols., 2003).

En los mamíferos, las CMS también están directamente asociadas con los *FOLÍCULOS TILÓTRICOS*. Las CMS aquí se distribuyen en la vaina folicular externa, en un número muy variable. Su disposición es la misma que en otros tipos de folículos, asociadas a fibras nerviosas largas de neuronas sensoriales (Winkelmann y Breathnach, 1973; English, 1977a; Gu y cols., 1981).

### **Pestañas**

La disposición de las CMS en este tipo de pelo es similar a la de las vibrisas, formando un collar de CMS en la parte más superficial del infundíbulo y agrupadas a modo de cinturón alrededor de la región engrosada, con unas 20 CMS por cinturón (Zelená, 1994).

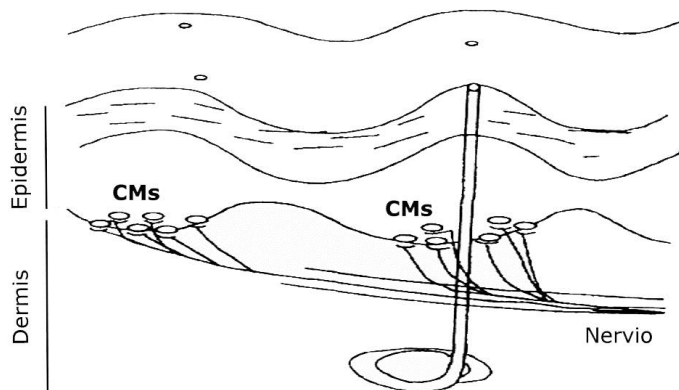
**Tabla 12. Diferentes de receptores cutáneos presentes en los diferentes tipos de pelo de los mamíferos.**

<b>Tipo de pelo</b>	<b>Localización</b>	<b>Receptor</b>	<b>Referencias</b>
Vibrisa	Hocico	Collar de CMS Manguito de CMS Corpúsculos simples Receptores de Rufini Terminaciones lanceoladas	Halata, 1975; Rice y cols., 1993; Zelená, 1994; Moll I. y cols., 1996b; Ebara y cols., 2003; Halata y cols., 2003, 2010
Pestañas	Párpados	Collar de CMS Receptores de Rufini Terminaciones lanceoladas	Zelená, 1994
Pelo tilótrico	1-2% de la población pilosa	CMS: nº variable Haarscheiben Terminaciones lanceoladas	Zelená, 1994
Pelo de guarda	12% del pelo	CMS: 4-12 Receptores de Rufini Terminaciones lanceoladas	Moll I., 1993, 1994; Zelená, 1994; Narisawa y cols, 1994a, b; Tanaka y Narisawa, 2000; Moll I. y cols., 2005
Vello	86% de la población pilosa	Terminaciones lanceoladas Collar de CMS ocasional Receptores de Rufini	Moll I., 1993, 1994; Zelená, 1994; Narisawa y cols, 1994a, b

## CÉLULAS DE MERKEL EN LA PIEL DESPROVISTA DE PELO

Existen dos tipos de piel glabra en los mamíferos. El primer tipo o *piel con papilas epidérmicas* (*pegged skin* en inglés) presenta prolongaciones sólidas de la epidermis hacia la dermis. Un ejemplo típico se encuentra en el hocico del cerdo y en el plano nasal del topo y del gato. En la base de estas papilas encontramos nidos de CMs compuestos por entre 4 y 40 células. La mayoría están en contacto con terminaciones discoidales de axones mielinizados que pierden su vaina de mielina al entrar en la epidermis (Halata, 1975; Halata y cols., 2003; 2010).

El segundo tipo de piel glabra o *piel crestada* (con crestas epidérmicas, *ridged skin* en inglés) se encuentra en los extremos de los dedos de primates y marsupiales. Equivale también al tipo de piel de las almohadillas plantares de los carnívoros. Grupos de hasta 10 CMs se encuentran en la base de las crestas epidérmicas cerca de la penetración de los ductos de las glándulas sudoríparas (Halata, 1975; Moll R. y cols., 1984; Halata y cols., 2003).



**Figura 24.** Organización de las CMs en la piel glabra o lampiña. (Modificado de Ogawa, 1996).

Un tipo particular de piel sin pelo es el *lecho de la uña*, donde de manera ocasional se pueden encontrar CMs (Moll I. y Moll R., 1993).

## TERMINACIONES NERVIOSAS DE MERKEL EN LA DERMIS

Algunas CMs son visibles en la dermis superficial de los mamíferos durante el desarrollo o de manera ocasional en adultos (Moll R y cols. 1984; Moll I. y cols., 1986; Narisawa y cols., 1992a). Las CMs dermales también forman complejos con terminaciones nerviosas. Estos

complejos están cubiertos por una delgada lámina citoplasmática de célula de Schwann. Las CMs presentan procesos citoplasmáticos extendiéndose hacia la dermis, en muchas ocasiones con gránulos de núcleo denso en su interior. En la piel pilosa, estos complejos se encuentran muy cerca o entre los folículos pilosos en la dermis profunda (Winkelmann y Breathnach, 1973; Moll R y cols. 1984; Gould y cols., 1985; Halata y cols., 2003). En muy raras ocasiones se han observado CMs dermales sin contacto a terminaciones nerviosas (Halata y cols., 2003).

### ***CÉLULAS DE MERKEL EN LA MUCOSA DE LOS MAMÍFEROS***

Las CMs son muy comunes en las mucosas derivadas del ectodermo (boca, labios y canal anal) en muchas especies de mamíferos. En el resto de mucosas constituyen un hallazgo ocasional.

#### ***MUCOSA ORAL***

Las CMs son muy numerosas y presentan un marcado polimorfismo en la mayoría de las especies. Son muy abundantes en el paladar rugoso, la encía y en el borde labial inferior de los animales y del hombre. En la boca se pueden distinguir tres tipos de mucosa diferentes:

- 1) La primera, denominada ***mucosa circundante*** (*surrounding mucosa* en inglés), cubre la superficie de los labios, el paladar blando y los laterales de la cavidad bucal o cara interna de los carrillos. No está cornificada y forma papilas epiteliales que en su base hospedan numerosas CMs (Halata y cols., 2003, 2010; Righi y cols., 2006).
- 2) La segunda, la ***mucosa especializada***, cubre la superficie de la lengua formando las características papilas con los órganos gustativos. Sólo Lacour y colaboradores (1991) han descrito CMs en este epitelio, contradiciendo la idea generalizada respecto a su ausencia en esta localización (Tachibana y cols., 1997; Barret y cols., 2000; Tachibana y Nawa, 2000; Halata y cols., 2003, 2010).
- 3) El último tipo de mucosa aguanta fuertes cargas mecánicas durante la masticación de la comida, es la denominada ***mucosa masticatoria***. Cubre el paladar duro y forma la

superficie de la encía. Se trata de un epitelio cornificado cuyo estrato basal forma crestas y papilas epidermales con muchas CMs. Su morfología es similar a la piel glabra, pero su orientación y disposición en el epitelio muestra diferencias según la especie (Barret y cols., 2000; Halata y cols., 2003, 2010; Righi y cols., 2006).

En la mucosa oral, las CMs se unen o no a terminaciones nerviosas según la especie animal. Así, en roedores y humanos la unión axonal es inconstante, mientras que en la cabra siempre muestran contacto a terminaciones nerviosas (Ramieri y cols., 1992; Hilliges y cols., 1996; Tachibana y cols., 1997; Halata y cols., 1999; Tachibana y Nawa, 2000; Righi y cols., 2006).

### *MUCOSA ANAL*

La mayoría de las CMs del canal anal humano se encuentran en la zona escamosa, tanto en las partes queratinizadas como en las no queratinizadas, y en la piel perianal. En la porción no queratinizada, el epitelio es estratificado plano con papilas epiteliales cortas en cuya base se encuentran las CMs. La zona queratinizada también muestra papilas epiteliales pero más desarrolladas y con numerosas terminaciones nerviosas de Merkel (Weihe y cols., 1991b; Horsch y cols., 1992; Halata y cols., 2003, 2010).

En otras especies de mamíferos también existen CMs en la mucosa anal. Así, Rettig y Halata (1990) demostraron en el cerdo numerosas CMs en la porción queratinizada, organizadas en discretos grupos o corpúsculos. La parte no queratinizada sólo presenta unas pocas células aisladas. La porción más externa de esta mucosa en los cerdos presenta folículos pilosos y también algunas CMs eran visibles en la vaina folicular externa.

### *ESÓFAGO*

La mucosa esofágica es una localización extraña (por su derivación endodermal) en la que se han identificado también CMs o células muy similares (Harmse y cols., 1999). Se disponen de forma individualizada, dispersas, pero también en pequeños grupos a lo largo del epitelio basal, principalmente en la porción esofágica media. Morfológicamente sus características generales son similares a las de otras ubicaciones, con la particularidad de que no

presentan inervación y muchas de ellas muestran procesos citoplasmáticos extendiéndose entre las células escamosas (Tateishi y cols., 1974; Harmse y cols., 1999; Schulz y cols., 2003).

### OTRAS MUCOSAS

Existen escasos trabajos acerca de la presencia de CMs en otras mucosas. La mucosa del pene no presenta CMs (Halata y Spaethe, 1997), mientras que la mucosa vaginal sí (Hilliges y cols., 1995).

**Tabla 13. Cuadro resumen de las localizaciones y las densidades aproximadas de las CMs en los mamíferos (modificado de Halata y Baumann, 2000).**

<b>Piel pilosa – folículos pilosos</b>	
Folículos sinusales	
Localización	estrato basal de la vaina folicular externa, bajo la glándula sebácea
Densidad	1000-3000 CMs
Folículos tilótricos	
Localización	estrato basal de la vaina folicular externa, bajo la glándula sebácea
Densidad	varias docenas de CMs
Folículos primarios (pelo primario)	
Localización	estrato basal de la vaina folicular externa, bajo la glándula sebácea
Densidad	varias docenas de CMs
Folículos secundarios (pelo de borra)	
Localización	estrato basal de la vaina folicular externa, bajo la glándula sebácea
Densidad	hasta 5 CMs
<b>Piel pilosa – epidermis</b>	
Disco táctil ( <i>Haarscheiben</i> )	
Localización	estrato basal
Densidad	hasta 20 CMs
Piel interfolicular	
Localización	estrato basal
Densidad	muy escasas, aisladas
<b>Piel glabra</b>	
Primates y marsupiales	
Localización	estrato basal de las crestas glandulares en dedos, palmas y plantas
Densidad	hasta 10 CMs
Otros mamíferos	
Localización	estrato basal de las crestas epidérmicas en almohadillas y hocico
Densidad	hasta 10 CMs (hasta 40 en el hocico)
<b>Mucosa derivada del ectodermo</b>	
Localización	estrato basal de las crestas o papilas epiteliales
Densidad	hasta 20 CMs



### 3.2.6. ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL

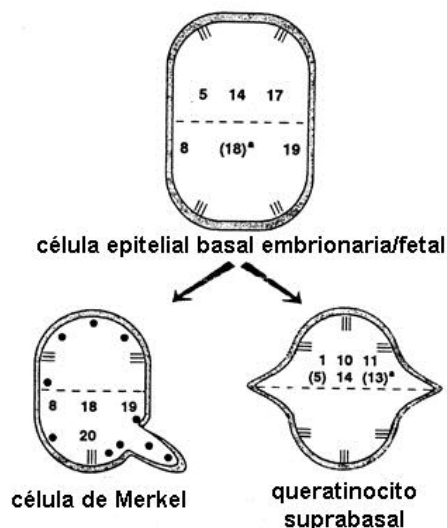
Los trabajos de Grim y Halata (2000) con quimeras aviares ya demostraron de manera fehaciente que en las aves las CMs comparten un origen común con elementos nerviosos. Se originan de células que migran desde la cresta neural junto con los progenitores de las células de Schwann y los melanoblastos. Sin embargo, en los mamíferos esta cuestión aún está lejos de resolverse y se defienden dos hipótesis diferentes.

#### ***ORIGEN EPIDERMAL DE LAS CÉLULAS DE MERKEL***

Esta hipótesis, compartida por la mayoría de los autores, defiende que las CMs de los mamíferos se diferencian a partir de células madre o precursoras ectodermales en la epidermis. Los principales argumentos a favor de esta teoría son:

- 1) La localización de las CMs dentro de la epidermis (Lyne y Hollis, 1971).
- 2) El hallazgo de *células transicionales* con características intermedias entre una CM y un Q (Tachibana y Nawa, 1980; Tachibana e Ishizeki, 1981; Toyoshima y cols., 2000).
- 3) La presencia de desmosomas y proteínas desmosomales en las CMs (Winkelmann y Breathnach, 1973; Ortonne y Darmon, 1985; Rickelt y cols., 2011).
- 4) La expresión inmunohistoquímica de CKs (Moll R. y cols., 1982, Ortonne y Darmon, 1985; Moll I y cols., 1986; Narisawa y cols., 1992a, 1994b; Moll I. y cols., 1995).
- 5) Las CMs aparecen primero en la epidermis en el desarrollo embrionario (Moll I. y cols., 1986; Moll I. y Moll R., 1992, 1993; Narisawa y cols., 1992b, 1993a).
- 6) Capacidad de desarrollarse en xenotransplantes de piel humana (Moll I. y cols., 1990a) y la aparición rápida en la epidermis durante la curación de heridas, incluso en ausencia de dermis subyacente (Scott y cols., 1981).
- 7) Su similitud con otros tipos celulares neuroendocrinos de origen epitelial (células neuroendocrinas de pulmón, intestino y páncreas) (Moll I. y cols., 1986).

- 8) La supresión de factores de transcripción necesarios para el desarrollo de las CMs (*Atoh1*) en progenitores epidermales resulta en la ausencia de CMs en todas las regiones cutáneas, mientras que su eliminación en precursores de la cresta neural no tiene efectos en la población de CMs (Morrison y cols., 2009; Van Keymeulen y cols., 2009).
- 9) Las CMs co-expresan proteínas y presentan factores de transcripción presentes en células madre epidermales. Por el contrario, las CMs no expresan los factores de transcripción reconocidos en células madre cutáneas derivadas de la cresta neural (Tilling y cols., 2014). Estos resultados indican que en la homeostasis y desarrollo de las CMs humanas están implicados progenitores epidermales con mucha más probabilidad que progenitores derivados de la cresta neural.



**Figura 25.** Esquema del posible origen de las CMs (y los queratinocitos suprabasales) a partir de precursores epidermales basales, y cambios en el perfil de citoqueratinas. (Moll I y moll R y cols., 1992).

### **ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL A PARTIR DE LA CRESTA NEURAL**

La hipótesis alternativa considera que la CM es un derivado de la cresta neural capaz de migrar a la epidermis durante la embriogénesis siguiendo el trayecto de los nervios periféricos. Las razones para esta afirmación son las siguientes:

- 1) La asociación de las CMs adultas con terminaciones nerviosas sensoriales (Iggo y Muir, 1969; Winkelmann y Breathnach, 1973; Halata y cols., 2003, 2010).

- 2) La acumulación citoplasmática de gránulos electrodensos limitados de membrana que contienen una amplia variedad de neuropéptidos (Winkelman y Breathnach, 1973; Tachibana, 1995; Moll I y cols., 2005).
- 3) El descubrimiento de CMs dermales asociadas íntimamente con nervios periféricos en la piel en desarrollo de mamíferos (Winkelman y Breathnach, 1973; Moll R y cols. 1984; Tachibana, 1995).
- 4) La observación de fenómenos de migración a través de la membrana basal (Moll R. y cols., 1984; Moll I. y cols., 1986).
- 5) La expresión de moléculas como NSE, CgA, Syn y S100, comunes a otras células con derivación neural (Hartschuh y Weihe, 1988; Gauweiller y cols., 1988; Tachibana, 1995; García-Caballero y cols., 2003b).
- 6) Su capacidad de captar *quinacrina*, específica de células con este origen (Nurse y cols., 1983; Yamashita y cols., 1993).
- 7) Los tumores de CMs se desarrollan en la dermis y no en la epidermis, como ocurre con muchos melanomas (Warner y cols., 1983; Gould y cols., 1985; Walsh, 2001; Gupta y cols., 2005).
- 8) Detección de factores de transcripción (*Hath1* y *Brn-3c*) necesarios para la activación de genes que definen fenotipos celulares neuronales (Leonard y cols., 2002).
- 9) Las CMs expresan  $\beta$ -galactosidasa, expresado constantemente por las células migratorias de la cresta neural. Esto sugiere un origen neural para los precursores embriológicos de las CMs y su posterior diferenciación una vez alcanzan la epidermis (Szeder y cols., 2003; Sieber-Blum y cols., 2003).
- 10) Más recientemente, se ha reconocido la síntesis del factor de transcripción *Sox2* por las CMs, el cual también expresan las células madre derivadas de la cresta neural en la piel humana (Laga y cols., 2010).

### 3.2.7. RESPUESTA FISIOLÓGICA Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL

Desde su descubrimiento (Merkel, 1875), las CMs se han relacionado con la percepción mecánica debido a su íntima relación anatómica con nervios sensitivos cutáneos. La función de las CMs, sin embargo, no aparece restringida al sentido del tacto. Los diversos neuropéptidos presentes en las CMs pueden no sólo mediar las comunicaciones CM-neurona, sino que también podrían, por sí mismas, ejercer efectos endocrinos o paracrinos sobre otras células diana (Boulais y Misery, 2007; Lucarz y Brand, 2007; Moll I y cols., 2005; Eisper y cols., 2009).

Recientemente, se ha demostrado dos rutas de secreción diferentes en las CMs: la primera, una ruta de señalización  $Ca^{2+}$ -dependiente que lleva a la liberación de neurotransmisor en el proceso de mecanotransducción (**función mecanorreceptiva**); la segunda, una ruta  $Ca^{2+}$ -independiente que está implicada en la exocitosis de los gránulos de núcleo denso (**función neuroendocrina**) (Boulais y cols., 2009a, b). La activación de señales  $Ca^{2+}$ -dependientes inhiben la ruta  $Ca^{2+}$ -independiente implicada en la liberación de neuropéptidos, por lo que es improbable que ambas funciones se desarrollen conjuntamente.

#### A. FUNCIÓN MECANORRECEPTIVA

---

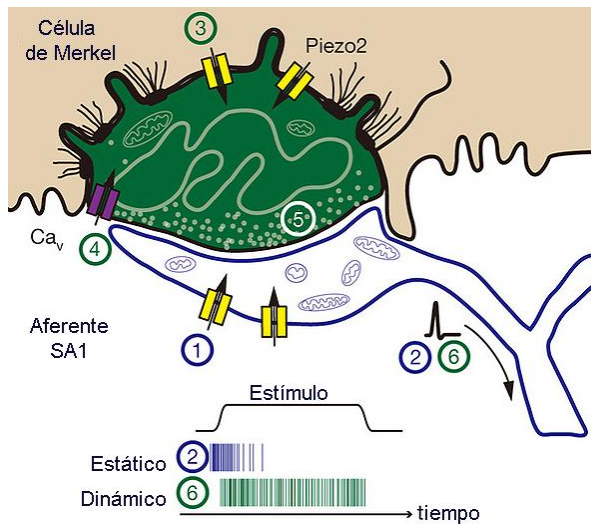
Los distintos mecanorreceptores cutáneos están compuestos de aferentes neuronales de adaptación lenta de tipo 1 (SA1) que acaban en las CMs, aferentes de adaptación rápida (RA) que acaban en los corpúsculos de Meissner y Paccini y los aferentes de adaptación lenta de tipo 2 (SA2) que terminan en los corpúsculos de Riffini. Cada una de esas neuronas responde a la deformación y el estímulo mecánico de diferente forma.

La función exacta que desempeñan las CMs propiamente dichas en los complejos neurocelulares de Merkel (CM + axón) fue controvertida durante mucho tiempo. Los primeros investigadores, basándose en hallazgos tales como que el proceso de transducción en los receptores de CMs es mucho más rápido que el tiempo esperado para una sinapsis química (Gottschaldt y Vahle-Hinz, 1981, 1982) o que las respuestas mecanosensoriales normales pueden ser iniciadas en las áreas de piel privadas de CMs (Diamond y cols., 1988; Mills y Diamond, 1995), pensaron que las CMs tenían un papel pasivo en el proceso de

mecanotransducción, que eran simples soportes o estribos que permitían al estímulo mecánico deformar la terminación nerviosa mecanorreceptiva. En este caso, el transductor del estímulo mecánico sería la terminación nerviosa en sí misma. Posteriormente, varios autores comenzaron a descubrir que las CMs podían funcionar como *transductores mecanoeléctricos*, como células sensoriales que responden a la deformación mecánica mediante la generación de un potencial receptor, el cual sería transmitido a la terminación nerviosa por medio de la liberación de uno o varios neurotransmisores desde los gránulos electrodensos neurosecretores. Las espinas o vellosidades de las CMs pueden actuar como sensores que detectan la distorsión intraepitelial; la presencia de microfilamentos dentro de éstas y su conexión con el sistema de tonofilamentos queratinocítico a través de desmosomas induce a pensar que estas células posean propiedades especiales elásticas para la deformación (Toyoshima y cols., 1998; Fagan y Cahusac, 2001). Por otra parte, se había descrito años atrás la existencia de contactos con las características típicas de una sinapsis química entre las CMs y los axones (Mihara y cols., 1979; Hartschuh y Weihe, 1980); en algunas de estas sinapsis se vió que la membrana de los gránulos de la CM se fusionaba con la membrana plasmática y el contenido era descargado dentro del espacio intercelular (Cheng y cols., 1973; Tachibana y cols., 1984). Numerosos componentes sinápticos y sustancias neuroactivas presentes en las CMs podían tener el papel de neurotransmisor o neuromodulador de estas respuestas en las terminaciones nerviosas (Hartschuh y cols., 1979; Hartschuh y Weihe, 1980; Hartschuh y cols., 1983; Maksimovic y cols., 2013).

Los posteriores estudios de Ogawa (1996, 2000) unificaron todos estos hallazgos bajo un único modelo, revelando que ambos fenómenos podían producirse conjuntamente dependiendo del tipo de estímulo aplicado (mantenido o dinámico). Los estudios más recientes vienen a confirmar este modelo del doble receptor: *el complejo neurocelular de Merkel es un receptor sensorial cutáneo único que contiene dos tipos de elementos receptores: CM y terminación nerviosa, que median respuestas táctiles ligeras y la discriminación táctil*. Las CMs se encargan de la transducción del estímulo mecánico a través de canales iónicos Piezo2, un canal iónico presente en diferentes células neuronales somatosensoriales y elemento clave en el mecanismo de transducción. Piezo2 transduce el estímulo táctil en potencial de acción  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes en la CM, el cual se transmite a la terminación nerviosa aferente para generar los impulsos nerviosos de adaptación lenta (figura 26) (Boulais y cols., 2009a; Marichich y cols., 2009, 2012; Maksimovic y cols., 2014). El  $\text{Ca}^{2+}$  es requisito para la liberación del neurotransmisor desde la

CM a la terminación nerviosa asociada (Boulais y cols., 2009a). Qué moléculas concretas intervienen en la comunicación entre la CM y la neurita para generar el impulso nervioso en ésta, aún no se conocen con claridad.



**Figura 26.** La deformación cutánea abre los canales de mecanotransducción en el aferente SA1 (1) para iniciar el potencial de acción al inicio del estímulo dinámico (2). La CM actúa de forma pasiva, a través de mecanismos independientes de Piezo2. La deformación cutánea activa simultáneamente los canales de mecanotransducción Piezo2-dependientes en las CMs (3), despolarizándolas, lo que se traduce en entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de activados por voltaje (CaV) (4) y liberación de neurotransmisores no identificados (5) que desencadenan el impulso sostenido (6). (Modificado de Maksimovic y cols., 2014).

En la mucosa oral, la distribución preferencial de las CMs en los sitios de contacto íntimo y directo con la lengua ha promovido la creencia de que pueden proporcionar información importante acerca de la posición de ésta (Ramieri y cols., 1992; Hilliges y cols., 1996; Kingsmill y cols., 2005).

## B. FUNCIÓN ENDOCRINA

Muchos autores han considerado que las CMs pueden contener sustancias capaces de actuar a largas distancias, en el medio ambiente cercano o incluso sobre ellas mismas. La existencia de células morfológicamente similares a las CMs pero sin conexión nerviosa, de morfología estrellada y con procesos citoplasmáticos ricos en gránulos secretores a modo de *procesos paracrinos* fomenta la idea de la existencia de diferentes subpoblaciones de CMs con funciones alternativas a la conocida de mecanorrecepción (Toyoshima y Shimamura, 1991; Ramieri y cols., 1992; Hillinges y cols., 1996; Tachibana y cols., 1984, 1997; Tachibana y Nawa, 2000, 2002). Como estos procesos citoplasmáticos se extienden hacia la lámina basal o entre los Qs, elementos dermales y epidermales pueden verse afectados a través de un

mecanismo de *secreción paracrina*. Además, las CMs presentan algunas características ultraestructurales en la membrana plasmática orientada hacia los Qs (densidades y bandas electrodensas). A través de un mecanismo de *secreción diacrina* (expulsión de la secreción directamente por paso simple a través de una célula), los gránulos neurosecretores pueden descargar su contenido por liberación gradual (García-Caballero y cols., 1988). La presencia de receptores para diferentes neuropéptidos en las CMs de roedores indican también que en sí mismas están influenciadas por neurosustancias (Tachibana y cols., 2001; Tachibana y Nawa, 2005). De este modo, alguno de los neuropéptidos que son liberados por los gránulos neurosecretores podría actuar de una manera *autocrina* sobre ellas mismas.

### **REGULACIÓN EN EL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE LA EPIDERMIS Y ANEJOS CUTÁNEOS**

Parece razonable suponer que los múltiples péptidos almacenados en la CM podrían afectar a las células vecinas, ya que algunas de estas sustancias ya ejercen efectos en otras células epidermales. Es el caso del CGRP, que influye sobre la función de presentación de antígenos por parte de la CL (Hosoi y cols., 1993); la dinorfina A, que produce un efecto de analgesia local tras su liberación bajo condiciones de rascado o inflamación (Weihe y cols., 1998); o el VIP y la sustancia P, que son capaces de promover el crecimiento y la diferenciación de varias células cutáneas como los Qs, los fibroblastos o las células endoteliales (Hartschuh y cols., 1984; Moll I. y cols., 2005).

Muchas CMs están localizadas en el área protuberante del folículo piloso, lugar de asentamiento para células madre o precursoras del mismo (Moll I., 1993; Narisawa y cols., 1994a; Sieber-Blum y cols., 2004; Pascucci y cols., 2006; Kobayashi y cols., 2010). La mayor función de las CMs aquí no es la de iniciar sensación táctil, sino más bien la de estimular células precursoras para iniciar una nueva fase de anagen por medio de sustancias tales como el VIP (Hartschuh y cols., 1983), factores de crecimiento como el NGF (Vos y cols., 1991) o diferentes citoquinas (Moll I., 1993; Narisawa y cols., 1994b).

La relación entre las CMs y las CLs es especialmente evidente en los folículos pilosos. Muchas de las CMs observadas en el estrato basal de la vaina folicular externa se relacionan mediante contacto directo con los cuerpos celulares de las CLs o bien por medio de

prolongaciones citoplasmáticas (Taira y cols., 2002). Debido a esta relación, se cree que las CMs, en colaboración con las CLs, puedan actuar en el mantenimiento y regulación de los folículos pilosos.

### ***INDUCCIÓN PARA EL DESARROLLO DE ELEMENTOS NERVIOSOS***

La aparición de las CMs en la epidermis y en los anejos cutáneos precede al crecimiento de las fibras nerviosas, así que las CMs podrían poseer también un importante papel en la inducción, promoción y desarrollo del plexo nervioso dermal superficial en las etapas fetales y en la arborización postnatal de las fibras nerviosas de tipo 1. Esta dependencia trófica puede, además, ser mutua, puesto que la pérdida de nervios cutáneos resulta en la degeneración de las CMs no inervadas (Pasche y cols., 1990; Narisawa y cols., 1992b, 1993b; Moll I. y Moll R., 1993).

Las CMs son capaces de expresar NGF *in vitro* y sus receptores *in vivo* (Ribeiro da Silva y cols., 1991; Vos y cols., 1991; Narisawa y cols., 1992b; English y cols., 1994). Esto indica que podrían proveer de información posicional a los nervios en formación para el crecimiento hacia ellas. Experimentos en anfibios y mamíferos han demostrado que, tras la resección nerviosa, las fibras en regeneración vuelven a conectar con las CMs nuevas o con las supervivientes en la epidermis (Tweedle, 1978; Scott y cols., 1981; Tachibana y Ishizeki, 1981). Así pues, las CMs son, aparentemente, *dianas* para los axones en desarrollo. La función mecanorreceptiva del complejo CM-neurita se hace operativa a partir de que la CM es alcanzada por la terminación nerviosa correspondiente (Scott y cols., 1981; Tachibana, 1995). Los neuropéptidos serían importantes en esta función diana, puesto que el número de gránulos neurosecretores se reduce tras el establecimiento de su inervación (Cheng-Chew y Leung, 1994).

### ***CÉLULAS DE MERKEL EN EL SISTEMA INMUNE CUTÁNEO***

Potenciales funciones inmunorreguladoras también se han sugerido para las CMs, si bien no se ha estudiado en profundidad. El hallazgo de consistente expresión de CD200 en las CMs, una proteína transmembrana que induce señales intracelulares que atenúan las reacciones



inflamatorias y promueven la tolerancia inmunológica, ha abierto la vía para un papel no conocido en los mecanismos de inmunidad (Woo y cols., 2010).

Otro hallazgo que sugiere el papel de las CMs en el sistema inmune cutáneo es su relación con las CLs, las células dendríticas presentadoras de antígenos que residen en la epidermis. Taira y colaboradores (2002) demostraron relaciones y contactos íntimos entre las CMs y las CLs. Teniendo en cuenta que los folículos pilosos pueden actuar como puertas de entrada de las CLs a la epidermis en la piel pilosa, en la piel glabra o lampiña son los grupos de CMs los que podrían cumplir esta función.

Al mismo tiempo, las CMs producen CGRP, un neuropeptido que es capaz de inhibir la presentación de antígenos por las CLs (Cheng-Chew y Leung, 1996). También producen otras sustancias que están implicadas en respuestas moduladoras de la inflamación, como la met-enkefalina (suprime o intensifica la respuesta según la dosis), el VIP (disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias), o dinorfinas y péptidos opiáceos (mitigan o regulan las sensación del dolor y la analgesia) (Gauweiler y cols., 1988; Cheng-Chew y Leung, 1996; Weihe y cols., 1998).

### ***LAS CÉLULAS DE MERKEL COMO PRECURSORAS DE LAS CÉLULAS GUSTATIVAS***

Esta teoría se basa en la similitud ultraestructural e inmunofenotípica que existe entre las CMs y las células basales de las yemas gustativas de los vertebrados inferiores y algunos reptiles (Toyoshima y cols., 1984; Toyoshima y Shimamura, 1988; Withear, 1989; Yoshie, 1999). No obstante, la similitud de estas células no es suficiente para justificar un nombre idéntico, ni para asumir funciones comparables.

### 3.2.8. OTROS ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LAS CMs.

#### **PROLIFERACIÓN**

Muchos estudios iniciales afirmaron que las CMs pueden proliferar durante la vida embrionaria pero que, sin embargo, no se dividen tras el nacimiento en condiciones normales. Moll R. y colaboradores (1984) describieron que la densidad de las CMs era alta en la piel plantar de los fetos humanos para luego ir disminuyendo hasta la edad adulta, lo que podría reflejar una capacidad reducida de las CMs para proliferar. La gran mayoría de las CM adultas no expresan *bromodeoxiuridina*, sustancia que sustituye a la timidina en el ADN de las células en división, indicando que estas células son incapaces de dividirse o que se dividen muy raramente (Vaigot y cols., 1987). Posteriormente, varios autores concluyeron que las CMs no son proliferativas en base a la inmunorreacción negativa al marcador de proliferación Ki-67 (Moll I. y cols., 1996a; Tachibana y Nawa, 2000; Tachibana y cols., 2000). Así pues, se deduce, *a priori*, que las CMs son células postmitóticas completamente diferenciadas como las del estrato espinoso de la piel o las células cromoafines intestinales o pulmonares.

No obstante, parece que las CMs realmente sí tienen capacidad para proliferar pero sólo bajo ciertas circunstancias anómalas y/o patológicas que producen su entrada en el ciclo celular activo y, por consiguiente, su división, de una manera similar a las células espinosas de la epidermis. Así, en la piel dañada crónicamente por radiación UV, en heridas, en trasplantes de piel y en la regeneración de los discos táctiles se han observado indicios de proliferación y regeneración (English, 1974; Tachibana e Ishizeki, 1981; Merot y Mooy, 1989; Moll I. y cols., 1990b; Righi y cols., 2006). Factores neuronales pueden ser los responsables de esta activación, ya que la reinervación de la piel lleva a una recuperación en el número de CMs (English, 1974, 1977b).

Recientemente, el factor de transcripción *Atoh1* se ha identificado como un factor clave en la generación de las CMs (Marchich y cols., 2009; Morrison y cols., 2009; van Kaymeulen y cols., 2009; Wright y cols., 2015). La determinación de las sustancias que influyen en su renovación ayudará a entender la patogenia del carcinoma de células de Merkel.

## **DIFERENCIACIÓN**

La inervación durante el desarrollo fetal y postnatal temprano está acompañada por un incremento notable de gránulos neurosecretores en las CMs. Posteriormente y una vez que se establece la inervación, los gránulos se reducen. Por ello, en un principio se sugirió que la inervación era importante en la maduración de las CMs (Ochiai y Suzuki, 1981; Cheng-Chew y Leung, 1994). Sin embargo, esto parece poco probable ya que las CMs se diferencian en ausencia de inervación en todos los tipos de piel y en la mucosa oral (Moll I. y cols., 1990a; Tachibana y cols., 2000; Kim y Holbrook, 2001). Así pues, la diferenciación de las CMs y la penetración de las fibras nerviosas sensoriales dentro de sus áreas diana finales ocurre independientemente. Es probable que exista cierta dependencia en cuanto a la localización corporal para la diferenciación, desarrollo y supervivencia de las CMs en los vertebrados (Kim y Holbrook, 2001). Más recientemente, se ha demostrado en ratones que el factor de transcripción *Sox2* es esencial para la diferenciación de las CMs, actuando previamente a *Atoh1* (Lesko y cols., 2013).

## **DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA**

La vida media de las CMs es desconocida. Nafstad (1984) reconoció tres poblaciones de CMs morfológicamente distintas en la piel madura de los mamíferos, sugiriendo un proceso secuencial de desarrollo, maduración y degeneración. Muchos estudios relacionaron la unión de la CM por el axón terminal con el hecho de que, probablemente, los nervios tenían una función trófica u otra función de soporte para la CM. Sin embargo, no todas las CMs están asociadas a un axón nervioso, lo que implica que no requieren necesariamente de sustento trófico por parte de los nervios cutáneos (Scott y cols., 1981; Narisawa y cols., 1993a, b; Narisawa y Khoda, 1995). Las CMs no inervadas se mantienen a partir de factores tróficos derivados de ellas mismas, de una manera autocrina. Así lo indica la existencia de receptores para neuropéptidos supuestamente liberados desde los gránulos citoplasmáticos (Tachibana y Nawa, 2005).

La sobreexpresión de *neurotrofina 3* (NT-3) incrementa el número de terminaciones nerviosas de Merkel, mientras que mutaciones en los genes que codifican para NT-3 y sus receptores actúan al contrario. Así pues, la NT-3 y sus receptores son importantes para la

supervivencia y maduración postnatal de las CMs en la piel pilosa (Tachibana y cols., 2001; Szeder y cols., 2003b; Sieber-Blum y cols., 2004) y en el paladar rugoso (Ichikawa y cols., 2001).

En conclusión, la cinética de la piel durante su etapa fetal y adulta favorece la noción de que las CMs son células postmitóticas bajo condiciones normales, que pueden activar su proliferación bajo condiciones anormales, que presentan una diferenciación dependiente del área corporal y que requieren para su supervivencia de factores tróficos derivados de las propias CMs, pero no de los nervios directamente. La controversia generada acerca de si la terminación nerviosa asociada es necesaria o no para la supervivencia de las CMs podría resolverse considerando que existen diferentes poblaciones, inervadas y no inervadas (Tachibana y Nawa, 2000, 2002). Es por esto que en los estudios de denervación cutánea no todas las CMs desaparecen (English, 1977b; Kurosumi y cols., 1979, Kurosumi, 2000).

### 3.3. LA CÉLULA DE MERKEL EN LA ETAPA FETAL Y PERINATAL

Las CMs muestran características morfológicas y citoquímicas particulares durante el desarrollo fetal, siendo algunas meras adaptaciones para desempeñar determinadas funciones durante esta fase.

#### 3.3.1. MORFOLOGÍA Y LOCALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL DURANTE EL DESARROLLO

La morfología de las CMs y su localización en el epitelio de la piel fetal puede variar mucho en función de la fase del desarrollo.

Las *CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS* generales de las CMs fetales (CMsF) incluyen procesos citoplasmáticos delgados y vesículas neuroendocrinas de núcleo denso (Moll R y cols., 1984; Moll I. y cols., 1986). En los estadios fetales tempranos del desarrollo humano aparecen como *células globulares y/o células dendríticas*. Normalmente, en la epidermis glabra predominan las CMs con morfología globular, redondeadas a ovals, aunque también se pueden observar CMs con grandes dendritas de hasta 20  $\mu\text{m}$  de longitud, dirigidas hacia la lámina basal y extendiéndose entre los Qs de alrededor (Moll R. y cols., 1984; Narisawa y cols., 1993a; Kim y Holbrook, 1995). En la piel pilosa también existen CMs globulares, si bien los fetos de más de 17 semanas presentan muchas CMs dendríticas con procesos citoplasmáticos cortos (Moll I. y Moll R., 1992; Narisawa y cols., 1994a; Kim y Holbrook, 1995). Con respecto a su *TAMAÑO*, tiende a incrementarse de una manera directamente proporcional a la progresión de la edad gestacional (Kim y Holbrook, 1995).

El resto de características morfológicas también dependen de la etapa de desarrollo fetal. Al principio, las CMsF presentan un citoplasma pálido y un núcleo claro que no contiene las lobulaciones típicas de los núcleos de las CMs adultas, los gránulos electrodensos suelen ser pocos, dispersos y sin ninguna localización concreta en la célula, y los filamentos intermedios son evidentes y similares a los tonofilamentos de los Qs. Cuando se establece la inervación, se produce un incremento en el número de gránulos electrodensos, especialmente en áreas del

citoplasma más basal, y los filamentos intermedios dejan de ser abundantes. Estas CMs aparecen casi maduras una semana después del nacimiento, con un núcleo lobulado, proyecciones espinosas bien desarrolladas y en contacto con grandes axones terminales (Ochiai y Sukuzi, 1981).

La *DISPOSICIÓN* de las CMsF es individualizada en una mayor proporción que las CMs adultas. Ocasionalmente pueden formar pequeños grupos o nidos, especialmente aquellas asociadas a las glándulas ecrinas de la piel plantar fetal (Moll R. y cols., 1984; Narisawa y Hashimoto, 1991; Narisawa y cols., 1993a). En los estadios fetales tempranos e intermedios, las CMsF presentan una *LOCALIZACIÓN* parabasal, mientras que en los estadios fetales tardíos la mayoría de las CMs exhiben una localización basal (Moll R. y cols., 1984; Hartschuh y cols., 1989b; Moll I. y Moll R., 1992; Narisawa y cols., 1992a; Kim y Holbrook, 1995).

Una característica importante en determinados momentos del desarrollo fetal es la presencia de CMs en la dermis superficial y en la unión dermoepidérmica. Estas *CMsF dermales* son fundamentalmente globulares, redondeadas u ovals, y sólo unas pocas exhiben dendritas cortas (Moll R. y cols., 1984; Moll I. y cols., 1986; Moll I. y Moll R., 1992; Narisawa y cols., 1994a; Kim y Holbrook, 1995).

### **3.3.2. PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS CÉLULAS DE MERKEL DURANTE EL DESARROLLO**

Existen variaciones en la expresión de determinados polipéptidos en función de la etapa del desarrollo estudiada:

1. En fetos humanos, las CMs se pueden reconocer por medio de anticuerpos específicos para *CITOQUERATINAS* (CKs) de epitelio simple, como las CKs 7, 8, 18, 19 y 20, siendo esta última expresada por las CMsF mucho antes que cualquier otra CK (Moll R. y cols., 1984; Moll I. y cols., 1986; Moll I. y Moll R., 1992; Narisawa y cols., 1992a). Al contrario que en las CMs adultas, las CMsF no sólo contienen CKs de epitelios simples sino también de epitelios estratificados, como la CK5. Además, las CMsF presentan una expresión distinta de CKs entre las células epidérmicas y las dérmicas (Narisawa y cols, 1992a).

2. La expresión de la *CROMOGRANINA A* (CgA) aparece sobre la undécima semana de la gestación, sugiriendo que la CM ya es funcional, y normalmente precede a la expresión de los otros neuropéptidos. Las CMsF presentan una expresión variable durante el desarrollo respecto al contenido en CgA, más fuerte en la piel fetal de fases tardías del desarrollo (Hartschuh y cols., 1989a, b, 1990).
3. Las CMsF en la piel humana muestran una clara inmunorreacción a *ENOLASA NEURONAL ESPECÍFICA* (NSE) y una débil inmunorreacción a *BOMBESINA*. Esta inmunorreactividad para bombesina se pierde en la piel adulta de las mismas localizaciones, si bien la inmunorreacción para NSE permanece (Gould y cols., 1985).
4. Usando técnicas de microscopía inmunoelectrónica, Cheng-Chew y Leung (1994) estudiaron la presencia del péptido opioide *METENCEFALINA* en ratones en desarrollo. Observaron que la metencefalina se localizaba en la región de los gránulos de núcleo denso de las CMs, inervadas y no inervadas, durante todo el desarrollo y que la intensidad de marcado era significativamente más alta en las CMs de ratones fetales que en los ratones postnatales.
5. Las CMs del hombre y del cerdo en todos los estadios del desarrollo también expresan inmunorreacción positiva para *PANCREASTATINA*, distribuyéndose homogéneamente por todo el citoplasma y en co-expresión con la CgA (Hartschuh y Weihe, 1989).
6. Las CMsF humanas expresan el *RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO* (NGF-r). Aproximadamente el 90% de las CMs dermales y el 60% de las CMs en la interfase dermo-epidérmica expresan NGF-r en la semana 16 del desarrollo fetal, mientras que las epidermales y foliculares no (Narisawa y cols., 1992b; Moll I., 1993).
7. Hansson y colaboradores (2000) demostraron la expresión de *TRANSPORTADORES DE SEROTONINA* durante la gestación y el desarrollo postnatal temprano en la rata, sugiriendo un posible papel de las CMs en la regulación de los niveles de la serotonina extracelular durante este periodo.

Otras inmunorreacciones a diferentes anticuerpos se muestran en la tabla 14:

Tabla 14. Resumen de las diferentes sustancias expresadas por las CMsF en las diferentes especies.

ESPECIE	Ck5 Ck7 Ck8 Ck18 Ck19 Ck20 EMA CgA NSE S100 PGP9.5 NGF-R Metencefalina VIP CGRP Sustancia P Bombesina Pancreastatina p27 EMA	REFERENCIA
Rata	•	Nindl y cols., 1991
	• •	Tachibana y cols., 1997
	• • •	Tachibana y Nawa, 2000
	• • •	Tachibana y cols., 2000
Gerbo	• •	Tachibana y cols., 1997
Ratón	•	Cheng-Chew y Leung, 1994
Cerdo	•	Hartschuh y Weihe, 1989
	•	Hartschuh y cols., 1989a
	• • •	Hartschuh y cols., 1989b
Humano	• • •	Moll R. y cols., 1984
	• • • •	Gould y cols., 1985
	• • •	Moll I. y cols., 1986
	•	Hartschuh y Weihe, 1989
	•	Hartschuh y cols., 1989a
	• •	Moll I. y cols., 1990a
	• •	Narisawa y Hashimoto, 1991
	• •	Moll I. y Moll R., 1992
	• • • • • •	Narisawa y cols., 1992a
	•	Narisawa y cols., 1992b
	• •	Moll I., 1993
	• •	Moll I. y Moll R., 1993
	• • •	Narisawa y cols., 1993a
• •	Kim y Holbrook, 1995	



### **3.3.3. DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL DURANTE EL DESARROLLO**

Las CMs durante el desarrollo fetal comparten similares localizaciones que durante la edad adulta pero en un mayor número. Además, los fetos presentan numerosas CMs dermales, asociadas a las glándulas ecrinas plantares y en el lecho ungular.

#### ***CÉLULAS DE MERKEL EN LA PIEL PILOSA EN DESARROLLO***

Al igual que en los adultos, las CMsF se extienden por la piel pilosa del cuerpo asociadas a los *discos epidermales* y los *folículos pilosos* en formación, incluyendo los pelos especializados (English, 1977a; Pasche y cols., 1990; Moll I., 1993; Narisawa y cols., 1993b; Kim y Holbrook, 1995). Además, Narisawa y colaboradores (2000) demostraron que las CMsF se desarrollan transitoriamente en la *epidermis interfolicular*; después del nacimiento desaparecen rápidamente. Esta localización se ha visto de manera muy ocasional en humanos adultos (Moll I. y cols., 1990b; Lacour y cols., 1991).

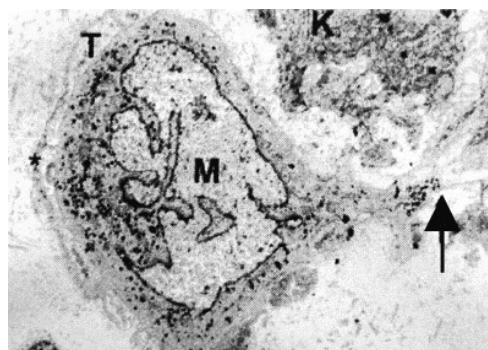
En los folículos pilosos tempranos, las CMsF se asientan en el estrato basal de la vaina epitelial externa del infundíbulo, no en las áreas más profundas. En fases tardías del desarrollo también están presentes en el istmo y en el área protuberante del folículo piloso. Las CMsF dendríticas son más abundantes en las partes más profundas y en la glándula sebácea en desarrollo. No se observan CMsF dermales alrededor de los folículos pilosos en desarrollo, sólo muy raramente en zonas cercanas al infundíbulo (Pasche y cols., 1990; Moll I., 1993; Narisawa y cols., 1993b; Kim y Holbrook, 1995).

#### ***CÉLULAS DE MERKEL EN LA PIEL GLABRA EN DESARROLLO***

Las CMsF se encuentran agrupadas en la base de las crestas glandulares de la piel plantar y palmar, donde también se observan numerosas CMsF dermales (Moll R. y cols., 1984; Gould y cols., 1985; Moll I. y cols., 1986, 1990a; Kim y Holbrook, 1995). Las glándulas ecrinas y el lecho de la uña en desarrollo también presentan muchas CMsF (Moll I. y Moll R., 1993; Narisawa y cols., 1993a).

### ***CÉLULAS DE MERKEL EN LA UNIÓN DERMOEPIDÉRMICA EN DESARROLLO***

En la zona de la membrana basal se observan CMsF mostrando delgados procesos citoplasmáticos, tanto hacia la dermis como hacia la epidermis (figura 26). Además, algunas CMsF del estrato basal parecen protruir hacia la dermis, es decir, algunas de ellas parecen estar localizadas con sus cuerpos celulares parcialmente en la epidermis y parcialmente en la dermis (Moll R. y cols., 1984; Moll I. y cols., 1986; Narisawa y cols., 1992a; Kim y Holbrook, 1995; Halata y cols., 2003). Estos hallazgos sugieren que durante el desarrollo fetal las CMs migran desde un compartimento a otro, pero no permite definir una dirección concreta de este movimiento.



**Figura 27.** Prolongación citoplasmática penetrando la membrana basal y en contacto con un queratinocito del estrato basal de la epidermis felina. K = queratinocito; M = células de Merkel; T = terminación nerviosa (Modificado de Halata y cols., 2003).

### ***CÉLULAS DE MERKEL EN LA DERMIS EN DESARROLLO***

Las CMsF dermales son muy frecuentes y aparecen aisladas e íntimamente asociadas con pequeños nervios no mielinizados (Moll R. y cols., 1984; Moll I. y cols., 1986; Moll I. y Moll R., 1992; Narisawa y cols., 1992a, b; Kim y Holbrook, 1995). Se ha llegado a estimar que en los fetos humanos de 17 semanas, el 17% del total de las CMs cutáneas son dermales; en la semana 14 sólo el 3.9% son dermales, incluyendo algunas que parecen estar en proceso de atravesar la unión dermo-epidérmica (Moll I. y cols., 1986). Esto pone de manifiesto que las CMs en los fetos sólo están situadas en la dermis de una manera transitoria, para cumplir alguna determinada función en esta etapa del desarrollo.

## ***CÉLULAS DE MERKEL EN LAS MUCOSAS EN DESARROLLO***

Tachibana y colaboradores (2000) demostraron la presencia de CMsF en la mucosa palatina de ratas, en estratos basales del epitelio de forma similar a las células en etapas adultas. Al contrario de los que ocurre en piel en desarrollo, parece que estas células se desarrollan postnatalmente, presentando una morfología dendrítica.

### **3.3.4. DESARROLLO FETAL DE LAS CÉLULAS DE MERKEL**

Las CMsF epidermales humanas son visibles con anticuerpos frente a CK20 sobre la semana fetal 8<sup>a</sup>; con anticuerpos frente a otras CKs de epitelio simple en las semanas fetales 10<sup>a</sup>-12<sup>a</sup>. Las CMsF dermales no aparecen hasta las semanas 13<sup>a</sup>-14<sup>a</sup>. La mayor densidad de CMsF se describe a las 20-24 semanas de edad. Posteriormente, su número disminuye considerablemente con el incremento de la edad gestacional.

## ***DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DE MERKEL EN LA PIEL PILOSA***

### ***DESARROLLO DE LOS DISCOS TÁCTILES***

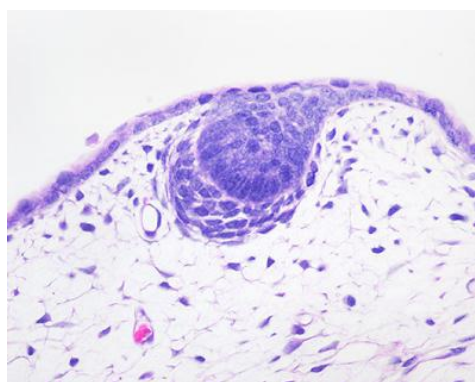
La aparición de los discos táctiles primordiales ocurre independientemente a la del pelo, en la semana 18<sup>a</sup> del desarrollo fetal humano (Moll I., 2000). Existe un ciclo secuencial bien definido en el desarrollo de un disco táctil. Primero, las CMs y células de apariencia transicional aparecen en la epidermis antes de que el primordio de un disco se eleve con respecto a la superficie epidermal. No se observan nervios en este primer momento y la piel carece de pelo casi totalmente. Después el disco comienza a formarse como un pequeño engrosamiento epidermal, para finalmente producirse la unión de las terminaciones nerviosas con las CMs de la base. Postnatalmente aumenta el diámetro y grosor para adquirir su tamaño adulto (tabla 15). Las propias CMs pueden estimular parcialmente la proliferación de los Qs. (Lyne y Hollis, 1971; English, 1977a; Moll I. y cols., 1993; Moll I., 2000; Suzuki y cols., 2000).

Tabla 15. Evolución del diámetro medio de los discos táctiles en la piel pilosa de ratas (según English, 1977a).

Estadio del desarrollo	Diámetro medio de un haarscheibe
Recién nacido	95 $\mu\text{m}$
7 días postnatales	150 $\mu\text{m}$
13 días postnatales	208 $\mu\text{m}$
23 días postnatales	214 $\mu\text{m}$
Adulto	217 $\mu\text{m}$

### DESARROLLO DE LAS CMs EN LOS FOLÍCULOS PILOSOS

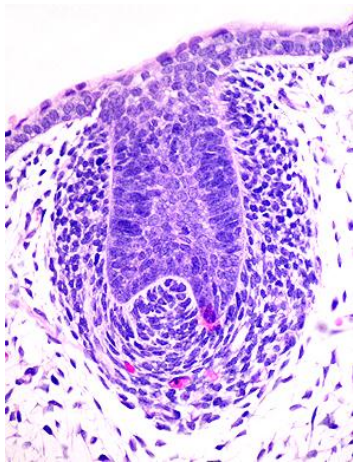
En la piel pilosa, las CMsF aparecen en la semana 10<sup>a</sup>-11<sup>a</sup> del desarrollo fetal humano, en el periodo donde el folículo piloso es sólo una pequeña invaginación bulbosa de la epidermis. Entre las semanas 11<sup>a</sup>-13<sup>a</sup> su número aumenta y se observan en los primordios de los pelos y de los clavos epidermales. Ya en la piel fetal de 14 semanas se observan agregados de CMsF en el infundíbulo piloso principalmente, aunque también aparecen unas pocas células dispersas en otras partes del folículo y de las áreas interfoliculares. A partir de la semana 17<sup>a</sup>-18<sup>a</sup> de gestación, las CMsF comienzan a formar agregados dispuestos a modo de anillo o cinturón en el infundíbulo y grupos densos en la protuberancia pilosa. Después, su número comienza a decrecer. En la semana 20<sup>a</sup> ya están concentradas en la región protuberante y en el infundíbulo, con la disposición típica (Moll I., 1993; Narisawa y cols., 1993b; Kim y Holbrook, 1995). Un pequeño número de CMsF individualizadas y dispersas puede persistir en las áreas interfoliculares (Kim y Holbrook, 1995).



**Figura 28.** Primordio de folículo piloso en piel canina fetal. 20x. HE.

### **DESARROLLO DE LAS CMs EN LOS PELOS ESPECIALIZADOS**

Las vibrisas de los mamíferos son los primeros pelos que se desarrollan en la piel embrionaria. Las CMsF aparecen organizadas a modo de anillo alrededor del infundíbulo en el día 15° de gestación y a modo de manguito o cinturón cilíndrico en la región engrosada del folículo sobre el día 16°. Al nacimiento, las CMs del infundíbulo están innervadas y bien desarrolladas comprendiendo alrededor de 100 CMs/collar, mientras que un manguito simple contiene sobre 600 células, bastante menos que en un adulto (Zelená, 1994).



**Figura 29.** Primordio de vibrisa en piel canina fetal. 20x. HE.

### **DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DE MERKEL EN LA PIEL GLABRA**

En la piel glabra humana, las CMs se detectan por vez primera en la epidermis de los fetos de 8-12 semanas de edad. La densidad se incrementa rápidamente alcanzando un máximo en la semana 12<sup>a</sup>-20<sup>a</sup> del desarrollo. Algunas de ellas aparecen en la dermis en los fetos de 15 semanas de gestación. Posteriormente, la densidad disminuye considerablemente con el incremento de la edad gestacional (Moll R. y cols., 1984; Moll I. y cols., 1986; Narisawa y Hashimoto, 1991; Moll I. y Moll R., 1992, 1993; Narisawa y cols., 1992a, b; Kim y Holbrook, 1995).

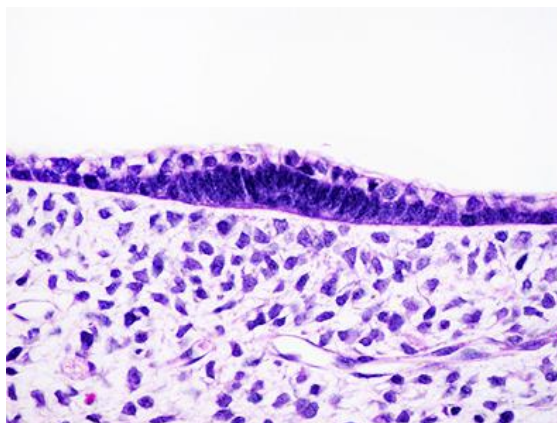
Un tipo especial de piel glabra es la matriz de la uña. Aquí se distinguen CMsF en un número mayor que durante la vida adulta, desde la semana 9<sup>a</sup> del feto hasta aproximadamente la semana 22<sup>a</sup>. Luego su número decrece (Moll I. y Moll R., 1993).

### **DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DE MERKEL EN LA DERMIS**

En la dermis de la piel glabra fetal humana, las CMs comienzan a aparecer entre la semana 11<sup>a</sup> y la 13<sup>a</sup> del desarrollo, aunque es en los fetos de más de 14 semanas donde son más fácilmente distinguibles por su mayor densidad. Se localizan en la dermis superficial próximas a la unión dermo-epidérmica. Desaparecen paulatinamente después de la semana fetal 20, quedando ya muy pocas al final de la gestación (Moll R. y cols., 1984; Gould y cols., 1985; Moll I. y cols., 1986; Narisawa y Hashimoto, 1991; Narisawa y cols., 1992a, b; Kim y Holbrook, 1995).

### **DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DE MERKEL EN LAS MUCOSAS**

Existen muy pocos trabajos que estudien el desarrollo de las CMs en las mucosas de los mamíferos. Tachibana y cols. (2000) y Tachibana y Nawa (2000) mostraron que las CMs en la mucosa palatina de la rata se diferencian postnatalmente, tras el desarrollo de las terminaciones nerviosas periféricas. Las CMs emergen primero en la mayoría de las rugosidades palatinas en el 4<sup>o</sup> día postnatal y aumentan gradualmente en número hasta el día 21<sup>o</sup>. En la parte posterior del paladar duro, las primeras células emergen el día postnatal 10<sup>o</sup> e incrementan en número hasta el día 28<sup>o</sup> (Tachibana y Nawa, 2000). En la mucosa del esófago, las primeras células similares a CMs aparecen en la semana 13<sup>a</sup> de gestación (Schulz y cols., 2003).



**Figura 30.** Cresta epitelial en formación en el paladar duro canino. 20x. HE.

## **DESARROLLO DE LA INERVACIÓN**

Las CMs epidermales y foliculares en los mamíferos se diferencian inicialmente sin inervación. Actúan como células diana para las terminaciones nerviosas en crecimiento que penetran en la epidermis, atrayendo a los axones en crecimiento por medio de la liberación determinadas sustancias como el NGF (Ochiai y Suzuki, 1981; Scott y cols., 1981; Pasche y cols., 1990; Vos y cols., 1991; Zelená, 1994; Shimohira-Yamasaki y cols., 2006). Aún así, algunas CMs permanecen sin inervación (Zelená, 1994, Tachibana y cols., 1997).

Inicialmente, pequeñas terminaciones axonales hacen contacto con una CM en varios puntos de su superficie. Durante la posterior maduración, las CMs comienzan a estar inervadas cada una por una terminación simple que cubre la mitad de la superficie celular, normalmente en el lado dermal de la célula. Consecutivamente, las vesículas o gránulos de núcleo denso se acumulan en la CM a lo largo de su contacto con la terminación nerviosa, mientras que las características espinas se desarrollan en el lado opuesto de la célula contactando con la superficie de los Qs (Ochiai y Suzuki, 1981; Zelená, 1994).

### **3.3.5. FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS Y EL DESARROLLO FETAL.**

En los tejidos fetales, las funciones de las CMs van encaminadas hacia un efecto paracrino sobre el desarrollo de estructuras vecinas como las crestas epidermales y glandulares, los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y los plexos nerviosos dermales (Tachibana y Nawa, 2000, 2002).

## **PARTICIPACIÓN EN LA FORMACIÓN DE ANEJOS CUTÁNEOS**

Las CMs durante la etapa fetal en humanos son muy numerosas en las crestas epidermales glandulares (en la piel plantar y palmar), en los primordios de los folículos pilosos y en el lecho de la uña, pudiendo contribuir a la formación de estas estructuras y al crecimiento de las glándulas sudoríparas (Moll R. y cols., 1984, 1986; Moll I. y Moll R., 1992, 1993;

Narisawa y cols., 1993a). Péptidos con capacidad de inducir proliferación, como la sustancia P (Nilsson y cols., 1985), el VIP (Hartschuh y Weihe, 1988), el NGF (Vos y cols., 1991) y la bombesina (Gould y cols., 1985), están presentes en las CMsF.

Por otro lado, las CMsF en la protuberancia folicular pueden también estar implicadas en el desarrollo de estructuras adyacentes, como los nervios perifoliculares y los músculos piloerectores. Se ha observado una correlación topográfica entre la inserción epidermal y folicular de los músculos erectores y las CMs dermales y epidermales. Esto permite la especulación de que las CMsF participan en la inducción y el alineamiento correcto de los músculos piloerectores, puesto que éstos contienen nervios periféricos que serían “atraídos” por las CMs foliculares y epidermales (Narisawa y cols., 1993b, 1996; Kim y Holbrook, 1995).

### **“CÉLULAS DIANA” PARA NERVIOS**

El concepto de una función paracrina de las CMsF está además en línea con la idea de que pueden actuar como estructuras *diana* para el crecimiento de las fibras nerviosas hasta la epidermis. Que la expresión del NGF-r en las CMsF dermales preceda a su unión con pequeños nervios sustenta esta hipótesis (Pasche y cols., 1990; Narisawa y cols., 1992b), así como la formación de sinapsis entre fibras nerviosas y CMs en cultivos celulares (Shimohira-Yamasaki y cols., 2006). La desaparición de las CMs dermales durante los estadios fetales tardíos reflejaría una pérdida de esta función (Moll R. y cols., 1984, 1986; Moll I. y Moll R., 1993).

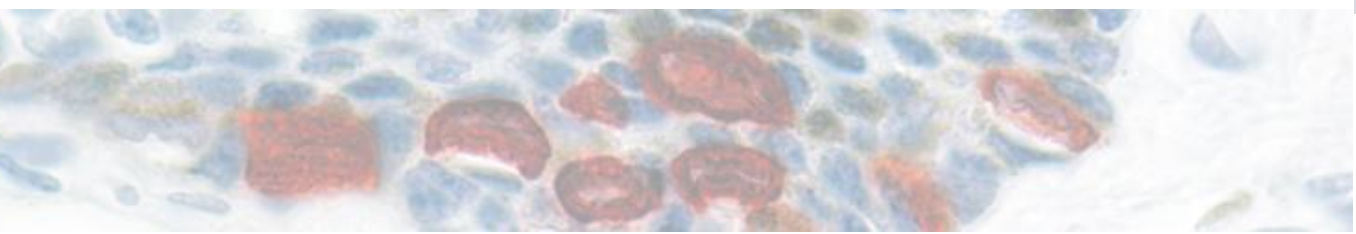
Además, parece posible que las CMs no sólo actúen sobre los nervios mecanosensoriales, sino también sobre otras estructuras nerviosas. Si se considera que las CMsF epidermales producen NGF (Vos y cols., 1991) y que las CMsF dermales expresan el NGF-r antes de hacer conexión con los nervios (Narisawa y cols., 1992b), las CMsF situadas en los alrededores de los folículos pilosos, de las glándulas ecrinas en formación y en el compartimento dermal superficial atraen a los nervios en crecimiento a estos lugares logrando así el desarrollo de los plexos nerviosos perifolicular, periglandular y subepidermal, respectivamente.





# 4 ESTUDIOS REALIZADOS

---





**4.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL EN LA PIEL  
CANINA MEDIANTE MÉTODOS HISTOQUÍMICOS**



### **Introducción.**

Con la tinción de rutina de HE, las CMs no presentan características claramente distintivas con otras células claras de la epidermis. Para su correcta identificación con microscopía óptica es necesario recurrir a tinciones especiales. En la literatura médica, existen escasas referencias acerca de la utilidad de las tinciones histoquímicas para la detección de las CMs, como el azul de metileno, el ácido peryódico de Schiff (PAS) o tinciones de impregnación de plata (Ranvier, 1877; Retzius, 1894; Dogiel, 1903; Miller y cols., 1958; Lyne y Hollis, 1971; Winkelmann, 1977, 1982). La *tinción argirofílica de Grimelius* (Grimelius, 1968) es una impregnación argéntica con reducción del nitrato de plata por medio de la adición de hidroquinona. Es la técnica histoquímica con la que mejores resultados se ha obtenido respecto a la identificación de las CMs normales y neoplásicas (Tateishi y cols., 1974; Gould y cols., 1985; Zaccone, 1986). A pesar de que algunas de estas técnicas se han testado en diferentes especies animales, a nuestro entender no existen referencias específicas en la especie canina.

El objetivo del presente estudio fue evaluar diferentes métodos histoquímicos rutinarios comunes en laboratorios de histopatología para determinar cuál o cuáles son útiles para la identificación de las CMs en la piel del perro.

### **Material y Métodos.**

Para comprobar la utilidad de varias técnicas histoquímicas rutinarias en la identificación de las CMs en la piel del perro, se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor a partir de muestras de piel facial, incluyendo vibrisas, labio superior, trufa, cojinetes plantares y mucosa de paladar duro de seis perros adultos sanos fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina, usando un microtomo Leica RM 2135 (Leica Instruments GMBH, Nussloch, Alemania). Las secciones histológicas fueron secadas 30 minutos en estufa a 60° C y desparafinadas, previamente a la aplicación de las siguientes tinciones en las condiciones que se describen:

### Métodos de impregnación de plata

En las secciones tisulares, la mayoría de las células neuroendocrinas captan iones de plata derivados del nitrato de plata o de la plata amoniacal en solución. La **argirofilia** es la propiedad que poseen determinadas estructuras tisulares de precipitar estos iones a plata metálica por acción de un agente reductor externo. Esta reacción es causada por la cromogranina A de los gránulos. La **argentoafinidad** es la propiedad que tienen algunos tejidos de reducir el nitrato de plata amoniacal a plata metálica sin intervención de agentes reductores externos. La reacción argentafín resulta de los productos de aldehídos y aminas biógenas (Wilson y Chalk, 1996).

La **tinción argirofílica de Grimelius** es una impregnación argéntica con reducción del nitrato de plata por medio de la adición de hidroquinona.

<b>Método argirofílico de Grimelius</b>	
Desparafinar e hidratar	
Solución de nitrato de plata a 58° C.....3 h (precalentar 1 h antes)	
Tras 2 h preparar dos recipientes con solución reductora y precalentar en estufa a 58° C	
Preparar una segunda solución de nitrato de plata y mantenerla a Tª ambiente y en oscuridad	
Solución reductora a 58° C.....10 min	
Aclarar en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Tiosulfato sódico al 5%.....2 min	
Aclarar en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Solución de nitrato de plata a Tª ambiente.....10 min	
Solución reductora a 58° C.....1 min	
Aclarar en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Verde metilo acidificado al 1%.....4 min	
Aclarar en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Deshidratar, aclarar en xilol y montar	
<b>Solución de Plata</b> Tampón Acetato 0.2M.....5 ml Nitrato de Plata acuoso al 1%.....3.5 ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> .....43.5 ml  <b>Tampón Acetato 0.2M (pH 5.6)</b> Solución de ácido acético.....11 ml Ácido acético.....0.6 ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> hasta un volumen de 50 ml Solución de acetato sódico.....89 ml Acetato sódico.....6.8 g H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> hasta un volumen de 250 ml	<b>Solución Reductora</b> Hidroquinona.....0.5 g Sulfito sódico.....2.5 g H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> .....100 ml  <b>Tiosulfato de sodio al 5%</b> Tiosulfato sódico.....25 gr H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> .....500 ml  <b>Verde metilo acidificado al 1%</b> Verde metilo.....1 g H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> .....99 ml Ácido acético glacial.....1 ml

Demuestra gránulos argirófilos en el citoplasma con una coloración marrón oscuro a negro, uniformes en tamaño, que corresponden a los gránulos neurosecretores. La cromatina nuclear es verde brillante y el citoplasma celular y el tejido conectivo aparecen amarillo-verdoso. Como tejido control de la técnica se usó la médula adrenal.

Como la melanina presente en el tejido puede ser confundida con gránulos teñidos positivamente debido a su coloración similar, los cortes que presentaban cantidades abundantes de melanina fueron sometidos a un pretratamiento de *blanqueo*:

<b>Método de eliminación de la melanina</b>	
Desparafinar e hidratar	
Solución de permanganato potásico al 0.25%.....	30 m - 2 h según la cantidad de pigmento
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Solución de ácido oxálico al 5%.....	5 m o hasta que las secciones aparezcan claras
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	

El *método argentafin de Fontana-Masson* es una impregnación argéntica en dos tiempos, en la cual el amoniaco realiza la primera reducción del nitrato de plata a óxido diaminoargéntico y el tejido la segunda, precipitándose plata metálica sobre las granulaciones dotadas de capacidad reductora. Los gránulos argentafines se observan de color negro y los núcleos de coloración rosa. El control interno de la técnica estuvo representado por la melanina presente en las secciones.

<b>Fontana-Masson para células argenorreductoras</b>	
Desparafinar e hidratar	
Solución de Fontana-Masson a 58 °C.....	1 h en oscuridad
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Cloruro de oro al 0.2%.....	5 m
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Hiposulfito sódico al 5%.....	2 m
Lavado en H <sub>2</sub> O corriente	
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Contraste con rojo fino nuclear si se desea.....	5 m
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Deshidratar, aclarar en xilol y montar	



*Reacciones de metacromasia*

La **metacromasia** es la propiedad de ciertas estructuras titulares de teñirse de un color diferente al de la solución de tinción de algunos colorantes. Muchas células neuroendocrinas presentan una metacromasia enmascarada. Esta característica puede ser revelada mediante un tratamiento previo por hidrólisis con ácido caliente, lo que libera los grupos carboxilos de los polipéptidos quedando libres para reaccionar y producir cambios de color con colorantes básicos como el azul de toluidina (Wilson y Chalk, 1996). Los métodos para demostración de metacromasia utilizados fueron los siguientes:

<b>Método de desenmascaramiento de la Metacromasia</b>	
Desparafinar e hidratar	
Hidrolizar en HCL 0.2 M a 60° C.....3-4 h	
Lavar bien en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Teñir en Azul de Toluidina o Giemsa	
<b>Azul de Toluidina</b>	<b>Tinción de Giemsa</b>
Desparafinar e hidratar	Desparafinar e hidratar
Azul de Toluidina.....15 s	1ml H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> + 1 gota reactivo Giemsa.....25 m
Alcohol 96°.....2 pases rápidos	Alcohol 96°.....2 pases rápidos
Alcohol 100°.....1 m (x2)	Alcohol 100°.....1 m (x2)
Xilol.....2 m (x2)	Xilol.....2 m (x2)

Los gránulos que presenten metacromasia se observan de coloración roja-violácea y el resto del tejido aparece azul. El control interno de la técnica lo constituyeron los mastocitos.

*Tinción del Ácido Peryódico de Schiff (PAS)*

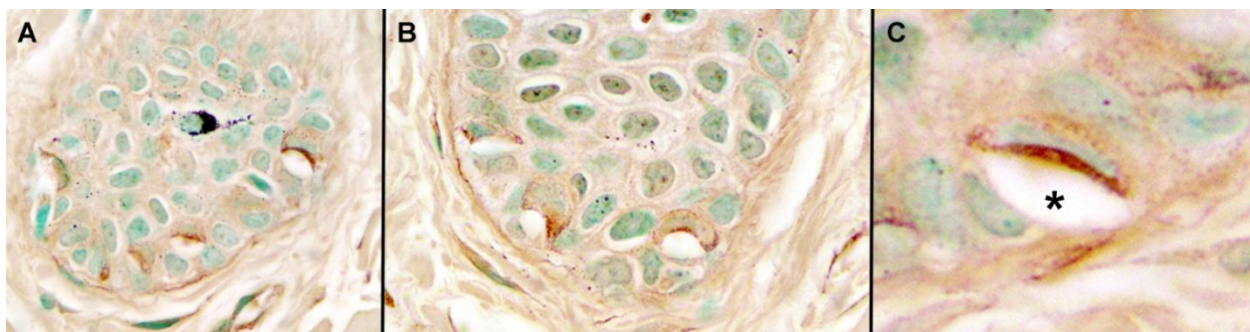
Consiste en oxidar los tejidos mediante ácido peryódico para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) presentes en ellos, de forma que puedan ser demostrados posteriormente mediante el reactivo de Schiff.

<b>Tinción del Ácido Peryódico de Schiff</b>	
Desparafinar e hidratar	
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Ácido peryódico al 0.5%.....	5 m
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Reactivo de Schiff.....	15 m
Lavado en H <sub>2</sub> O corriente.....	10 m
Hematoxilina de Harris.....	6 m
Lavado en H <sub>2</sub> O corriente.....	10 m
Deshidratar, aclarar en xilol y montar	

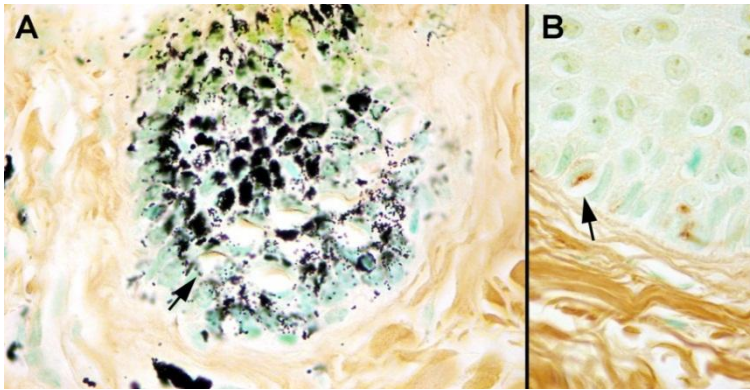
El material PAS positivo se observa de color rojo oscuro a magenta y los núcleos celulares azules. El control interno de la técnica en la piel canina lo constituyen estructuras como la membrana basal y las glándulas sudoríparas apocrinas.

**Resultados.**

Con la tinción argirofílica de Grimelius, en el estrato basal de la mucosa labial y del paladar duro (figura 1), en el estrato basal de la epidermis de la trufa y de los cojinetes plantares (figura 2) y en la vaina folicular externa de las vibrisas (figura 3) y de escasos folículos primarios de la piel facial (figura 4), se observaron escasas células redondeadas, ovaladas o alargadas con tinción citoplasmática granular, con una coloración marrón oscuro mayoritariamente.

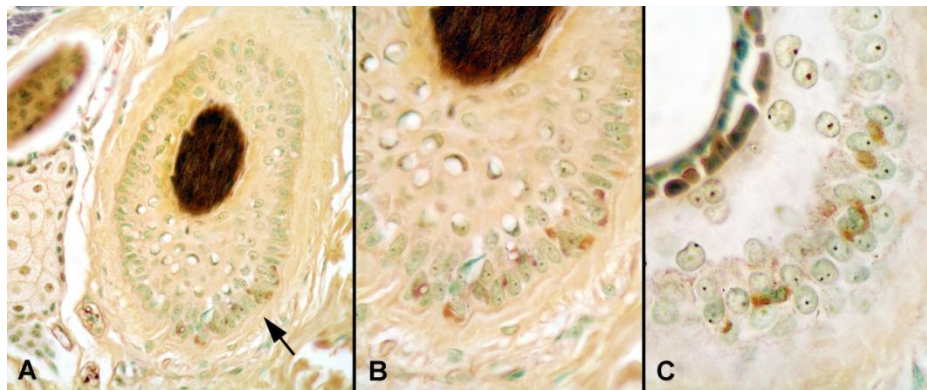
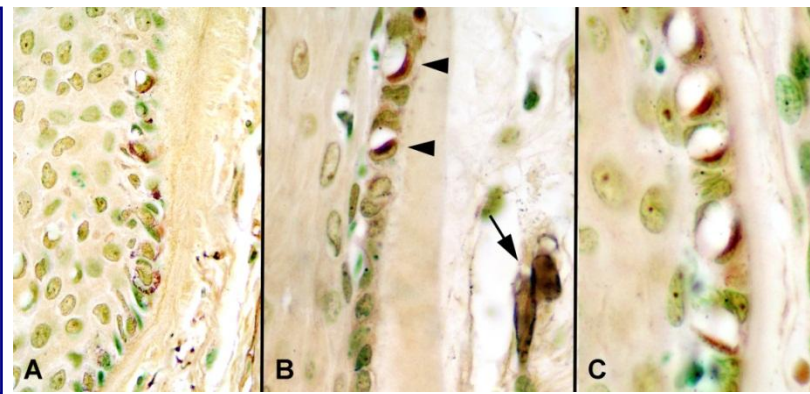


**Figura 1.** MUCOSA. CMs teñidas con tinción argirofílica de Grimelius en la base de una papila epitelial en mucosa labial (A y C) y paladar duro (B). La tinción es expresada mayoritariamente en la porción citoplasmática en contacto con la terminación nerviosa, que aparece vacuolizada por artefacto (C, asterisco). 40x (A, B), 100X (C).



**Figura 2. PIEL LAMPIÑA.** (A) Sección de trufa sin blanquear. Nótese un grupo de CMs con leve tinción citoplasmática basal en el fondo de una papila epitelial. El axón se muestra vacuolizado (flecha). 40x. (B) CMs en el estrato basal de la epidermis en almohadilla plantar. La tinción está polarizada hacia la base de la célula (flecha). Tinción de Grimelius, 40x.

**Figura 3. VIBRISAS.** Típicos agregados de CMs en la vaina epitelial externa. (A) Varias CMs mostrando tinción positiva. 40x. (B) No todas las CMs se tiñen con la técnica; en aquellas positivas se distingue tinción polarizada en el citoplasma adyacente a la terminación nerviosa (cabeza de flecha). También los nervios dérmicos son teñidos (flecha). 40x. (C) detalle de la reacción. 100x.



**Figura 4. FOLÍCULOS PILOSOS.** (A) Sección de piel facial. En la vaina folicular externa de escasos folículos primarios, pequeños grupos de CMs mostraban tinción positiva granular en el citoplasma (flecha). 20x. (B) y (C) Detalle de dos folículos primarios distintos con pequeños agregados de CMs positivas. 40x.

En muchos casos, esa reacción tendía a manifestarse polarizada hacia la porción citoplasmática que contacta con la terminación nerviosa, la cual frecuentemente aparecía como una vacuolización clara (artefacto), de forma similar a lo que ocurre en las secciones

histológicas convencionales con HE. Muchas terminaciones nerviosas libres y nervios mielinizados de la dermis y de áreas parafoliculares también mostraban una intensa tinción.

El resto de técnicas utilizadas fallaron para identificar células intraepidérmicas compatibles morfológicamente o por localización con CMs. La correcta realización de cada una de estas técnicas fue confirmada mediante positividad en los controles internos.

### ***Discusión.***

La CM se demostró por vez primera mediante una técnica no-específica de *ácido de osmio* (Merkel, 1875). Posteriormente, existen escasas referencias con otros tipos de tinción, como cloruro de oro, azul de metileno, ácido peryódico de Schiff (PAS) o tinciones de plata. Sin embargo, estas técnicas no siempre demuestran la CM propiamente dicha, sino que muestran la expansión axonal intraepitelial en contacto con ella; la célula se identifica como un halo claro sobre la terminación nerviosa discoidal teñida (Winkelman y Breathnach, 1973). Con la aparición y desarrollo de las técnicas de tinción inmunohistoquímica en los años 80, todos estos métodos pronto quedaron obsoletos. Nuestros resultados demuestran que las CMs de la piel del perro pueden identificarse con el método argirofílico de Grimelius. La tinción básicamente aparecía concentrada en la porción citoplasmática más próxima a la localización de la terminación nerviosa adyacente, lo que sugiere que la reacción está orientada sobre los gránulos neurosecretorios. Sin embargo, el número de células positivas es muy inferior al que se puede observar con los marcadores inmunohistoquímicos sobre las mismas muestras. Teniendo en cuenta la dificultad metodológica de esta técnica y su menor sensibilidad para la detección de CMs respecto a los métodos inmunohistoquímicos, los resultados obtenidos no son suficientemente satisfactorios para recomendar su uso para estudios de determinación de densidad o distribución de este tipo celular.

De manera distinta ocurre para las CMs neoplásicas. La argirofilia también es un hallazgo común en muchos de los carcinomas de células de Merkel. Únicamente las técnicas histoquímicas destinadas a demostrar esta propiedad, como la técnica de Grimelius, son útiles para identificar estas neoplasias por medio de la tinción específica de sus gránulos neurosecretorios, particularmente en el subtipo histológico trabecular (Gould y cols., 1985). Un

35-50% de los casos presentan una reacción positiva citoplasmática granular (Frigerio y cols., 1983; Leong y cols., 1986; Parrado y cols., 1998).

En resumen, las tinciones histoquímicas se muestran de escasa utilidad para la identificación y el reconocimiento de las CMs normales en la piel del perro, excepto el método argéntico de Grimelius. No obstante, el resultado de esta tinción es variable e inconsistente y, por lo tanto, no aporta ventajas respecto al reconocimiento a través de técnicas inmunohistoquímicas. Para el diagnóstico del tumor de células de Merkel, como para otras neoplasias neuroendocrinas, la técnica sí se muestra útil en un porcentaje de casos.

**4.2. HALLAZGOS MORFOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS  
DE LAS CÉLULAS DE MERKEL EN EL PERRO**



## **RESUMEN**

Las células de Merkel son receptores cutáneos especializados que se caracterizan por su particular localización y su asociación íntima con terminaciones nerviosas. También presentan una presunta función endocrina y son consideradas parte del sistema neuroendocrino difuso. A través del uso de anticuerpos comerciales monoclonales y policlonales sobre muestras de piel canina, las células de Merkel fueron claramente diferenciadas de otros tipos de células claras de la epidermis. Expresan citoqueratinas 7, 8, 18 y 20, EpCAM, NSE, CGA, SYN, CGRP, proteína S100 y NF. Presentan rasgos citológicos y organizaciones diversas, dependiendo de la localización considerada y muestran una pronunciada heterogeneidad, con patrones de distribución y expresión para los anticuerpos usados marcadamente diferentes. Anti-CK20 se muestra como el anticuerpo más específico y fiable para su identificación. El presente estudio incrementa nuestro conocimiento de las células de Merkel y establece la base para futuros estudios acerca del papel(es) de estas células en patologías cutáneas en el perro, incluido el tumor neuroendocrino (de células de Merkel) cutáneo.







## Morphologic and immunohistochemical features of Merkel cells in the dog



G.A. Ramírez <sup>\*</sup>, F. Rodríguez, P. Herráez, A. Suárez-Bonnet, M. Andrada, A. Espinosa-de-los-Monteros

Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary College, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario Cardones, 45413 Arucas, Las Palmas, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 February 2014

Accepted 10 October 2014

#### Keywords:

Dog  
Immunohistochemistry  
Merkel cell  
Neuroendocrine  
Skin

### ABSTRACT

Merkel cells (MCs) are specialized skin receptors characterized by their particular location and close association with nerve terminals. They also are cells with a presumptive neuroendocrine function and are considered as part of the diffuse neuroendocrine system. By using commercially available monoclonal and polyclonal antibodies in samples of dog skin, MCs were properly distinguished from other clear cell types in the epidermis. They expressed cytokeratins 7, 8, 20, EpCAM, NSE, CGA, SYN, S100 protein, and NF, presented diverse cytological features and arrangements depending on the location considered, and showed pronounced heterogeneity with markedly different expression and distribution patterns for antibodies used. Anti-CK20 presented as the most reliable and specific antibody for their identification. The present study increases our knowledge of MCs and establishes a basis for future studies of the role(s) of the MCs in diseased tissues of the dog skin, including the cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) tumour.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Merkel cells (MCs) are specialized cutaneous receptors and putative neuroendocrine cells located in the basal layer of epidermis, epithelium of the oral mucosa and the external root sheath of hair follicles of vertebrates. Although their origin is controversial, current evidence suggests that MCs are derived from a primitive epidermal stem cell. They are engaged in tactile sensation by acting as mechanoreceptors essential for light-touch responses, particularly localized at sites with high touch sensitivity. For instance, snout, vibrissae, the vermilion border of the lip, and palatine rugae of mammals are MC-rich areas (Boulais et al., 2009a; Eispert et al., 2009; Halata et al., 2003; Moll et al., 2005; Morrison et al., 2009; Tachibana, 1995). Many other functions have been suggested for mammalian MCs via paracrine secretion, such as influencing cutaneous blood flow and sweat production, coordinating and promoting keratinocyte proliferation and differentiation, maintaining and stimulating the stem cell population of the hair follicle (hence controlling the hair cycle), modulating inflammatory responses in the skin, and induction of nerve development in the skin (Eispert et al., 2009; Kim and Holbrook, 1995; Moll et al., 2005; Narisawa et al., 1992b). MCs also

appear to participate in pathological conditions of human skin, including immunologic conditions such as pemphigus vulgaris or graft-versus-host rejection (Boulais et al., 2009b; Hartschuh and Shultz, 1997; Wollina and Mahrle, 1992). The neoplastic counterpart is the Merkel cell carcinoma (MCC) or cutaneous neuroendocrine carcinoma, a well-known entity in human beings but infrequent in dogs and cats (Bagnasco et al., 2003; Gil da Costa et al., 2010; Konno et al., 1998; Patnaik et al., 2001; Wang et al., 2011). The secretion of the content of typical cytoplasmic dense-core granules is closely related with the function of MCs. Knowledge of the chemical nature of these granules is essential to investigate MC functions and to better understand MCC development and behaviour.

MCs are not visible in histological paraffin sections stained with haematoxylin and eosin. It is mandatory to perform specific techniques for their identification, such as electron microscopy or immunohistochemistry (Halata et al., 2003; Moll et al., 2005). Electron microscopy is limited for studies of the anatomical distribution of the population of MCs or in routine diagnostic pathology. Immunohistochemistry has shown that mammalian MCs express cytokeratin polypeptides, desmosomal proteins, neuroendocrine markers, different neuropeptides, and serotonin (Eispert et al., 2009; Gauweiler et al., 1988; Moll et al., 2005; Tachibana, 1995). The precise immunohistochemical features of non-neoplastic MCs in the dog have not been extensively investigated (Cheng-Chew and Leung, 1996; Hartschuh et al., 1983).

The aim of this study was to determine the immunohistochemical profile of canine MCs in normal conditions, including location of immunoreactive products in the cell. The findings would serve

<sup>\*</sup> Corresponding author. Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary College, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario Cardones, 45413 Arucas, Las Palmas, Spain. Tel.: +34 928451145; fax: +34 93 721 19 16.

E-mail address: [gramirez@becarios.ulpgc.es](mailto:gramirez@becarios.ulpgc.es) (G.A. Ramírez).

as a basis for studies of MC's distribution in the dog skin and of its role(s) in pathological conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Tissue collection

Six, male and female, healthy young adult dogs were used for the study. All of them came from a local kennel and had been humanely euthanized for other academic purposes according to current legislation (RD53/2013 from the Spanish Government and 2010/63/UE Policy from European Union on the protection of animals used for scientific purposes). Samples from skin regions reported to be MC rich areas in several mammals (Halata et al., 2003) were collected: upper flew/lip, glabrous snout, whisker pad including vibrissae, hard palate mucosa, and pawpads. The macroscopic appearance of the tissues included had been normal.

### 2.2. Tissue preparation

Skin samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated through graded alcohols and embedded in paraffin wax. Samples from the glabrous skin, oral mucosa and paws were sectioned perpendicularly to the surface at 3 µm whereas sections were performed longitudinally through the upper part of the vibrissae in the whisker pad to easily access the MCs area (they form a close-meshed cuff in the outer root sheath of the hair follicle). Histological sections from each location were stained with haematoxylin and eosin (HE).

### 2.3. Immunohistochemistry

The primary antibodies used for immunohistochemistry are listed in Table 1. Tissue sections previously collected onto Vectabond-coated slides (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) and incubated at 37 °C for 24 h were deparaffinized, rehydrated in graded alcohols, and incubated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes at room temperature to block endogenous peroxidase activity. After antigen retrieval treatment (Table 1) for each antibody,

the slides were covered with 10% normal rabbit (for monoclonal antibodies) or porcine (for polyclonal antibodies) sera in phosphate buffered saline (PBS) for 30 minutes at room temperature before incubation with the primary antibodies for 18 hours at 4 °C. A biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (IgG; Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:200 in PBS containing 1% normal rabbit serum (for monoclonal antibodies) or a biotinylated porcine anti-mouse immunoglobulin G (IgG; Dako) diluted 1:200 in PBS containing 1% normal porcine serum (for polyclonal antibodies) was applied for 30 min at room temperature as secondary reagent. The avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) method (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was then applied as the third reagent. To develop the immunoreaction, 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Sigma) was applied to the slides for 3–5 minutes at room temperature. Sections were lightly counterstained with Mayer's haematoxylin, washed in tap water, and aqueous mounted (Shandon Immu-Mount™, Thermo Electron Corporation, PA, USA).

### 2.4. Controls

Sections in which the specific primary antibodies were replaced by PBS were included as negative controls and run simultaneously with the test slides. Several tissues served as positive control (Table 1) for different antibodies in every assay.

### 2.5. Evaluation of immunohistochemical data

Positivity immunoreactivity was characterized by the presence of a distinct cytoplasmic red reaction without background staining. The immunostaining was evaluated separately and results based on the consensus of at least two observers.

## 3. Results

### 3.1. Haematoxylin and eosin staining

MCs were not differentiated from other epidermal clear cell populations. Some cells were believed to be MCs by its location in vibrissae, at the base of the touch domes in hairy skin epidermis,

**Table 1**  
Technical data of antibodies and immunohistochemical procedures.

Antibody*	Clon	Type	Manufacturer <sup>a</sup>	Ag retrieval	Dilution	Positive controls
CK7	OV-TL 12/30	M	Dako	Enzimatic <sup>b</sup>	1:20	Canine sweat gland epithelium
CK14	LL002	M	Biogenex	HIER <sup>c</sup>	1:40	Canine epidermis and sweat gland epithelium
CK20	Ks20.8	M	Dako	HIER	1:40	Human and canine intestinal epithelium
CK5+8	RCK-102	M	EuroDiagnostica	Enzimatic	1:20	Canine epidermis
CK8+18	NCL-5D3	M	EuroDiagnostica	HIER	1:20	Canine sweat gland epithelium
pan-CK	AE1/AE3	M	Dako	Enzimatic	1:100	Canine epidermis
NSE	BBS/NC/VI-H14	M	Dako	HIER	1:1000	Canine brain; smooth muscle of blood vessels
CGA	–	P	Dako	HIER	1:50	Human and canine colon
SYN	SY38	M	Dako	HIER	1:20	Canine adrenal medulla
NF	MNF402	M	EuroDiagnostica	HIER	1:20	Canine skin nerves
S100 Protein	–	P	Dako	Enzimatic	1:100	Canine skin nerves and striated muscle
NGFr	NGFR5	M	Dako	HIER	1:50	Nerves of fetal and perinatal canine skin
GFAP	–	P	EuroDiagnostica	–	1:100	Canine brain
GAP-43	–	P	Chemicon	HIER	1:200	Nerves of adult and perinatal canine skin
CGRP	–	P	Amersham	HIER	1:500	Canine and murine nervous enteric plexus (colon)
PGP9.5	–	P	Chemicon	HIER	1:40	Canine and human nervous enteric plexus (colon)
NCAM (CD56)	1B6	M	Monosan	HIER	1:10	Canine adrenal medulla; canine brain
EpCAM	MOC31	M	Dako	HIER	1:10	Human colon carcinoma
Serotonin	–	P	Biogenex	Enzimatic & HIER	1:10	NE cells of small intestine; canine mast cells
Met-enkephalin	–	P	Peninsula Labs	Enzimatic & HIER	1:10	Nervous plexus of canine small intestine

\* See text for abbreviations.

M = monoclonal; P = polyclonal; Ag = antigen; NE = neuroendocrine.

<sup>a</sup> Dako Labs., Glostrup, Dinamarca; Biogenex Labs., Fremont CA, USA; EuroDiagnostica Labs., Malmö, Sweden; Chemicon Labs., Billerica, MA, USA; Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ, USA; Monosan Co., Uden, The Netherlands; Peninsula Labs-Baschem Co., Bubendorf, Switzerland.

<sup>b</sup> Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, MO, USA) diluted 0.1% in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2.

<sup>c</sup> HIER: heat-induced epitope retrieval (water bath at 95 °C) with 1 mmol/litre ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich Chemical Co) pH 6.0.

and in mucosal epithelium by the observation of a clear space, representing a non-stained vacuolated terminal axon, under the cell.

### 3.2. Immunohistochemistry

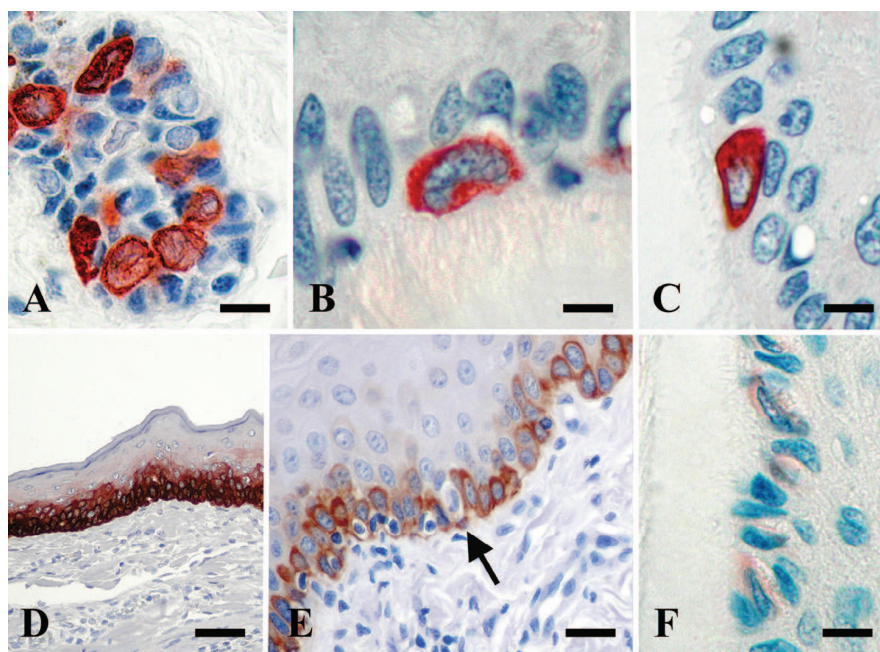
Positive cells showed several patterns of immunoreactivity and different reaction intensity depending on the antibody used. Usually, they were located at the tips of epithelial pegs of labial and palatine mucosa, rete ridges of glabrous skin of snout and pawpad epidermis, and at the base of the epidermal thickenings known as hair discs, touch domes or *haarscheiben* in hairy skin regions. They were not regularly distributed, singly and separated by lengths of epithelium devoid of positive cells or grouped in various arrangements and linear distribution. The positive cells had a round, oval, bipolar, or triangular appearance (Fig. 1A–C), with occasional short dendrites. Nuclei were predominantly oval or lobulated with finely stippled or vesicular chromatin appearance. Nerve fibres with endplates clearly associated with the basal parts of the cells were frequently observed.

*Cytokeratin* (CK) antibodies (Table 1) presented a similar pattern of immunostaining: strongly intense, predominantly diffuse, and homogeneously distributed throughout the cell cytoplasm (Fig. 1A–C). Granular or “ring-like”/peripheral cytoplasmic positive staining was occasionally seen with anti-CK20 and NCL-5D3 (anti-CK8+18) antibodies in cells of the oral mucosa. Anti-CK8+18 and CK7 antibodies strongly labelled sweat glands in addition to MCs in skin. By contrast, immunoreactivity with anti-CK20 antibody was completely absent from other skin cells. Pan-CK AE1AE3 antibody was variably expressed in all layers of the epidermis, the root sheaths of hair follicles, the apocrine sweat glands, and the sebaceous glands and their ducts. When the antibody was not expressed in basal layers, MCs were easily identified. RCK-102 (anti-CK5+8) antibody was consistently expressed in the basal layers of epidermis and inner root

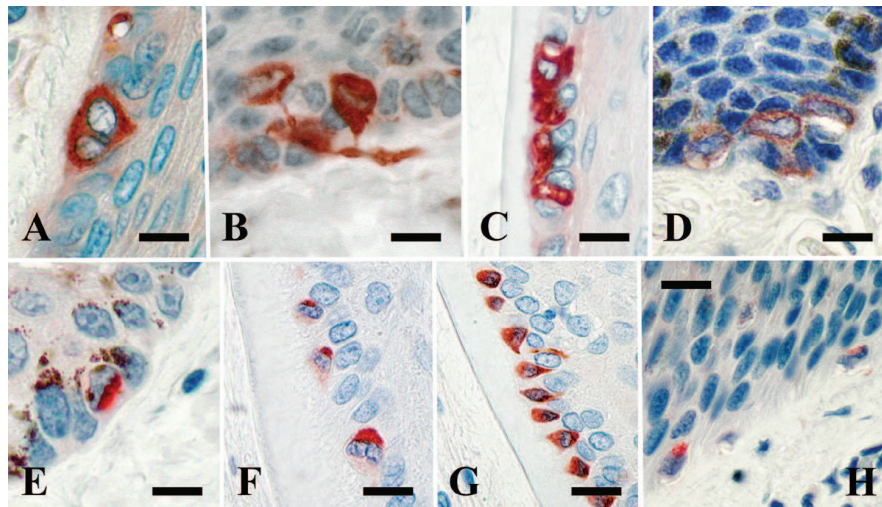
sheath of hair follicles. Therefore, MCs were undistinguished from other stained basal cells by the use of this antibody (Fig. 1D). CK14 showed an identical immunohistochemical pattern than CK5+8, but MCs were not stained and appeared as oval, clear, non-stained cells (Fig. 1E). MOC31 (anti-*Epithelial Cell Adhesion Molecule*: EpCAM) antibody labelled only a few MCs in sinus hairs and oral mucosa. Immunostaining was weak and visible only in the plasma membrane of the cells (Fig. 1F).

MCs were strongly reactive with anti-*Neuron Specific Enolase* (NSE) antibody. The staining pattern was mainly granular and homogeneously distributed in the entire cytoplasm (Fig. 2A). Dermal immunostained nerve fibres penetrated the basement membrane and formed naked nerve endings or were closely associated with the basal part of numerous immunostained cells (Fig. 2B). Anti-*Neurofilament* (NF) antibody revealed the presence of several MCs with a variably intense, diffuse or granular, cytoplasmic pattern of immunostaining located in the external epithelial sheath of vibrissae (Fig. 2C). Nerve terminals were also stained. NF-positive axons in the mesenchymal sheath close to the glassy membrane were also noted. In the skin and oral mucosa, immunoreaction was demonstrated in fine dermal nerve processes found in close contact with epithelial pegs or epidermal rete ridges, but not in intraepidermal cells; they appeared as clear halos above the stained axonal discs. Anti-*S100 protein* antibody showed a variable intensity of immunostaining. Immunoreactive products were clearly visible in the cytoplasm of MCs in lip mucosa and vibrissa but a poor immunostaining was detected in hairy skin, glabrous snout and palate mucosa (Fig. 2D). There was no immunoreaction in pawpad skin. Nuclei and epidermal nerve terminals associated with MCs did not show immunoreaction, but some dermal nerve fibres and their Schwann cell sheath were moderate to heavily positive.

Using anti-Chromogranin A (CGA) and Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) antibodies, immunoreaction was always



**Fig. 1.** Immunostaining of MCs with antibodies against epithelial antigens. Immunohistochemistry, ABC method. Mayer's haematoxylin counterstain. (A) AE1AE3 antibody, labial mucosa. Intense cytoplasmic immunoreaction with a homogeneous or granular appearance, Bar = 10  $\mu$ m. (B) CK20 antibody, cheek skin. Cytoplasmic granular pattern of immunoreaction, Bar = 6  $\mu$ m. (C) NCL-5D3 (CK8+18) antibody, vibrissa. Cytoplasmic homogeneous immunostaining, Bar = 8  $\mu$ m. (D) RCK-102 (CK5+8) antibody, cheek hairy skin. MCs were undistinguished from other stained basal cells, Bar = 50  $\mu$ m. (E) Anti-CK14 antibody, pawpad glabrous skin. Stained basal cells in the epidermis; MCs appeared as clear, oval, non-stained cells (arrow), Bar = 20  $\mu$ m. (F) Vibrissa. Weak cytoplasmic diffuse immunoreaction was observed in MCs using MOC-1 (EpCAM) antibody, Bar = 10  $\mu$ m.



**Fig. 2.** Immunostaining of MCs with antibodies against neuroendocrine antigens. Immunohistochemistry, ABC method, Mayer's haematoxylin counterstain. (A) Anti-NSE antibody, vibrissa. Cytoplasmic pattern of immunostaining, Bar = 8  $\mu$ m. (B) Anti-NSE antibody, hard palate mucosa. Unmyelinated nerve terminal penetrating the basement membrane and giving rise to cup-like endings closely apposed with the basal part of immunostained MCs. Note that one terminal is shared by several cells, Bar = 10  $\mu$ m. (C) Vibrissa. Cytoplasmic diffuse staining pattern using anti-NF antibody, Bar = 10  $\mu$ m. (D) S100 protein antibody, lip mucosa. Immunostained basal cells showing morphologic features typical for MCs. Immunoreaction was limited to cytoplasm, Bar = 10  $\mu$ m. (E) Anti-CGA antibody, pawpad epidermis. Immunoreactive products were restricted to the basal cytoplasm, Bar = 10  $\mu$ m. (F, G) Vibrissa. Similar to CGA, CGRP staining was located in the cytoplasmic part of the cell next to the terminal axon (F) or occupying the entire cytoplasm (G), Bar = 20  $\mu$ m. (H) Anti-SYN antibody, cheek hairy skin. Immunostaining showed an opposite cytoplasmic distribution to CGA and CGRP, Bar = 10  $\mu$ m.

cytoplasmic with a predominantly granular pattern. The strongest immunoreactivity was seen on the basal side of the cytoplasm in epidermal and mucosal MCs (Fig. 2E). Unlike in the epidermis, MCs in vibrissae were most intensely stained on the side facing the follicle, far from the glassy membrane (Fig. 2F). In addition, many cells appeared uniformly stained (Fig. 2G). Neither the expanded nerve terminals associated with MCs nor the myelinated axons found in the superficial dermis were positive for these antibodies. Seldom, positive nerve terminals were found in nerve bundles and around vascular structures in the deep dermis. *Synaptophysin* (SYN) positive cells showed a finely granular cytoplasmic immunostaining. The immunoreactivity was mainly localized in the superficial face of the cell in the epidermal and mucosal MCs whereas it was situated in the dermal face in the sinus hairs (Fig. 2H). Immunostained nerve fibres positive for synaptophysin were seen in the perivascular areas on the dermis; intraepithelial nerve terminals did not show positivity.

Although MCs showed no immunoreaction, nerve fibres were immunostained when the following antibodies were applied: *Protein Gene Product 9.5* (PGP9.5) showed some immunoreactive fibres followed the basement membrane, giving rise to cup-like specializations, bulb-like endings, or beaded axons appearing in close apposition to the cell surface; *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) and *Nerve Growth Factor receptor* (NGFr) antibodies stained only dermal nerve processes; CD56 (*Neural Cell Adhesion Molecule*: NCAM) immunopositivity was exclusively found in dermal nerve fibres; *Growth Associated Protein 43* (GAP-43) was limited to perivascular small nerve fibres. Finally, MCs were not found to exhibit immunoreactivity with anti-*Met-enkephalin* and *Serotonin* antibodies.

#### 4. Discussion

MCs in the dog are not differentiated from other clear cells of the epidermis, such as melanocytes or Langerhans cells, under routine H&E staining. However, by using a panel of monoclonal and polyclonal antibodies, the immunohistochemistry is a powerful tool for their identification and study.

MCs express cytokeratin polypeptides demonstrating their epithelial cell character. CKs 8, 18, and 19, all of which are typical markers of simple epithelia, have become well-established immunohistochemical markers of human MCs both in adults and in later fetal stages (Moll et al., 1982, 1984; Narisawa et al., 1992a). Canine MCs also contain the low molecular weight CKs 8, 18 and 20, in addition to high molecular weight CK7. CKs 7, 8, 18 and 19 are not specific for MCs since they are also found in outer root sheath keratinocytes, sweat glands and some early fetal epidermal cells of human, rodent and dog skin (García-Caballero et al., 2003; Lundquist et al., 1999; Narisawa et al., 1992a, 1994a; Walter, 2001). CK20, however, is of particular value because it is highly specific for MCs in normal canine squamous epithelia, similarly to that described in humans, pigs and mice (Moll et al., 1995). CK20 also reacts with gastrointestinal simple epithelium and uroepithelium, but in the skin the immunoreactivity is limited to MCs. In addition to being the structural cytoskeleton, CKs in the MCs seems to be participating in conjunction with the microfilament villin in the cell plasticity necessary for mechanoreceptive function (Eispart et al., 2009; Toyoshima et al., 1998).

General markers of neuroendocrine cells, such as NSE, PGP9.5, SYN, and CGA, and various kinds of neuropeptides, such as vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance P, met-enkephalin, serotonin, pancreastatin, somatostatin, bombesin and CGRP have been localized in mammalian MCs by means of immunohistochemistry. These findings justified the classification of mammalian MCs within the diffuse neuroendocrine system (Fantini and Johansson, 1995; Gauweiler et al., 1988; Moll et al., 2005; Pearse, 1980; Tachibana, 1995). NSE is known as a molecular marker for neurons and paraneurons. Gu et al. (1981) were the first to detect NSE-like immunoreactions in the mammalian MCs and its associated nerve terminals. Our study further demonstrates the strong presence of NSE in the MCs of the dog, suggesting a neuroectodermal origin of these cells. It was also possible to show that the cells were intimately innervated, forming the typical MC-neurite complex. Granular immunostaining pattern is probably related to high concentration of NSE in the rough endoplasmic reticulum and ribosomes. Posi-

tive immunoreactivity to CGA has been proven in MCs of various mammals. CGA coexists with other neuropeptides, such as VIP, peptide histidine isoleucine, substance P or CGRP, in the same MC granules (Cheng-Chew and Leung, 1996; Fantini and Johansson, 1995; Gauweiler et al., 1988; Hartschuh et al., 1989b). The present study also suggests coexistence in the canine MCs for CGA and CGRP. Using both antibodies, immunostaining was restricted to the cytoplasmic portion of the MCs closest to the nerve ending where dense-core granules are concentrated. Interestingly, SYN showed a cytoplasmic immunostaining pattern in the opposite cellular side in relation to CGA and CGRP antibodies, which is the part of the cytoplasm farthest from the neurite. This particular distribution for SYN has been related with the structural distribution of small clear-content vesicles observed with electron microscope in human, porcine (García-Caballero et al., 1989a) and canine MCs (personal communication). This finding suggests that secretory electron dense-core granules and small clear vesicles could be involved in two different secretory pathways of MCs in dogs, as has been suggested in MCs of pig (García-Caballero et al., 1989a) and demonstrated in neurons (Lundberg and Hokfelt, 1983). Interestingly, recent reports propose two secretory pathways in rat MCs: a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway that serves mechanosensory function and neurotransmitter release, and a Ca<sup>2+</sup>-independent pathway that serves neuroendocrine functions and neuropeptide release (Boulais et al., 2009a, 2009b).

MOC31 antibody recognizes the epithelial cell adhesion molecule in human MCs (García-Caballero et al., 2003). MCs of sinus hairs and hard palate in the current study also express this molecule but no reaction was found in other locations. Anti-NF antibody showed a similar “location-dependent” expression pattern; it was expressed by MCs of vibrissae but not from epidermis or mucosal epithelia. These results are similar to those described by Narisawa et al. (1994b), who found that about 5.9% of human MCs express a positive immunoreactivity for NF. They suggested that expression of NF proteins in follicular MCs may be a sign of carcinomatous changes in the cells because human MC carcinomas consistently express NF and non-neoplastic MCs only express NF in low amounts and usually restricted to hair follicles. This fact may also be true for follicular MCs in dogs since they express NFs in a similar pattern of distribution. However, it is more likely that this finding is related to different subtypes of MCs or to MC specialization. Tachibana (1995; Tachibana and Nawa 2002) demonstrated that MCs could be divided into different subpopulations according with different functions. This theory explains differences in numbers, expression and synthesis of molecules and in morphologic features among MCs of different locations.

In addition to location-dependency, many studies suggest that the expression of peptides in MCs is also “species-dependent”. MCs in dogs do not contain PGP9.5 or NCAM as human, porcine and rodent MCs do (Dalsgaard et al., 1989; Gallego et al., 1995; Ramieri et al., 1992; Rice et al., 1993). The proposed physiological role of NCAM in the endocrine and neuroendocrine systems is to stabilize the cells into aggregates. This function is unlikely for MCs because isolated human and porcine MCs express NCAM (Gallego et al., 1995) and rodent (Moll et al., 1996) and canine MCs arranged into aggregates do not express the molecule. Further studies are needed to clarify its role. S100 protein has been consistently negative in human MCs. It has only been demonstrated in pig snout MCs with a nuclear and cytoplasmic location (García-Caballero et al., 2003). MCs in dogs also express S100 protein restricted to the cell cytoplasm in the hard palate, lip mucosa, sinus hairs and glabrous skin of snout and only when proteinase K was used as antigen retrieval treatment. These results may indicate that S100 expression in MCs among mammals not only is species-dependent but it also depends on technical procedures. A similar situation was observed for MOC31 antibody; positive immunoreaction was also achieved when pro-

longed heat antigen retrieval was used suggesting that technical procedures could influence, at least partly, the results observed.

One of the presumed functions of MCs in the skin is to act as target for developing peripheral nerves. This hypothesis is based on the identification of NGF in cultures of MCs from embryonic rat pups (Vos et al., 1991) and the immunohistochemical expression of NGF in MCs *in vivo* in the adult rat and human fetus (English et al., 1994; Narisawa et al., 1992b; Ribeiro-da-Silva et al., 1991). MCs in dogs do not express NGF according to previous publications in human beings (Moll et al., 2005). This result is against the assumption that NGF in MCs may regulate the synthesis or secretion of neuropeptides in the cells for nerve development. However, it is possible that MCs only express NGF or NGF during the development of skin innervation early in life or during re-innervation of the skin after injury. Therefore, it is conceivable that at least certain groups of MCs may exert paracrine trophic functions during development and homeostasis. The possible diverse functions of MCs also illustrate the heterogeneity of this cell type.

## 5. Conclusions

The results presented in the current study represent the first complete description of the immunohistochemical profile of canine MCs. The results were similar to other species regarding the expression of CKs, NSE, CGA and SYN with a location-dependent pattern observed, especially for NF. Species variability in peptide expression may be, in part, closely related to the different methodologies used. The features of a complex expression of different markers indicate multiple functions of this interesting cell type and also that MCs should be considered as a variable cell population with adaptations depending, among others, upon the type of tissue within which the MCs occur.

## Acknowledgements

This study has been supported by a grant from the Ministry of Education and Science of the Government of Spain (Program for Development of University Professors and Researchers, BOE 12022000). The authors would like to thank Dr. Tomás García-Caballero for gently session of serotonin and MOC31 antibodies and the Pathology Service of Dr. Negrín's Hospital for providing control tissues.

## References

- Bagnasco, G., Properzi, R., Porto, R., Nardini, V., Poli, A., Abramo, F., 2003. Feline cutaneous neuroendocrine carcinoma (Merkel cell tumour): clinical and pathological findings. *Veterinary Dermatology* 14, 111–115.
- Boulais, N., Pennec, J.P., Lebonvallet, N., Pereira, U., Rougier, N., Dorange, G., et al., 2009a. Rat Merkel cells are mechanoreceptors and osmoreceptors. *Public Library of Science One* 4, e7759.
- Boulais, N., Pereira, U., Lebonvallet, N., Gobin, E., Dorange, G., Rougier, N., et al., 2009b. Merkel cells as putative regulatory cells in skin disorders: an *in vitro* study. *Public Library of Science One* 4, e6528.
- Cheng-Chew, S.B., Leung, P.Y., 1996. Localization of VIP- and CGRP-like substances in the skin and sinus hair follicles of various mammalian species. *Histochemistry and Cell Biology* 105, 443–452.
- Dalsgaard, C.-J., Rydh, M., Haegerstrand, A., 1989. Cutaneous innervation in man visualized with Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5) antibodies. *Histochemistry* 92, 385–389.
- Eispert, A.C., Fuchs, F., Brandner, J.M., Houdek, P., Wladykowski, E., Moll, I., 2009. Evidence for distinct populations of human Merkel cells. *Histochemistry and Cell Biology* 132, 83–93.
- English, K.B., Harper, S., Stayner, N., Wang, Z.M., Davies, A.M., 1994. Localization of Nerve growth factor (NGF) and low-affinity NGF receptors in touch domes and quantification of NGF mRNA in keratinocytes of adult rats. *Journal of Comparative Neurology* 344, 470–480.
- Fantini, F., Johansson, O., 1995. Neurochemical markers in human cutaneous Merkel cells. An immunohistochemical investigation. *Experimental Dermatology* 4, 365–371.
- Gallego, R., García-Caballero, T., Fraga, M., Beiras, A., Forteza, J., 1995. Neural cell adhesion molecule immunoreactivity in Merkel cells and Merkel cell tumors. *Virchows Archiv* 426, 317–321.

- García-Caballero, T., Cuevas, J., Gallego, R., Rosón, E., Forteza, J., Beiras, A., 1989a. Synaptophysin-like immunoreactivity in the Merkel cells of pig-snout skin. *Ultrastructural Pathology* 13, 55–61.
- García-Caballero, T., Pintos, E., Gallego, R., Parrado, C., Blanco, M., Falkmer, U.G., et al., 2003. MOC-31, cytokeratin 7 and S100 protein immunoreactivity in Merkel cell and Merkel cell carcinoma. In: Baumann, K.L., Halata, Z., Moll, I. (Eds.), *The Merkel Cell: Structure, Development, Function, Cancerogenesis*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 231–236.
- Gauweiler, B., Weihe, E., Hartschuh, W., Yanaihara, N., 1988. Presence and coexistence of chromogranin A and multiple neuropeptides in Merkel cells of mammalian oral mucosa. *Neuroscience Letters* 89, 121–126.
- Gil da Costa, R.M., Rema, A., Pires, M.A., Gärtner, F., 2010. Two canine Merkel cell tumours: immunoreaction of c-KIT, E-cadherin, beta-catenin and S100 protein. *Veterinary Dermatology* 21, 198–201.
- Gu, J., Polack, J.M., Tapia, F.J., Marangos, P.J., Pearse, A.G.E., 1981. Neuron-specific enolase in the Merkel cells of mammalian skin: the use of specific antibody as a simple and reliable histologic marker. *American Journal of Pathology* 104, 63–68.
- Halata, Z., Grim, M., Bauman, K.L., 2003. Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *The Anatomical Record Part A* 271A, 225–239.
- Hartschuh, W., Shultz, T., 1997. Merkel cell hyperplasia in chronic radiation-damaged skin: its possible relationship to fibroepithelioma of Pinkus. *Journal of Cutaneous Pathology* 24, 477–483.
- Hartschuh, W., Weihe, E., Yanaihara, N., Reinecke, M., 1983. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the Merkel cell. *Journal of Investigative Dermatology* 81, 361–364.
- Hartschuh, W., Weihe, E., Yanaihara, N., 1989b. Immunohistochemical analysis of chromogranin A and multiple peptides in the mammalian Merkel cell: further evidence for its paraneuronal function? *Archives of Histology and Cytology* 52 (Suppl. 1), 423–431.
- Kim, D.K., Holbrook, K.A., 1995. The appearance, density, and distribution of Merkel cells in human embryonic and fetal skin: their relation to sweat gland and hair follicle development. *Journal of Investigative Dermatology* 104, 411–416.
- Konno, A., Nagata, M., Nanko, H., 1998. Immunohistochemical diagnosis of a Merkel cell tumor in a dog. *Veterinary Pathology* 35, 538–540.
- Lundberg, J.M., Hokfelt, T., 1983. Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends in Neurosciences* 6, 325–333.
- Lundquist, K., Kohler, S., Rouse, R.V., 1999. Intraepidermal cytokeratin 7 expression is not restricted to Paget cells but is also seen in Tokier cells and Merkel cells. *American Journal of Surgical Pathology* 23, 212–219.
- Moll, I., Kuhn, C., Moll, R., 1995. Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cell while certain neuronal proteins are absent. *Journal of Investigative Dermatology* 104, 910–915.
- Moll, I., Paus, R., Moll, R., 1996. Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density. *Journal of Investigative Dermatology* 106, 281–286.
- Moll, I., Roessler, M., Brandner, J.M., Eispert, A.C., Houdek, P., Moll, R., 2005. Human Merkel cells: aspects of cell biology, distribution and functions. *European Journal of Cell Biology* 84, 259–271.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11–24.
- Moll, R., Moll, I., Franke, W.W., 1984. Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. *Differentiation; Research in Biological Diversity* 28, 136–154.
- Morrison, K.M., Miesegae, G.R., Lumpkin, E.A., Maricich, S.M., 2009. Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Developmental Biology* 336, 76–83.
- Narisawa, Y., Hashimoto, K., Bayless, T.J., Nihei, Y., Ishihara, M., Lawrence, D., et al., 1992a. Cytokeratin polypeptides of Merkel cells in human fetal and adult skin: difference of expression of cytokeratins in epidermal and dermal Merkel cells. *Journal of Investigative Dermatology* 98, 171–180.
- Narisawa, Y., Hashimoto, K., Nihei, Y., Pietruk, T., 1992b. Biological significance of dermal Merkel cells in development of cutaneous nerves in human fetal skin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 40, 65–71.
- Narisawa, Y., Hashimoto, K., Kohda, H., 1994a. Immunohistochemical demonstration of cytokeratin 19 expression in isolated human hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology* 103, 191–195.
- Narisawa, Y., Hashimoto, K., Kohda, H., 1994b. Immunohistochemical demonstration of the expression of neurofilament proteins in Merkel cells. *Acta Dermatovenereologica* 74, 441–443.
- Patnaik, A.K., Post, G.S., Erlandson, R.A., 2001. Clinicopathologic and electron microscopic study of cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma in a cat with comparisons to human and canine tumors. *Veterinary Pathology* 38, 553–556.
- Pearse, A.G., 1980. The neuroendocrine (APUD) cells of the skin. *American Journal of Dermatopathology* 2, 121–123.
- Ramieri, G., Panzica, G.C., Viglietti-Panzica, C., Modica, R., Springall, D.R., Polak, J.M., 1992. Non-innervated Merkel cells and Merkel-neurite complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. *Archives of Oral Biology* 37, 263–269.
- Ribeiro-da-Silva, A., Kenigsberg, R.L., Cuello, A.C., 1991. Light and electron microscopic distribution of nerve growth factor receptor-like in the skin of the rat lower lip. *Neuroscience* 43, 631–646.
- Rice, F.L., Kinnman, E., Aldskogius, H., Johansson, O., Arvidsson, J., 1993. The innervation of the mystacial pad of the rat as revealed by PGP9.5 immunofluorescence. *Journal of Comparative Neurology* 337, 366–385.
- Tachibana, T., 1995. The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Archives of Histology and Cytology* 58, 379–396.
- Tachibana, T., Nawa, T., 2002. Recent progress in studies on Merkel cell biology. *Anatomical Science International* 77, 26–33.
- Toyoshima, K., Seta, Y., Takeda, S., Harada, H., 1998. Identification of Merkel cells by an antibody to villin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 46, 1329–1334.
- Vos, P., Stark, F., Pittman, R.N., 1991. Merkel cells in vitro: production of nerve growth factor and selective interactions with sensory neurons. *Developmental Biology* 144, 281–300.
- Walter, J.H., 2001. Cytokeratins in the canine epidermis. *Veterinary Dermatology* 12, 81–87.
- Wang, T.S., Byrne, P.J., Jacobs, L.K., Taube, J.M., 2011. Merkel cell carcinoma: update and review. *Seminars in Cutaneous Medicine & Surgery* 30, 48–56.
- Wollina, U., Mahrle, G., 1992. Epidermal Merkel cells in psoriatic lesions: immunohistochemical investigations on neuroendocrine antigen expression. *Journal of Dermatology Science* 3, 145–150.

## MATERIAL ADICIONAL

### OTROS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS ESTUDIADOS

Junto los anticuerpos descritos en el artículo anterior, se testaron algunos anticuerpos comerciales dirigidos contra células de estirpe linfoide e histiocítica. Teniendo en cuenta que uno de los diagnósticos diferenciales del tumor de células de Merkel es el linfoma e, incluso, algunas formas de histiocitosis (Wick y cols., 1983; Gupta y cols., 2005), sería útil determinar si este tipo celular epidérmico expresa alguno de los marcadores que tradicionalmente se utilizan en el diagnóstico inmunohistoquímico rutinario de estas neoplasias.

**Tabla 1 adicional. Datos técnicos de los anticuerpos y procedimientos inmunohistoquímicos.**

Anticuerpo	Clon	Tipo	Fabricante	Tto.	Dilución	Control positivo
Lisozima	-	P	Dako	Enzimático <sup>b</sup>	1:100	Linfonodo canino
IgG cadenas ligeras $\lambda$	-	P	Dako	Calor <sup>c</sup>	1:2000	Linfonodo canino
CD3	-	P	Dako	Enzimático	1:1000	Linfonodo canino
CD79a	JCB117	M	Dako	Calor	1:50	Linfonodo canino
Ag Mieloide / histiocítico	MAC 387	M	Dako	Enzimático	1:100	Linfonodo canino

Ag = antígeno; M = monoclonal; P = policlonal; <sup>a</sup> Laboratorios Dako, Glostrup, Dinamarca; <sup>b</sup> Proteinasa K (Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, MO, USA) diluida al 0.1% en tampón fosfato-salino (PBS), pH 7.2. <sup>c</sup> Desenmascaramiento antigénico por calor (baño maría a 95° C) con ácido etildiaminotetraacético 1 mmol/litro (Sigma-Aldrich Chemical Co), pH 6.0.

No se observó inmunorreacción en las CMs del perro con ninguno de estos anticuerpos. Los controles positivos confirmaron que la técnica fue correcta en cada procedimiento



## ICONOGRAFÍA ADICIONAL

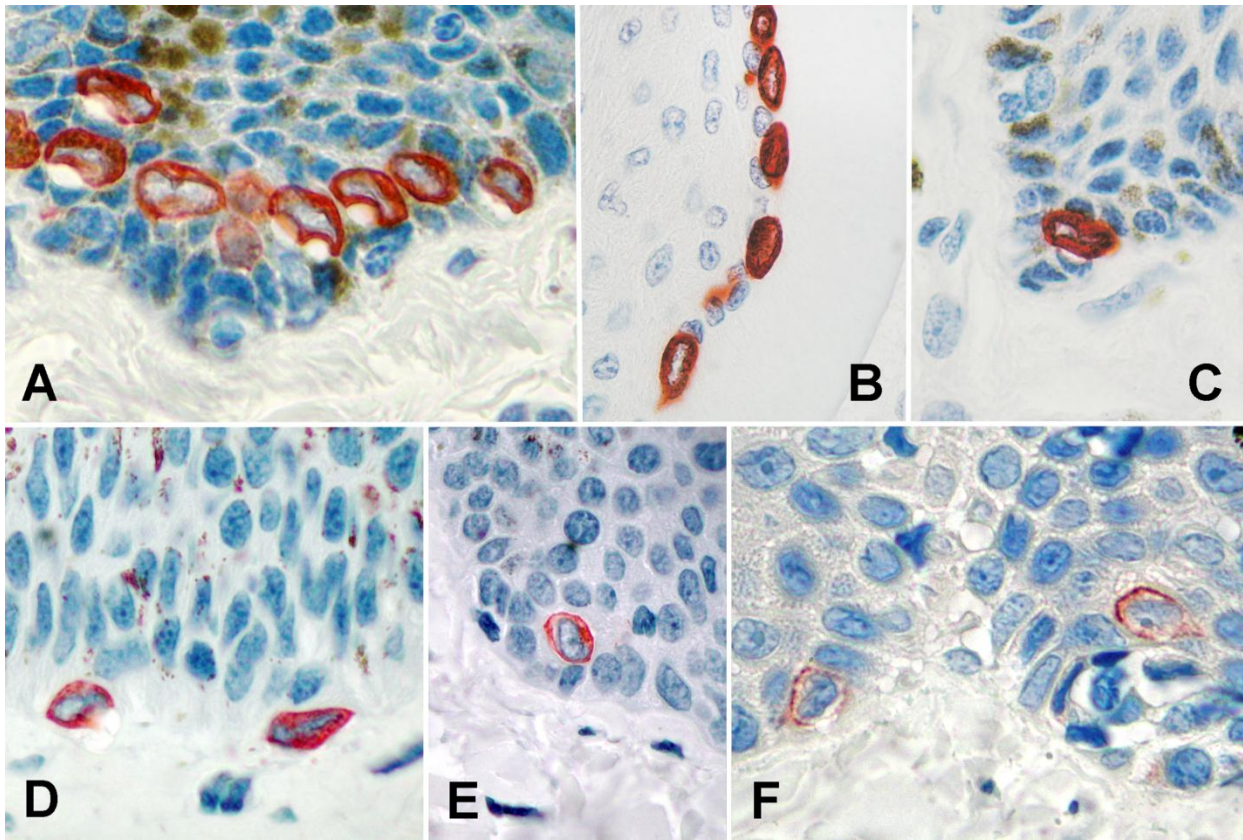


Figura 1. (A) Grupo de CMs en mucosa labial con CK20. La tinción es homogénea o granular e intensa. (B) CMs en disposición lineal en la vaina epitelial externa de una vibrisa con CK7. Como con otras CKs, la reacción es citoplasmática, homogénea y granular. (C) CM aislada en encía con CK7. (D) Dos CMs en la base de un disco epidermal de la piel facial marcadas con CK8+18. (E, F) Efecto de tinción periférica o reforzamiento de membrana con CK20 y CK8+18 (F). ABC, 100x.

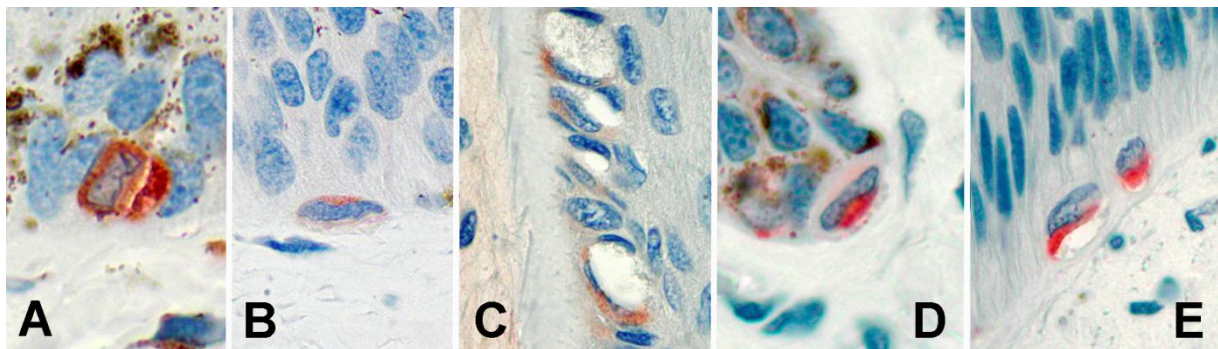


Figura 2. (A) Trufa. NSE se expresa tanto en el citoplasma de la CM como en la terminación discoide asociada. (B) Disco epidermal en la piel facial. La SYN se expresa solamente en la porción citoplasmática supranuclear. (C) Vibrisa, piel facial. SYN se expresa en la porción citoplasmática anti-neurita (que aparece vacuolizada en esta imagen). (D) Paladar duro. CGRP muestra tinción polarizada hacia lado citoplasmático. Levemente, se expresa en la porción citoplasmática contraria. (E) Infundíbulo de vibrisa, piel facial. CGA se expresa solamente en la porción citoplásmica basal. ABC, 100x.

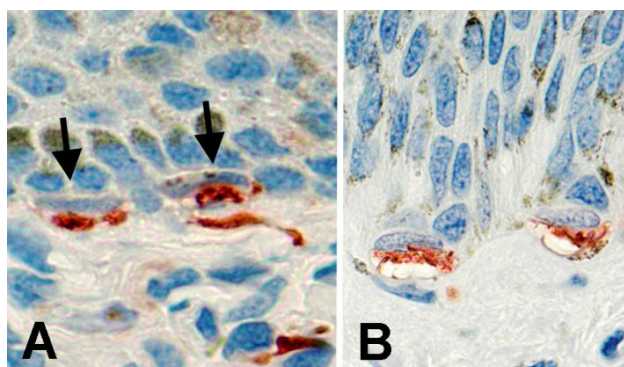


Figura 3. Discos epidermales de la piel facial. Las CMs son visibles sin inmunorreacción sobre las terminaciones nerviosas positivas a NF (A) y PGP9.5 (B). ABC, 100x.

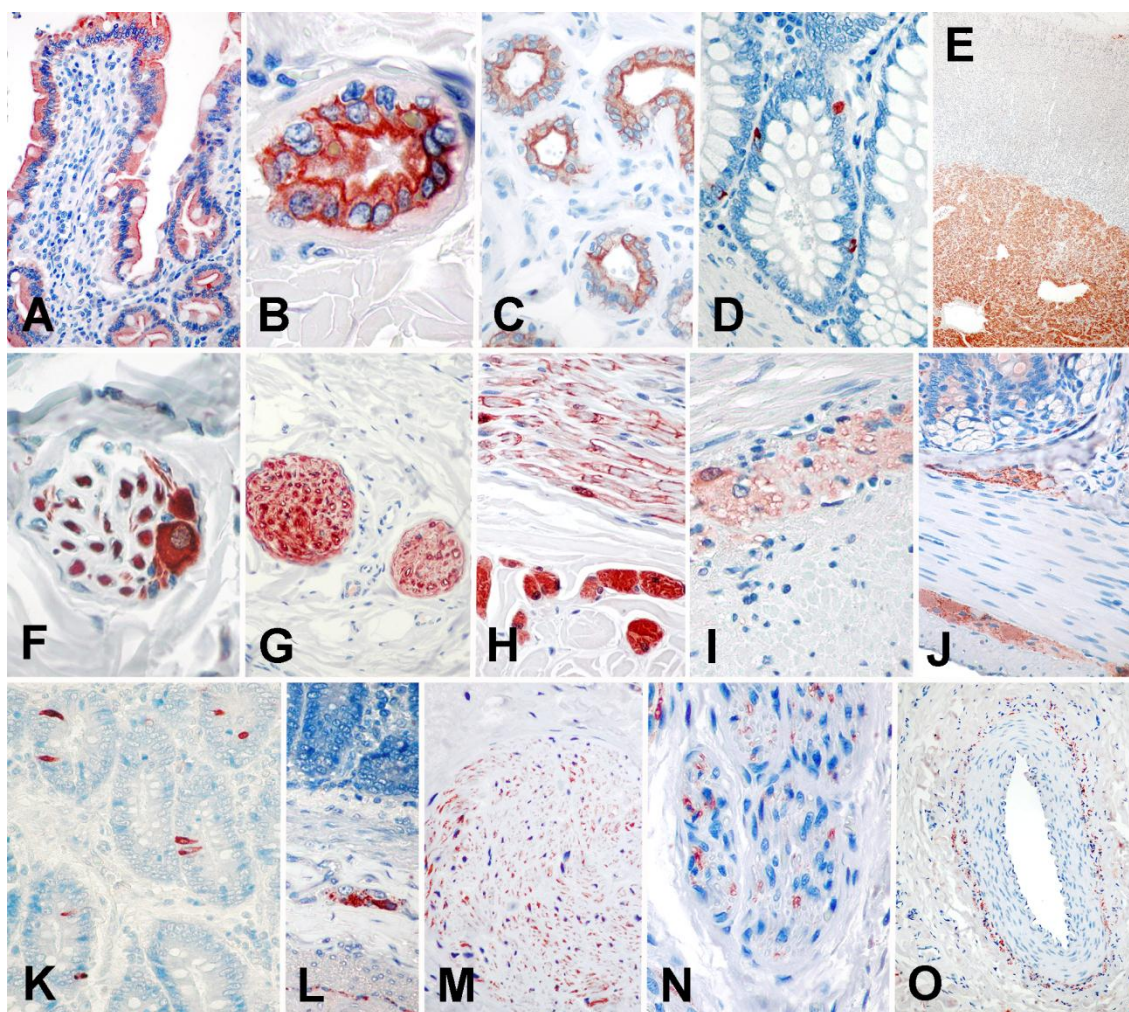


Figura 4. Controles positivos de CK20 (A), CK7 (B), CK8+18 (C), CGA (D), SYN (E), NSE (F), NF (G), S100 (H), PGP9.5 (I), CGRP (J), Serotonina (K), Metencefalina (L), NCAM (M), NGFr (N), GAP43 (O). ABC.

Intestino delgado perro (A); Glándulas apocrinas sudoríparas perro (B, C); Colon perro (D, K); Médula adrenal (E); Nervios periféricos (F, G, H, M, N); Músculo estriado (H); Plexo nervioso intestinal (I, J, L); Nervios perivascuales (O).



**4.3. CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS  
CÉLULAS DE MERKEL EN EL PERRO**



## RESUMEN

**Introducción.** La implicación de las células de Merkel (CMs) en diferentes formas de enfermedad cutánea así como en el crecimiento, diferenciación y homeostasis de la piel ha sido previamente documentada.

**Hipótesis/Objetivos.** Evaluar las características ultraestructurales de las CMs en la piel de perros, incluyendo valores morfométricos, resaltando sus similitudes y diferencias con aquellas descritas para otros mamíferos.

**Animales.** Se obtuvieron muestras de paladar duro, plano nasal, labio inferior y piel de las vibras de dos perros sanos destinados a propósitos académicos.

**Métodos.** Secciones ultrafinas de las muestras se fijaron con tetraóxido de osmio y fueron embebidas en resina Epon 812, teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 2010.

**Resultados.** Las características ultraestructurales incluyeron: (1) ordenamiento en agregados en el estrato basal de la epidermis, mucosa oral o vaina externa de la vaina externa folicular; (2) unión inconstante con terminaciones nerviosas; (3) forma celular oval ( $10,27 \pm 1,64 \mu\text{m}$  en el eje mayor) con núcleos grandes lobulados ( $5,98 \pm 1,16 \mu\text{m}$  en el eje mayor); (4) procesos citoplasmáticos gruesos parecidos a espinas que interdigitan con los Qs próximos; (5) presencia de desmosomas en el cuerpo celular o en la base de los procesos espinosos, uniéndose a los Qs vecinos; (6) citoplasma conteniendo filamentos intermedios organizados de forma laxa ( $10,04 \pm 1,17 \text{ nm}$ ) y numerosos gránulos de centro denso ( $100,1 \pm 17,12 \text{ nm}$ ) ordenados en la porción basal del citoplasma.

**Conclusiones e importancia clínica.** Este estudio supone la primera descripción completa de las características ultraestructurales de las CMs en el perro, aumentando el conocimiento de la estructura de la piel en esta especie y representando un cimiento básico para estudios futuros acerca del papel de estas células en los tejidos normales y lesionados caninos.



## Ultrastructural characterization of normal Merkel cells in the dog

Gustavo A. Ramírez, Francisco Rodríguez, Pedro Herráez, Ayoze Castro-Alonso, Marisa Andrada and Antonio Espinosa-de-los-Monteros

Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary College, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario Cardones, Arucas, Las Palmas 45413, Spain

Correspondence: Gustavo A. Ramírez, Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary College, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario Cardones, Arucas, Las Palmas 45413, Spain. E-mail: gramirez@becarios.ulpgc.es

**Background** – Involvement of Merkel cells (MKs) in different cutaneous diseases as well as in the growth, differentiation and homeostasis of the skin has been previously documented.

**Hypothesis/Objectives** – The aim was to assess the ultrastructural features of MKs in canine skin, including morphometrics, highlighting their similarities with and differences from those described for other mammals.

**Animals** – Hard palate, nasal planum, lower lip and whisker pad samples were taken from two healthy young dogs destined for academic purposes.

**Methods** – Ultrathin sections of samples fixed in osmium tetroxide and embedded in Epon 812 resin were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined using a JEOL JEM 2010 transmission electron microscope.

**Results** – Ultrastructural characteristics included the following: (i) arrangement in clusters in the basal layer of the epidermis, oral mucosa and external follicular root sheath; (ii) inconstant link with nerve terminal; (iii) oval ( $10.27 \pm 1.64 \mu\text{m}$  major axis) cell shape with large lobulated nuclei ( $5.98 \pm 1.16 \mu\text{m}$  major axis); (iv) spine-like and thick cytoplasmic processes interdigitating with surrounding keratinocytes; (v) presence of desmosomes in the cell body or at the base of spine-like processes attaching to neighbouring keratinocytes; and (vi) cytoplasm containing loosely arranged intermediate filaments ( $10.04 \pm 1.17 \text{nm}$ ) and numerous dense-core granules ( $100.1 \pm 17.12 \text{nm}$ ) arranged in the basal portion of the cytoplasm.

**Conclusions and clinical importance** – This study provides the first complete description of the ultrastructural characteristics of MKs in the dog, enhancing our knowledge of the skin structure in this species and providing a basis for future physiological and pathological studies of the role of these cells in normal and damaged canine tissues.

### Introduction

The Merkel cells (MKs) are noncornified distinctive cells of the epidermis, hair follicles and mucosa of fish, amphibia, reptilia and mammals.<sup>1–5</sup> Mammalian MKs are mainly located in the basal epidermis of touch-sensitive areas of glabrous and haired skin. Most of them show intraepidermal nerve-ending connections, forming the so-called Merkel cell–axon complex or Merkel nerve ending, a slowly adapting type I mechanoreceptor, which encodes sustained pressure and represents object features with high fidelity.<sup>6,7</sup> Noninnervated MKs are presumed to have a neuroendocrine function.<sup>3,8</sup>

Electron microscopy has been the classical method to identify this cell type.<sup>4,9–11</sup> Merkel cells have morphological features of epithelial cells, such as desmosomal contacts with surrounding keratinocytes and bundles of intermediate-sized filaments identified by

immunohistochemistry as cytokeratins of simple epithelial type (cytokeratins 8, 18, 19 and 20) and neurofilaments.<sup>5,12–15</sup> Merkel cells contain specialized plasma membrane projections and characteristic granules, which have been suggested to be implicated in mechanoreceptive and neuroendocrine functions.<sup>3,6,8,16,17</sup>

Merkel cells are considered to be involved in some diseases, such as pemphigus vulgaris and graft-versus-host rejection in humans<sup>17–19</sup> and cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) tumour in humans, dogs and cats.<sup>20–24</sup> Morphological features of MKs have not been reported in detail for dogs. The aims of this study were to describe the ultrastructural features of canine MKs by transmission electron microscopy and to compare the findings with those previously published for other mammals, including humans. These findings may serve as a basis for studies of the function of MKs, including their physiological role and their involvement in pathological conditions in canine skin.

### Materials and methods

Merkel cell density is higher in certain areas of the body, such as the vibrissae, nasal planum and oral mucosa,<sup>3,4</sup> therefore tissue samples representing these locations were included in the study. Samples

Accepted 9 May 2015

**Sources of Funding:** This study was supported by a grant from the Ministry of Education and Science of the Government of Spain (Program for Development of University Professors and Researchers, BOE 12022000).

**Conflict of Interest:** No conflicts of interest have been declared.



were taken from the hard palate, nasal planum, lower lip and whisker pad (located around the mystacial vibrissae on the muzzle) from one male and one female healthy young dog from a local kennel. They had been humanely euthanized and were destined for academic training according to current legislation (RD53/2013 from the Spanish Government and 2010/63/UE Policy from the European Union on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes).

For transmission electron microscopy, 1 mm<sup>3</sup> samples were prepared and immersed in refrigerated 2.5% buffered glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.3. Samples were then postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in acetone and propylene oxide and embedded in epoxy resin (Fluka, Buchs, Switzerland). Epon 812-embedded sections (0.5–1 µm thick) were stained with toluidine blue (1% aqueous solution) for a first morphological screening in order to select the most appropriate areas for transmission electron microscopy. Ultrathin sections (50 nm) were made with a Leica Ultracut R (Leica Instruments GmbH, Nußloch, Germany), stained with uranyl acetate and lead citrate and examined using a JEOL JEM 2010 transmission electron microscope (Jeol Europe BV, Saventhem, Belgium).

Morphometric analysis was carried out with a constant magnification for each sample using the INCA Energy TEM 200 microanalysis software (Oxford Instruments, Abingdon, UK). Cellular and nuclear diameters were established on the basis of 25 cells examined. Granule diameter was measured using a sample of 607 neurosecretory granules from 10 MKs. The criteria for selecting these cells were an appropriate axial orientation and a large nuclear section. The thickness of intracytoplasmic filaments was measured in a sample of 20 elements. The length of desmosomes between MKs and keratinocytes was determined using a sample of 20 desmosomes. The length and diameter of cytoplasmic processes were measured in 14 spine-like processes and microvilli, eight large cytoplasmic projections and four short interstitial processes. The IBM SPSS<sup>®</sup> 22 software (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used for interpretation and presentation of data.

## Results

Toluidine-blue-stained thin sections revealed that Merkel cells were present as individual cells or, more frequently, as a cell cluster. In sinus hair follicles up to 70 MKs formed a close-meshed cuff in the basal layers of the external root sheath, at the level where the follicle is encircled by a blood sinus (ring sinus) with a dense connective tissue capsule. In the epidermis and the oral epithelium four to 10 MKs were arranged in groups located in the basal cell layer of the epithelial ridges and pegs and, occasionally, in suprabasal layers.

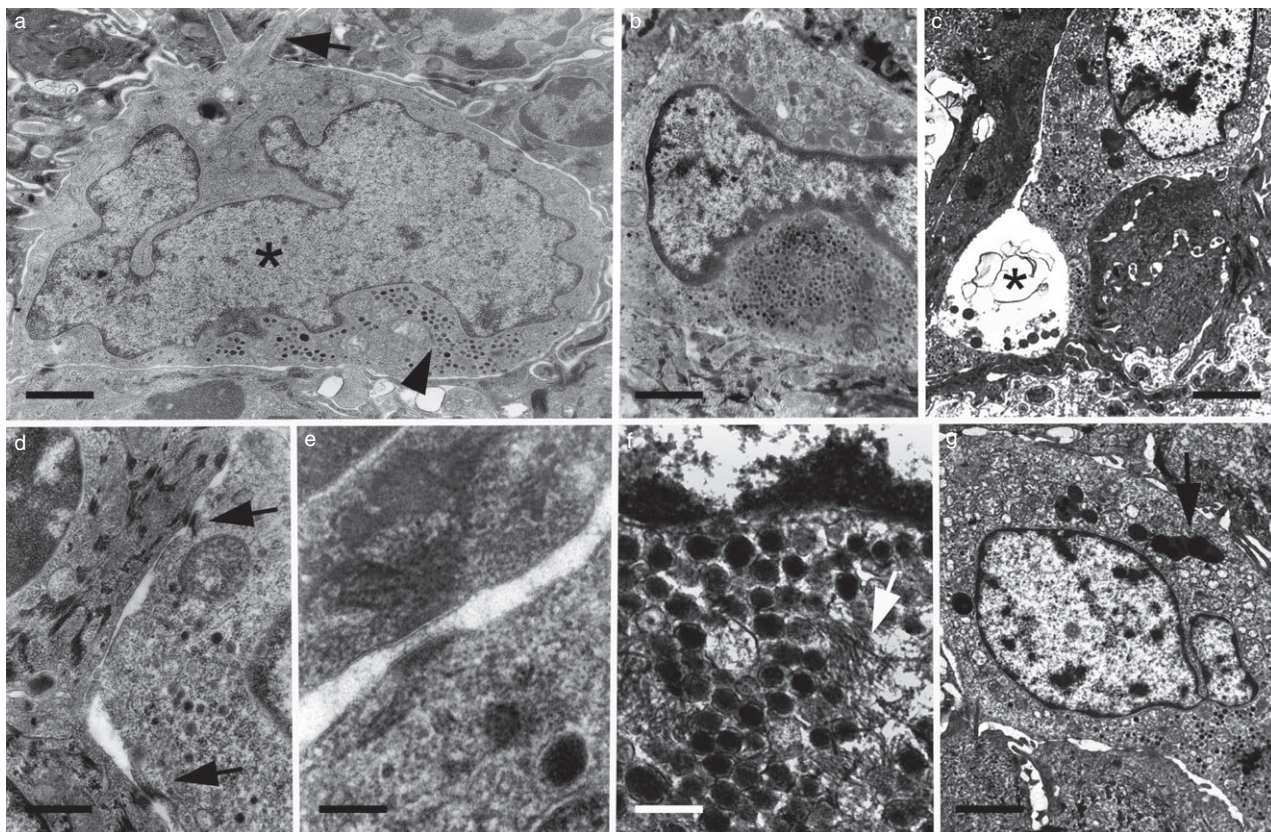
In ultrathin longitudinal sections of sinus hair follicles, up to 15 MKs were identified in linear aggregates in the basal layer of the external root sheath. In each ultrathin section of epidermis and oral mucosa usually not more than six MKs were found. The cells in the oral mucosa were predominantly oval or rounded in shape, whereas in the skin and sinus hair follicles they were elongated, flattened or triangular in appearance (Figure 1a,b). The cytoplasm was consistently clear and the nuclei were pale, predominantly oval and frequently lobulated. Cell measurements are reported in Table 1. The terminal axon associated with the MKs, when present, was seen as a rounded or flat meniscus filled with scarce mitochondria, myelin figures or both dense and clear vesicles (Figure 1c). These axons commonly showed artifactual vacuolation. Merkel cells without associated nerve terminals were mainly observed in the oral mucosa (Figure 1a,b).

Merkel cells were completely surrounded by epithelial cells that separated them from the basement membrane. They were connected to the adjacent keratinocytes by numerous, variably sized desmosomes (Table 1), which represented anchorage structures of convergent intermediate filament bundles (Figure 1d,e). These desmosomes were randomly located on the cell membrane or, very rarely, at the base of the spine-like cytoplasmic projections. Merkel cells were also characterized by an abundance of cytoplasmic dense-core granules, much more numerous in the basal region of the cytoplasm, facing the axon and remote from the Golgi region (Figure 1a–c). This particular distribution was irrespective of whether the MK showed contact with nerve endings or not. These granules were spherical, with variable diameters and electron densities, and possessed a dense core surrounded by a clear space and a membrane (Figure 1f). The cytoplasm also contained fine intermediate filaments (Table 1), sparsely distributed or forming paranuclear whorls (Figure 1f). Very rarely thicker or tonofibril-like aggregates around the nucleus were seen.

Mitochondria were usually large, elongated or rounded, with long cristae. The rough endoplasmic reticulum was poorly developed. Free ribosomes and glycogen particles were frequently found, and Golgi membranes and vesicles were present but not prominent. Cytoplasmic non-specific vesicles, multivesicular bodies and variably dense lysosome-like granules were occasionally noted. Ovoid or rounded cytoplasmic dense organelles resembling mature melanin granules were also found in MKs from lip mucosa and nasal planum skin (Figure 1g). Most of these cytoplasmic structures were frequently found in the apical area of the cytoplasm, above the nucleus and opposite the major aggregation of dense-core granules.

The following three major morphologically different types of cytoplasmic processes could be identified: (i) spine-like processes or microvilli; (ii) rare interstitial processes; and (iii) variably shaped large dendritic processes (Table 1). Spine-like processes of variable length were directed towards keratinocytes. In the MKs of the nasal planum, lip and the whisker pad skin they were large and frequently arose from the supranuclear cell surface, whereas in the oral mucosa they were smaller in length and more commonly arranged in a random distribution on the cell surface. They were fixed in a cylindrical cavity of the adjacent keratinocyte and were composed of a conical base, a shaft of cytoplasmic core, usually with a filamentous axis, and a dome-like vertex (Figure 2a,b). They were occasionally joined with the keratinocyte by means of small, poorly developed desmosomes on their base.

Interstitial processes were located in the interstitium between keratinocytes. They were formed by thin, wavy membrane processes with a scant amount of cytoplasm and without organelles, filaments or desmosomes (Figure 2c). Large dendritic cytoplasmic processes of variable shape were mainly observed in sinus hair follicles and the oral mucosa. They arose from the lateral sides of the MKs and were located in the space between keratinocytes. They usually contained several dense-core granules and other organelles and had no filamentous axis or desmosomal unions (Figure 2d,e).



**Figure 1.** Ultrastructural features of canine Merkel cells (MKs). (a) Noninnervated MK in the whisker pad epidermis. Note the oval shape, folded nucleus (\*), the spine-like cytoplasmic projections on the apical surface (arrow) and the electron-dense granules polarized to the basal part of the cell cytoplasm (arrowhead). Scale bar represents 1  $\mu\text{m}$ . (b) Noninnervated MK in palatine mucosa. Cell is rounded in shape and contains typical polarized electron-dense granules. Scale bar represents 1  $\mu\text{m}$ . (c) Innervated MK in the nasal planum epidermis. Terminal axon (asterisk) is vacuolated (artifact), containing dilated clear vesicles, membrane-like material and mitochondria. Scale bar represents 1.3  $\mu\text{m}$ . (d) Attachment of MKs with adjacent keratinocytes is mediated by small desmosomes (arrows). Scale bar represents 600 nm. (e) Detail of the desmosome structure. The cytoplasmic filaments converging onto the desmosomal membranes are thicker in the keratinocyte (above). Scale bar represents 100 nm. (f) Round MK granules with a dense core encircled by a clear space and a single membrane. Loosely arranged intermediate filaments are also visible (arrow). Scale bar represents 200 nm. (g) Melanin-like granules (arrow) opposite the areas of major aggregation of dense-core granules. Scale bar represents 1  $\mu\text{m}$ . Uranyl acetate and lead citrate staining.

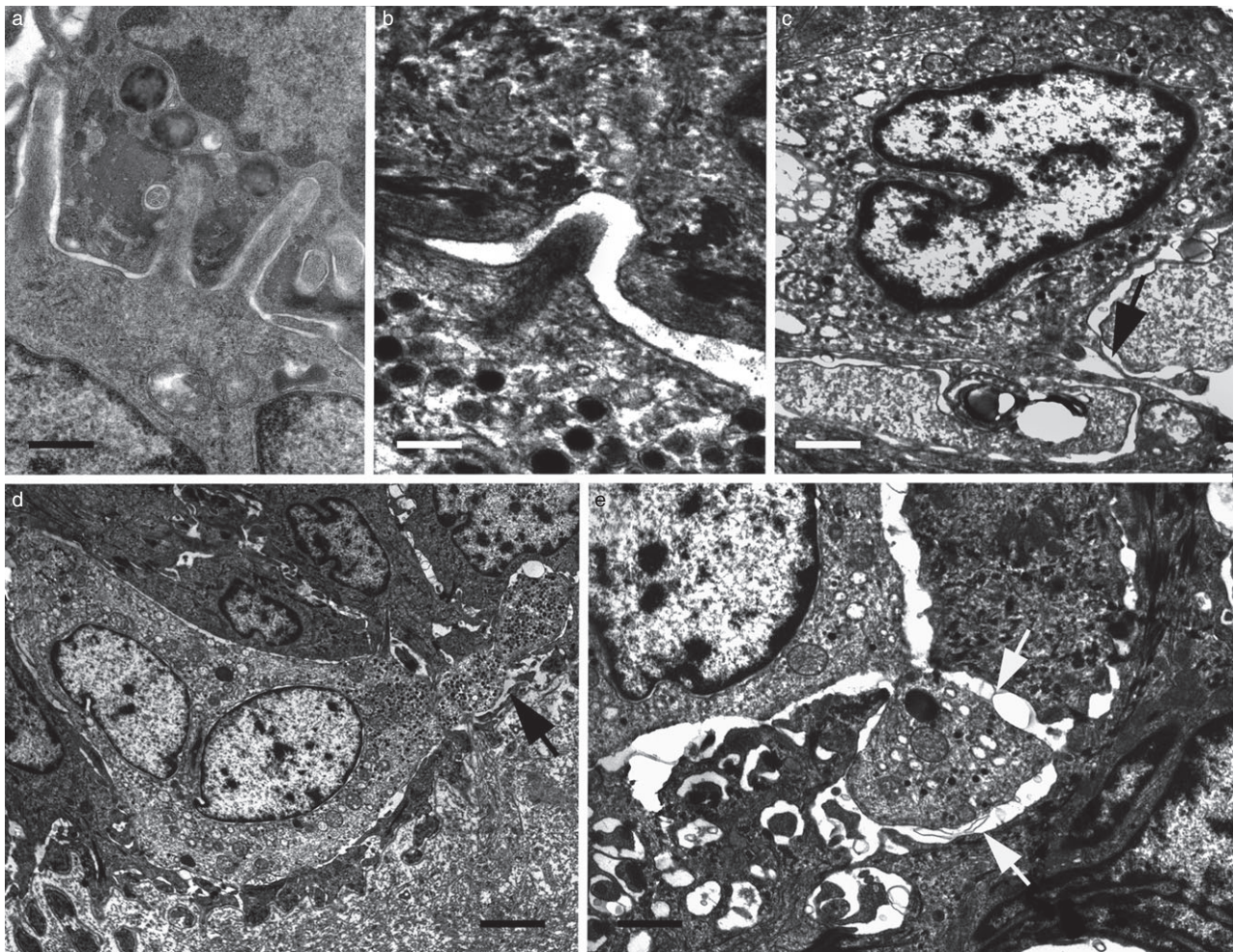
**Table 1.** Summary of measurements of Merkel cells in canine skin samples

Parameters	No. of elements	Mean	SD	SEM
Cellular major/minor axis ( $\mu\text{m}$ )	25	10.27 / 6.33	1.64 / 1.27	0.33 / 0.25
Nuclear major/minor axis ( $\mu\text{m}$ )	25	5.98 / 3.83	1.16 / 0.95	0.23 / 0.19
Desmosome length (nm)	20	203.22	25.11	5.61
Granule diameter (nm)	607	100.10	17.12	0.70
Filament diameter (nm)	20	10.04	1.17	0.26
Spine-like process length/diameter ( $\mu\text{m}$ )	14	1.51 / 0.26	1.10 / 0.06	0.29 / 0.02
Dendritic process length/diameter ( $\mu\text{m}$ )	8	2.12 / 0.99	0.69 / 0.70	0.24 / 0.25
Interstitial process length/diameter ( $\mu\text{m}$ )	4	1.42 / 0.24	0.46 / 0.02	0.23 / 0.01

## Discussion

The Merkel cell appears to be a special cell type in the epidermis, capable of connecting with neural and epithelial cells.<sup>4,14,16,25–27</sup> The distinctive ultrastructural features observed in this study of MKs in dog tissues contrasts with those of the other intraepithelial components. The lack of well-developed tonofilaments establishes clear differences from keratinocytes. Cytoplasmic filaments in MKs were fewer and finer than those of keratinocytes. In addition, no cytoplasmic dense-core granules have been

observed in keratinocytes.<sup>28</sup> Langerhans cells and melanocytes lack tonofilaments, desmosomes, association with nerve terminals and the characteristic MK granules.<sup>28</sup> Few MKs containing melanosomes were detected in the nasal planum and lip epithelium in our study, similar to MKs in other mammals.<sup>25,29</sup> These melanosomes appeared mature and were located in the apical cytoplasm, opposite the major accumulation of dense-core granules. The absence of immature melanosomes and the identification of membrane-bound melanosomes indicate that they are transferred from surrounding melano-



**Figure 2.** Ultrastructural features of canine Merkel cells. (a) Merkel cell in the whisker pad epidermis. Spine-like projections or microvilli directed towards the adjacent keratinocytes are commonly observed arising from Merkel cell membranes. Scale bar represents 400 nm. (b) Merkel cell in the lip epidermis. Detail of a short spine-like process with a notable filamentous axis fixed in a cylindrical cavity of the overlying keratinocyte. Scale bar represents 200 nm. (c) Merkel cell in palatine mucosa. Interstitial thin processes among keratinocytes (arrow) were rarely found. Scale bar represents 600 nm. (d) Merkel cell in sinus hair follicle. Large cytoplasmic projection containing electron-dense granules (arrow) is surrounded by keratinocytes. Scale bar represents 1  $\mu$ m. (e) Merkel cell in the palatine mucosa. Detail of short cytoplasmic process (arrows) containing several dense-core granules, mitochondria, clear vesicles and a lysosome. Scale bar represents 600 nm. Uranyl acetate and lead citrate staining.

cytes by a similar mechanism to that described for keratinocytes.<sup>25,29,30</sup>

The ultrastructure of mammalian MKs is distinctive for its clear cytoplasm, lobulated nucleus, specific granules and, when present, innervation.<sup>3,4,9–11,25</sup> The present study demonstrated that MKs in dogs have a closely similar ultrastructure to MKs in other mammals. However, some differences were noted. Intranuclear inclusions, described in the MKs of rabbit and human skin, were not observed.<sup>31,32</sup> These inclusions are rodlets, plaques or bands of crystalline or filamentous material, which have been suggested to be related to the contractibility of the folded nucleus of MKs. Synapse-like structures between the MKs and the apposed sensory afferents have been described in several mammals,<sup>26,27,33,34</sup> but they were not detected in the present study. Other authors have also failed to observe synaptic structures.<sup>9,35,36</sup> However, a substantial body of molecular evidence supports the hypothesis that mammalian MKs are presynaptic cells.<sup>37</sup> It seems plausible that these conflicting results are due to different methodological procedures of tissue prepara-

tion, fixation or staining, instead of species variations (e.g.  $\text{OsO}_4$  postfixation can result in a rather weak, unreliable staining and insufficient resolution of the synaptic membranes).<sup>34</sup> Different fixation and postfixation methods should be tested to clarify the possible presence of synaptic contacts between MKs and terminal axons in dog skin.

There were some morphometric differences observed in canine MKs in comparison with studies of human MKs.<sup>10,11</sup> The MKs of dogs, in our study, were larger (10.13 versus 8.09  $\mu$ m), desmosomes smaller (204.07 versus 226.90 nm) and granules slightly larger (100.1 versus 94.23 nm) than those of human MKs. Different granule size and granule electron density, which may suggest diverse content,<sup>10,11</sup> were observed in the same cell and in neighbouring cells in the same ultrathin section independently of whether the MKs were connected to terminal axons or not. It has been demonstrated that canine MKs express several molecules, including different neuropeptides previously reported to be presumably located in the cytoplasmic granules.<sup>15,38,39</sup> There

may be a diverse range of canine MK subpopulations with a variety of secretory elements, as also described for humans.<sup>3,8,40</sup>

Merkel cells in the dog are highly heterogeneous with regard to surface projections. Three morphologically different types of cytoplasmic projections or processes, similar to those described in amphibians and mammals,<sup>2,9,10,40,41</sup> were detected in our study. Spine or finger-like processes and microvilli are consistently described in a number of species and development stages. As these spines are orientated towards the skin surface, it has been speculated that they participate in the mechanoreceptive function as 'antennas' for receiving mechanical stimuli. There is some evidence showing that MKs respond to mechanical stretching of the cell membrane by an elevation of the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, which triggers granule exocytosis in various secretory cells.<sup>6,42</sup> Moreover, recent studies have demonstrated that MCs contain the Piezo2 transducer molecule and therefore have the ability to respond to mechanical stimulation, acting as mechanoreceptive primary cells.<sup>7</sup> The presence of morphologically identical cell processes in the present study suggests that MKs in the dog may also act as mechanoreceptors. In addition, it has been shown that the MKs of the sinus hair follicle and the mucosa of the posterior palate in rats differ from each other in the distribution of their microvilli on the cell surface as well as in their topographical relationships with surrounding tissues. A random distribution of these microvilli on the cell surface of mucosal MKs was a common feature, as described in the present study, in the MKs of the oral mucosa in the dog. These features indicate that various kinds of tissue deformation may bend the microvilli of the MKs, ensuring repeated release of secretory granules in favour of their proposed neuroendocrine functions, such as the maintenance of epithelial cells and development of nerve fibres.

Large cytoplasmic projections were also observed in noninnervated MKs of canine oral mucosa. These cytoplasmic processes were morphologically similar to those described at the same location in rodents and humans.<sup>16,40,41</sup> The cytoplasmic processes consistently contained neurosecretory granules and extended towards both keratinocytes and the basal lamina, which supports the theory of a neuroendocrine function. Interestingly, recent reports propose two secretory pathways in MKs: a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway that serves mechanosensory function and neurotransmitter release and a Ca<sup>2+</sup>-independent pathway that serves neuroendocrine functions and neuropeptide release.<sup>6,17</sup> In addition, receptors for met-enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide, substance P and calcitonin gene-related peptide have been detected on MKs of rats rather than in sensory terminals.<sup>43</sup> The neuropeptides contained in the granules of MKs could therefore exert autocrine actions on the MKs themselves and paracrine actions on nerve and keratinocyte development and dermal vascular flow regulation. However, evidence of exocytosis was not observed in our study and is still lacking in the literature.<sup>41</sup> Alternatively, the demonstration of a higher concentration of neurosecretory granules close to the MK membrane facing the adjacent keratinocytes has suggested a mecha-

nism of diacrine secretion.<sup>1,30</sup> Interstitial processes interdigitating between adjacent keratinocytes were previously observed in MKs of human skin, but no function was suggested.<sup>10</sup> They are shorter and thinner than the large cytoplasmic projections of MKs of the oral mucosa and do not contain granules. Whether both processes represent different specialized cytoplasmic projections with different functions or are morphological modifications of the same cellular processes remains unclear.

In conclusion, MKs in the dog showed ultrastructural features similar to those described in other mammals, including the characteristic neurosecretory dense-core granules and heterogeneous cytoplasmic processes. Our data indicate that canine MKs may include a heterogeneous cellular family, with various subpopulations that have different secretory elements displaying different functions, morphology and nerve linking.

## References

1. Tachibana T, Ishizeki K, Sakakura Y *et al.* Ultrastructural evidence for a possible secretory function of Merkel cells in the barbels of a teleost fish, *Cyprinus carpio*. *Cell Tissue Res* 1984; 235: 695–697.
2. Whitear M. Merkel cells in lower vertebrates. *Arch Histol Cytol* 1989; 52(Suppl. 1): 415–422.
3. Tachibana T. The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 379–396.
4. Halata Z, Grim M, Bauman KI. Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 271A: 225–239.
5. Moll I, Roessler M, Brandner JM *et al.* Human Merkel cells: aspects of cell biology, distribution and functions. *Eur J Cell Biol* 2005; 84: 259–271.
6. Boulais N, Pennec JP, Lebonvallet N *et al.* Rat Merkel cells are mechanoreceptors and osmoreceptors. *PLoS One* 2009; 4: e7759.
7. Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y *et al.* Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* 2014; 509: 617–621.
8. Tachibana T, Nawa T. Recent progress in studies on Merkel cell biology. *Anat Sci Int* 2002; 77: 26–33.
9. Winkelmann RK, Breathnach AS. The Merkel cell. *J Invest Dermatol* 1973; 60: 2–15.
10. Beiras A, García-Caballero T, Fernández-Redondo V *et al.* Morphometric characterization of the human neuroendocrine Merkel cells. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 766–768.
11. Beiras A, García-Caballero T, Gallego R. EM diversity of neuroendocrine (Merkel) cells of the human skin. *Ultrastruct Pathol* 1987; 11: 59–65.
12. Narisawa Y, Hashimoto K, Kohda H. Immunohistochemical demonstration of the expression of neurofilament proteins in Merkel cells. *Acta Derm Venereol* 1994; 74: 441–443.
13. Moll I, Kuhn C, Moll R. Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 910–915.
14. Rickelt S, Moll I, Franke WW. Intercellular adhering junctions with an asymmetric molecular composition: desmosomes connecting Merkel cells and keratinocytes. *Cell Tissue Res* 2011; 346: 65–77.
15. Ramírez GA, Rodríguez F, Herráez P *et al.* Morphological and immunohistochemical features of Merkel cells in the dog. *Res Vet Sci* 2014; 97: 475–480.
16. Takahashi-Iwanaga H. The three-dimensional microanatomy of Merkel cells. In: Baumann KI, Halata Z, Moll I, eds. *The Merkel Cell: Structure, Development, Function, Cancerogenesis*. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag, 2003; 7–12.

17. Boulais N, Pereira U, Lebonvallet N *et al.* Merkel cells as putative regulatory cells in skin disorders: an in vitro study. *PLoS One* 2009; 4: e6528.
18. Wollina U, Mahrle G. Epidermal Merkel cells in psoriatic lesions: immunohistochemical investigations on neuroendocrine antigen expression. *J Dermatol Sci* 1992; 3: 145–150.
19. Hartschuh W, Shultz T. Merkel cell hyperplasia in chronic radiation-damaged skin: its possible relationship to fibroepithelioma of Pinkus. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 477–483.
20. Wang TS, Byrne PJ, Jacobs LK *et al.* Merkel cell carcinoma: update and review. *Semin Cutan Med Surg* 2011; 30: 48–56.
21. Konno A, Nagata M, Nanko H. Immunohistochemical diagnosis of a Merkel cell tumor in a dog. *Vet Pathol* 1998; 35: 538–540.
22. Patnaik AK, Post GS, Erlanson RA. Clinicopathologic and electron microscopic study of cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma in a cat with comparisons to human and canine tumors. *Vet Pathol* 2001; 38: 553–556.
23. Bagnasco G, Properzi R, Porto R *et al.* Feline cutaneous neuroendocrine carcinoma (Merkel cell tumour): clinical and pathological findings. *Vet Dermatol* 2003; 14: 111–115.
24. Gil da Costa RM, Rema A, Pires MA *et al.* Two canine Merkel cell tumours: immunoreexpression of c-KIT, E-cadherin,  $\beta$ -catenin and S100 protein. *Vet Dermatol* 2010; 21: 198–201.
25. Kurosumi K, Kurosumi U, Suzuki H. Fine structures of Merkel cells and associated nerve fibers in the epidermis of certain mammalian species. *Arch Histol Jpn* 1969; 30: 295–313.
26. Chen SY, Gerson S, Meyer J. The fusion of Merkel cell granules with a synapse-like structure. *J Invest Dermatol* 1973; 61: 290–292.
27. Mihara M, Hashimoto K, Ueda K *et al.* The specialized junctions between Merkel cell and neurite: an electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 1979; 73: 325–334.
28. Eurell JA, Frappier BL. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. 6th edition. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2006; 321–323.
29. Toyoshima K, Seta Y, Nakashima T *et al.* Occurrence of melanosome-containing Merkel cells in mammalian oral mucosa. *Acta Anat (Basel)* 1993; 147: 145–148.
30. García-Caballero T, Gallego R, Basanta D *et al.* Ultrastructural evidences for a paracrine function of the human neuroendocrine Merkel cells. *Histologia Medica* 1988; 4: 153–160.
31. Straile WE, Tipnis UR, Mann SJ *et al.* Lattice and rodlet nuclear inclusions in Merkel cells in rabbit epidermis. *J Invest Dermatol* 1975; 64: 178–183.
32. Fortman GJ, Winkelmann RK. A Merkel cell nuclear inclusion. *J Invest Dermatol* 1973; 61: 334–338.
33. Iggo A, Muir AR. The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. *J Physiol* 1969; 200: 763–796.
34. Hartschuh W, Weihe E. Fine structural analysis of the synaptic junction of Merkel cell-axon-complexes. *J Invest Dermatol* 1980; 75: 159–165.
35. Smith KR Jr. The ultrastructure of the human Haarscheibe and Merkel cell. *J Invest Dermatol* 1970; 54: 150–159.
36. Hashimoto K. Fine structure of Merkel cell in human oral mucosa. *J Invest Dermatol* 1972; 58: 381–387.
37. Maksimovic S, Baba Y, Lumpkin EA. Neurotransmitters and synaptic components in the Merkel cell–neurite complex, a gentle-touch receptor. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1279: 13–21.
38. Gauweiler B, Weihe E, Hartschuh W *et al.* Presence and coexistence of chromogranin A and multiple neuropeptides in Merkel cells of mammalian oral mucosa. *Neurosci Lett* 1988; 89: 121–126.
39. Hartschuh W, Weihe E, Yanaihara N. Immunohistochemical analysis of chromogranin A and multiple peptides in the mammalian Merkel cell: further evidence for its paraneuronal function? *Arch Histol Cytol* 1989; 52(Suppl. 1): 423–431.
40. Tachibana T, Kamegai T, Takahashi N *et al.* Evidence for polymorphism of Merkel cells in the adult human oral mucosa. *Arch Histol Cytol* 1998; 61: 115–124.
41. Tachibana T, Yamamoto H, Takahashi N *et al.* Polymorphism of Merkel cells in the rodent palatine mucosa: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Arch Histol Cytol* 1997; 60: 379–389.
42. Tazaki M, Suzuki T. Calcium inflow of hamster Merkel cells in response to hyposmotic stimulation indicate a stretch activated ion channel. *Neurosci Lett* 1998; 243: 69–72.
43. Tachibana T, Nawa T. Immunohistochemical reactions of receptors to met-enkephalin, VIP, substance P, and CGRP located on Merkel cells in the rat sinus hair follicle. *Arch Histol Cytol* 2005; 68: 383–391.

## Résumé

**Contexte** – L'implication des cellules de Merkel (MKs) dans les différentes dermatoses ainsi que dans la croissance, différenciation et homéostasie de la peau a été précédemment décrite.

**Hypothèses/Objectifs** – Déterminer les caractéristiques ultrastructurales des MKs dans la peau du chien, y compris leur morphométrie, mettant en évidence leurs ressemblances et leurs différences avec celles décrites chez les autres mammifères.

**Sujets** – Le palais dur, le planum nasal, la lèvre inférieure et les coussinets plantaires ont été prélevés sur deux jeunes chiens de laboratoire.

**Méthodes** – Des sections ultrafines des échantillons fixés dans le tétrahydroxyde d'osmium et montés dans la résine Epon 812 ont été colorées par acétate uranyl et citrate de plomb et examinées par microscopie électronique JEOL JEM 2010.

**Résultats** – Les caractéristiques ultrastructurales comprenaient : (1) un arrangement en amas dans la couche basale de l'épiderme, la muqueuse orale ou la gaine épithéliale externe folliculaire; (2) des liens inconstants avec des terminaux nerveux; (3) une forme cellulaire ovale ( $10.27 \pm 1.64 \mu\text{m}$  axe principal) avec de larges noyaux plurilobés ( $5.98 \pm 1.16 \mu\text{m}$  axe principal); (4) des processus cytoplasmiques étoilés et épais s'intercalant avec des kératinocytes satellites; (5) présence de desmosomes dans les corps cellulaires ou à la base des processus étoilés attachés aux kératinocytes voisins; (6) un cytoplasme contenant des filaments intermédiaires lâches ( $10.04 \pm 1.17 \text{ nm}$ ) et de nombreux granules denses ( $100.1 \pm 17.12 \text{ nm}$ ) arrangés dans la portion basale du cytoplasme.

**Conclusions et importance clinique** – Ceci est la première description des caractéristiques ultrastructurales des MKs chez le chien, améliorant ainsi la connaissance de la structure de la peau de cette espèce et présentant un contexte de base pour de futures études physiologiques et pathologiques du rôle de ces cellules dans les tissus normaux et endommagés du chien.

## Resumen

**Introducción** – la implicación de las células de Merkel (MKs) en diferentes formas de enfermedad cutánea así como en el crecimiento, diferenciación, y homeostasis de la piel ha sido previamente documentada

**Hipótesis/Objetivos** – evaluar las características ultraestructurales de las MKs en la piel de perros, incluyendo valores morfométricos, resaltando sus similitudes y diferencias con aquellas descritas para otros mamíferos.

**Animales** – se obtuvieron paladar duro, plano nasal, labio inferior, y piel de las vibrisas de dos perros sanos destinados a propósitos académicos.

**Métodos** – secciones ultra finas de las muestras se fijaron con tetraóxido de osmio y fueron embebidas en resina Epon 812 y teñidas con una acetato de uranilo y citrato de plomo y examinadas utilizando un microscopio de electrónico de transmisión JEOL JEM 2010.

**Resultados** – las características ultra estructurales incluyeron: (1) ordenamiento en agregados en el estrato basal de la epidermis, mucosa oral, o vaina externa de la raíz externa folicular; (2) unión inconstante con la terminal nerviosa; (3) forma celular oval ( $10,27 \pm 1,64 \mu\text{m}$  en el eje mayor) con núcleos grandes lobulados ( $5,98 \pm 1,16 \mu\text{m}$  en el eje mayor); (4) procesos citoplásmicos gruesos parecidos a espinas interdigitadas con los queratinocitos de alrededor; (5) presencia de desmosomas el cuerpo celular o en la base de las de los procesos espinosos uniéndose a los queratinocitos vecinos; (6) citoplasma conteniendo filamentos intermedios en orientación laxa ( $10,04 \pm 1,17 \text{ nm}$ ) y numerosos gránulos de centro denso ( $100,1 \pm 17,12 \text{ nm}$ ) ordenados en la porción basal del citoplasma.

**Conclusiones e importancia clínica** – este estudio aporta la primera descripción completa de las características ultraestructurales de las MKs en el perro, aumentando el conocimiento de la estructura de la piel en esta especie y representando un cimiento básico para estudios futuros fisiológicos y patológicos acerca del papel de estas células en los tejidos normales y enfermos caninos.

## Zusammenfassung

**Hintergrund** – Die Beteiligung von Merkel Zellen (MKs) an verschiedenen Hauterkrankungen sowie am Wachstum, der Differenzierung und der Homöostase der Haut wurde schon früher dokumentiert.

**Hypothese/Ziele** – Eine Untersuchung der ultrastrukturellen und morphometrischen Merkmale der MKs in der Hundehaut, um ihre Ähnlichkeiten und Unterschiede mit jenen, die bei anderen Säugetieren beschrieben sind, herauszufinden.

**Tiere** – Proben des harten Gaumens, des Nasenspiegels, der Unterlippe und der Schnurrbartpolster wurden von zwei gesunden jungen Hunden, die für akademische Zwecke vorgesehen waren, genommen.

**Methoden** – Ultradünne Schnitte der Proben, die in Osmium Tetroxid fixiert und in Epon 812 Resin eingebettet waren, wurden mit Uranyl Acetat und Bleizitrat gefärbt und mittels JEOL JEM 2010 Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

**Ergebnisse** – Die ultrastrukturellen Charakteristika inkludierten: (1) ein Arrangement in Clustern in der Basalschicht der Epidermis, der oralen Mucosa oder des externen follikulären Wurzelschafts; (2) einen inkonstante Verbindung zum Nervenende; (3) ovale ( $10,27 \pm 1,64 \mu\text{m}$  Hauptaxis) Zellform mit langen lappenförmigen Kernen ( $5,98 \pm 1,16 \mu\text{m}$  Hauptaxis); (4) wirbelsäulenartige und dicke zytoplasmatische Fortsätze, die mit den umgebenden Keratinozyten in Verbindung traten; (5) Auftreten von Desmosomen im Zellkörper oder an der Basis des wirbelsäulenartigen Fortsatzes, der an benachbarte Keratinozyten angrenzte; (6) Zytoplasma mit locker arrangierten Intermediärfilamenten ( $10,04 \pm 1,17 \text{ nm}$ ) und zahlreiche dichte Granula ( $100,1 \pm 17,2 \text{ nm}$ ), die im basalen Anteil des Zytoplasmas angeordnet waren.

**Schlussfolgerungen und klinische Bedeutung** – Die vorliegende Studie repräsentiert die erste umfassende Beschreibung der ultrastrukturellen Charakteristika der MKs beim Hund, was das Wissen über die Struktur der Haut dieser Spezies weiterbringt und einen grundlegenden Hintergrund für zukünftige physiologische und pathologische Studien über die Rolle dieser Zellen in normalem oder beschädigtem Gewebe des Hundes darstellt.

## 要約

**背景** – 皮膚の増殖、分化ならびに恒常性だけでなく様々な皮膚疾患におけるメルケル細胞(MKs)の関与は今まで立証されてきた。

**仮説/目的** – 形態計測学、他の哺乳類で解説されているそれらの類似点および相違点の強調を含めたイヌの皮膚におけるメルケル細胞の超微細構造的な特徴を評価すること。

**供与動物** – 2頭の健康な若いイヌから硬口蓋、鼻鏡、下顎側口唇および触毛部のサンプルを研究目的で採取した。

**方法** – 四酸化オスミウムで固定し、エポン812レジンで包埋した極薄の切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、JEOL JEM 2010透過型電子顕微鏡を使用して検査した。

**結果** – 特徴付けられた超微細構造は(1)表皮、口腔粘膜、あるいは外毛根鞘の基底層で塊状に配列していた;(2)神経末端との不規則なつながり;(3)分葉状核(主軸 $5.98 \pm 1.16 \mu\text{m}$ )を伴う卵型(主軸 $10.27 \pm 1.64 \mu\text{m}$ )の細胞;(4)棘状で厚い細胞質突起が周囲のケラチンサイトに入り込む;(5)細胞体、あるいは隣り合っているケラチンサイトに接触する棘状

突起の根底におけるデスモソームの存在;(6)緩く配列する中間径フィラメント( $10.04 \pm 1.17$  nm)を含んだ細胞質ならびに細胞質の基底側に並ぶ複数の有芯顆粒( $100.1 \pm 17.12$  nm)

**結論および臨床的な重要性** — この研究ではイヌにおけるMKsの超微細構造的な特徴、この動物種における皮膚構造の知識を深め、正常および損傷を受けたイヌの組織におけるこれらの細胞の役割についての将来的な生理学や病理学的な研究のための基礎的な背景を示す最初の詳しい説明を提供した。

#### 摘要

**背景** — 以前的研究发现梅克尔细胞(MKs)参与不同的皮肤病,以及皮肤的生长、分化及内环境稳定。

**假设/目的** — 评估犬皮肤MKs的超微结构,包括形态测定,重点关注与其他哺乳动物的异同。

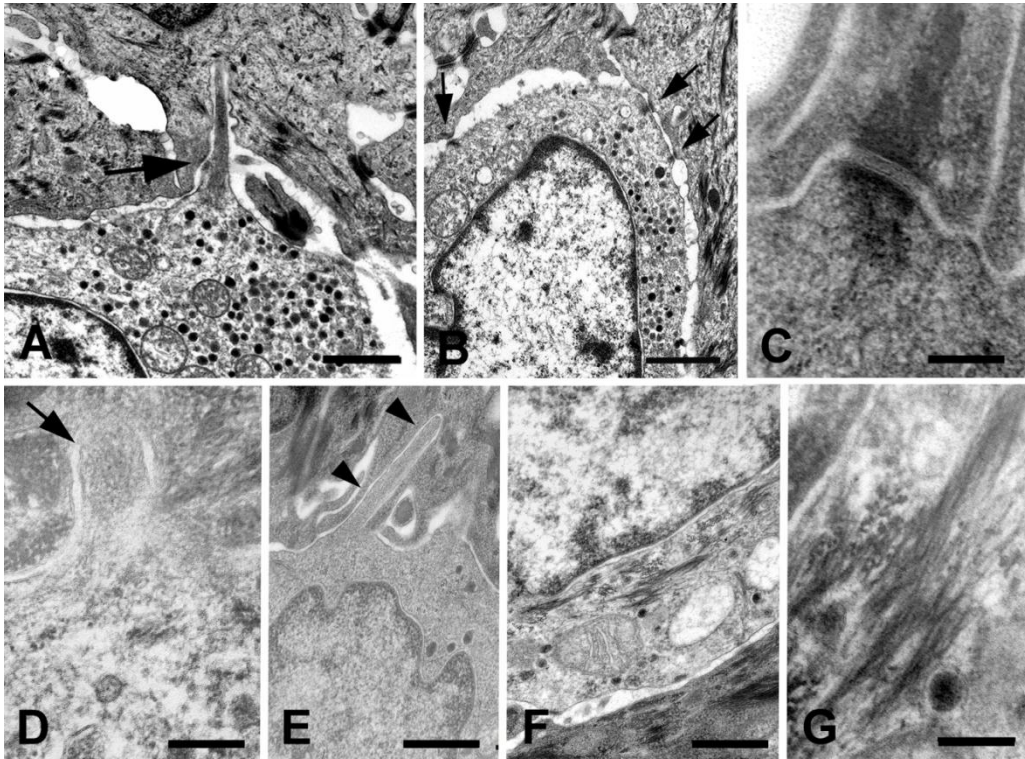
**动物** — 来自研究机构的两只健康犬,取其硬顎、鼻平面、下唇和胡须垫样本。

**方法** — 样本的超薄切片浸入四氧化锇中,并嵌入Epon812树脂中,用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色,用JEOL JEM 2010透射式电子显微镜镜检。

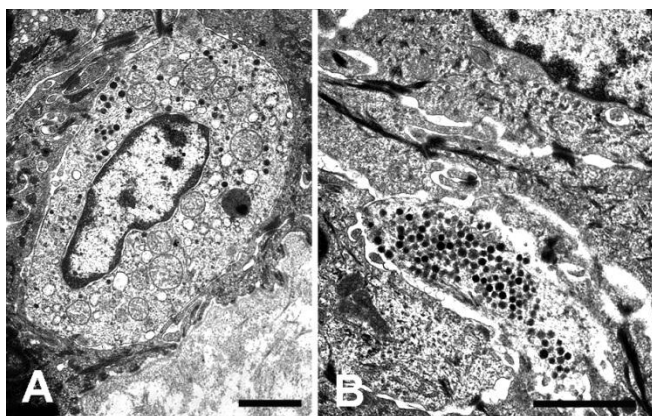
**结果** — 超微结构特点包括:(1)在表皮基层,口腔黏膜或外部的毛囊根鞘呈簇状排列;(2)与神经末梢断续链接;(3)圆形细胞(长轴 $10.27 \pm 1.64$   $\mu\text{m}$ )伴随分叶大细胞核(长轴 $5.98 \pm 1.16$   $\mu\text{m}$ );(4)刺状的粗胞质突与周围的角质形成细胞交联;(5)细胞体上有细胞桥粒,或刺样突出底部附着于相邻的角质形成细胞上;(6)细胞质中含有疏松排列的中间纤丝( $10.04 \pm 1.17$  nm),细胞质底部排列有大量密致核心颗粒( $100.1 \pm 17.12$  nm)。

**总结与临床意义** — 本次研究是首次对犬皮肤MKs超微结构的完整描述,增强该物种皮肤结构的知识,陈述犬这些细胞在正常和受损组织中的作用,为未来生理学 and 病理学研究提供基本背景。

## ICONOGRAFÍA ADICIONAL

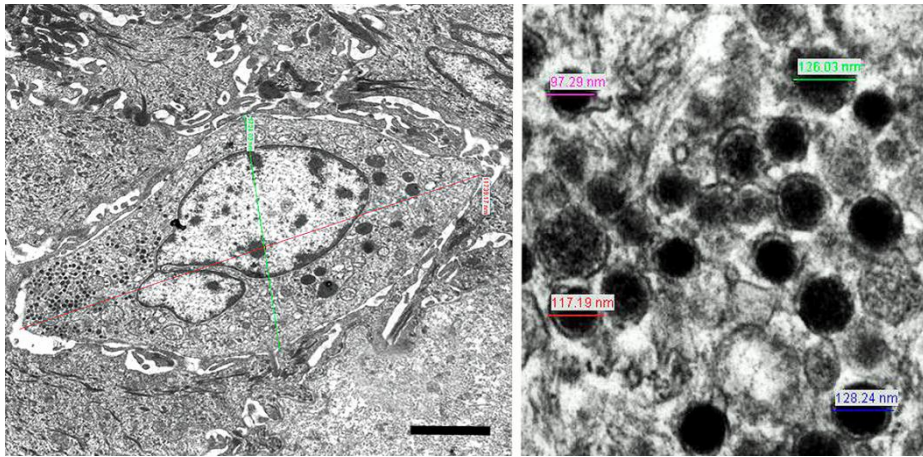


**Figura 1.** (A) Trufa. Larga espina citoplasmática con desmosoma en la base (flecha). (B) Labio inferior. Varios desmosomas unen una CM con los queratinocitos adyacentes. (C) Detalle de un desmosoma entre una CM (abajo) y un queratinocito (arriba). (D) Piel facial. Detalle de una espina corta. (E) Trufa. Detalle de una espina larga. (F) Labio inferior. Filamentos intermedios perinucleares. (G) Labio inferior. Detalle de filamentos. Barra = 1  $\mu\text{m}$  (A, E, F), Barra = 2  $\mu\text{m}$  (B), Barra = 200 nm (C, G); Barra = 500nm (D).



**Figura 2.** (A) Paladar duro. Esta célula tiene forma redondeada, no presenta terminación asociada, núcleo poco lobulado y no muestra espinas citoplasmáticas. Barra = 2  $\mu\text{m}$ . (B) Paladar duro. Proceso *paracrino* de una CM entre los queratinocitos. Barra = 1  $\mu\text{m}$ .





**Figura 3.** Mediciones realizadas por el software para determinación de diámetros celulares (izquierda) y gránulos electrodensos (derecha). Barra = 2  $\mu$ m.

**4.4. CORRELACIÓN ENTRE LOS HALLAZGOS  
INMUNOHISTOQUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DE LAS  
CÉLULAS DE MERKEL EN EL PERRO**



Una vez determinadas las características inmunohistoquímicas y ultraestructurales de las células de Merkel (CMs) en la piel del perro, a través de los estudios descritos anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue poner de manifiesto las correlaciones presentes entre estos hallazgos, a fin de conocer y entender mejor este tipo celular y su contexto en la estructura de la piel canina.

### ***Material y Métodos.***

Las localizaciones cutáneas muestreadas, la metodología usada para la fijación y procesado de los tejidos y los procedimientos de inmunohistoquímica y microscopía electrónica se describen en los apartados 4.2 y 4.3 del presente capítulo.

Adicionalmente, para demostrar inmunohistoquímicamente la relación entre las CMs y las terminaciones nerviosas, sobre varias secciones de cada localización se realizó doble inmunomarcaje usando CK20 y NF. Tras realizar inmunomarcaje simple con CK20, las secciones marcadas con AEC fueron lavadas en tampón salino TRIS y re-incubadas con suero normal de conejo al 10% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente antes de la incubación con anticuerpo primario anti-NF (clon MNF402, EuroDiagnostica Lab., Malmö, Suecia) o anti-NSE (clon BBS/NC/VI-H14, Dako Lab., Glostrup, Dinamarca). Posteriormente, el reactivo secundario y el complejo ABC se aplicaron como se ha descrito previamente. Para demostrar este segundo marcaje, las secciones se sumergieron en cromógeno 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EEUU) disuelto en tampón salino TRIS durante 1-2 min. La señal positiva se caracterizó por la presencia de reacción citoplasmática homogénea de color rojo intenso sin ruido de fondo para CK20 y de coloración marrón con intensidad variable para NF.

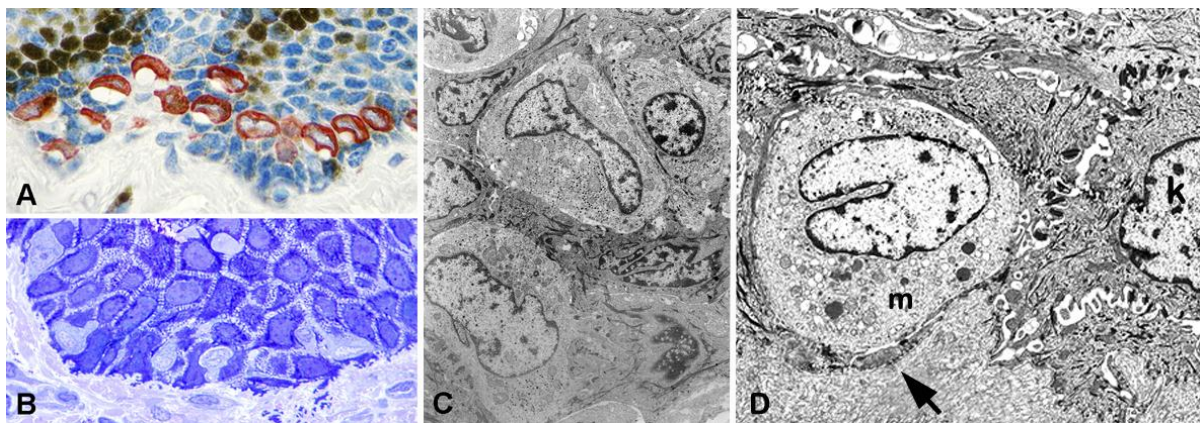
---

Presentado en *22nd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP) and 6th Meeting of the European Society of Veterinary Clinical Pathology (ESVCP)*.

## Resultados y Discusión.

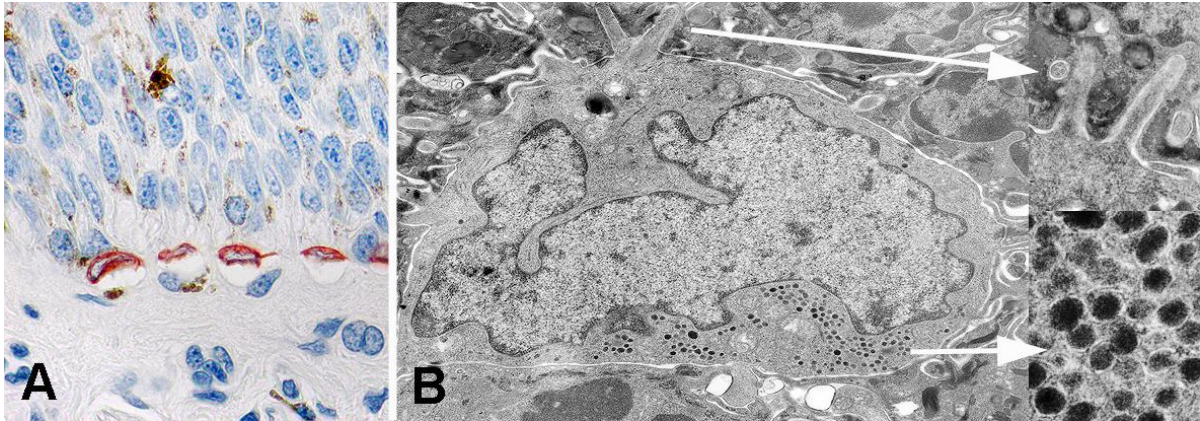
### 1. Localización y Orientación en el epitelio.

En los estratos basales del epitelio de las mucosas y de la epidermis de la piel lampiña canina, las CMs pueden identificarse individualizadas o tienden a agregarse frecuentemente (figura 1). Aquí, la orientación es variable, paralela a la superficie mayoritariamente.



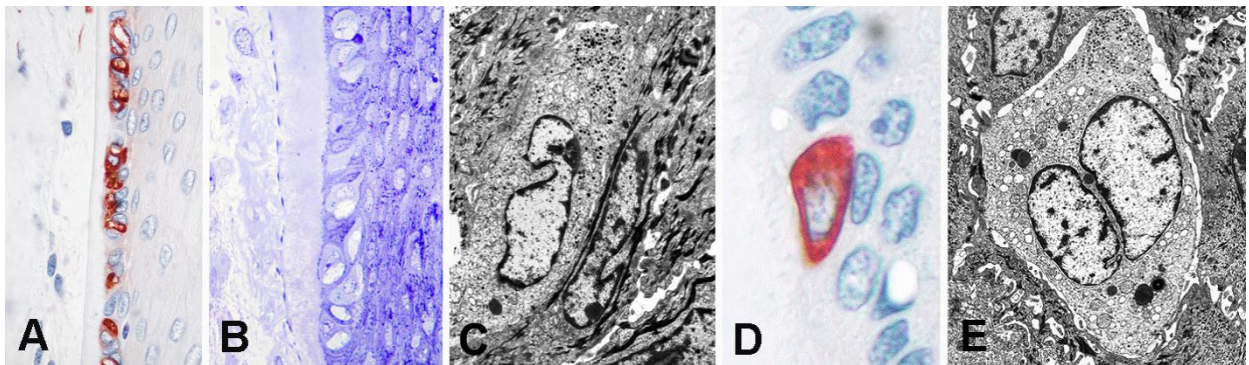
**Figura 1.** Numerosas CMs agrupadas en el estrato basal del epitelio de la mucosa labial, mostradas mediante inmunomarcaje con CK20 (A) y en corte semifino (B). 40x. (C) Detalle de uno de estos grupos bajo el microscopio electrónico. Tres CMs (claras) son evidentes y diferenciables de los Qs circundantes (más electrodensos por su mayor contenido en filamentos). 3400x. (D) CM redondeada en mucosa oral. Prolongaciones del citoplasma de los Qs separan generalmente las CMs de la membrana basal (flecha). 4600x.

En la piel pilosa canina, las CMs se identifican perpendiculares a la superficie cutánea en el estrato basal de los discos táctiles epidermales (figura 2). Esta orientación se ha demostrado que está relacionada con la función mecanorreceptiva (Hartschuh y Weihe, 1980; Halata y cols., 1999, 2003; Halata y Baumann, 2000). En la superficie apical de las CMs, la membrana plasmática forma prolongaciones en forma de espinas de variable longitud que contactan íntimamente con los Qs adyacentes, lo cual favorece la captación del estímulo mecánico por las células. En la porción citoplasmática basal, en el lado dermal, se suelen concentrar los gránulos electrodensos secretores. Esta polaridad se mantiene de forma más o menos constante.



**Figura 2.** (A) CMs en la base de un disco táctil epidermal en la piel facial. En esta localización, las CMs se disponen generalmente paralelas a la superficie cutánea y perpendiculares a las células columnares del disco. CK20. 40x. (B) Equivalencia de la imagen A al microscopio electrónico. Las CMs se dividen virtualmente en porción citoplasmática apical o supranuclear, con las características espinas citoplásmicas digitiformes, y una porción basal o subnuclear, donde se concentran los gránulos electrodensos. 5800x.

En los folículos pilosos, incluido los especializados como las vibrisas, las CMs se ubican en la vaina epitelial externa en agrupaciones longitudinales en los cortes histológicos convencionales y bajo el microscopio óptico, en menor medida de forma aislada. Se disponen oblicuas a la membrana vítrea, intercaladas con los Qs (figura 3).

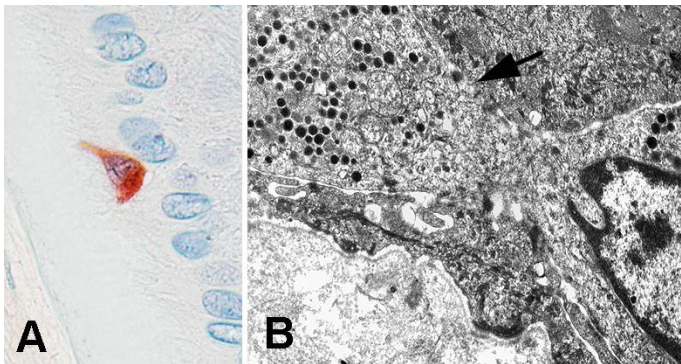


**Figura 3.** CMs en la vaina epitelial externa de una vibrisa, con diferentes morfologías. Alineadas e intercaladas con los Qs en sección inmunomarcada con NF (A, 40x), en corte semifino (B, 40x) y con orientación oblicua en corte ultrafino (C, 5800x). De forma triangular o piramidal inmunomarcada con CK8+18 (D, 100x) y al microscopio electrónico (E, 4600x).

A pesar de que en las secciones inmunomarcadas las CMs parecen contactar íntimamente con la membrana basal (o membrana vítrea en las vibrisas), bajo el microscopio electrónico se reconocen porciones citoplasmáticas de queratinocitos que se interponen entre ambas estructuras (figura 1, flecha).

## 2. Morfología.

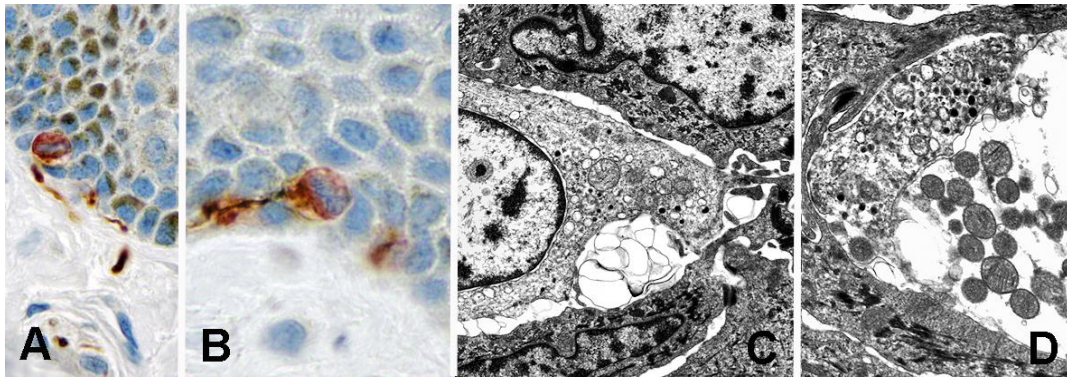
Las CMs caninas muestran una morfología bastante variada. Como regla general, las formas ovaladas o aplanadas son predominantes en la piel pilosa y glabra (figuras 1 y 2), mientras que en la mucosa y en los folículos pilosos es donde mayor polimorfismo se aprecia (figura 3). Esto coincide en gran medida con observaciones previas en otras especies de mamíferos (Tachibana, 1995; Tachibana y Nawa, 2002). En las mucosas y en las vibrisas, fundamentalmente, se reconocen proyecciones citoplasmáticas de variable longitud, diferentes a las clásicas espinas citoplasmáticas de la superficie celular apical, que interdigitan con los Qs de alrededor y contienen variable cantidad de gránulos neurosecretores (figura 4).



**Figura 4.** Especialmente las CMs de las vibrisas (mostrado aquí) y de la mucosa oral presentan prolongaciones citoplasmáticas con una alta cantidad de gránulos neurosecretores (flecha), a modo de *procesos paracrinos*. (A) inmunohistoquímica con CGRP, 100x. (B) microscopio electrónico, 13500x.

## 3. Terminaciones nerviosas.

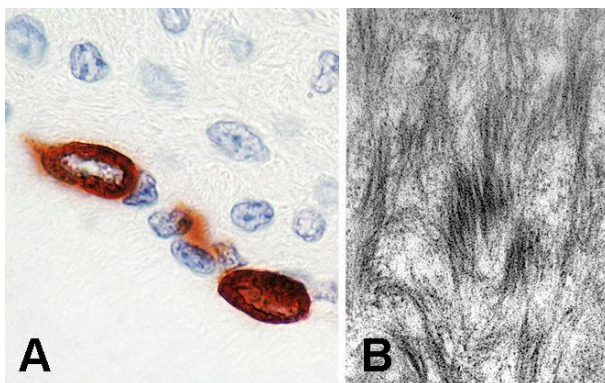
Terminaciones nerviosas que provienen de nervios mielinizados de la dermis contactan con las CMs caninas en su porción citoplasmática basal en la piel pilosa, glabra y en muchas CMs de las mucosas (figura 5). En las vibrisas, las terminaciones nerviosas contactan con las CMs en la porción citoplasmática contraria, la más alejada a la membrana vítrea. Esas terminaciones nerviosas contienen una gran cantidad de mitocondrias y vesículas claras (figura 5). Algunos autores han descrito conexiones similares a sinapsis química (Chen y cols., 1973; Mihara y cols., 1979; Iggo y Muir, 1969; Hartschuh y Weihe, 1980). Las CMs en el presente estudio no mostraron estructuras similares. No obstante, su detección es difícil y está influenciada por los métodos de fijación, procesado y tinción del material (Hartschuh y Weihe, 1980).



**Figura 5.** (A) (B) Trufa. Terminaciones nerviosas que acaban en formaciones discoidales contactan con las CMs en su lado dermal. Las terminaciones nerviosas provienen de nervios mielinizados de la dermis (A). Doble marcaje con NF (marrón) y CK20 (rojo). 40x (A), 100x (B). (C) Detalle de terminación nerviosa vacuolizada adyacente a una CM en trufa. 10500x. (D) Terminación nerviosa con numerosas mitocondrias y vesículas claras (derecha) en íntimo contacto con un proceso citoplasmático de una CM (izquierda). 13500x.

#### 4. *Filamentos intermedios.*

Consistentemente, las CMs caninas bajo el microscopio electrónico muestran filamentos intermedios dispersos por el citoplasma y asociados o formando parte de desmosomas y de las proyecciones espinosas. Con menor frecuencia, estos filamentos se concentran perinuclearmente. Los procedimientos inmunohistoquímicos demuestran que estos filamentos son CKs 7, 8, 18, 20 y, sólo en vibrisas, NF positivos (figura 6). Estos rasgos son muy similares que los descritos en otras especies, incluida la inconsistente presencia de NF (Narisawa y cols., 1994c; Moll I. y cols., 2005).

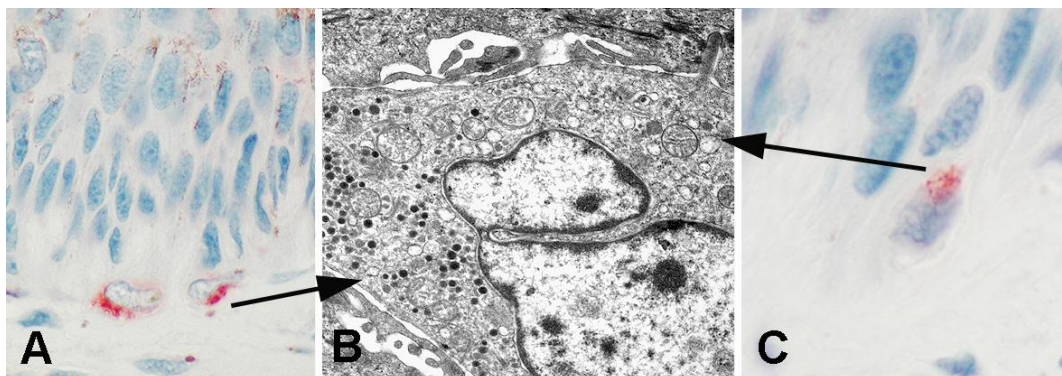


**Figura 6.** (A) Vibrisa. Inmunorreacción a CK7. 100x. (B) Paladar duro. Sección ultraestructural mostrando en detalle la apariencia de los filamentos intermedios en el citoplasma de una CM. 64000x.



## 5. Proteínas neuroendocrinas.

Inmunohistoquímicamente, los patrones de tinción más característicos observados en las CMs caninas son los obtenidos con los anticuerpos dirigidos contra CGA, CGRP y SYN. Al examen ultraestructural, se aprecia como estos patrones corresponden con la ubicación de los gránulos electrodensos secretores (porción basal de las CMs) y pequeñas vesículas claras (porción apical de las CMs) (figura 7). Los gránulos electrodensos y las vesículas claras pueden ser organelas implicadas en dos vías de secreción diferenciadas. Estudios recientes confirman esta posibilidad a través de la demostración de una ruta de señalización  $Ca^{2+}$ -dependiente que lleva a la liberación de neurotransmisor por la CM hacia la terminación asociada (*función mecanorreceptiva*) y una segunda vía  $Ca^{2+}$ -independiente que está implicada en la exocitosis de los gránulos de núcleo denso, más probablemente implicada en una *función endocrina o paracrina* por parte de las CMs (Boulais y cols., 2009a, b).

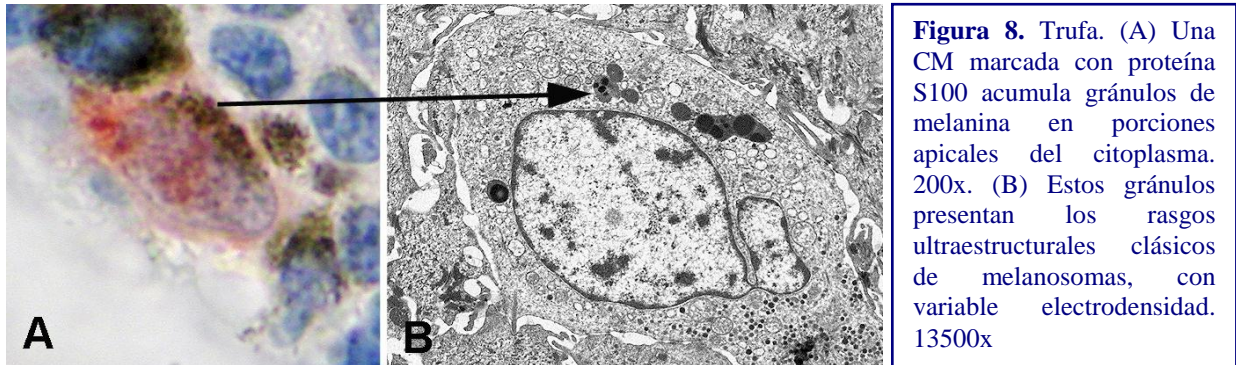


**Figura 7.** Disco táctil epidermal en piel facial. Las CMs en la base del disco aparecen inmunomarcadas para CGA con un patrón de reacción granular y subnuclear (A) y para SYN con un patrón de reacción granular y supranuclear (C). 100x. (B) Ultraestructura de una CM en piel pilosa facial. Los gránulos electrodensos se concentran en la base; corresponde a la reacción inmunohistoquímica a CGA. Las vesículas claras se acumulan en la porción supranuclear; se corresponden con la inmunorreacción a SYN. 13500x.

## 6. Melanina.

Ocasionalmente, las CMs inmunomarcadas, especialmente en áreas cutáneas altamente pigmentadas, parecen contener gránulos de pigmento melánico (figura 8). Bajo el microscopio electrónico, se confirma la existencia, en ocasiones, de gránulos densos muy similares a los

melanosomas clásicos que se pueden observar en los Qs y MLs adyacentes. Su presencia sugiere que entre los MLs y las CMs puede existir un mecanismo de transferencia similar al que se da entre los MLs y los Qs. Algunos autores ya describieron especializaciones de membrana y contactos especializados entre las CMs y los otros tipos celulares de la epidermis (García-Caballero y cols., 1988; Moll I. y cols., 2005).



En definitiva, existe una clara y marcada relación entre los hallazgos inmunohistoquímicos y las características ultraestructurales de las CMs caninas, que demuestran el carácter neuroepitelial de este tipo celular.



**4.5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE CINCO ANTICUERPOS COMERCIALES  
PARA IDENTIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA Y RECUENTO DE  
LAS CÉLULAS DE MERKEL EN PIEL NORMAL DEL PERRO**



## RESUMEN

**Introducción.** Las células de Merkel (CMs) son células claras especializadas que se concentran en áreas sensitivas al tacto de la piel de los mamíferos. Presentan un amplio perfil inmunohistoquímico, que incluye citoqueratinas de bajo peso molecular y varios marcadores endocrinos y neurales. Diferencias en la expresión de estos marcadores pueden ser consecuencia de resultados contradictorios en estudios de este tipo celular en tejidos normales o alterados.

**Hipótesis/Objectivos.** Evaluar y comparar cinco anticuerpos comerciales diferentes desarrollados contra CK8+18, CK20, NSE, CGA and SYN a fin de dilucidar posibles diferencias entre ellos respecto al tipo y calidad de la inmunorreacción y al recuento de CMs.

**Animales.** Muestras de paladar duro, piel facial incluyendo vibrisas, trufa y cojinetes plantares fueron tomadas de cinco perros sanos, adultos jóvenes, destinados a propósitos académicos.

**Métodos.** Los anticuerpos fueron testados inmunohistoquímicamente mediante el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina.

**Resultados.** Todos los anticuerpos mostraron una tinción específica en las CMs en las secciones en parafina sin tinción de fondo. La expresión de CK20 fue la más intensa entre los diferentes anticuerpos, seguida de la obtenida con los anticuerpos contra NSE, CK8+18, CGA y SYN. Se encontró una diferencia significativa entre los valores de intensidad de inmunorreacción dependiendo de la localización examinada.

**Conclusiones e importancia clínica.** Los anticuerpos comerciales disponibles presentan una gran variabilidad con respecto a la reactividad y calidad para identificar y cuantificar las CMs en la piel del perro. El anticuerpo anti-CK20 es claramente más efectivo para reconocer las CMs en la piel canina. Estos resultados representan un fundamento básico para estudios futuros acerca del papel de estas células en los tejidos caninos normales y lesionados.



*Scientific Paper*

**Comparative analysis of five commercial antibodies for immunohistochemical identification and counting of Merkel cells in normal skin of the dog**

Gustavo A. Ramírez\*, Francisco Rodríguez, Ayoze Castro-Alonso, Miguel Rivero, Alejandro Suárez-Bonnet, Antonio Espinosa de los Monteros

Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary College, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario Cardones, 45413 Arucas, Las Palmas, Spain.

*\*Corresponding author*

Gustavo A. Ramírez

Phone: +34 928451145, Fax: +34 937211916, E-mail: gramirez@becarios.ulpgc.es

*Conflict of interest statement*

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

*Sources of Funding*

This study has been supported by a grant from the Ministry of Education and Science of the Government of Spain (Program for Development of University Professors and Researchers, BOE 12022000).

*Running Heading*

Comparative analysis of canine Merkel cells



## **Abstract**

**Background.** Merkel cells (MCs) are specialized clear cells concentrated in touch-sensitive areas of mammalian skin. They showed a wide immunohistochemical profile including low molecular weight cytokeratins and various endocrine and neural markers. Differences in expression of these markers may be consequence of contradictory results in studies of MCs in normal and damaged canine tissues.

**Hypotesis/Objectives.** To asses and compare five different commercial available antibodies developed against CK8+18, CK20, NSE, CGA and SYN in order to elucidate possible differences in terms of immunoreaction and MCs counting.

**Animals.** Hard palate, cheek skin including sinus hair follicles or vibrissae, nasal planum and footpad samples were taken from five healthy young dogs destined for academic purposes.

**Methods.** Antibodies were tested immunohistochemically by avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method on formalin-fixed paraffin-embedded samples.

**Results.** All the antibodies showed specific staining of MCs on paraffin sections without background staining. The expression of CK20 was the strongest among different antibodies, with a substantially high number of immunostained cells, followed by the antibodies against NSE, CK8+18, CGA and SYN. There was a significant difference in intensity of immunoreaction scores between them depending on the location examined.

**Conclusions and clinical importance.** Commercially available antibodies show great variability with respect to quality and reactivity to identify and quantify MCs in the dog skin. Anti-CK20 is clearly more effective to recognize MCs in the dog skin. These results represent a basic background for future physiological and pathological studies of the role of these cells in normal and damaged canine tissues.

**Key words:** cytokeratin 20, dog, immunohistochemistry, Merkel cell.

## **Introduction**

Merkel cells (MCs) were first described in 1875 by Friedrich Sigmund Merkel as “tastzellen” (touch cells). These specialized clear cells function as slowly-adapting type-I mechanoreceptors and are concentrated in touch-sensitive areas in glabrous and hairy skin and in ectoderm-derived mucosa.<sup>1-3</sup> In addition, MCs are believed to be involved in paracrine functions related to skin homeostasis and cutaneous nerve development.<sup>4-5</sup> They contain a plethora of active molecules known to be neurotransmitters, biogenic monoamines, endocrine and neurocrine substances, neurotrophins, or growth and differentiation factors for various cell types, such as neuron-specific enolase (NSE), synaptophysin (SYN), chromogranin A (CGA), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), bombesin, met-enkephalin, serotonin, pancreastatin, substance P, peptide histidina isoleucine and calcitonin gene-related peptide (CGRP).<sup>4,6-8</sup> These findings justified the classification of mammalian MCs with the diffuse neuroendocrine system. On the other hand, MCs also express cytokeratin polypeptides demonstrating their epithelial cell character, including low molecular weight cytokeratins (CK) 7, 8, 18, 19 and 20.<sup>9-13</sup> CK20 is an acidic, type I cytokeratin which has turned out to be the most specific and sensitive marker for the identification of MCs in human skin (Moll 95).<sup>12</sup>

Since immunohistochemical profile of MCs in the dog appears to be wide,<sup>14</sup> it would be of interest to study whether differences in the identification and number of canine MCs could be found using different available commercial antibodies in the same tissues. The selection of the most sensible and specific antibody is crucial to perform studies of density and anatomical mapping in cell populations. The aim of the present study was to compare the immunohistochemical expression of five commercial available monoclonal and polyclonal antibodies developed against low molecular weight cytokeratins and neuroendocrine molecules, in order to determine possible differences in terms of immunoreaction and counting of MCs that allow selecting the most reliable antibody for study of density and distribution of MCs in the dog.

## **Material and Methods**

### *Sample selection*

Five, male and female, healthy young adult dogs were used for the study. They had been humanely euthanized and destined for academic training according to current legislation (RD53/2013 from Spanish Government and 2010/63/UE Policy from European Union on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes). Samples from body locations reported to be MCs rich areas<sup>14,15</sup> were collected: hard palate, cheek skin including vibrissae, nasal planum and footpads. The macroscopic appearance of the tissues included had been normal.

### *Immunohistochemical study*

Specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated through graded alcohols, and embedded in paraffin wax. Serial tissue sections of 3µm thick were collected onto Vectabond-coated slides (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA), incubated at 37 °C for 24h, deparaffinized, rehydrated in graded alcohols, and incubated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes to block endogenous peroxidase activity. The sections were then subjected to heat-induced antigen retrieval by placing in 1 mmol/liter ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA) at pH 6.0 in a water bath at 95° C for 30 minutes. After cooling, the slides were covered with 10% normal rabbit (for monoclonal antibodies) or porcine (for polyclonal antibodies) sera in phosphate buffered saline (PBS) for 30 minutes at room temperature before incubation with the primary antibodies for 18 hours at 4° C.

The primary antibodies used included anti-CK20 (monoclonal antibody, clone Ks20.8, 1:40, Dako Labs., Glostrup, Denmark), anti-NSE (monoclonal antibody, clone BBS/NC/VI-H14, 1:1000, Dako Labs), anti-CGA (polyclonal antibody, 1:50, Dako Labs), anti-SYN (monoclonal antibody, clone SY38, 1:20, Dako Labs), and anti-CK8+18 (monoclonal antibody, clone NCL-5D3, 1:20, EuroDiagnostica Labs., Malmö, Sweden). A biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (IgG; Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:200 in PBS containing 1% normal rabbit serum (for monoclonal antibodies) or a biotinylated porcine anti-mouse

immunoglobulin G (IgG; Dako) diluted 1:200 in PBS containing 1% normal porcine serum (for polyclonal antibodies) was applied for 30 min at room temperature as secondary reagent. The avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was then applied as the third reagent. To develop the immunoreaction, 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Sigma-Aldrich Chemical Co.) was applied to the slides for 3-5 minutes at room temperature. Sections were lightly counterstained with Mayer's haematoxylin, washed in tap water, and aqueous mounted (Shandon Immu-Mount™, Thermo Electron Corporation, PA, USA). Sections in which the specific primary antibodies were replaced by PBS were included as negative controls and run simultaneously with the test slides. Several tissues served as positive control in every assay (human and canine intestinal epithelium for anti-CK20 antibody; canine sweat gland epithelium for anti-CK8+18 antibody; canine brain for anti-NSE antibody; human and canine colon for anti-CGA antibody; and canine adrenal medulla for anti-SYN antibody).

#### *Evaluation of immunohistochemistry*

Positivity immunoreactivity was characterized by the presence of a distinct cytoplasmic red reaction without background staining. The numerical frequency of MCs was assessed by counting the number of positive cells per 1cm length of epidermis at 40x magnification. Cells were registered when the nucleus-containing cell body was visible on the microscopic field, while cytoplasmic processes or partial cross-sections were discharged. Results were expressed as number of MCs *per centimetre of basal zone*. The intensity of immunoreaction for every positive cell was evaluated and divided into a three-point scale (1 = mild expression, 2 = moderate expression, 3 = strong expression).

#### *Statistical methods*

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS® 20 software package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). For the quantitative parameters, the mean and standard deviation (SD) were analyzed. The number of the positive cells and the intensity scores were compared between the 5 antibodies by one-way ANOVA test. Statistical significance was accepted at  $p < 0.05$ .

## **Results**

Round or oval MCs were detected in 98/100 tissue sections. They were placed individualized or clustered in various arrangements at the tips of epithelial pegs of the palatine mucosa, rete ridges of glabrous skin of the nasal planum and footpads, and at the base of the epidermal discs and within the outer root sheath of the hair follicles in cheek hairy skin. Several patterns of cytoplasmic immunoreactivity were noted depending on the antibody used; nuclei were not stained. CK20 and CK8+18 presented a similar pattern of immunostaining, predominantly diffuse, and homogeneously distributed throughout the cell cytoplasm (figure 1a and 1b). Occasionally, granular or peripheral cytoplasmic staining was noted. The staining pattern with the anti-NSE antibody was light granular and homogeneously distributed in the cytoplasm (figure 1c). Dermal immunostained nerve fibres penetrated the basement membrane and were closely associated with many immunostained cells. CGA was expressed in a predominantly granular pattern with the strongest immunoreactivity on the basal side of the epidermal and mucosal MCs or on the side facing into the follicle in MCs of vibrissae (figure 1d). The immunoreactivity for SYN presented as finely granular immunostaining localized in the superficial face of the cytoplasm in the epidermal and mucosal MCs whereas it was situated in the dermal face in the MCs of vibrissae (figure 1e). Some nerve bundles and perivascular immunostained nerve fibres in dermis were also positive for CGA and SYN antibodies.

The intensity scores and counting of immunopositive cells are summarised in table 1. Differences in the intensity of immunoreaction for each antibody were noted between MCs in the same or in different location in the same individual. In hard palate and nasal planum, the strongest immunoreaction was obtained for CK20 (2.5 and 2.5 scoring respectively), followed by NSE (2.3 and 2.3), CK8+18 (1.7 and 1.5), CGA (1.5 and 1.5) and SYN (1.4 and 1.3). In cheek skin and footpads, the intensity of immunoreaction was very similar for CK20 (2 and 2.3 scoring respectively), NSE (2 and 2.3), and CGA (2.3 and 2.3), and stronger than CK8+18 (1.9 and 1.8) and SYN immunostaining (1.4 and 1). These scores were found to be statistically comparable. In the hard palate, differences in intensity of immunoreaction were statistically significant between CK20 and CGA ( $p = 0.03$ ), and CK20 and SYN ( $p = 0.01$ ). In the cheek skin, only significant differences were noted between CGA and SYN ( $p = 0.02$ ). Differences in immunoreaction scores were also present in the nasal planum for CK20 compared with CK8+18 ( $p = 0.04$ ), CGA ( $p = 0.04$ ), and SYN ( $p < 0.01$ ), and for NSE compared with SYN ( $p = 0.02$ ).

Finally, difference in reaction intensity with SYN was highly significant when compared with CK20 and CGA scores ( $p < 0.01$ ) in the footpads.

Our results also reveal variations in density of MCs between locations and antibodies used. For every location, the highest numbers of MCs were consistently obtained with anti-CK20 antibody. Total amounts of MCs in 98/100 tissue sections from all body sites were 902 MCs for CK20 antibody, 761 MCs for NSE, 690 MCs for CK8/18, 660 for CGA, and 491 for SYN. These differences in MCs numbers between the antibodies tested were not statistically significant, excepting in footpads between CK20 and SYN ( $p < 0.01$ ), NSE and SYN ( $p = 0.03$ ), and CGA and SYN ( $p = 0.02$ ).

## Discussion

The highest amounts of MCs were noted with CK20 antibody in every location. In addition, intensity of immunoreaction was usually more intense for Ck20 than for other antibodies tested. These findings agree with the high sensibility and specificity for MCs identification demonstrated for antibodies against CK20 in human.<sup>12</sup>

Pattern of immunostaining in MCs was different for each antibody used. These differences of immunostaining are due to the intracellular location of the specific peptide against which each antibody is directed. Cytokeratins are integral constituents of the cytoskeleton in the MCs.<sup>2,13,15</sup> Immunoreactive products in the MCs labelled with anti-cytokeratin antibodies appears to be homogeneously distributed within the cytoplasm, matching with typical arrangement of cytokeratins in the form of fine intermediate filaments distributed within the cell.<sup>2,15</sup> In addition being the structural cytoskeleton, CKs in the MCs seems to be participating in the cell plasticity necessary for mechanoreceptive function.<sup>13</sup> In the NSE-positive cells, the immunoreaction was dispersed throughout the cytoplasm in correspondence to the distribution of ribosomes and the rough endoplasmic reticulum observed in the MCs under electron microscopy.<sup>15-17</sup> It has been noted that the number of ribosomes per cell varies with the cell cycle,<sup>18</sup> therefore NSE expression by MCs may be different depending of the cell status.

CGA is the main element of the soluble matrix protein in secretory granules of various neuroendocrine cells, including mammalian MCs, usually coexisting with other neuropeptides such as VIP, peptide histidine isoleucine, substance P or CGRP in the same granule.<sup>6-8</sup> Using anti-CGA antibody, immunostaining in MCs of the dog was restricted to the cytoplasmic portion closest to the nerve ending where dense-core granules are concentrated.<sup>15</sup> SYN, a specific component of the membrane of presynaptic vesicles in neurons and neuromuscular junctions,<sup>19</sup> showed a cytoplasmic immunostaining pattern in the opposite cellular side in relation to CGA antibody, which is the part of the cytoplasm farthest from the nerve terminal. This particular distribution has been related with the structural distribution of small clear-content vesicles observed with electron microscope.<sup>15</sup> Secretory electron dense-core granules and small clear vesicles could be involved in two different secretory pathways of MCs in dogs, as appears to be in MCs of pig<sup>20</sup> and neurons.<sup>21</sup> Two secretory pathways have been proposed in MCs: a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway that serves mechanosensory function and neurotransmitter release, and Ca<sup>2+</sup>-independent pathway that serves neuroendocrine functions and neuropeptide release.<sup>3,5</sup> Numbers, sizes, and electron densities of the granules and clear-vesicles can vary between MCs from the same or different location in the same animal or between different individuals.<sup>15,22</sup> Although these antibodies can identify the MCs in the skin, appears to be not completely adequate to perform extensive studies in cell density or distribution because of MCs with scant amounts of granules or vesicles could be difficult to identify by immunohistochemistry. In fact, CGA and Syn showed the lower intensity of immunoreaction and lower amounts of MCs in seriated sections.

In conclusion, the results of the present study highlight the need to validate human commercial antibodies available for identification of MCs for any particular immunohistochemical study of density or mapping of this cell population in veterinary species. Antibodies developed against CK20 appear to be the most appropriate to effectively recognize MCs in the dog skin.

## References

1. Merkel F. Tastzellen und Taskörperchen bei den Hausthieren und beim Menschen. *Arch Mikr Anat* 1875; 11: 636-652.
2. Halata Z, Grim M, Baumann KI. Current understanding of Merkel cells, touch reception and the skin. *Expert Rev Dermatol* 2010; 5: 109–116.
3. Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, *et al.* Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* 2014; 509: 617-21.
4. Tachibana T. The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 379-396.
5. Boulais N, Pereira U, Lebonvallet N, *et al.* Merkel cells as putative regulatory cells in skin disorders: an in vitro study. *PLOS ONE* 2009; 4: e6528.
6. Gauweiler B, Weihe E, Hartschuh W, *et al.* Presence and coexistence of chromogranin A and multiple neuropeptides in Merkel cells of mammalian oral mucosa. *Neurosci Lett* 1988; 89: 121-126.
7. Hartschuh W, Weihe E, Yanaihara N. Immunohistochemical analysis of chromogranin A and multiple peptides in the mammalian Merkel cell: further evidence for its paraneuronal function? *Arch Histol Cytol* 1989; 52: 423-431.
8. Fantini F, Johansson O. Neurohistochemical markers in human cutaneous Merkel cells. An immunohistochemical investigation. *Exp Dermatol* 1995; 4: 365-371.
9. Moll R, Moll I, Franke WW. Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. *Differentiation* 1984; 28: 136-154.
10. Lundquist K, Kohler S, Rouse RV. Intraepidermal cytokeratin 7 expression is not restricted to Paget cells but is also seen in Toker cells and Merkel cells. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 212-219.
11. Narisawa Y, Hashimoto K, Bayless TJ, *et al.* Cytokeratin polypeptides of Merkel cells in human fetal and adult skin: difference of expression of cytokeratins in epidermal and dermal Merkel cells. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 171-180.
12. Moll I, Kuhn C, Moll R. Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cell while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 910-915.



13. Eispert AC, Fuchs F, Brandner JM, *et al.* Evidence for distinct populations of human Merkel cells. *Histochem Cell Biol* 2009; 132: 83-93.
14. Ramírez GA, Rodríguez F, Herráez P, *et al.* Morphological and immunohistochemical features of Merkel cells in the dog. *Res Vet Sci* 2014; 97: 475–480.
15. Ramírez GA, Rodríguez F, Herráez P, *et al.* Ultrastructural characterization of normal Merkel cells in the dog. *Vet Dermatol* 2015; 26: 328–333.
16. Gu J, Polack JM, Tapia FJ, *et al.* Neuron-specific enolase in the Merkel cells of mammalian skin: the use of specific antibody as a simple and reliable histologic marker. *Am J Pathol* 1981; 104: 63-68.
17. Vinoses SA, Herman MM, Rubinstein LJ, *et al.* Electron microscopic localization of neuron-specific enolase in rat and mouse brain. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 1295-302.
18. Darzynkiewicz Z, Evenson DP, Staiano-Coico L, *et al.* Correlation between cell cycle duration and RNA content. *J Cell Physiol* 1979; 100: 425-438.
19. Ortonne JP, Petchot-Bacque JP, Verrando P, *et al.* Normal Merkel cells express a synaptophysin-like immunoreactivity. *Dermatologica* 1988; 177: 1-10.
20. García-Caballero T, Cuevas J, Gallego R, *et al.* Synaptophysin-like immunoreactivity in the Merkel cells of pig-snout skin. *Ultrastruct Pathol* 1989; 13: 55-61.
21. Lundberg JM, Hokfelt T. Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends Neurosci* 1983; 6: 325-333.
22. Beiras A, García-Caballero T, Gallego R. EM diversity of neuroendocrine (Merkel) cells of the human skin. *Ultrastruct Pathol* 1987; 11: 59-65

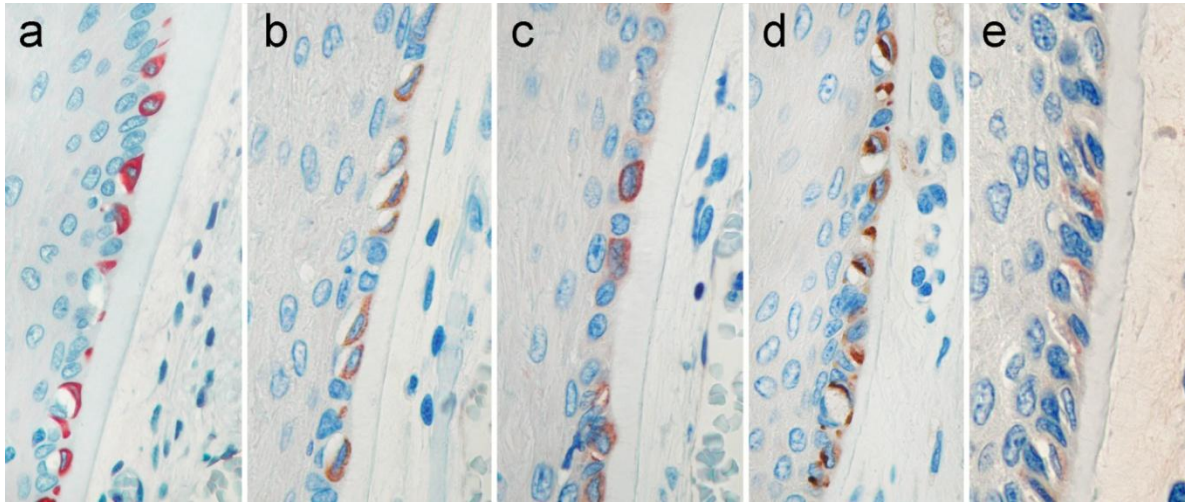
**Table 1.** Individual and mean values ( $\pm$  SD) of immunoreactive MCs/cm of basal zone and intensity of immunostaining (in brackets) for each location with the antibodies used.

ATB	Locations	Animals					Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5	
CK20	Hard palate	17 (2.5)	23 (1.8)	8 (3)	42 (2.8)	23 (2.6)	22.60 $\pm$ 12.46 (2.5)
	Nasal planum	31 (2.9)	17 (2.3)	13 (2.9)	46 (2.6)	22 (1.6)	25.80 $\pm$ 13.14 (2.5)
	Cheek skin	122 (2)	62 (1.7)	120 (1.8)	216 (2.8)	69 (1.6)	117.80 $\pm$ 61.56 (2)
	Footpads	21 (2.1)	17 (2.2)	7 (2)	10 (2.8)	16 (2.5)	14.20 $\pm$ 5.63 (2.3)
CK8+18	Hard palate	22 (1.7)	11 (2)	7 (1)	26 (1.7)	6 (2)	14.40 $\pm$ 9.07 (1.7)
	Nasal planum	19 (1.3)	10 (1.6)	13 (2)	39 (1.7)	9 (1)	18.00 $\pm$ 12.37 (1.5)
	Cheek skin	119 (2.3)	43 (1.5)	99 (2.3)	182 (2.2)	43 (1.2)	97.20 $\pm$ 58.19 (1.9)
	Footpads	16 (1.6)	9 (2)	3 (2)	5 (1.3)	9 (2)	8.40 $\pm$ 4.98 (1.8)
NSE	Hard palate	14 (2.7)	16 (1.3)	5 (2.6)	40 (2.7)	13 (1.9)	17.60 $\pm$ 13.20 (2.3)
	Nasal planum	20 (2)	14 (2.1)	10 (2)	47 (2.6)	16 (2.8)	21.40 $\pm$ 14.76 (2.3)
	Cheek skin	121 (1.7)	34 (1.5)	85 (2.5)	181 (1.8)	71 (2.5)	98.40 $\pm$ 55.70 (2)
	Footpads	21 (2.3)	21 (1.9)	0 (0)	12 (2.5)	20 (2.5)	14.80 $\pm$ 9.09 (2.3)
CGA	Hard palate	4 (2)	22 (1.2)	5 (1)	15 (1.2)	6 (2.3)	10.40 $\pm$ 7.83 (1.5)
	Nasal planum	18 (2.4)	17 (1)	3 (1)	38 (1.9)	8 (1.3)	16.80 $\pm$ 13.40 (1.5)
	Cheek skin	99 (2.6)	45 (2.7)	79 (2.1)	179 (2.6)	57 (1.6)	91.80 $\pm$ 52.96 (2.3)
	Footpads	14 (2.5)	19 (2.3)	2 (2.5)	12 (2.3)	18 (1.9)	13.00 $\pm$ 6.78 (2.3)
SYN	Hard palate	11 (1)	17 (1.5)	7 (2)	28 (1.4)	1 (1)	12.80 $\pm$ 10.30 (1.4)
	Nasal planum	18 (2)	4 (1)	5 (1.2)	28 (1.1)	3 (1)	11.60 $\pm$ 11.01 (1.3)
	Cheek skin	83 (1.1)	37 (1.3)	46 (1.1)	151 (1.6)	35 (1.7)	70.40 $\pm$ 49.04 (1.4)
	Footpads	3 (1)	10 (1)	0 (0)	1 (1)	3 (1)	3.40 $\pm$ 3.91 (1)

ATB = antibody; SD = standard deviation.

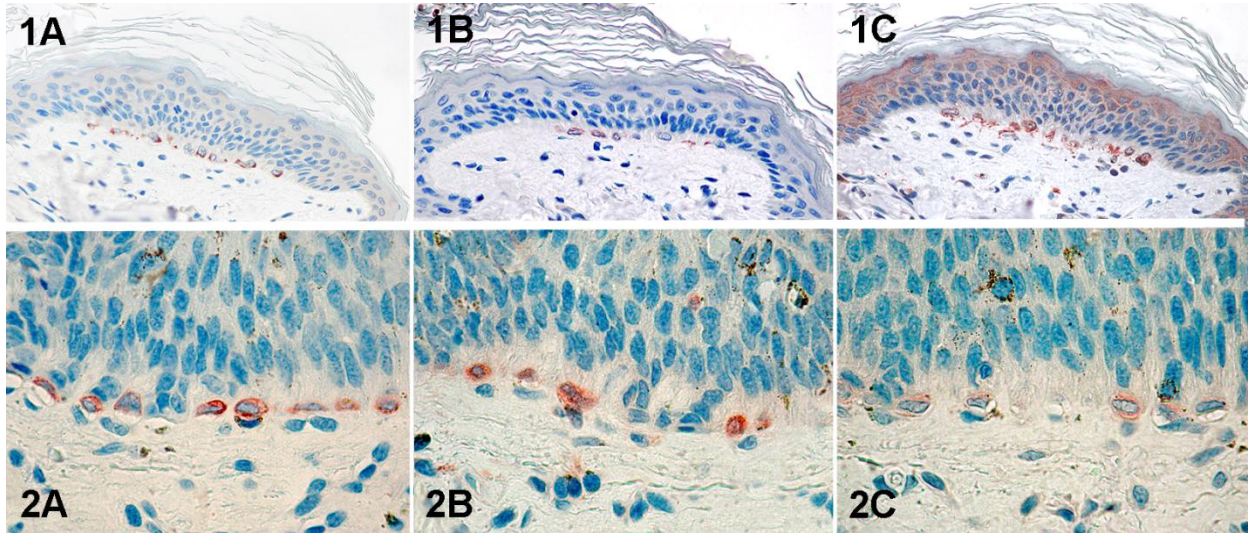
**Figure legends**

**Figure 1.** Seriated histologic sections of vibrissa showing cytoplasmic immunoreactivity in the MCs for CK20 (a), CK8+18 (b), NSE (c), CGA (d) and SYN (e) antibodies.

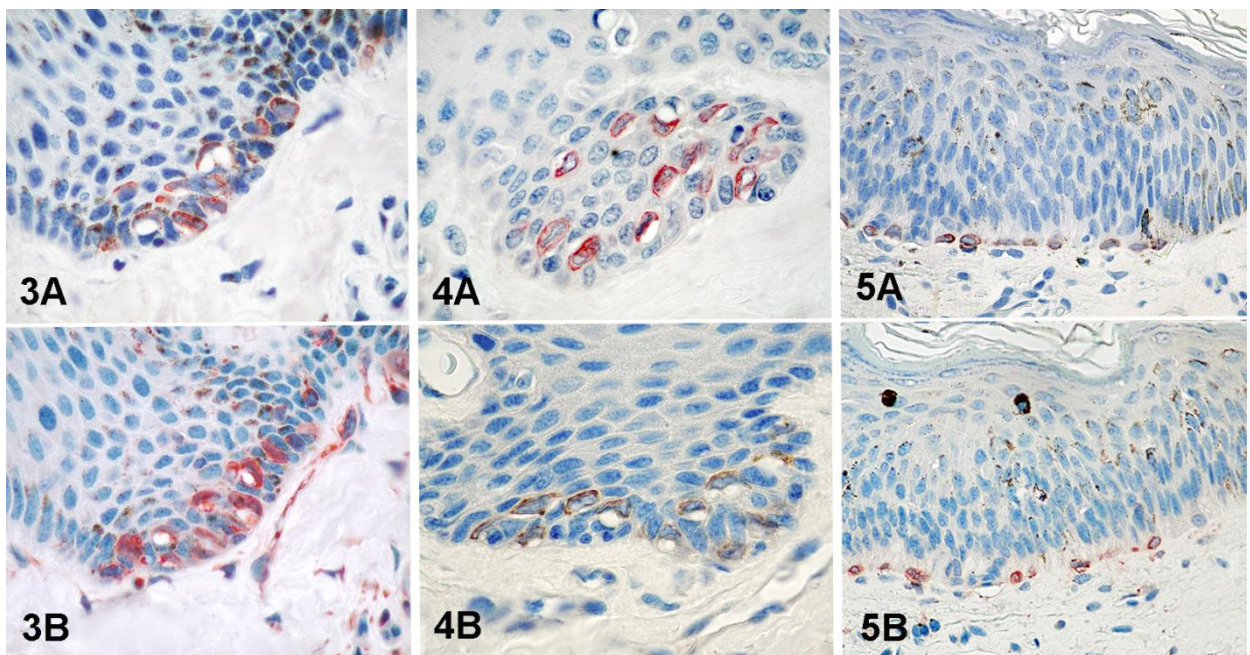


## MATERIAL ADICIONAL

### ICONOGRAFÍA



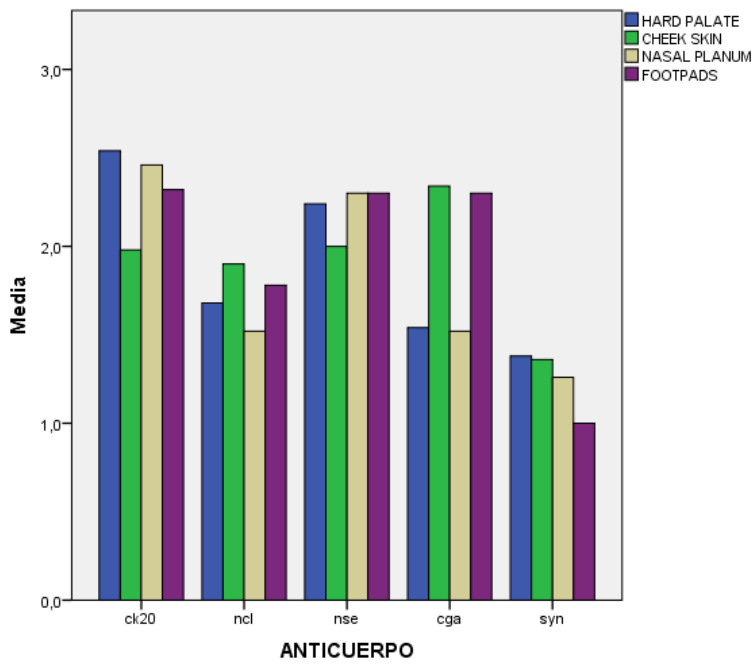
**Figura 1.** Disco epidermal en piel facial. Las CMs aparecen en la base inmunomarcadas con CGA (A), CK20 (B) y NSE (C). La intensidad de reacción es similar. 40x. **Figura 2.** Detalle de las CMs en la base de un disco epidermal en piel facial. La intensidad de reacción para CK20 (A) y NSE (B) es mayor que para SYN (C), además de reconocerse un mayor número de células. 100x



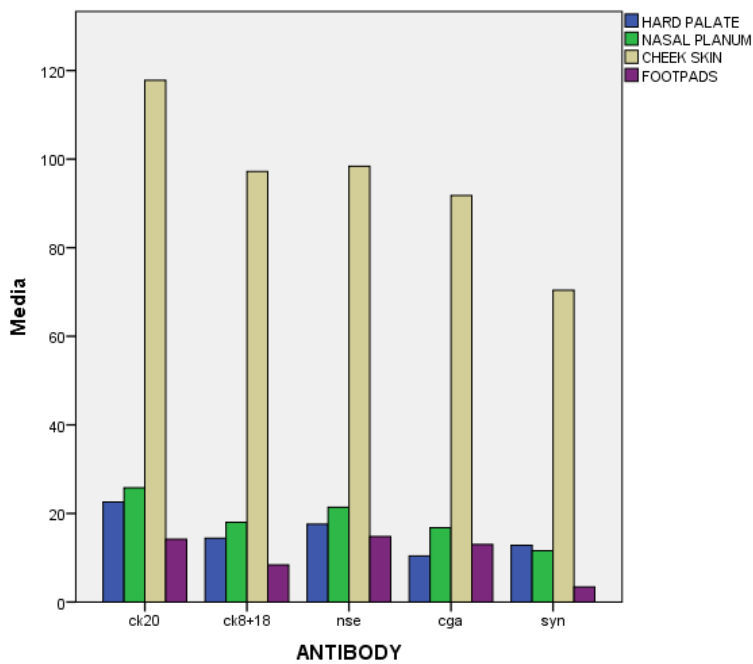
**Figura 3.** CMs en el epitelio del paladar duro. En este caso, la intensidad de inmunorreacción es menor con CK20 (A) que con NSE (B). **Figura 4.** Papila epitelial en la epidermis de cojinete plantar. CMs marcadas con CK20 (A) y CK8+18 (B), siendo la intensidad de marcado inferior para esta última. 100x. **Figura 5.** Disco epidermal de piel facial. Las CMs presentan similar intensidad de reacción a CK20 (A) y NSE (B). 40x.

## GRÁFICOS ESTADÍSTICOS

**Gráfico 1.** Intensidad de expresión de los diferentes anticuerpos para cada localización.



**Gráfico 2.** Recuento celular con cada anticuerpo para cada localización.



**4.6. DISTRIBUCIÓN ANATÓMICA Y RECUENTO DE LAS CÉLULAS DE MERKEL EN LA PIEL Y MUCOSA NORMAL DEL PERRO**



## RESUMEN

Las células de Merkel (CMs) son receptores cutáneos especializados en el sentido del tacto. A pesar que la distribución de CMs se ha estudiado extensivamente en humanos y roedores, su precisa distribución y densidad en la piel del perro no ha sido determinada previamente. El conocimiento de su distribución en la piel normal podría facilitar el entendimiento de sus funciones en esta especie. El propósito del presente estudio es determinar la densidad y realizar el mapeo de las CMs en la piel y mucosas normales del perro, incrementando el conocimiento de la estructura de la piel en esta especie, y resaltar las similitudes y las diferencias con otros mamíferos. El estudio se realizó mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo comercial específico para citoqueratina 20 en 1187 muestras de 60 localizaciones diferentes obtenidas de 21 perros adultos. Los resultados se expresaron como número de CMs por centímetro de zona basal (CMs/cmBZ) y fueron analizados estadísticamente en busca de diferencias respecto a edad, sexo, tamaño de la raza, localización, longitud del pelo, tono de la capa y pigmentación de cojinetes y mucosa oral. Diferentes patrones de organización fueron encontrados en la epidermis, folículos pilosos y mucosas, incluyendo grupos celulares de variable tamaño, organizaciones lineales o en forma de herradura y células individualizadas y dispersas. Se hizo recuento de las CMs inmunopositivas y se determinaron los valores medios por cm de zona basal para cada localización. Los resultados revelan gran variación en la densidad y distribución de las CMs en la superficie corporal, con la densidad más alta ( $> 20$  CMs/cmBZ) en la mucosa oral y la piel del área facial. No se encontró correlación de la densidad de CMs con la edad, sexo, tipo de raza, tipo de capa o pigmentación. El trabajo concluye que las CMs son numerosas en áreas de recepción sensorial. Estos hallazgos sugieren que las CMs pueden estar asociadas con el sentido táctil en el perro. Además, funciones paracrinas influenciando el desarrollo epitelial y folicular son posible para las CMs en algunas localizaciones.





*Original Paper*

**ANATOMICAL DISTRIBUTION AND COUNTING OF MERKEL CELLS IN  
NORMAL SKIN AND MUCOSAE OF THE DOG**

G.A. Ramírez\*, F. Rodríguez, O. Quesada, P. Herráez, A. Fernández, A. Espinosa de los  
Monteros y Zayas

Unit of Histology and Veterinary Pathology, Institute for Animal Health, Veterinary College,  
University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario Cardones, 45413 Arucas, Las  
Palmas, Spain.

*\*Corresponding author*

Gustavo A. Ramírez

Phone: +34 928451145; Fax: +34 93 721 19 16;

e-mail address: gramirez@becarios.ulpgc.es

*Running Heading*

Location and density of canine Merkel cells

*Conflict of interest statement*

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship,  
and/or publication of this article.

## **Summary**

Merkel cells (MCs) are specialized cutaneous receptor cells involved with tactile sense. Although the distribution of MCs has been extensively studied in humans and rodents, their precise distribution and density throughout skin in the dog has not previously been determined. Knowledge of their distribution into the normal skin could facilitate understanding of their functions. The aim of the present study is assess the density and anatomical mapping of the MCs in normal skin and mucosa of the dog, enhancing the knowledge of the skin structure in this species, and highlight the similarities and differences with other mammals. Immunohistochemistry was performed using a commercial antibody specific for cytokeratin 20 in 1187 samples from 60 different body sites from 21 adult dogs. Results were expressed as number of MCs per centimeter of basal zone (MCs/cmBZ) and statistically analyzed for differences related to age, sex, size of breed, site, length of hair, coat darkness, and pigmentation of footpad and oral mucosa. Different patterns were noted in epidermis, hair follicles or mucosa, including variable-sized clusters, linear or horse-shaped arrangements, and scattered and individualized cells. MCs were counted and the mean values for cm of basal zone calculated for each site. The results reveal great variations in density and distribution of MCs over the body surface, with the highest numbers ( $> 20$  MCs/cmBZ) in oral mucosa and facial skin. There was no correlation of MCs density with age, sex, type of breed, coat type or pigmentation. It is concluded that canine MCs are numerous in some sensory receptive areas. These findings suggest that MCs may be associated with the tactile sense in the dog. Moreover, paracrine functions influencing epithelial and follicular development are possible for MCs in some locations.

**Key words:** counting, density, distribution, dog, mapping, Merkel cell.

## **Introduction**

Merkel cells (MCs), discovered by Dr. Friedrich S. Merkel in 1875, are large clear specialized cells of the epidermis, hair follicles, and epithelium of mucosa originating from ectoderm of vertebrates including birds, fish, reptiles, amphibians and mammals (Whitear, 1989; Tachibana, 1995; Moll et al. 2005; Halata et al. 2010). In birds and man, they can be also located in superficial layer of the dermis (Winkelmann & Breathnach, 1973; Halata et al. 2010). Because of the presence of microvilli at the cell surface, the close contact with slowly adapting type I nerve fibers (one type of several classes of fibers which mediate tactile sensibility), the accumulation of dense-cored granules in the cytoplasm facing the nerve terminals, and the presence of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and the molecular machinery for synaptic transmission it is widely accepted that MCs mediate mechanoreceptive properties, including light-touch responses and texture discrimination (Boulais et al. 2009a; Marichich et al. 2012; Marksimovich et al. 2014). MC function appears, however, not to be restricted to the sense of touch. Putative neuroendocrine functions have been also proposed because they include cell subtypes with no nerve linking, contain cytoplasmic dense-core granules resembling the typical neurosecretory granules of neuroendocrine cells, and express various endocrine and neural markers, such as met-enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), neuron specific enolase (NSE), chromogranin A (CGA), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and synaptophysin (SYN) (Tachibana, 1995; Tachibana & Nawa, 2002; Moll et al. 2005; Boulais et al. 2009b).

Langerhans cells and melanocytes are fairly evenly distributed throughout the basal layers of the epidermis but the distribution of MCs varies among body sites, numbering far fewer than the other two cell types (Bermann et al. 1983; Lacour et al., 1991; Boot et al. 1992; Thignes et al. 2012). They are particularly numerous in some sensory receptive areas of mammalian body such as vibrissae, lips, face, snout or fingertips (Moll et al. 1984; Lacour et al. 1991; Moll et al. 2005; Boulais et al. 2009a; Halata et al. 2010), but they are still far from abundant. In dogs, some regions appear to be rich in MCs, but their exact anatomical distribution has not yet been seriously investigated (Ramírez et al. 2014, 2015). Morphological and immunohistochemical features of canine MCs are very similar to those in other mammals therefore it is likely they display the same functions (Ramírez et al. 2014, 2015). Knowledge of their distribution into the normal skin could facilitate understanding of these functions. The aim

of the present article is to perform a comprehensive study of the presence, distribution and density of MCs in normal skin and mucosae of the dog, enhancing the knowledge of the skin structure in this species and representing a basic background for future physiological and pathological studies of the role of these cells in normal and damaged canine tissues. Furthermore, we investigate whether the number of MCs varies with age, sex, breed, coat, or pigmentation.

## **Material and Methods**

### *Animal and sample collection*

Twenty-one adult dogs (n = 21) were selected for the study. All of them came from local kennel and had been humanely euthanized for other academic purposes in accordance with current legislation (RD53/2013 from Spanish Government and 2010/63/UE Policy from European Union on the protection of animals used for scientific purposes). They were classified in order of gender (11 male; 10 female), age (11, < 4 year-old dogs; 10, > 4 year-old dogs), weight (7 large dogs > 20 kg, 14 small dogs < 20 kg), pedigree (12 purebred dogs, 9 mixed dogs), length of hair (13 short-haired, 8 long-haired), coat (10 light coat, 11 dark coat), pigmentation of footpads (8 pigmented, 13 non-pigmented), and pigmentation of oral mucosa (9 pigmented, 12 non-pigmented). Biopsy samples (2 x 1 cm aprox.) from 60 different anatomical sites were collected for each animal after the hair was removed by scissors, when applicable. A total of 1187 samples were examined. The tissues were dissected to the level of the subcutis. The macroscopic appearance had been normal.

### *Tissue preparation and immunohistochemistry*

All tissues were routinely fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated through graded alcohols and embedded in paraffin wax. From each paraffin block, 5µm longitudinal sections were stained with haematoxylin and eosin (HE) and 3 µm longitudinal sections were also immunohistochemically stained for cytokeratin 20 (CK20, clone KS 20.8, dilution 1:40; Dako, Glostrup, Denmark) using the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). CK20 is an acidic, type I cytokeratin which has turned

out to be the most specific and sensitive marker for the detection of MCs in mammalian skin, including the dog (Moll et al. 1995; Ramírez et al. 2015). To develop the immunoreaction, 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA) was applied to the slides for 3-5 minutes at room temperature. The reactivity of the anti-CK20 antibody was confirmed by the presence of positive luminal epithelial cells in paraffin sections of human and canine small intestine.

#### *Cell counts and quantitative comparison of Merkel cells*

The numerical frequency of MCs was assessed by counting the number of CK20-positive cells per 1cm length of epidermis at 40x magnification. Cells were registered when the nucleus-containing cell body was visible on the microscopic field, while cytoplasmic processes or partial cross-sections were discharged. Results were expressed as *number of MCs per centimeter of basal zone* (MCs/cmBZ) and analyzed for differences related to age, sex, size of breed, site, length of hair, coat darkness, and pigmentation of footpad and oral mucosa. In addition, specific features for location (basal vs. suprabasal) and distribution (single cells vs. nests) of CK20-positive cells were evaluated. The location was considered basal when positive cells were lying within the first two layers above basal membrane and suprabasal when they were located in more superficial layers. Sections were analyzed with an Olympus BH2 microscope and images were captured by an Olympus E-500 digital camera.

#### *Statistical methods*

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS® 20 software package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). For the quantitative parameters, the minimum and maximum values, mean, and standard deviation (SD) were analyzed. Statistical comparison of the groups was performed using a two-tailed Student's t-test or Mann-Whitney U-test. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## **Results**

### *MCs morphological and immunohistochemical features*

On HE stained sections, some cells showing clear cytoplasm were believed to be MCs by its location in sinus hair follicles, at the base of the epidermal discs in hairy skin epidermis, and in basal layers of mucosal epithelium by the observation of a clear space, representing a non-stained vacuolated terminal axon, under the cell. By use of immunohistochemistry, CK20-positive MCs exhibited a high nuclear/cytoplasmic ratio were distributed singly and in groups along the basal layers of the epithelium in 1103 biopsies. CK20 stained completely the cytoplasm leaving the nucleus unstained. The positive stained MCs appeared as round, oval, plump, or triangular in shape. They tended to have a similar size as the surrounding keratinocytes and horizontal orientation, their long axes lying parallel to the skin surface. Nuclei were predominantly oval or lobulated with finely speckled or vesicular chromatin pattern.

### *MCs location*

The oral mucosa is thickened and firmly linked with the underlying connective tissue through epithelial thickenings (rete pegs). Numerous positive cells arranged in large clusters (up to 25 cells) or isolated at the bottom of these pegs were consistently found in a basal or parabasal location within palatine, cheek, gingival, and labial mucosa (Figs. 1A-1B). Their number depended on the thickness of the epithelial pegs. In nasal vestibule, anal, and genital mucosa, only very rare individualized MCs were detected in basal location. No CK20-positive cells were seen in the conjunctiva epithelium.

In glabrous skin, the basal layer of the epithelium forms rete ridges or rete pegs containing large numbers of MCs with an identical structure as that found in mucosa. In the larger ridges of the nasal planum, large clusters (up to 18 cells) were found while smaller ones had only individualized MCs (Figs. 1C). Cells were less numerous in glabrous skin of footpads, located in groups (up to 12 cells) or individualized in basal and parabasal areas of the rete ridges of the epidermis and close to the penetration of the eccrine sweat gland ducts in epidermis.

Accumulations of MCs in hairy skin were exclusively present in epidermal discs and hair follicles. The epidermal disc (touch dome, hair disc or *haarscheibe*) is a specialized disc-shaped thickening of the epidermis found only in the hairy skin of mammals with an important sensory function as a highly sensitive, slowly adapting type I mechanoreceptor. Immunoreactive MCs were clustered at the base of these discs (up to 13 cells) arranged in a linear and arciform or horseshoe-shaped pattern (Fig. 1D). In vibrissae or sinus hair follicles, considerable numbers of immunoreactive cells were routinely observed in two belt-like or cuff-like arrangements. The first belt-like area (up to 10 cells) was situated basally in the epithelial ridges of the upper infundibulum, close to the skin surface (Fig. 1E-1F). The second and most prominent MCs accumulation (up to 104 cells) was in a lower belt located basally within the epithelium of the outer root sheath in the isthmus region (Fig. 1G-1H). Positive MCs were also found in the outer root sheath or in the bulge area of the primary hair follicles (Fig. 1I). Those hair follicles with MCs possessed up to 7 cells. In secondary follicles, up to 4 cells were scattered and preferentially situated within the basal layer of the outer root sheath at the sebaceous gland level (Fig. 1J). Hair follicles of labial and interdigital skin contained the higher numbers of CK20-immunoreactive MCs.

No MCs were detected disseminated within the epidermis (outside epidermal discs), in the deep follicular portions, or in the dermis.

*MC number according to site.*

Mean values of MCs per centimeter of basal zone (CMs/cmBZ) obtained from the 60 selected sites are listed in table 1. The results revealed wide regional variation in density and distribution of MCs. Four different zones could be defined. *MC-rich zones*, that contained usually more than 20 MCs/cmBZ; these included the hard palate, cheek mucosa, lips, cheek skin, and nasal planum. *Medium-dense zones*, which contained 10-20 MCs/cmBZ such as gums, soft palate and footpads. *MC-poor zones*, with less than 10MCs/cmBZ which were the anal and genital mucosa, nipple, muzzle, forehead, eyelids, pinna, neck, dorsum, flank, abdomen, croup, chest, axilla, groin, shoulder, forearm, thigh, interdigital skin, perianal skin, scrotum, prepuce, tail, and vulvar skin. Finally, *zones with no MCs* included tongue and ocular mucosa.



### *Statistical analyses*

Significant quantitative differences in the frequency of MCs between different anatomical sites were not demonstrated for hair length, footpad pigmentation, or between the left and right body sites. Only significant differences were noted for specific locations, including right forearm digital footpad between sexes ( $p=0.013$ ), left forearm between ages ( $p=0.048$ ), lower lip mucosa between small and large dogs ( $p=0.006$ ), right forearm and left forearm digital footpad between purebred and mixed dogs ( $p=0.049$  and  $p=0.045$ , respectively), right pinna outer surface between dark and light coat ( $p=0.016$ ), and cheek mucosa between pigmented and non-pigmented oral mucosa ( $p=0.039$ )

### **Discussion**

Our results in the dog reveal great variations in density of MCs between locations. However, these differences were usually not statistically significant because of a wide individual variability. Only very few locations showed statistically significant differences for number of MCs between sexes, ages, sizes of dogs, pedigree, coat types and oral mucosa pigmentation but these differences are not enough to extract general conclusions. The findings are also according with presumption that MCs number is greater in humans than in other mammals including mice, rats, and cats (English, 1977; Lacour et al. 1991; Moll et al. 2005; Halata et al. 2010). How far these numerical differences result in functional differences between humans and the other species remains to be determined. It should be noted that the numbers of MCs can be altered under some cutaneous diseases (i.e. psoriasis and actinic keratosis) or in sun-exposed skin (Merot & Mooy, 1989; Moll et al. 1990; Wollina & Mahrle, 1992). Moreover, differences in MCs morphology and numbers related to hair cycle have been observed (Moll et al. 1996; Nakafusa et al. 2006). It would be interesting further investigation to confirm similar variations in the dog.

The distribution of MCs in the dog has some similarities and differences to the distribution observed in humans and other mammals. Similarly, MCs have not been described within the sebaceous gland or in eccrine glands (Lacour et al. 1991; Boot et al. 1992; Narisawa et al. 1994; Moll et al. 2005). As occurs in humans (Lacour et al. 1991; Boot et al. 1992; Barret

et al. 2000; Righi et al. 2006), the highest numbers of MCs in the dog are found in the facial skin, oral mucosa and footpads (counterpart to fingertips in humans). The distribution of MCs in the skin of the face shows local differences: high numbers are reported in the cheek skin (especially due to the presence of vibrissae), followed by lips and glabrous skin of nasal planum (due to MCs tendency to form aggregates). In all body hairy skin, excepting that covering face, the overall appearance was low. Small differences in MCs numbers between individuals were detected among hairy skin sites, but these differences were not statistically significant and are caused by the presence of epidermal discs in some but not all sections. All mammals appear to have epidermal discs in their hairy skin showing a wide variability in the number between different anatomical regions (Moll et al. 1993a). In many mammals, they are associated with specialized hairs. However, in the cat, man and dogs, as observed in the present study, there is little or no constant relationship between discs and hairs (Smith, 1977, Moll et al. 1993a). They are important sensory organs; each MC in the epidermal disc is in a synapse-like contact to a neurite (Smith, 1977). Moreover, keratinocytes of epidermal discs possess a biochemically peculiar cytokeratin cytoskeleton which may be important for optimal sensory perception (Moll et al. 1993a).

Follicular MCs were frequently observed within an ill-defined swelling of the outer root sheath variably extending throughout the isthmic tract of the hair follicle. This structure, resembling the bulge region previously described in humans, mice and dogs (Moll, 1993b; Narisawa et al. 1993, 1994; Pascucci et al. 2006; Kobayashi et al. 2009), appeared to be present only in primary follicular units. It is widely documented that a pool of epithelial stem cells located in hair follicle bulge region is involved in the restoration of the whole follicular unit during each anagen phase (Narisawa et al. 1993, 1994; Pascucci et al. 2006; Kobayashi et al. 2009). Based upon the coexistence of MCs and stem cells, some authors have suggested that MCs may secrete some growth factors or cytokines involved in the induction and stimulation of a new hair cycle (Moll, 1993b; Narisawa et al. 1993, 1994). This idea is highly speculative and further studies would be necessary, including investigation if stem cells in canine hair follicles show ultrastructural and biochemical features of MCs.

Significant differences in MCs distribution are found between the dog and other mammals. Analogous to the fingertips of humans (Moll et al. 1984; Lacour et al. 1991; Boot et

al. 1992), MCs are also placed in the epidermal ridges of footpad skin in dogs, but they are significantly less numerous. These differences may be attributed to that the humans usually use fingers to grasp objects whereas dogs do not. MCs in the human oral epithelium are almost restricted to the mucosa of the hard palate, maxillary and mandibular gingiva (Righi et al. 2006; Barrett et al. 2000) while in the dog they are also fairly common in other sites such as cheek or soft palate. Although MCs have not been found in the rat and human genital mucosa (Johnson & Halata, 1991; Halata & Spaethe, 1997), rare CK20-positive cells were detected in a few specimens of glans penis, vaginal vestibule and prepuce in our study. Finally, MCs disseminated throughout the epidermis outside the epidermal discs or grouped in the bulbs of hair follicles have been recognized in humans; they appear to be quite rare and mainly located in sun-exposed areas (Lacour et al. 1991; Moll et al. 1990). These cells were not noted in our study. All these differences may be consequence of antibody specificity. Meanwhile the CK20 has been demonstrated to be highly specific and sensible for MCs identification (Moll et al. 1995; Ramírez et al. 2014), other cytokeratins such as CK8, 18 and 19 (Lacour et al. 1991; Moll et al. 1990) may be less specific because also stain other cutaneous cell types. On the other hand, it should be considered the existence of interspecies differences in the number and location of CMs as occur for the expression of different molecules and antibodies (Tachibana, 1995; Tachibana & Nawa, 2002).

The mechanoreceptive function of the MCs in mammals is widely accepted (Boulais et al. 2009a; Maricich et al. 2012; Maksimovic et al. 2014). They are essential for texture discrimination tasks (Maricich et al. 2012). Some features of MCs in the dog appear to be in agreement with this role. The predominance of MCs in plantar skin and their relative scarcity at other sites of exquisite tactile sensation, such as the genitalia, suggests that their involvement may be related to blunt mechanoreceptor function rather than to acute tactile sensation. The high frequency of canine MCs in vibrissae follicles, which are critical skin territories for generating and transmitting touch sensation, argues for the concept that the MCs function to subserve the tactile sensation of the facial skin. In addition, the preferential distribution at sites of intimate contact with the tongue suggests that they may provide a sensory system for pressure and may function as an important source of somatosensory feedback providing valuable information regarding the position of the tongue in the oral cavity (Turner, 1983; Righi et al. 2006).

The interspecies and body sites variations in MCs location and neuropeptides content are particularly important when alternative functions to the sense of touch are considered (Tachibana, 1995; Tachibana & Nawa, 2002; Boulais et al. 2009b; Ramírez et al. 2014). MCs are located in close contact with the proliferating basal keratinocytes and are themselves positives for ki67, indicating that they may play a specific regulatory role in epithelial cell proliferation (Righi et al. 2006). MCs in the bulge area of the hair follicle may exert paracrine functions such as attraction of developing nerve fibers during embryogenesis and/or stimulation of hair follicle stem cells for a new hair cycle (Moll, 1993b; Narisawa et al. 1993, 1994). Further studies are needed to confirm these hypotheses in the dog.

### **Acknowledgements**

This study has been supported by a grant from the Ministry of Education and Science of the Government of Spain (Program for Development of University Professors and Researchers, BOE 12022000).

### **Author contributions**

Study concept/design: G.A. Ramírez and A. Espinosa de los Monteros y Zayas; Acquisition of data: G.A. Ramírez, O. Quesada; Data analysis and interpretation: G.A. Ramírez and A. Espinosa de los Monteros y Zayas; Drafting of the manuscript: G.A. Ramírez; All authors contributed to critical revision and the final version of manuscript, and approved its content.

## References

- Barret AW, Cort EM, Patel P, et al.** (2000) An immunohistological study of cytokeratin 20 in human and mammalian oral epithelium. *Arch Oral Biol* **45**, 879-887.
- Berman B, Chen VL, France DS, et al.** (1983) Anatomical mapping of epidermal Langerhans cell densities in adults. *Br J Dermatol* **109**, 553-8.
- Boot PM, Rowden G, Walsh N** (1992) The distribution of Merkel cells in human fetal and adult skin. *Am J Dermatopathol* **14**, 391-396.
- Boulais N, Pennec JP, Lebonvallet N, et al.** (2009a) Rat Merkel cells are mechanoreceptors and osmoreceptors. *PLoS One* **4**, e7759.
- Boulais N, Pereira U, Lebonvallet N, et al.** (2009b) Merkel cells as putative regulatory cells in skin disorders: an in vitro study. *PLoS One* **4**, e6528.
- English KB** (1977) The ultrastructure of cutaneous type I mechanoreceptor (Haarscheiben) in cats following denervation. *J Comp Neurol* **172**, 137-164.
- Halata Z, Grim M, Baumann KI** (2010) Current understanding of Merkel cells, touch reception and the skin. *Expert Rev Dermatol.* **5**, 109–116.
- Halata Z, Spaethe A** (1997) Sensory innervation of the human penis. *Adv Exp Med Biol* **424**, 265-266.
- Johnson RD, Halata Z** (1991) Topography and ultrastructure of sensory nerve endings in the glans penis of the rat. *J Comp Neurol* **312**, 299-310.
- Kobayashi T, Iwasaki T, Amagai M, et al.** (2010) Canine follicle stem cell candidates reside in the bulge and share characteristic features with human bulge cells. *J Invest Dermatol* **130**, 1988-95.
- Lacour JP, Dubois D, Pisani A, et al.** (1991) Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis. *Br J Dermatol* **125**, 535-542.
- Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, et al.** (2014) Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* **509**, 617-21.
- Maricich SM, Morrison KM, Mathes EL, et al.** (2012) Rodents rely on Merkel cells for texture discrimination tasks. *J Neurosci* **32**, 3296-300.
- Merot Y, Mooy A** (1989) Merkel cell hyperplasia in hypertrophic varieties of actinic keratoses. *Dermatologica* **178**, 189-93.
- Moll I, Bladt U, Jung EG** (1990) Presence of Merkel cells in sun-exposed and not sun-exposed skin: a quantitative study. *Arch Dermatol* **282**, 213-216.

- Moll I, Kuhn C, Moll R** (1995) Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cell while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol* **104**, 910-915.
- Moll I, Paus R, Moll R** (1996) Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density. *J Invest Dermatol* **106**, 281-286.
- Moll I, Roessler M, Brandner JM, et al.** (2005) Human Merkel cells: aspects of cell biology, distribution and functions. *Eur J Cell Biol* **84**, 259-271.
- Moll I, Troyanovsky SM, Moll R** (1993a) Special program of differentiation expressed in keratinocytes of human haarscheiben: An analysis of individual cytokeratin polypeptides. *J Invest Dermatol* **100**, 69-71.
- Moll I** (1993b) Merkel cell distribution in fetal and adult human hair follicles of the scalp. *Cell Tiss Res* **277**, 131-138.
- Moll R, Moll I, Franke WW** (1984) Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. *Differentiation* **28**, 136-154.
- Nakafusa J, Narisawa Y, Shinogi T, et al.** (2006) Changes in the number of Merkel cells with the hair cycle in hair discs on rat back skin. *Br J Dermatol* **155**, 883-889.
- Narisawa Y, Hashimoto K, Kohda H** (1994) Merkel cells of the terminal hair follicle of the adult human scalp. *J Invest Dermatol* **102**, 506-510.
- Narisawa Y, Hashimoto K, Nakamura Y** (1993) A high concentration of Merkel cells in the bulge prior to the attachment of the arrector pili muscle and the formation of the perifollicular nerve plexus in human fetal skin. *Arch Dermatol Res* **285**, 261-268.
- Pascucci L, Mercati F, Gargiulo AM et al.** (2006) CD34 glycoprotein identifies putative stem cells located in the isthmus region of canine hair follicles. *Vet Dermatol* **17**, 244-51.
- Ramírez GA, Rodríguez F, Herráez P, et al.** (2015) Ultrastructural characterization of normal Merkel cells in the dog. *Vet Dermatol* **26**, 328–333.
- Ramírez GA, Rodríguez F, Herráez P et al.** (2014) Morphologic and immunohistochemical features of Merkel cells in the dog. *Res Vet Sci* **97**, 475-480.
- Righi A, Betts CM, Marchetti C, et al.** (2006) Merkel cells in the oral mucosa. *Int J Surg Pathol* **14**, 206-211.
- Smith KR** (1977) The haarscheibe. *J Invest Dermatol* **69**, 68-74.
- Tachibana T, Nawa T** (2002) Recent progress in studies on Merkel cell biology. *Anat Sci Int* **77**, 26-33.

**Tachibana T** (1995) The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* **58**, 379-396.

**Thingnes J, Lavelle TJ, Hovig E, et al.** (2012) Understanding the melanocyte distribution in human epidermis: an agent-based computational model approach. *PLoS One* **7**, e40377.

**Turner DF** (1983) The morphology and distribution of Merkel cells in primate gingival mucosa. *Anat Rec* **205**, 197-205.

**Whitear M.** (1989) Merkel cells in lower vertebrates. *Arch Histol Cytol* **52**, 415-22.

**Winkelman RK, Breathnach AS** (1973) The Merkel cell. *J Invest Dermatol* **60**, 2-15.

**Wollina U, Mahrle G** (1992) Epidermal Merkel cells in psoriatic lesions: immunohistochemical investigations on neuroendocrine antigen expression. *J Dermatol Sci* **3**, 145-150.

**Table 1.** Mean values ( $\pm$  SD) of MCs for each body site examined.

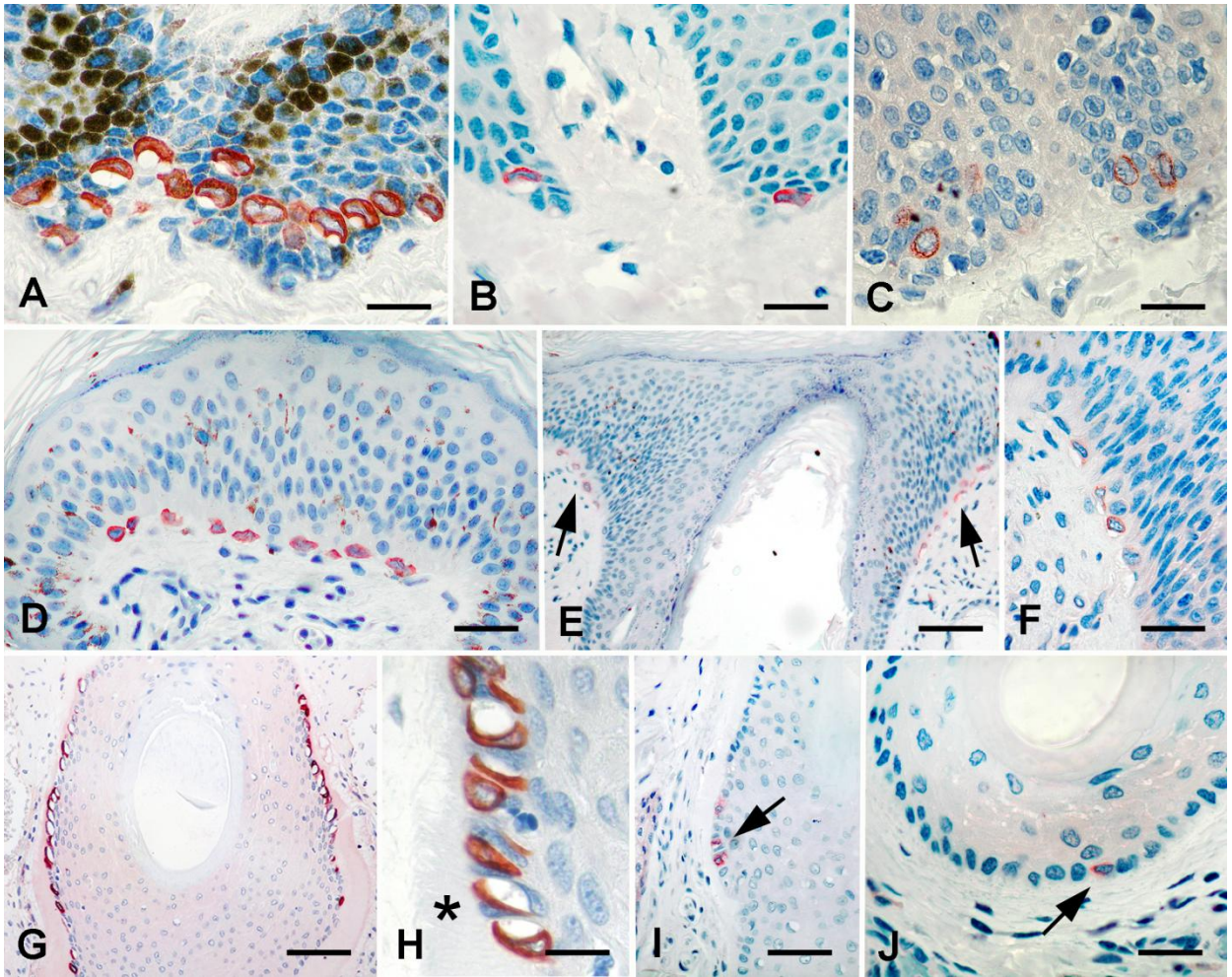
Location	Average MCs/cmBZ	Location	Average MCs/cmBZ
<b>MUCOSA</b>			
Hard Palate	25.71 $\pm$ 10.10	Palpebral Conjunctiva	0
Soft Palate	11.29 $\pm$ 7.60	Bulbar Conjunctiva	0
Cheek Mucosa	27.62 $\pm$ 19.83	Nictitating Membrane	0
Gum	16.81 $\pm$ 11.75	Anal Canal	0.48 $\pm$ 1.12
Lower Lip Mucosa	32.52 $\pm$ 23.87	Prepuce Mucosa	0.09 $\pm$ 0.30
Upper Lip Mucosa	21.00 $\pm$ 7.62	Glans Penis	0.09 $\pm$ 0.30
Tongue	0	Vagina	0.10 $\pm$ 0.31
Nasal Vestibule	0.24 $\pm$ 0.62	Vaginal Vestibule	0.70 $\pm$ 0.60
<b>GLABROUS SKIN</b>			
Philtrum	28.62 $\pm$ 23.11	Left rearlimb digital pad	14.62 $\pm$ 6.22
Nosepad	37.38 $\pm$ 23.81	Right rearlimb digital pad	10.14 $\pm$ 5.06
Left forelimb digital pad	13.43 $\pm$ 6.64	Nipple	0.57 $\pm$ 1.57
Right forelimb digital pad	11.62 $\pm$ 6.46		
<b>HAIRY SKIN</b>			
Lower lip hairy	91.62 $\pm$ 51.83	Chest	0.76 $\pm$ 2.04
Upper lip hairy	92.48 $\pm$ 50.86	Axilla	1.33 $\pm$ 2.51
Cheek skin	115.67 $\pm$ 52.00	Groin	0.86 $\pm$ 1.66
Muzzle skin	3.86 $\pm$ 3.03	Right shoulder	3.10 $\pm$ 4.62
Left upper eyelid	2.24 $\pm$ 2.02	Left shoulder	1.57 $\pm$ 1.92
Right upper eyelid	2.05 $\pm$ 2.09	Right forearm	1.14 $\pm$ 1.46
Left lower eyelid	1.00 $\pm$ 1.76	Left forearm	1.57 $\pm$ 1.41
Right lower eyelid	0.90 $\pm$ 1.78	Left upper thigh	1.24 $\pm$ 2.79
Forehead	1.48 $\pm$ 3.34	Right upper thigh	2.81 $\pm$ 3.62
Right pinna inner surface	0.57 $\pm$ 0.95	Left lower thigh	2.29 $\pm$ 2.67
Right pinna outer surface	1.10 $\pm$ 1.36	Right lower thigh	1.95 $\pm$ 2.65
Left pinna inner surface	0.19 $\pm$ 0.43	Forelimb interdigital skin	3.95 $\pm$ 2.78
Left pinna outer surface	1.05 $\pm$ 2.08	Rearlimb interdigital skin	2.24 $\pm$ 1.79
Ventral neck	0.76 $\pm$ 1.06	Perianal skin	1.95 $\pm$ 2.95
Dorsal neck	1.71 $\pm$ 3.44	Scrotum	0.73 $\pm$ 1.51
Dorsum	0.38 $\pm$ 0.30	Prepuce skin	0.91 $\pm$ 2.85
Flank	1.00 $\pm$ 2.61	Tail	1.67 $\pm$ 2.52
Abdomen	0.81 $\pm$ 1.63	Vulvar skin	3.10 $\pm$ 4.45
Croup	0.86 $\pm$ 1.07		

MCs/cmBZ = Merkel cells per cm of basal zone.



## Figure legends

**Figure 1.** Immunohistochemical staining of MCs with antibodies against cytokeratin 20 (CK20). ABC method. Mayer's haematoxylin counterstain. (A) Lip mucosa. Numerous CK20-positive MCs arranged in characteristic clusters at the tips of the epithelial pegs. (B) Hard palate mucosa. Some epithelial pegs contained single positive cells. (C) Footpad. Positive cells were less numerous in the rete ridges of glabrous skin showing a similar presentation to that in mucosa. (D) Cheek skin. In hairy skin regions, groups of immunoreactive cells were found at the basal layer of the epidermal discs in a plane parallel to the basement membrane. (E) Cheek skin. MCs in sinus hair follicles were grouped in the epithelial ridges of the upper follicle, next to the skin surface (arrows). (F) Cheek skin. Detail of positive cells in the ridges of upper sinus hair follicle. (G) Cheek skin. In the sinus hair follicle, numerous immunoreactive MCs were also present in a cuff-like arrangement in the external follicle epithelium. (H) Cheek skin. Detail of MCs arranged obliquely to the glassy membrane (asterisk) like scales of a pine cone. Note the non-stained, vacuolated nerve terminals in close contact with some cells. Bar = 10  $\mu$ m. (I) Interdigital skin. Few CK-20 positive MCs between keratinocytes in the bulge region of a primary hair follicle (arrow). (J) Skin of vulva. Occasionally, single CK20-stained MCs were noted in the outer root sheath of secondary hair follicles (arrow). Bar = 15  $\mu$ m (A, B, C); Bar = 30  $\mu$ m (D, F, J); Bar = 100  $\mu$ m (E, G, I); Bar = 10  $\mu$ m (H).



## MATERIAL ADICIONAL

### RECUENTO CELULAR ESPECÍFICO

**Tabla 1.** Parámetros descriptivos en mucosas y piel glabra.

Location	Average MCs/cmBZ	Max. MCs/cmBZ	Max. MCs/ridge
Hard Palate	25.71 ± 10.10	52	18
Soft Palate	11.29 ± 7.60	26	9
Cheek Mucosa	27.62 ± 19.83	57	20
Gum	16.81 ± 11.75	46	12
Lower Lip Mucosa	32.52 ± 23.87	91	25
Upper Lip Mucosa	21.00 ± 7.62	47	9
Tongue	0	0	0
Nasal Vestibule	0.24 ± 0.62	2	2
Palpebral Conjuntiva	0	0	-
Bulbar Conjuntiva	0	0	-
Nictitating Membrane	0	0	-
Anal Canal	0.48 ± 1.12	4	1
Prepuce Mucosa	0.09 ± 0.30	1	1
Glans Penis	0.09 ± 0.30	1	1
Vagina	0.10 ± 0.31	1	1
Vaginal Vestibule	0.70 ± 0.60	6	5
Philtrum	28.62 ± 23.11	97	12
Nosepad	37.38 ± 23.81	98	18
Left forelimb digital pad	13.43 ± 6.64	26	7
Right forelimb digital pad	11.62 ± 6.46	23	8
Left rearlimb digital pad	14.62 ± 6.22	21	5
Right rearlimb digital pad	10.14 ± 5.06	22	12
Nipple	0.57 ± 1.57	6	4

BZ = basal zone; Max = máximo.

**Tabla 2.** Parámetros descriptivos en piel pilosa.

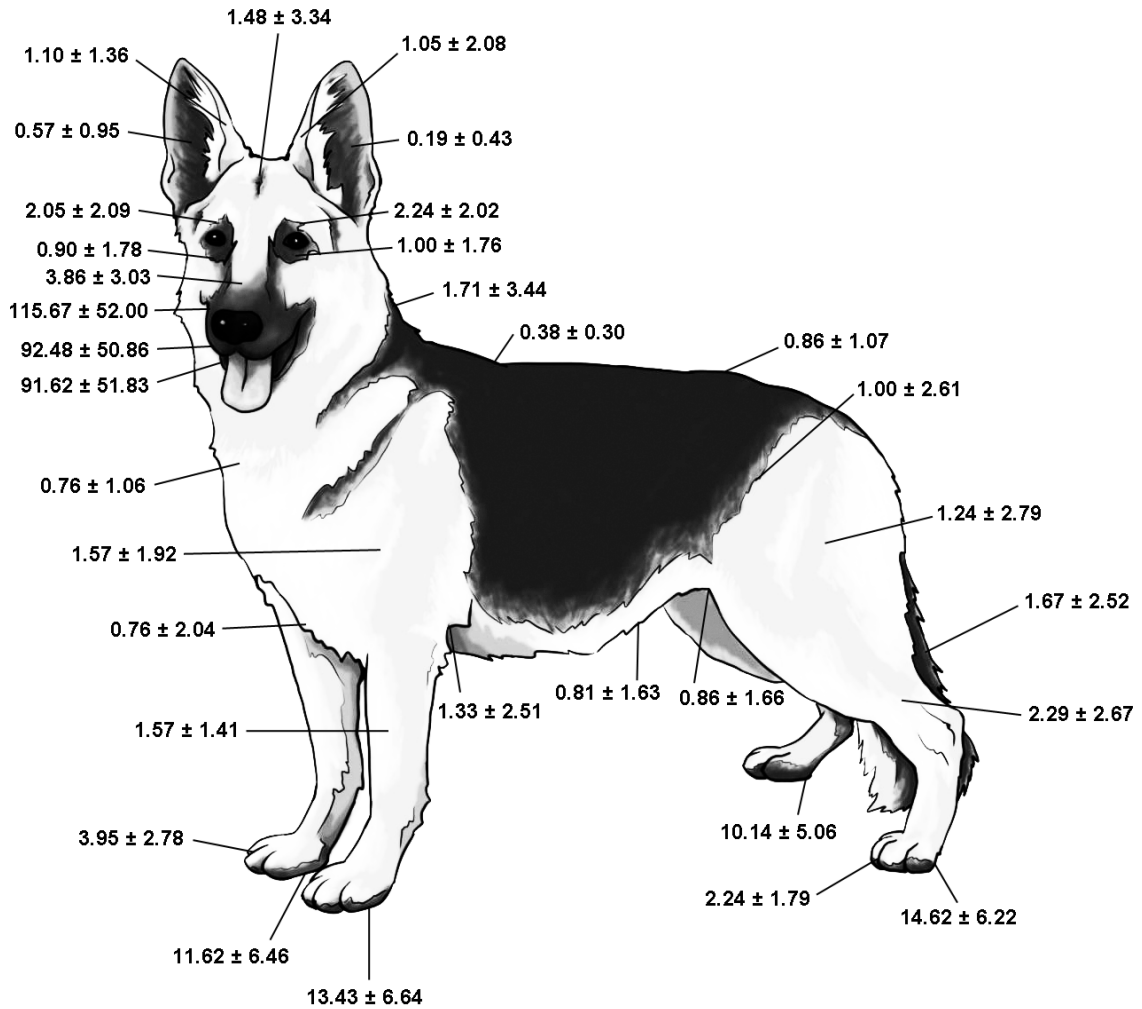
Location	Average MCs/cmBZ	Average eMCs/cmBZ	Average pfMC/cmBZ	Average sfMCs/cmBZ	Average vMCs/cmBZ	Máx. MCs/ed	Max. MCs/pf	Max. MCs/sf	Max. MCs/v
Lower lip hairy	91.62 ± 51.83	16.48 ± 2.99	11.86 ± 2.06	3.76 ± 1.00	59.52 ± 9.04	6	6	3	77
Upper lip hairy	92.48 ± 50.86	17.90 ± 2.89	7.00 ± 1.55	4.05 ± 1.45	63.52 ± 9.53	11	7	3	80
Cheek skin	115.67 ± 52.00	9.38 ± 1.43	0.67 ± 0.33	1.14 ± 0.33	100.86 ± 10.94	12	3	2	129
Muzzle skin	3.86 ± 3.03	2.33 ± 0.66	0.90 ± 0.52	0.62 ± 0.52	-	5	5	4	-
Left upper eyelid	2.24 ± 2.02	1.00 ± 0.44	0.62 ± 0.61	0.62 ± 0.25	-	5	4	2	-
Right upper eyelid	2.05 ± 2.09	1.19 ± 0.46	0.62 ± 0.25	0.24 ± 0.12	-	6	2	1	-
Left lower eyelid	1.00 ± 1.76	0.76 ± 0.38	0.24 ± 0.14	0	-	4	3	0	-
Right lower eyelid	0.90 ± 1.78	0.67 ± 0.39	0.14 ± 0.10	0.10 ± 0.07	-	5	2	1	-
Forehead	1.48 ± 3.34	1.33 ± 0.74	0.10 ± 0.07	0.05 ± 0.04	-	9	1	1	-
Right pinna inner surface	0.57 ± 0.95	0.29 ± 0.21	0.14 ± 0.14	0.14 ± 0.10	-	4	3	2	-
Right pinna outer surface	1.10 ± 1.36	0.52 ± 0.29	0.14 ± 0.14	0.43 ± 0.25	-	6	3	1	-
Left pinna inner surface	0.19 ± 0.43	0.10 ± 0.09	0.05 ± 0.04	0.05 ± 0.05	-	2	1	1	-
Left pinna outer surface	1.05 ± 2.08	0.86 ± 0.46	0	0.19 ± 0.11	-	9	0	2	-
Ventral neck	0.76 ± 1.06	0.33 ± 0.23	0.33 ± 0.25	0.10 ± 0.07	-	4	2	1	-
Dorsal neck	1.71 ± 3.44	1.24 ± 0.75	0.29 ± 0.17	0.05 ± 0.04	-	13	3	1	-
Dorsum	0.38 ± 0.30	0.10 ± 0.07	0.10 ± 0.09	0.19 ± 0.11	-	0	2	1	-
Flank	1.00 ± 2.61	0.57 ± 0.57	0.19 ± 0.15	0.24 ± 0.15	-	12	3	2	-
Abdomen	0.81 ± 1.63	0.52 ± 0.36	0.14 ± 0.11	0.14 ± 0.08	-	7	2	1	-
Croup	0.86 ± 1.07	0.38 ± 0.23	0.38 ± 0.25	0.10 ± 0.07	-	4	2	1	-
Chest	0.76 ± 2.04	0.57 ± 0.44	0.14 ± 0.14	0.05 ± 0.04	-	9	2	1	-
Axilla	1.33 ± 2.51	1.29 ± 0.55	0.05 ± 0.04	0	-	7	1	0	-

Location	Average MCs/cmBZ	Average eMCs/cmBZ	Average pfMC/cmBZ	Average sfMCs/cmBZ	Average vMCs/cmBZ	Máx. MCs/ed	Max. MCs/pf	Max. MCs/sf	Max. MCs/v
Groin	0.86 ± 1.66	0.57 ± 0.36	0.24 ± 0.17	0.05 ± 0.04	-	6	1	1	-
Right shoulder	3.10 ± 4.62	2.05 ± 1.01	0.67 ± 0.44	0.38 ± 0.20	-	11	5	1	-
Left shoulder	1.57 ± 1.92	0.90 ± 0.42	0.52 ± 0.28	0.14 ± 0.08	-	6	3	1	-
Right forearm	1.14 ± 1.46	0.62 ± 0.32	0.33 ± 0.25	0.19 ± 0.14	-	6	4	2	-
Left forearm	1.57 ± 1.41	0.71 ± 0.42	0.52 ± 0.35	0.33 ± 0.17	-	8	5	3	-
Left upper thigh	1.24 ± 2.79	1.14 ± 0.61	0.05 ± 0.04	0.05 ± 0.04	-	12	1	1	-
Right upper thigh	2.81 ± 3.62	2.10 ± 0.79	0.52 ± 0.33	0.19 ± 0.11	-	9	5	2	-
Left lower thigh	2.29 ± 2.67	1.81 ± 0.78	0.29 ± 0.17	0.19 ± 0.15	-	8	3	2	-
Right lower thigh	1.95 ± 2.65	1.43 ± 0.58	0.24 ± 0.17	0.29 ± 0.14	-	7	3	1	-
Forelimb interdigital skin	3.95 ± 2.78	1.14 ± 0.61	1.52 ± 0.48	1.29 ± 0.39	-	9	5	3	-
Rearlimb interdigital skin	2.24 ± 1.79	0.71 ± 0.39	0.76 ± 0.33	0.76 ± 0.33	-	7	4	2	-
Perianal skin	1.95 ± 2.95	1.86 ± 0.64	0.05 ± 0.04	0	-	11	1	0	-
Scrotum	0.73 ± 1.51	0.67 ± 0.66	0	0	-	4	0	0	-
Prepuce skin	0.91 ± 2.85	1.17 ± 0.82	0.09 ± 0.08	0	-	6	1	0	-
Tail	1.67 ± 2.52	1.57 ± 0.55	0.10 ± 0.07	0	-	6	1	0	-
Vulvar skin	3.10 ± 4.45	2.50 ± 1.41	0.05 ± 0.05	0.10 ± 0.09	-	12	3	1	-

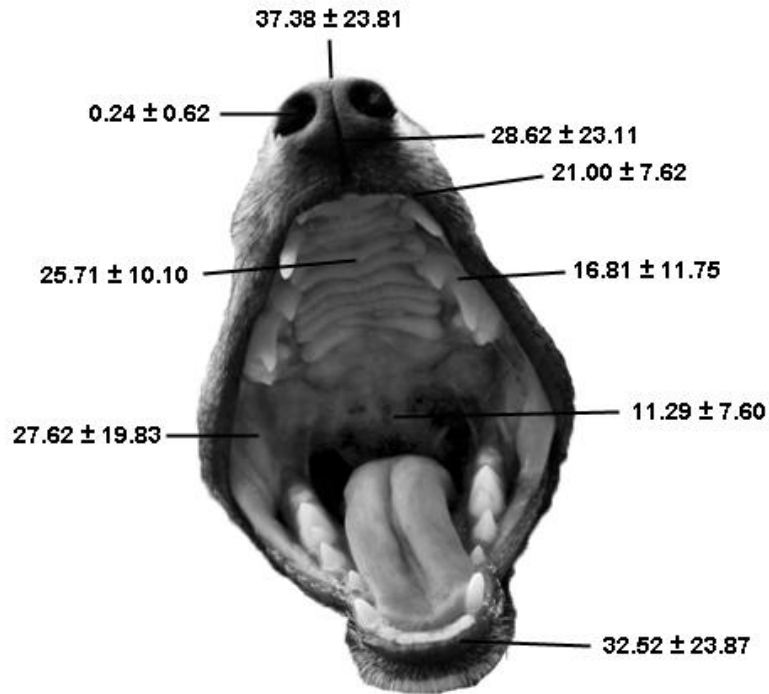
eMCs = epidermal Merkel cells; pfMCs = primary follicles Merkel cells; sfMCs = secondary follicles Merkel cells; vMCs = vibrissal Merkel cells; BZ = basal zone; Max = maximum; ed = epidermal disc; pf = primary follicles; sf = secondary follicles; v = vibrissa.

**FIGURAS COMPLEMENTARIAS**

**Figura 1.** Representación esquemática de la densidad de CMs, expresada como la media de CMs por centímetro de zona basal  $\pm$  SD, en la piel pilosa y glabra de los cojinetes plantares.

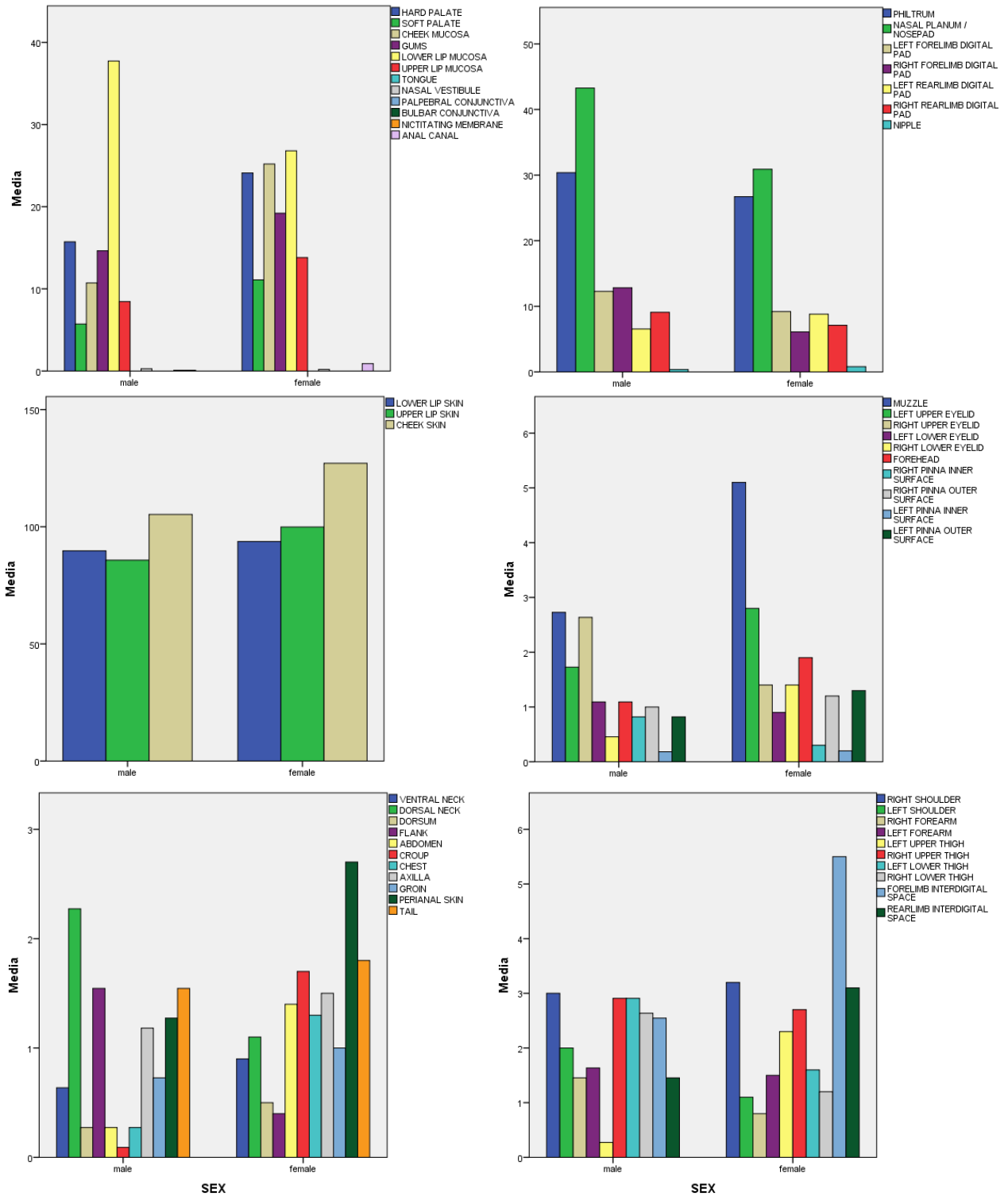


**Figura 2.** Representación esquemática de la densidad de CMs, expresada como la media de CMs por centímetro de zona basal  $\pm$  SD, en mucosa oral y piel glabra facial.



GRÁFICOS ESTADÍSTICOS

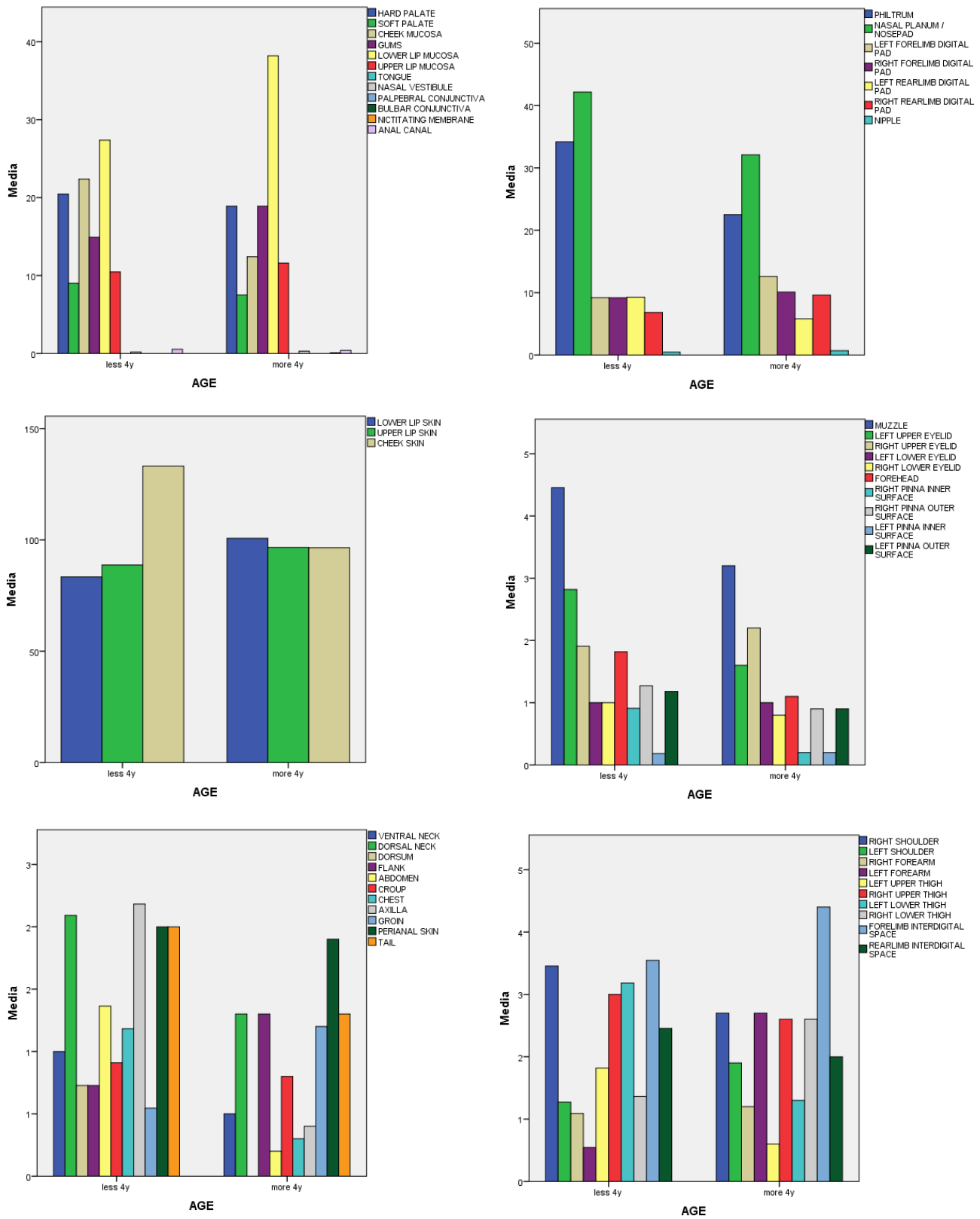
Gráfico 1. Diferencias entre sexos respecto a la media de CMs para cada localización.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Significancia estadística en el nº de CMs entre sexos en almohadilla digital delantera derecha (*right forearm digital footpad*),  $p=0.013$ .

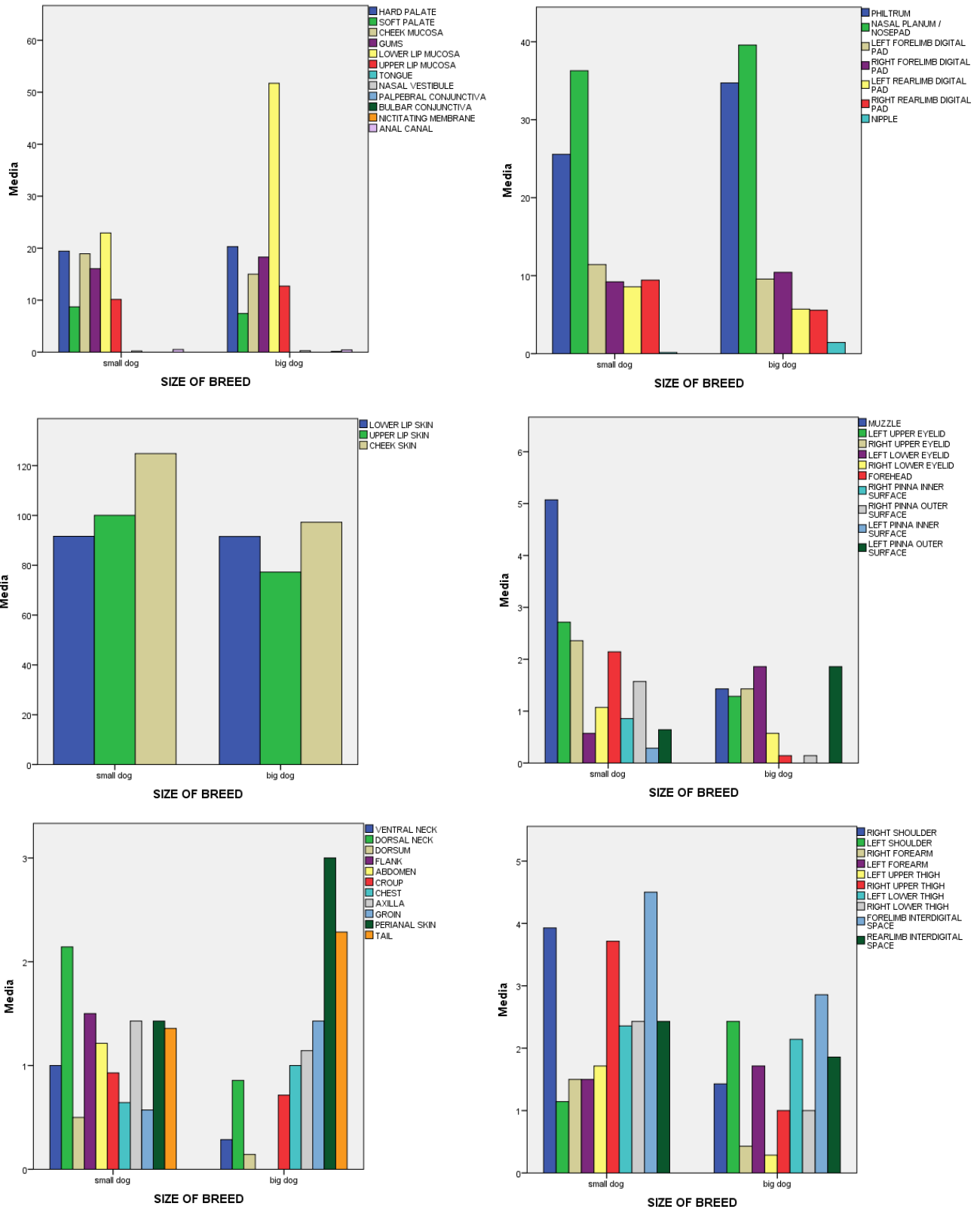


**Gráfico 2.** Diferencias entre edades respecto a la media de CMs para cada localización.<sup>2</sup>



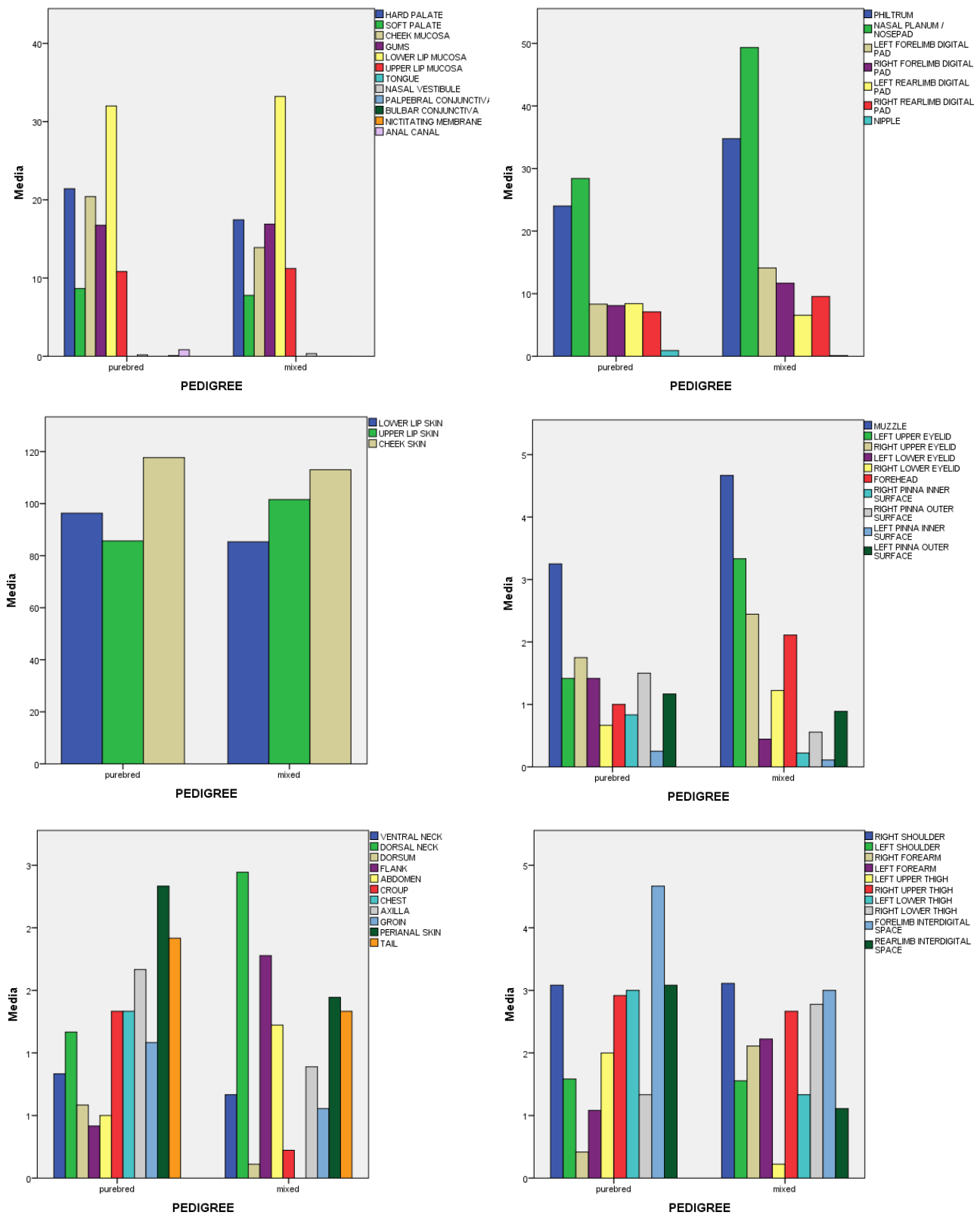
<sup>2</sup> Significancia estadística en el n° de CMs entre edades en antebrazo izquierdo (*left forearm*),  $p=0.048$ .

Gráfico 3. Diferencias entre tamaño de raza respecto a la media de CMs para cada localización.<sup>3</sup>



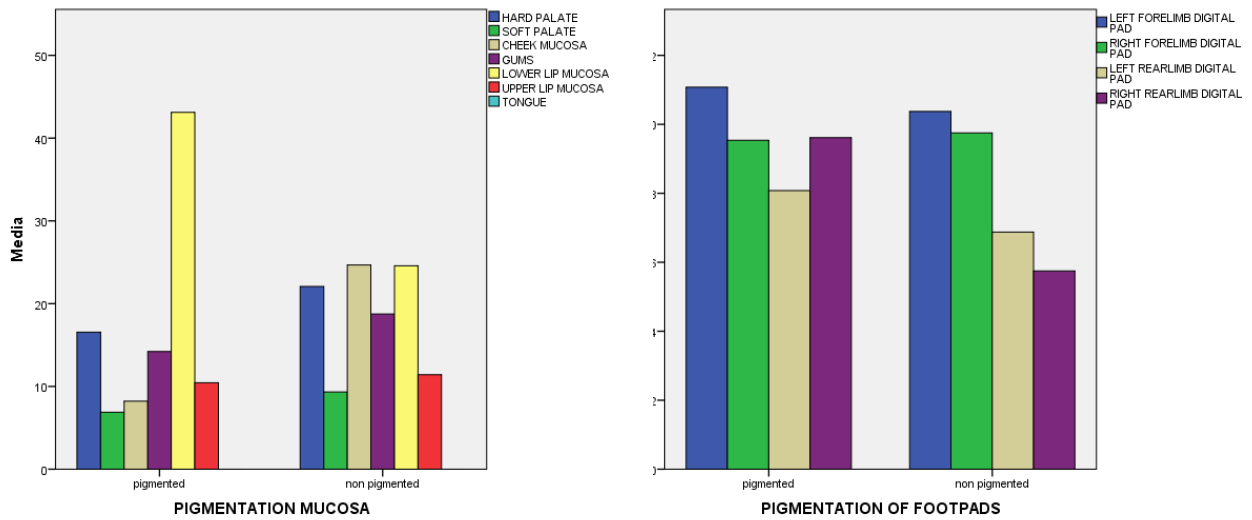
<sup>3</sup> Significancia estadística en el nº de CMs entre tamaños de raza en mucosa labial inferior (*lower lip mucosa*), p=0.006.

**Gráfico 4.** Diferencias entre pedigrí respecto a la media de CMs para cada localización.<sup>4</sup>

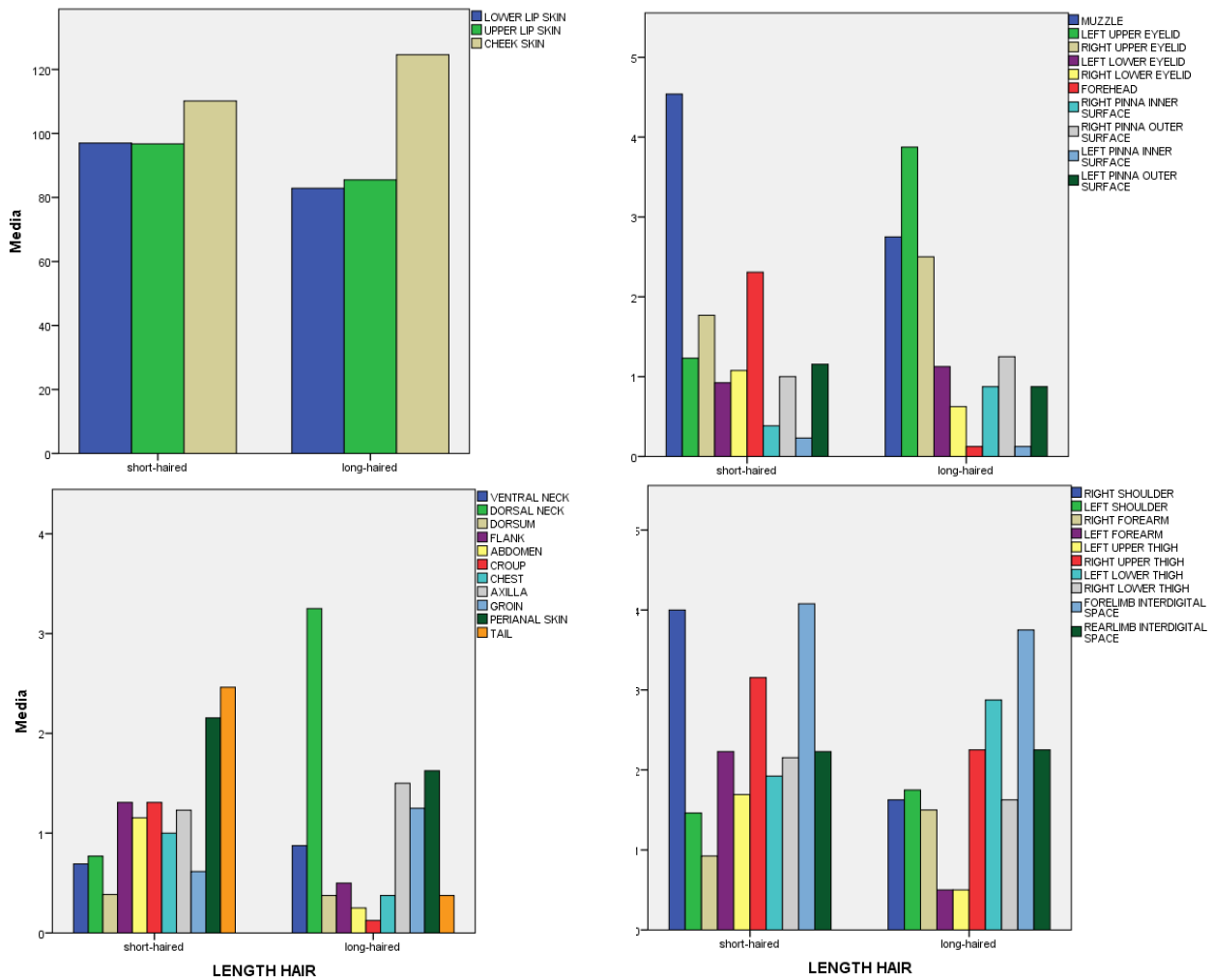


<sup>4</sup> Significancia estadística en el n° de CMs entre pedigrí en antebrazo derecho (*right forearm*),  $p=0,049$ , y almohadilla digital delantera izquierda (*left forearm digital footpad*),  $p=0.045$ .

**Gráfico 5.** Diferencias en la media de CMs para cada localización según pigmentación.<sup>5</sup>

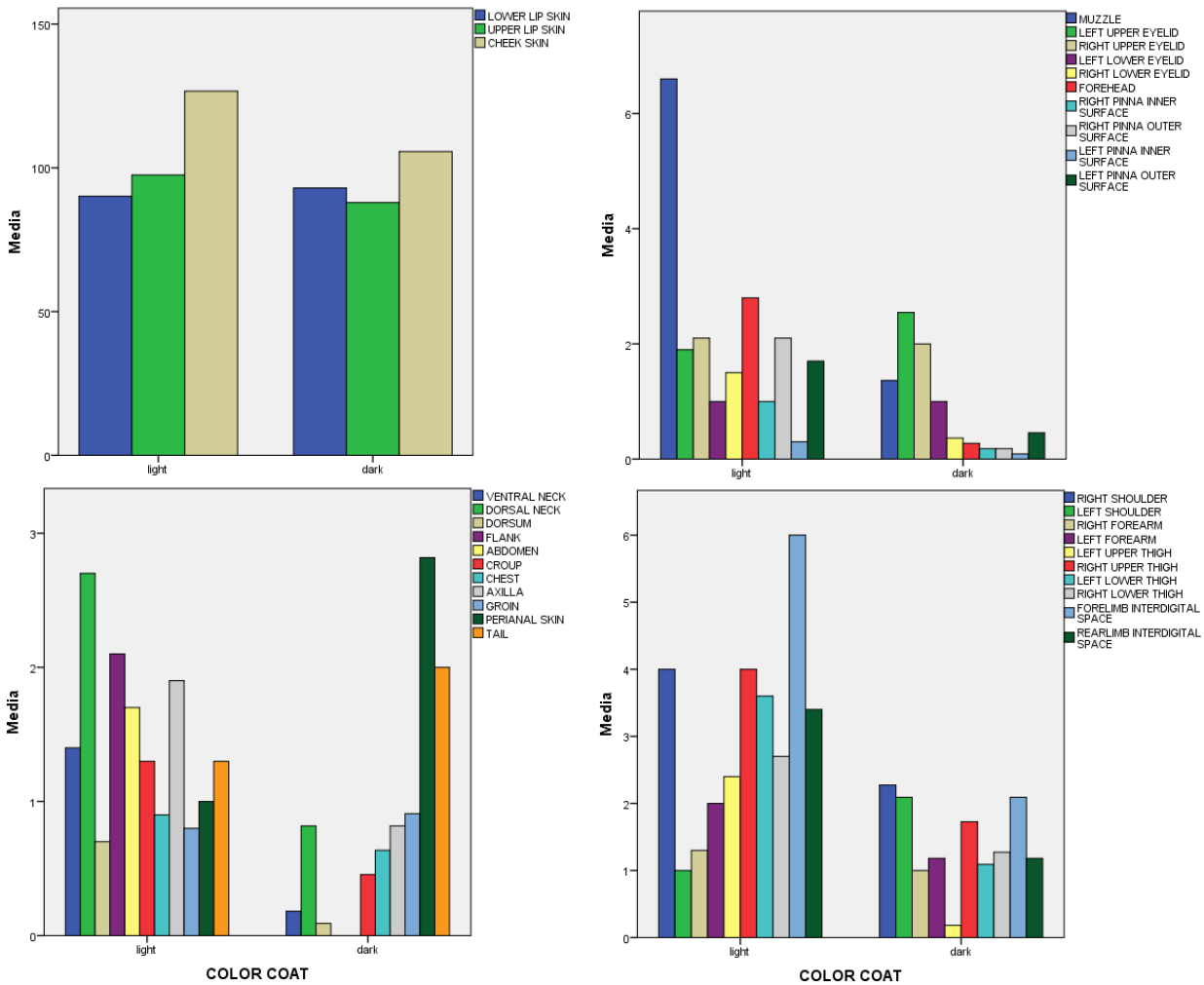


**Gráfico 6.** Diferencias en la media de CMs para cada localización según longitud de pelo.

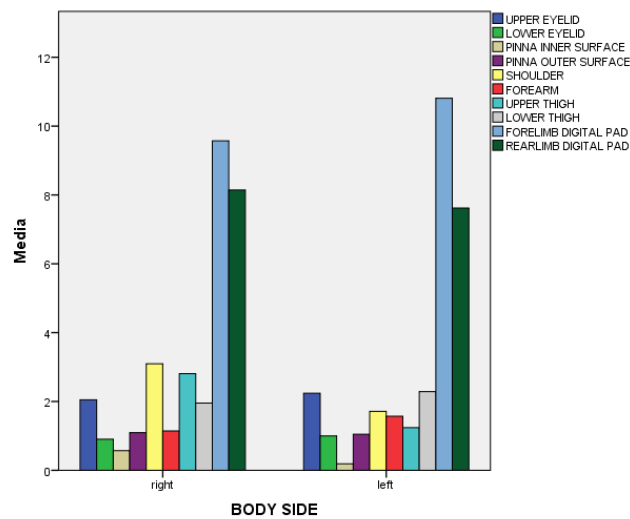


<sup>5</sup> Significancia estadística en el nº de CMs entre pigmentación de mucosa oral en mucosa de carrillo (*cheek mucosa*),  $p=0.039$ .

**Gráfico 7.** Diferencias en la media de CMs para cada localización según tono de capa.<sup>6</sup>



**Gráfico 8.** Diferencias en la media de CMs para cada localización según lado corporal.



<sup>6</sup> Significancia estadística en el n° de CMs entre tono de capa en cara externa de pabellón auricular (*right pinna outer surface*),  $p=0.016$ .

**4.7. ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DE MERKEL DURANTE EL PERIODO FETAL Y PERINATAL EN EL PERRO: APARIENCIA, DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN**



### ***Introducción.***

El origen de las células de Merkel (CMs), las células neuroendocrinas de la epidermis y de los folículos pilosos, durante el desarrollo fetal es aún objeto de debate. Algunos autores defienden un origen a partir de células pluripotenciales de la epidermis. La descripción de “células intermedias” (con rasgos morfológicos intermedios entre un queratinocito y una CMs), la presencia de filamentos intermedios de tipo epitelial (citoqueratinas) y varios estudios experimentales apoyan esta teoría (Tachibana y Nawa, 1980; Moll I y cols., 1986, 1990a, 1995; Narisawa y cols., 1992a, 1994b; Tilling y cols., 2014). Otros autores defienden la migración de las CMs desde la cresta neural en etapas embrionarias, como ocurre con los melanocitos. La presencia de varios rasgos diferenciales de células neurales, así como la conexión con terminaciones nerviosas sustentan esta idea (Leonard y cols., 2002; Laga y cols., 2010).

La clásica función mecanorreceptiva de las CMs no se desarrolla hasta que la célula madura en su ubicación definitiva, la epidermis, y establece unión íntima con fibras amielínicas intraepidermales de nervios dérmicos mielinizados. Antes de eso, durante las diferentes fases del desarrollo embrionario y fetal, las CMs no poseen contacto con nervios, pueden encontrarse en la dermis y son muy numerosas en crestas epidermales y folículos en formación. Se cree que durante este periodo, las CMs presentan funciones de tipo paracrino sobre los elementos cutáneos en formación (Moll I. y Moll R., 1992, 1993; Narisawa y cols., 1993b, 1996; Kim y Holbrook, 1995).

### ***Objetivos.***

Con el presente trabajo se pretende: 1) Determinar cuándo las CMs aparecen en la piel canina en desarrollo; 2) Realizar una evaluación general de su densidad en los principales tipos de piel y estructuras cutáneas; 3) Observar los patrones de distribución de las CMs en relación con el desarrollo de las diferentes estructuras cutáneas; 4) Comparar los hallazgos con aquellos descritos en animales adultos; 5) Intentar dilucidar el posible origen de las CMs en la especie canina.

---

Presentado en XVI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria (SEAPV) y XII Reunión de la Sociedad Portuguesa de Patología Animal (SPPA).



**Material y Métodos.**

*Animales y tejidos.* Dos fetos de aproximadamente 27-30 días (1/2 de gestación), 2 fetos de aproximadamente 45 días (3/4 de gestación) y 3 animales a término (58-60 días), cedidos por la Unidad de Reproducción y Obstetricia Veterinaria de la ULPGC, fueron usados para el estudio. No se observaron alteraciones macroscópicas. Se tomaron muestras de piel lampiña, pilosa y de mucosas, incluyendo cojinetes plantares, trufa, labio inferior, piel facial con vibrisas, dorso, pecho y paladar duro.

*Procedimientos técnicos.* Las muestras se fijaron en formol tamponado al 10%, fueron deshidratadas en alcoholes e incluidas en parafina. Secciones de entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  de grosor fueron posteriormente teñidas con HE e inmunohistoquímicamente con el método ABC. El procedimiento técnico en este caso no difiere sustancialmente del descrito en el apartado 4.1. de la presente Tesis Doctoral para los animales adultos. Los anticuerpos primarios empleados, sus diluciones y métodos de desenmascaramiento antigénico se exponen en la tabla 1.

**Tabla 1. Resumen de los procedimientos técnicos.**

Anticuerpo	Desenmascaramiento antigénico	Dilución
CK20	Tampón citrato pH 6 95-100 °C 6 min	1:20
CK8+18	Tampón citrato pH 6 95-100 °C 6 min	1:20
NSE	Tampón citrato pH 6 95-100 °C 5 min	1:1000
CgA	Tampón citrato pH 6 95-100 °C 6 min	1:50
Syn	Tampón citrato pH 6 95-100 °C 6 min	1:20
NF	Tampón citrato pH 6 95-100 °C 6 min	1:20
Proteína S100	Pronasa 10 min	1:100
GAP43	Tampón citrato pH 6 95-100 °C 7 min	1:200
CGRP	Tampón citrato pH 6 95-100 °C 6 min	1:500
PGP9.5	Tampón citrato pH 6 95-100 °C 10 min	1:40

Adicionalmente, para diferenciar la membrana basal y delimitar correctamente la unión dermoepidérmica, algunas secciones histológicas de la piel de individuos perinatales y de 45 días fueron teñidas con tinción histoquímica de Ácido Peryódico de Schiff (PAS) una vez

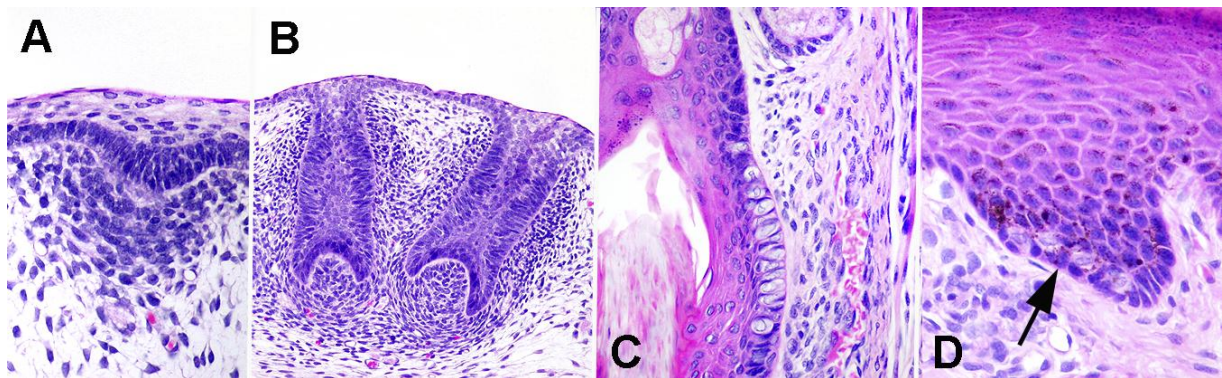
realizado el marcaje inmunohistoquímico con CK20. El material PAS positivo se observa de color magenta.

Tinción del Ácido Peryódico de Schiff	
Desparafinar e hidratar	
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Ácido periódico al 0.5%.....	5m
Lavado en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	
Reactivo de Schiff.....	15m
Lavado en H <sub>2</sub> O corriente.....	10m
Hematoxilina de Harris.....	6m
Lavado en H <sub>2</sub> O corriente.....	10m
Deshidratar, aclarar en xilol y montar	

**Resultados.**

*Apariencia de las CMs con HE*

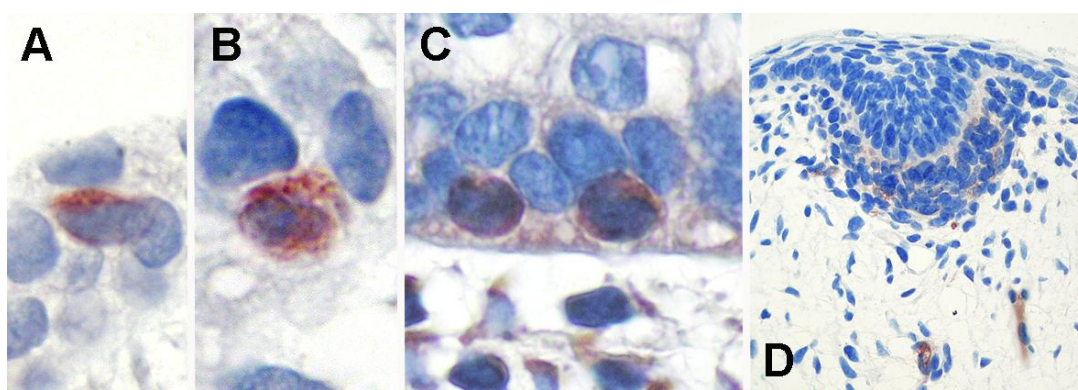
En los fetos de 30 días, no fue posible identificar las CMs y diferenciarlas de otras células de la epidermis (figuras 1A-B). En los fetos de 45 y 60 días, muchas células compatibles con CMs podían reconocerse por su morfología, marcadamente elipsoide, y localización en la epidermis, mucosa oral o vibrisas (figura 1C-D).



**Figura 1.** (A) Primordio folicular en piel del dorso de feto de 30d. 40x. HE. (B) Vibrisas en formación en la piel facial de feto de 30 días. 20x. HE. (C) Detalle de una vibrisa en feto de 45 días. Las CMs claras se reconocen en la vaina folicular externa en la característica disposición en hilera. 40x. HE. (D) Trufa en animal a término. En este periodo, las CMs son grandes, claras y fácilmente reconocibles en el estrato basal (flecha). 40x. HE.

*Identificación y perfil inmunohistoquímico de las CMs en el periodo fetal y perinatal.*

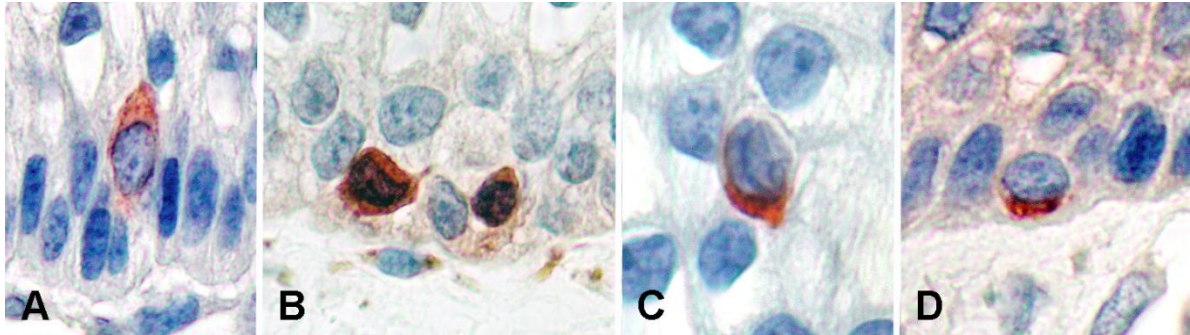
En los fetos de 30 días, las CMs fueron visibles con CK20 en la epidermis en desarrollo de la piel glabra y de la piel pilosa, además de en los primordios foliculares, mostrando un patrón de inmunorreacción citoplasmático y homogéneo (figuras 2A-B). No se observaron células en la mucosa oral. La reacción a CGA fue extremadamente escasa y ocasional, restringida a células aisladas en primordios foliculares. No se detectaron células positivas en la epidermis o en la mucosa oral. Con NSE, escasas células positivas con reacción citoplasmática y escasamente granular se reconocieron sólo en la epidermis de la piel lampiña (trufa) (figura 2C). Además, numerosas células en la dermis en desarrollo mostraban extensiones citoplasmáticas positivas. No se observó inmunorreacción para el resto de anticuerpos testados, salvo para NGFr en las células aplanadas de apariencia mesenquimatosas que recubren los primordios de las vibrisas y en escasos nervios dermales (figura 2D).



**Figura 2.** CMs en fetos de 30 días inmunorreactivas a CK20 (A, B) y NSE (C). 100x. (D) reacción débil positiva a NGFr en células planas alrededor de un folículo en formación. 40x.

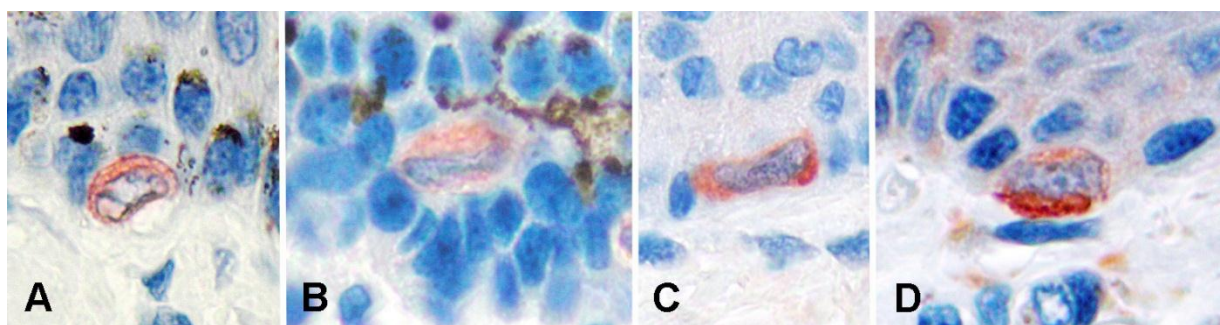
En los fetos de 45 días, el mayor número de células positivas y la mayor intensidad de reacción también se observó con CK20 (figura 3A). La ubicación de estas células en la epidermis fue mayoritariamente basal, de forma similar a los fetos de 30 días pero en agrupaciones más desarrolladas en la vaina folicular de las vibrisas. Numerosas células positivas a NSE, con un patrón de tinción citoplasmático y homogéneo (figura 3B), a CGRP y a CGA, con inmunorreacción homogénea o polarizada basal (figuras 3C-D), también se detectaron en esta fase. Destacaron escasas células aisladas o en agregados mal definidos en la epidermis con la inmunorreacción a CGRP polarizada hacia los Qs. No se reconoció reacción con el resto de

anticuerpos. No se observaron células positivas en la mucosa oral ni en la dermis. Con SYN, ocasionalmente se marcaban algunas terminaciones nerviosas intraepiteliales o perifoliculares.

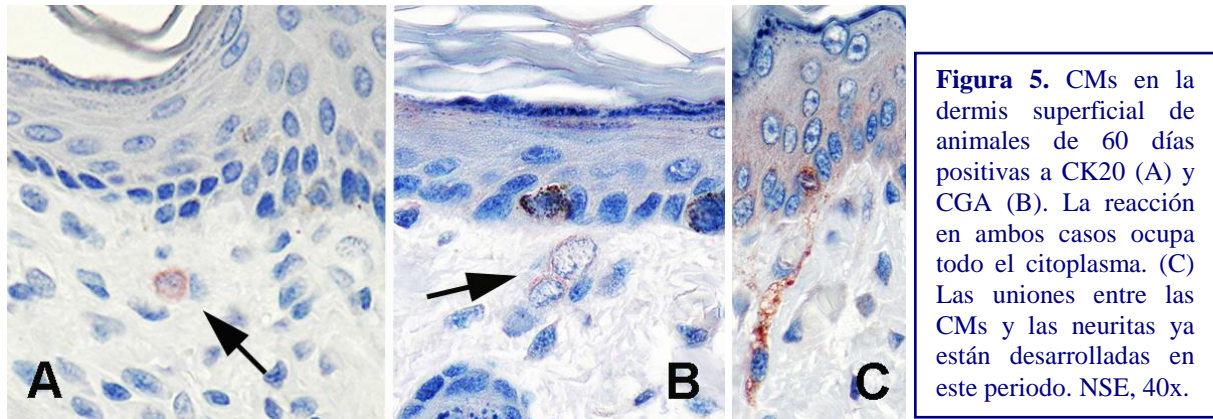


**Figura 3.** CMs en fetos de 45 días inmunorreactivas a CK20 (A), NSE (B), CGRP (C) y CGA (D). 100x.

En los animales de 60 días, numerosas células positivas eran visibles con CKs, CGA, NSE, SYN, y CGRP (figura 4). En las secciones teñidas con proteína S100, PGP9.5, GAP43, NF y NGFr no se reconocieron CMs, si bien numerosas estructuras nerviosas en la dermis superficial, áreas perifoliculares y en contacto con las CMs en su ubicación normal eran positivas y muy pronunciadas. Escasas células positivas se reconocieron en la dermis superficial con CK20 y CGA, con un patrón de reacción citoplasmático homogéneo (figura 5A-B). Además, con NSE las terminaciones nerviosas de Merkel (CM+axón) se mostraban completamente desarrolladas y muy evidentes (figura 5C).



**Figura 4.** CMs en animales de 60 días positivas a CK20 (A), CK8+18 (B), CGRP (C) y NSE (D). 100x.

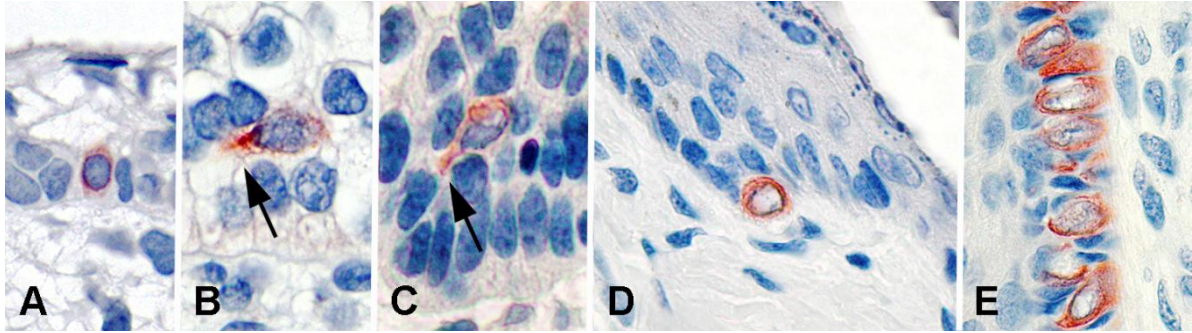


Dado que la CK20 demostró la mayor intensidad de reacción y una distribución citoplasmática más homogénea en todas las fases del desarrollo, además de la mayor especificidad (ninguna otra estructura presentó positividad), se usó como referente para el estudio de morfología, densidad y distribución.

#### *Cambios en la forma y el tamaño de las CMs durante el desarrollo fetal.*

Las CMs presentaron una morfología aplanada, globular y/o dendrítica con inmunomarcaje con CK20. Las CMs dendríticas aumentaron conforme avanzaba la edad gestacional. A los 30 días de gestación, predominaron las células redondeadas sobre las células aplanadas (figura 6A). Algunas mostraban cortas y escasas prolongaciones del citoplasma (figura 6B). Posteriormente, a los 45 días, la morfología predominante era globular y eran más numerosas las células con procesos citoplasmáticos (figura 6C). En la piel perinatal continuaba observándose células globulares, especialmente en la unión dermoepidérmica (figura 6D), aunque ya la mayoría mostraba características morfológicas típicas de la etapa adulta. Las CMs dermales perinatales fueron siempre globulares, localizadas libremente en la dermis superficial (figura 5).

Las variaciones en el tamaño de las CMs también fueron evidentes a lo largo del desarrollo cutáneo, siendo más frecuentes las células pequeñas a los 30 días de gestación para ir incrementando su volumen y ser muy grandes y pronunciadas en la piel perinatal (figura 6A, 6E). Así pues, el tamaño celular parece incrementarse paralelamente a la progresión de la edad gestacional.

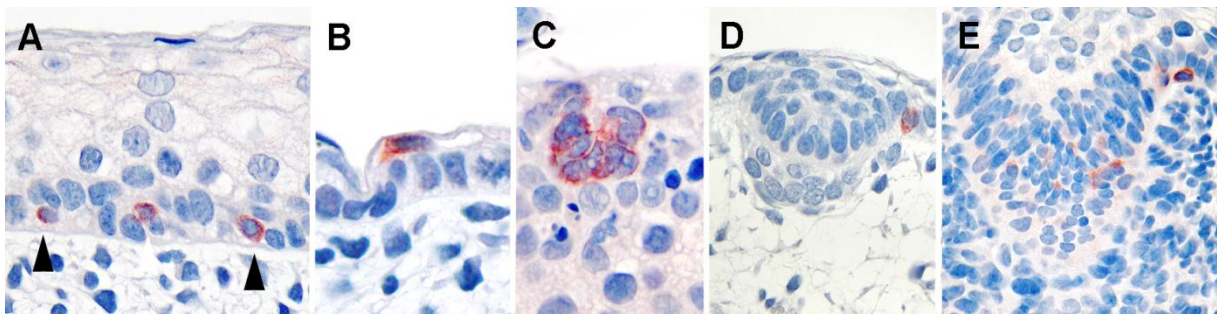


**Figura 6.** Las CMs en los fetos de 30 días presentan mayoritariamente una forma redondeada y pequeño tamaño (A), con ocasionales pequeñas prolongaciones o dendritas (B). En los fetos de 45 días, las CMs muestran dendritas más desarrolladas (C). Al término de la gestación, las CMs predominantes son globosas y de gran tamaño (D, E). 100x.

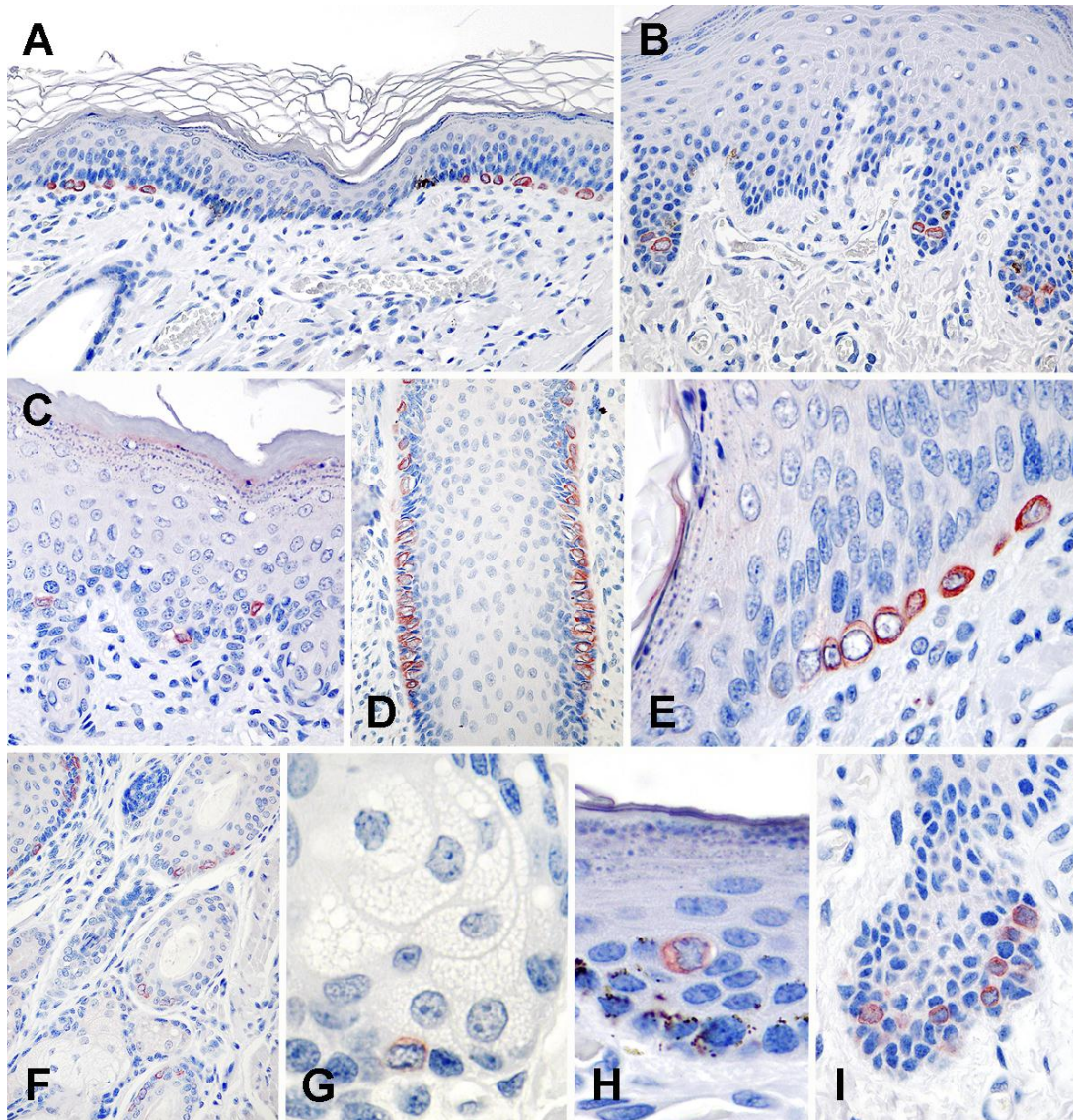
#### *Densidad y distribución de las CMs en la piel fetal y perinatal.*

Las CMs positivas fueron menos abundantes en los fetos 30 días si se compara con el periodo perinatal. Las células se distribuían irregularmente en el estrato basal o parabasal de la epidermis (figura 7A). Con menor frecuencia, aparecían en el peridermo, muy próximas a la superficie cutánea (figura 7B). Normalmente, se presentaban como células individualizadas; muy raramente, agregados irregulares de células positivas podían encontrarse a cualquier nivel dentro de la epidermis (figura 7C). Aparentemente, esta distribución no seguía un patrón definido dentro de cada estructura cutánea en esta fase, excepto en las áreas superficiales de los primordios foliculares, en las áreas que formarán las crestas infundibulares, donde aparecían células positivas de forma similar a la que se observa en estadios posteriores (perinatal y adulto) (figura 7D). También pudo constatar la presencia de células individualizadas o en pequeños agregados, entremezcladas con las células que formarán la vaina epitelial folicular. En las vibrisas, especialmente, estos agregados eran más pronunciados (figura 7E).

**Figura 7.** Distribución de las CMs en los fetos de 30 días de gestación. (A) Individualizadamente en el estrato basal. 40x; (B) en el peridermo. 100x; (C) formando agregados irregulares en cualquier estrato. 100x; (D) en las áreas que formarán las crestas infundibulares de los folículos pilosos. 40x; (E) en la vaina folicular y en el área infundibular de las vibrisas. 40x.

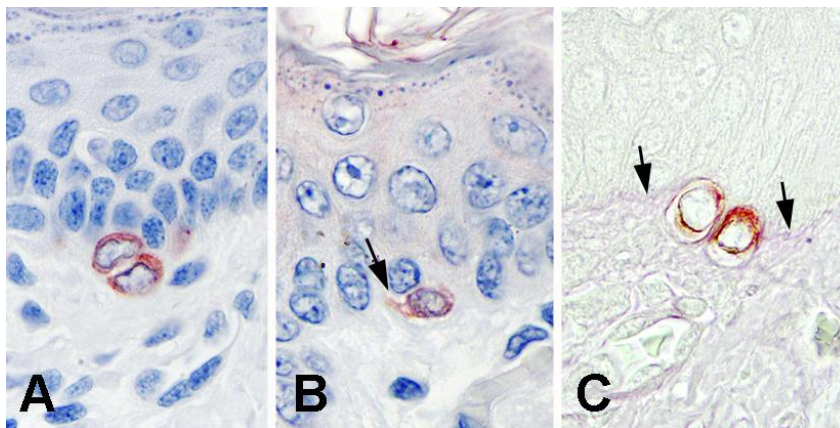


En los fetos de 45 días y, especialmente, en los de 60 días, la densidad celular fue elevada en cada localización (figura 8). La disposición y localización de las CMs era bastante similar a la descrita en adultos, incluidos los agregados lineales en la base de los discos epidermales (figura 8A), los agregados o corpúsculos de Merkel en la piel lampiña (figura 8B) y las características disposiciones en las vibrisas (figura 8C). Además de esto, fue notable la cantidad de células positivas en los folículos pilosos, mayor que la reconocida en adultos (figura 8D). Muy raramente, células aisladas se detectaron ubicadas en los anejos glandulares (figura 8E). Aún en este periodo se denota la persistencia de escasas células en estratos superficiales de la epidermis, cerca de la superficie cutánea (figura 8F). En la piel de esta etapa del desarrollo fue característica la existencia de células positivas individualizadas en la piel pilosa fuera de los discos táctiles. Característicamente, algunas de estas células se presentaban en parejas en la unión dermoepidérmica (figura 9A), parecían protruir hacia la dermis y mostraban una morfología globular o elipsoide, con ocasionales prolongaciones citoplasmáticas hacia la epidermis (figura 9B). En las tinciones con PAS, la membrana basal parecía bordearlas dejándolas en el lado dermal (figura 9C). Finalmente, escasas células positivas se reconocieron libres en la dermis superficial. Las conexiones que establecen las CMs con las terminaciones nerviosas derivadas de nervios de la dermis superficial se mostraban muy desarrolladas ya en este periodo. En la mucosa oral, se detectaron células positivas sólo en los animales de 60 días (figura 8E).



**Figura 8.** Distribución de las CMs al final de la gestación. (A) En agregados lineales en la base de los discos epidermales. Piel facial, 40x; (B) en pequeños agregados o individualizadas en las papilas epiteliales de la trufa. 40x; (C) en las crestas de la epidermis de los cojinetes. 40x; (D) en la vaina epitelial externa de las vibrisas. 40x; (E) en las crestas infundibulares de las vibrisas. 100x; (F) en los folículos pilosos primarios y secundarios. Piel del dorso, 40x; (G) ocasionalmente, individualizadas en las glándulas sebáceas. Piel del dorso, 100x; (H) en el estrato parabaasal. Piel facial, 100x; (I) en la mucosa labial. 100x.





**Figura 9.** (A) Piel labial. Pareja de CMs interfolliculares en la unión dermo-epidérmica. Los cuerpos celulares parecen protruir hacia la dermis. 100x. (B) Piel facial. CMs en la unión dermo-epidérmica emitiendo prolongación citoplasmática hacia Qs epidérmicos. 100x. (C) Piel facial. CMs en la unión dermo-epidérmica. La membrana basal parece discurrir por encima de las CMs apareadas, que quedan hacia la dermis. Tinción de PAS, 100x.

### **Discusión.**

Las CMs fetales caninas ya aparecen en el día 30 de gestación en su ubicación definitiva, la epidermis, reconocibles mediante inmunomarcaje con CK20. Ninguna otra estructura cutánea muestra inmunorreacción y, por lo tanto, se muestra como el mejor marcador para las CMs del perro en estadios fetales. En humanos, tan pronto como en el día 56 de gestación, se pueden detectar CMs inmunopositivas a CK20 (Kim y Holbrook, 1995). Otras CKs de epitelio simple, las CKs 8 y 18, también se han demostrado en las CMs a partir de la semana 10-12 de gestación. Sin embargo, esas citoqueratinas son expresadas también los Qs del peridermo y, por lo tanto, son menos específicas (Moll R. y cols., 1982). En nuestras observaciones, destaca la ausencia completa de inmunorreacción para CK8+18 en las primeras etapas del desarrollo fetal, apareciendo únicamente a partir del día 45 de gestación. Escasas células, similares en localización y morfología a las células inmunorreactivas a CK20, son detectables con otros anticuerpos a los 30 días de gestación, para posteriormente incrementar su número e inmunoreactividad. Esto está en la línea de lo observado en fetos humanos donde, a medida que el desarrollo fetal avanza, las CMs se transforman tanto en morfología como en expresión de péptidos, indicando una distinta naturaleza del contenido de los gránulos neurosecretores y una

progresiva especialización en las funciones que desarrollarán en el animal adulto (Moll I. y cols., 1995). Una excepción es el desarrollo en la cavidad oral, donde las CMs en el perro sólo aparecen perinatalmente. Estos resultados son similares a los descritos por Tachibana y colaboradores (2000) en roedores. El porqué de esta tardía presentación en la mucosa oral no se conoce, pero podría estar relacionado con la existencia aquí de subtipos de CMs con diferentes funciones y, por lo tanto, con diferencias en el desarrollo.

Nuestros resultados respecto a la densidad de las CMs durante la gestación son contrarios a los descritos por algunos autores que afirmaban una reducción del número de CMs conforme avanzaba la edad gestacional, lo cual interpretaron como signo de la capacidad reducida de las CMs para proliferar (Moll R. y cols., 1984, Kim y Holbrook, 1995). Esta discrepancia puede ser el reflejo de diferencias entre especies respecto al desarrollo de la piel y, por extensión, de las CMs.

La presencia de CMs en los folículos pilosos del feto humano está implicada en la proliferación activa de las células epiteliales en estos sitios y en el desarrollo de estructuras adyacentes, como los nervios perifoliculares y el músculo piloerector (Narisawa y cols., 1993b, 1996; Kim y Holbrook, 1995). De forma similar, las CMs fetales caninas aparecen pronto en los primordios foliculares. Es notable el alto número de CMs que se reconocen en los folículos pilosos en la piel canina de 45 y 60 días. Esta gran concentración apoya la posibilidad de la participación en el desarrollo de los folículos pilosos en el perro, cuya densidad, complejidad y desarrollo es mayor que en los humanos. De hecho, nuestros hallazgos son muy similares a los encontrados en zonas de la piel humana con mayor densidad pilosa, como el cuero cabelludo. Aquí, las CMs incrementan en densidad y tamaño con la gestación, además de mostrar una mayor complejidad en la distribución dentro del folículo (Moll I., 1993a). Las CMs son, además, capaces de sintetizar y liberar neuropéptidos que pueden inducir la proliferación de células mesenquimatosas, como el VIP; la proliferación de estas células es uno de los procesos iniciales en la diferenciación del folículo piloso (Moll I., 1993a). De forma similar, un papel trófico o de inducción para el desarrollo de anejos glandulares es posible en el perro, dada la presencia de escasas CMs en las glándulas sebáceas, del mismo modo que en fetos humanos (Moll y cols., 1984a, 1986; Moll I. y Moll R., 1992, 1993; Narisawa y cols., 1993a).

En el presente estudio, las CMs fueron muy abundantes en la epidermis de los cojinetes plantares en los animales de 45 y 60 días, en las crestas glandulares ecruas en formación. Esta disposición es virtualmente idéntica a la que se describe en periodo fetal humano en la piel palmar y plantar humana. Su alto número y su localización se relacionan aquí con el desarrollo adecuado de las crestas glandulares (Narisawa y cols., 1993a Kim y Holbrook, 1995). Las CMs en la epidermis pueden, además, actuar como estructuras *diana* para el crecimiento y desarrollo de las fibras nerviosas hacia la epidermis, a través de la secreción de productos como el NGF (Vos y cols., 1991; Narisawa y cols., 1992b). Abundantes fibras nerviosas dérmicas e intraepiteliales en la piel en desarrollo del perro expresan NGFr. Adyacentes a las CMs epidérmicas y foliculares, las terminaciones nerviosas son muy numerosas y, muchas de ellas, establecían los característicos contactos con las CMs. Las CMs dermales también se relacionan con un papel inductivo en el desarrollo del plexo nervioso de la dermis superficial y de áreas perifoliculares (Narisawa y cols., 1992b, 1993).

Las CMs dendríticas son más numerosas en etapas fetales que en los perros adultos. La presencia de dendritas, las cuales ultraestructuralmente contienen un elevado número de gránulos neurosecretores, es un hallazgo que se mantiene interespecie (Tachibana, 1995; Tachibana y Nawa, 2002; Moll I. y cols, 2005). En muchos casos, estas dendritas se orientan hacia los Qs, originando la idea de que también pueden ejercer influencia sobre el desarrollo o la homeostasis de la epidermis. Prueba morfológica de esto es la presencia de áreas especializadas de unión entre las membranas de las CMs y los Qs adyacentes (García-Caballero y cols., 1988). En nuestro estudio, algunas CMs manifestaban polaridad de los gránulos secretores (manifestada como inmunorreacción a CGRP) hacia elementos de la epidermis y no hacia la región basal.

Las CMs fetales del perro presentan disposiciones y localizaciones atípicas respecto a su presentación en individuos adultos. Las más características son la presencia de células dispersas en la piel interfolicular, no asociadas con discos epidermales, y la presencia de células en la dermis superficial. Las CMs interfoliculares sólo se describen en humanos adultos bajo ciertas circunstancias patológicas y se relacionan con el proceso de regeneración epitelial a través de la liberación de diferentes péptidos como el VIP (Merot y Mooy, 1989; Moll I. y cols., 1990b). Su presencia en etapas fetales sugiere una función similar, relacionada con el desarrollo y

diferenciación de elementos epidérmicos. Muchas de estas células se localizaban en la lámina basal y manifestaban procesos citoplasmáticos dirigidos hacia los Qs. Otras mostraban una morfología redondeada o globosa y mostraban cuerpos celulares que parecían estar parcialmente en la dermis y parcialmente en la epidermis. Este particular hallazgo también se observa constantemente en los fetos humanos y ha sido considerado como una prueba de una migración a través de la membrana basal (Moll I. y cols., 1986; Narisawa y cols., 1992a; Kim y Holbrook, 1995; Halata y cols., 2003). Algunos autores han sugerido que la dirección de este movimiento es dermal-epidermal y prueba de la migración de las CMs desde la cresta neural hacia la epidermis (Winkelmann y breathnach, 1973). Si esto fuera así, se esperaría una mayor concentración de CMs en la dermis en etapas fetales tempranas y menor en la epidermis. Sin embargo, las CMs aparecen primero en la epidermis en los estadios tempranos del desarrollo. Así pues, a tenor de los datos, incluidas nuestras observaciones, la dirección del movimiento es más probable desde la epidermis hacia la dermis para cumplir funciones específicas de esta etapa, como la inducción y desarrollo de estructuras nerviosas. Una vez la piel adquiere su desarrollo completo, estas células se pierden y no se reconocen durante la vida adulta.

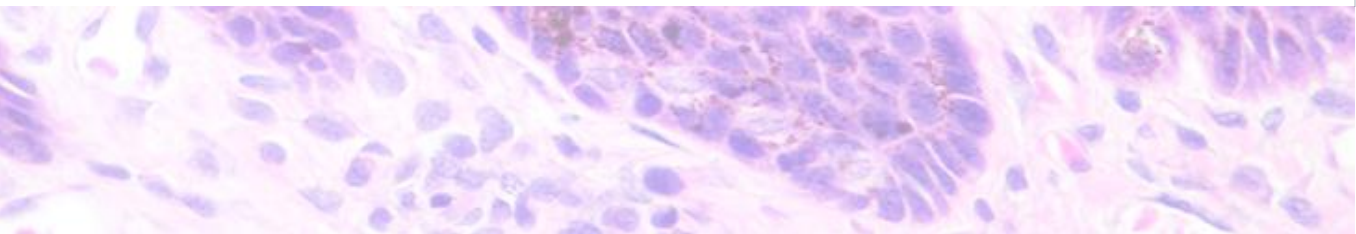
El hallazgo en ciertas especies de formas celulares que parecen intermedias o transicionales entre un Q y una CM desarrollada, la detección de citoqueratinas como proteínas del citoesqueleto, ciertos hallazgos ultraestructurales y estudios en piel fetal de mamíferos e invertebrados parecen sustentar la noción de que las CMs derivan de células epiteliales presentes en la epidermis fetal (Tachibana y Nawa, 1980; Moll I y cols., 1986; Moll I. y cols., 1990a, 1995; Narisawa y cols., 1992a, 1994b; Tilling y cols., 2014). En el perro, los hallazgos encontrados hasta ahora son similares y, por lo tanto, sugieren un origen epidérmico. Particularmente llamativo es el hallazgo de varias CMs en una posición alta en la epidermis, en el peridermo y cerca de la superficie cutánea en las primeras etapas del desarrollo. También en los animales de 45 días, algunas células mostraban una localización parabasal. Por el contrario, en fase perinatal y en adultos, las CMs exhiben una localización basal. Esto puede ser interpretado como una señal adicional de un origen epidérmico, donde las CMs son desplazadas tras su desarrollo hacia el área parabasal de forma similar a los Qs completamente diferenciados (Moll I. y Moll R., 1992). Gran parte de la controversia respecto al origen epidérmico o neural de las CMS existe porque muchos argumentos están basados en observaciones morfológicas, experimentales o en interpretaciones de resultados inmunohistoquímicos que son rebatidos por

una y otra corriente de pensamiento (teoría epidermal y teoría de la cresta neural). Sería importante considerar si las diferentes subpoblaciones de CMs provienen de un precursor común o de diferentes precursores, ya que esto podría explicar los resultados tan dispares respecto a su origen.

En resumen, nuestros resultados están en línea con los descritos para otros mamíferos, incluido el hombre, donde a medida que el feto se desarrolla las CMs sufren cambios en su morfología e inmunofenotipo, lo que se corresponde con la adquisición de una mayor especialización funcional. La presencia de dendritas en las CMs durante el periodo fetal estaría relacionada con la activación de las funciones paracrinas en las áreas donde los apéndices de la piel se están formando y diferenciando. Los hallazgos sugieren, además, que las CMs epidermales son dianas para los nervios sensoriales. Son necesarios estudios específicos sobre la producción de hormonas tisulares, citoquinas o factores de crecimiento por parte de las CMs del perro para clarificar su papel en la formación, crecimiento y diferenciación de los apéndices y nervios cutáneos.

# 5 CONCLUSIONES

---





**Primera.** Las técnicas histoquímicas rutinarias son de escasa utilidad para la identificación de las CMs normales en la piel del perro, exceptuando el método argéntico de Grimelius, aunque sus resultados son inconsistentes y no aportan ventajas respecto a las técnicas inmunohistoquímicas.

**Segunda.** Las CMs en el perro presentan un amplio perfil inmunohistoquímico que incluye marcadores epiteliales (EpCAM y citoqueratinas de epitelios simples 7, 8, 18 y 20), marcadores neurales (NSE, NF y proteína S100) y marcadores neuroendocrinos (SYN, CGA y CGRP), lo que permite su correcta diferenciación de las otras células claras de la epidermis. El patrón de expresión y distribución intracelular de estas sustancias es dependiente de la localización anatómica, especialmente para NF.

**Tercera.** La CK20 es el marcador más específico y útil para la identificación y el estudio de las CMs en el perro.

**Cuarta.** Las características ultraestructurales más significativas en las CMs del perro incluyen gránulos neurosecretores de núcleo electrodenso, procesos citoplasmáticos espinosos enfrentados a los queratinocitos, procesos dendríticos de carácter paracrino e inconstante asociación con terminaciones nerviosas.

**Quinta.** Existe una clara correlación entre las características inmunohistoquímicas y morfológicas de las CMs caninas que demuestran su carácter neuroepitelial. Además, nuestros resultados indican que las CMs caninas representan una familia celular heterogénea, con varias subpoblaciones que manifiestan distintas adaptaciones morfológicas y elementos secretores para cumplir diferentes funciones, dependiendo de la localización cutánea en la que se encuentren.

**Sexta.** Las CMs durante la etapa adulta en el perro tienden a organizarse y ser numerosas en áreas cutáneas receptoras sensoriales, indicando que están asociadas con el sentido del tacto en esta especie. Además, funciones paracrinas, influenciando el desarrollo epitelial y folicular, son posibles en algunas localizaciones.



**Séptima.** En la especie canina no existen diferencias significativas en la densidad de CMs respecto a edad, sexo, tamaño de la raza, longitud del pelo, tono de la capa o grado de pigmentación.

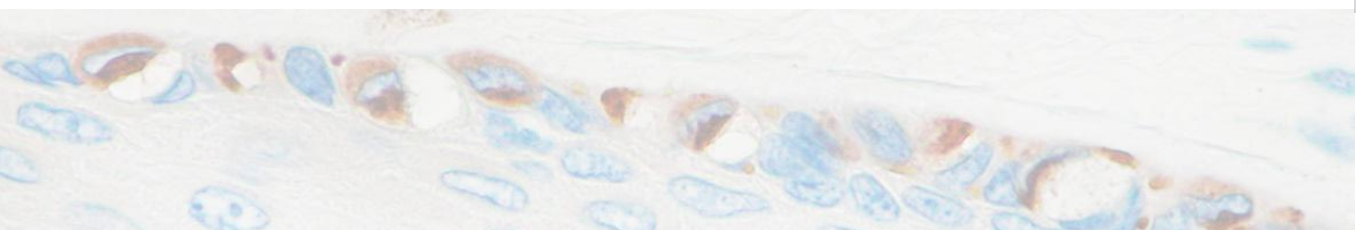
**Octava.** Las CMs aparecen desarrolladas en la 4ª semana (30 días) de gestación. La morfología celular varía y el tamaño celular y la expresión de péptidos se incrementan con la edad gestacional, lo que se corresponde con la adquisición de una mayor especialización funcional.

**Novena.** La presencia de dendritas en las CMs durante el periodo fetal estaría relacionada con la activación de las funciones paracrinas en las áreas donde los apéndices de la piel se están formando y diferenciando. Los hallazgos sugieren, además, que las CMs epidermales son dianas para el desarrollo y el establecimiento de conexiones con los nervios sensoriales.

**Décima.** Los rasgos morfológicos, inmunofenotípicos y la distribución de las CMs en el perro durante el desarrollo fetal son sugestivos de un origen epitelial.

# 6 RESUMEN

---





Las células neuroendocrinas cutáneas o células de Merkel (CMs) son receptores especializados que se caracterizan por su asociación íntima con terminaciones nerviosas (terminaciones nerviosas de Merkel) y su particular localización en áreas sensitivas al tacto de la piel de los mamíferos. También son consideradas parte del sistema neuroendocrino difuso y se les atribuyen funciones endocrinas. La implicación de las CMs en diferentes formas de enfermedad cutánea así como en el crecimiento, diferenciación y homeostasis de la piel ha sido previamente documentada en humanos. En el presente proyecto nos hemos propuesto realizar una completa caracterización de las CMs en la piel del perro, incluyendo sus rasgos histoquímicos, ultraestructurales e inmunofenotípicos, su densidad y distribución en piel y mucosas, así como su presentación y distribución durante el desarrollo fetal, a fin de dilucidar sus funciones y el posible origen en esta especie.

Las tinciones histoquímicas se muestran de escasa utilidad para la identificación y el reconocimiento de las CMs en la piel canina, excepto el método argéntico de Grimelius. No obstante, el resultado de esta tinción es variable e inconsistente y, por lo tanto, no aporta ventajas respecto al reconocimiento a través de otros métodos, como las técnicas inmunohistoquímicas o la microscopía electrónica.

Mediante el empleo de anticuerpos comerciales monoclonales y policlonales sobre muestras de piel de diferentes localizaciones, las CMs fueron claramente diferenciadas de otros tipos de células claras de la epidermis en el perro. Nuestros resultados demuestran la expresión de citoqueratinas 7, 8, 18 y 20, EpCAM, NSE, CGA, SYN, CGRP, proteína S100 y NF. Existe una pronunciada heterogeneidad en los patrones de distribución y expresión para los diferentes anticuerpos usados, dependiente de la localización anatómica. Esta heterogeneidad hace que no todos los anticuerpos sean igual de eficaces para estudiar la densidad y distribución de este tipo celular, por lo que se validó la utilidad de varios de estos anticuerpos comerciales para tal fin. La expresión de CK20 fue la más intensa y consistente entre los diferentes anticuerpos, seguida de la obtenida con los anticuerpos contra NSE, CK8+18, CGA y SYN. Se encontró una diferencia significativa entre los valores de intensidad de inmunorreacción dependiendo de la localización examinada.

Ultraestructuralmente, las CMs de la piel canina se caracterizan por: (1) ordenamiento en agregados en el estrato basal de la epidermis, mucosa oral o vaina externa de la raíz externa folicular; (2) unión inconstante con terminaciones nerviosas; (3) forma celular oval ( $10,27 \pm 1,64 \mu\text{m}$  en el eje mayor) con núcleos grandes lobulados ( $5,98 \pm 1,16 \mu\text{m}$  en el eje mayor); (4) procesos citoplasmáticos gruesos parecidos a espinas que interdigitan con los queratinocitos de alrededor; (5) presencia de desmosomas en el cuerpo celular o en la base de los procesos espinosos, uniéndose a los queratinocitos vecinos; (6) citoplasma con filamentos intermedios organizados de forma laxa y numerosos gránulos de centro denso ordenados en la porción basal del citoplasma. Existe una marcada correlación entre estos hallazgos y las características inmunohistoquímicas de las CMs caninas, que demuestran su carácter neuroepitelial.

Diferentes patrones de organización celular fueron encontrados en la epidermis, folículos pilosos y mucosas, incluyendo grupos celulares de variable tamaño, organizaciones lineales y células individualizadas y dispersas. Los resultados revelan gran variación en la densidad y distribución de las CMs en la superficie corporal, con la densidad más alta en la mucosa oral y la piel del área facial. No se encontró correlación de la densidad de CMs con la edad, sexo, tipo de raza, tipo de capa o pigmentación.

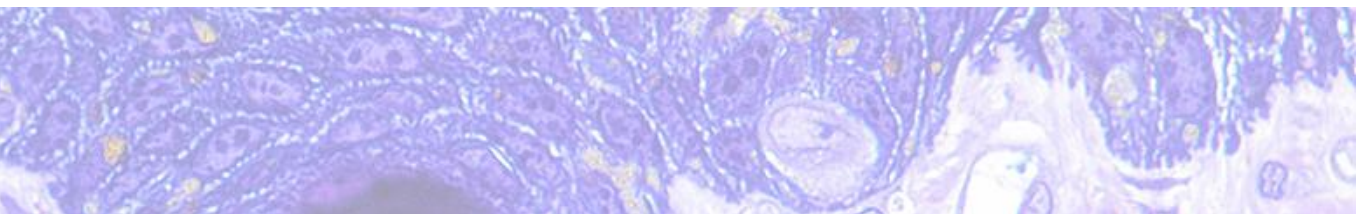
Durante el desarrollo fetal canino las CMs sufren cambios en su morfología e inmunofenotipo, lo que se corresponde con la adquisición de una mayor especialización funcional. La CK20 se muestra como el marcador más específico para el reconocimiento de las CMs también en este periodo. La presencia de dendritas en las CMs fetales estaría relacionada con la activación de funciones paracrinas en las áreas donde los apéndices de la piel se están formando y diferenciando. Las CMs epidermales serían, además, dianas para los nervios sensoriales. Nuestros hallazgos son también sugestivos de un origen epitelial en esta especie.

Los datos indican que las CMs en el perro deberían considerarse como una población celular variable con adaptaciones dependientes de la localización en la que se encuentran y de la etapa del desarrollo cutáneo. Nuestros hallazgos aumentan el conocimiento de la estructura de la piel en esta especie y representan un cimiento para estudios futuros acerca del papel de estas células en diferentes desórdenes cutáneos.

# 7

## SUMMARY

---





Cutaneous neuroendocrine cells or Merkel cells (MCs) are specialized skin receptors characterized by their close association with nerve terminals (Merkel nerve endings) and particular location in tactile sensitive areas in mammalian skin. They also are cells with a presumptive neuroendocrine function and are considered as part of the diffuse neuroendocrine system. Involvement of MCs in different cutaneous diseases as well as in the growth, differentiation and homeostasis of the skin has been previously documented for humans. The present work represents a complete characterization of the MCs in the dog skin, including description of histochemical, ultrastructural and immunophenotypical features, determination of density and mapping in skin and mucosae, and assessment of the presence and distribution during fetal development, in order to elucidate the functions and origin of this cell type in this species.

Histochemical stains are useless for identification of MCs in the canine skin, except for Grimelius argirophil staining. However, results presented as highly variable and inconsistent and, therefore, there is no advantages compared with other methods such as immunohistochemistry or electron microscopy.

By using of commercial available monoclonal and polyclonal antibodies in skin samples from different anatomic locations, canine MCs were properly distinguished from other clear cell types in the epidermis. Our results demonstrate that MCs express cytokeratins (CK) 7, 8, 18 and 20, EpCAM, NSE, CGA, SYN, CGRP, S100 protein, and NF, present diverse cytological features and arrangements depending on the location considered, and showed pronounced heterogeneity with markedly different expression and distribution patterns for antibodies used. Because of this expression variability we also assessed the sensibility and specificity of these commercial antibodies in order to elucidate possible differences in terms of immunoreaction and MCs counting. The expression of CK20 was the strongest among different antibodies, with a substantially high number of immunostained cells, followed by the antibodies against NSE, CK8+18, CGA and SYN. There was a significant difference in intensity of immunoreaction scores between them depending on the location examined.

Ultrastructural features of MCs in the dog include: (1) arrangement in clusters in the basal layer of the epidermis, oral mucosa or external follicular root sheath; (2) inconstant link



with nerve terminal; (3) oval ( $10.27 \pm 1.64 \mu\text{m}$  major axis) cell shape with large lobulated nuclei ( $5.98 \pm 1.16 \mu\text{m}$  major axis); (4) spine-like and thick cytoplasmic processes interdigitating the surrounding keratinocytes; (5) presence of desmosomes in the cell body or at the basis of spine-like processes attaching neighboring keratinocytes; (6) cytoplasm containing loosely arranged intermediate filaments and numerous dense-core granules arranged in the basal portion of the cytoplasm. There is a strong correlation between these findings and immunohistochemical features of canine CMs revealing a neuroepithelial character.

Different patterns were noted in epidermis, hair follicles or mucosa, including variable-sized clusters, linear or horse-shaped arrangements, and scattered and individualized cells. The results reveal great variations in density and distribution of MCs over the body surface, with the highest numbers in oral mucosa and facial skin. There was no correlation of MCs density with age, sex, type of breed, coat type or pigmentation.

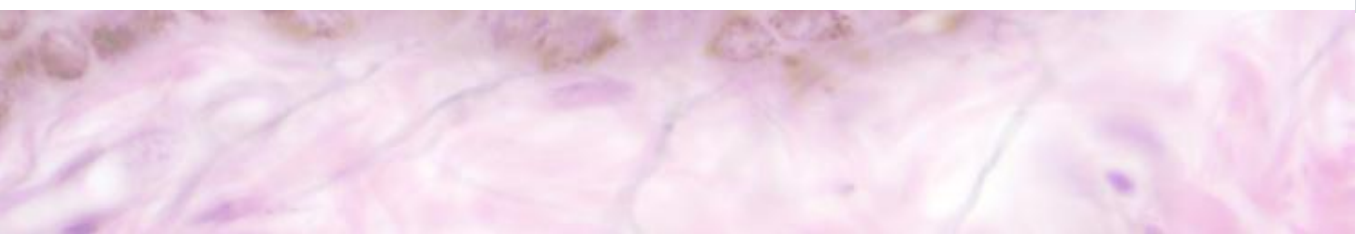
During fetal development MCs undergoes changes in morphology and immunophenotype with increasing gestational age. These facts are related to acquisition of functional specialization. CK20 also appears to be the most specific marker for MCs identification during this period. Growth of MC's dendritic processes in fetal MCs would be related to activation of paracrine functions in the areas where skin appendages are forming and differentiating. Epidermal MCs appears to be *target structures* for ingrowing sensorial nerve fibers. Moreover, our findings suggest an epithelial origin for MCs in this species.

According to the data obtained, MCs in the dog should be considered as a heterogeneous cell population with adaptations depending, among other, upon the developmental stage and the type of tissue within which they occur. The findings enhance our knowledge of the skin structure in this species and providing a basis for future studies of the roles of these cells in damaged canine tissues.



## **FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**

---





1.

En función de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, es necesario estudiar la producción de hormonas tisulares, citoquinas o factores de crecimiento por parte de las CMs del perro para clarificar su papel en la formación local, crecimiento y diferenciación de los anejos y nervios cutáneos en esta especie. Estudiar la expresión de moléculas de reconocido papel en el desarrollo de estructuras cutáneas, como el VIP o la sustancia P.

2.

Se ha documentado la implicación de las CMs en diferentes desórdenes cutáneos en medicina humana. Es necesario comprobar si esta participación es similar en la especie canina, especialmente en dermatosis solares y en neoplasias basales y foliculares. Por otro lado, dada su especial relación con terminaciones nerviosas cutáneas sensoriales, podría ser interesante comprobar si en condiciones degenerativas nerviosas, como las derivadas de la diabetes, la densidad, distribución y función de las CMs se ve modificada.

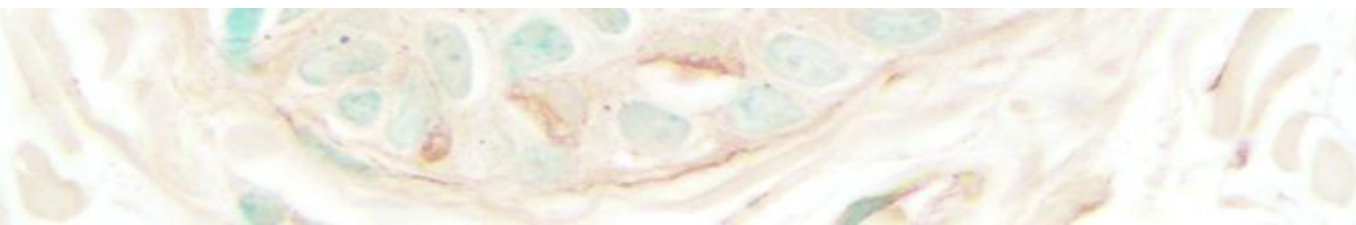
3.

Una vez caracterizado este tipo celular en el perro, estudiar la incidencia, presentación, características clínicas, histológicas e inmunofenotípicas de los tumores neuroendocrinos cutáneos (o de células de Merkel). Definir los criterios diagnósticos para esta neoplasia en esta especie y determinar el diagnóstico diferencial con otras neoplasias similares. Estudiar el porqué de su aparente diferencia de comportamiento con los tumores desarrollados en humanos y en gatos. *En desarrollo actualmente.*



# LISTADO DE ABREVIATURAS

---





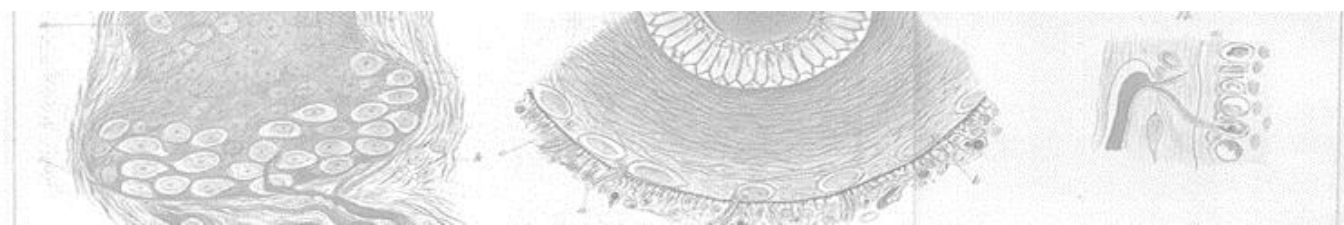
°C	Grados centígrados
Ø	Diámetro
ØM	Diámetro mayor
Øm	Diámetro menor
µm	Micrómetros o micras
µm <sup>2</sup>	Micrómetros o micras cuadradas
aa	Aminoácido
ABC	Complejo Avidina-Biotina (-Peroxidasa)
AchE	Acetilcolinesterasa
ADP	Adenosín difosfato
AEC	3-Amino-9-etilcarbazol
AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BZ	Zona basal ( <i>Basal zone</i> , en inglés)
C	Corneocito
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CCM	Carcinoma de células de Merkel ( <i>MCC</i> en inglés)
CD	Grupo antigénico de diferenciación ( <i>Cluster of differentiation</i> , en inglés)
CGA	Cromogranina A ( <i>Cromogranin A</i> , en inglés)
CGRP	Péptido genéticamente relacionado con la calcitonina ( <i>Calcitonin gene related peptide</i> , en inglés)
CK	Citoqueratina ( <i>Cytokeratin</i> , en inglés)
CL	Célula de Langerhans
CM	Célula de Merkel ( <i>MC</i> o <i>MK</i> , en inglés)
CMsF	Células de Merkel fetales
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> , en inglés)
EMA	Antígeno epitelial de membrana ( <i>Epithelial membrane antigen</i> , en inglés)
EpCAM	Molécula de adhesión celular epitelial ( <i>Epithelial cell adhesion molecule</i> )
EpE	Epitelio estratificado
EpS	Epitelio simple
FA	Fosfatasa alcalina
g	Gramos
GAP43	Proteína asociada al crecimiento 43 ( <i>Growth associated protein 43</i> , en inglés)
h	Horas
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Agua destilada
HE	Hematoxilina y eosina
HMB4	<i>Human melanoma black 45</i>
HT	Hidroxitriptamina
Ig	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IP3r	Recepto del inositol trifosfato
kDa	Kilodalton
LAPas	Leucina-aminopeptidasa
Long	Longitud
M	Molar
MCHII	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
mGLuR5	Receptor metabotrópico de glutamato no. 5



<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>ML</b>	Melanocito
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milímetros cuadrados
<b>NCAM</b>	Molécula de adhesión celular neural ( <i>Neural cell adhesion molecule</i> , en inglés)
<b>NF</b>	Neurofilamentos
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso ( <i>Nerve growth factor</i> , en inglés)
<b>NGFr</b>	Receptor del factor de crecimiento nervioso ( <i>Nerve growth factor receptor</i> )
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>nm<sup>2</sup></b>	Nanómetros cuadrados
<b>nº</b>	Número
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>NSE</b>	Enolasa específica de neuronas ( <i>Neuron specific enolase</i> , en inglés)
<b>NT3</b>	Neurotrofina 3
<b>PAS</b>	Ácido peryódico de Schiff ( <i>Periodic acid–Schiff</i> , en inglés)
<b>PBS</b>	Tampón fosfato-salino
<b>PGP9.5</b>	Proteína producto del gen 9.5 ( <i>Protein gene product 9.5</i> , en inglés)
<b>PHI</b>	Péptido Histidina-Isoleucina
<b>PLY</b>	Péptido leucina-tirosina
<b>Q</b>	Queratinocito
<b>RA</b>	Adaptación rápida ( <i>Rapidly-adapting</i> , en inglés)
<b>SA1</b>	Adaptación lenta tipo 1 ( <i>Slowly-adapting type 1</i> , en inglés)
<b>SA2</b>	Adaptación lenta tipo 2 ( <i>Slowly-adapting type 2</i> , en inglés)
<b>SD</b>	Desviación estándar ( <i>Standard deviation</i> , en inglés)
<b>SYN</b>	Sinaptofisina ( <i>Synaptophysin</i> , en inglés)
<b>T<sup>a</sup></b>	Temperatura
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UR</b>	Uranafina
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VGLU</b>	Transportador de glutamato vesicular ( <i>Vesicular glutamate transporter</i> , en inglés)
<b>VIM</b>	Vimentina
<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo ( <i>Vasoactive intestinal polypeptide</i> , en inglés)
<b>VMAT-1</b>	Transportador vesicular de monoamina 1 ( <i>Vesicular monoamine transporter 1</i> )

# 10 BIBLIOGRAFÍA

---





**A**lvarez FJ, Cervantes C, Villalba R, Blasco I, Martinez-Murillo R, Polak JM, Rodrigo J (1988). Immunocytochemical analysis of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal polypeptide in Merkel cells and cutaneous free nerve endings of cats. *Cell Tissue Res* 254:429-437.

**B**agnasco G, Properzi R, Porto R, Nardini V, Poli A, Abramo F (2003). Feline cutaneous neuroendocrine carcinoma (Merkel cell tumour): clinical and pathological findings. *Vet Dermatol* 14:111-115.

Barret AW, Cort EM, Patel P, Berkovitz BKB (2000). An immunohistological study of cytokeratin 20 in human and mammalian oral epithelium. *Arch Oral Biol* 45:879-887.

Baudoin C, Meneguzzi G, Portier MM, Demarchez M, Bernerd F, Pisani A, Ortonne JP (1993). Peripherin, a neuronal intermediate protein, is stably expressed by neuroendocrine carcinomas of the skin, their xenograft on nude mice, and the corresponding primary cultures. *Cancer Res* 53:1175-1181.

Baumann KI, Senok SS, Chan E, Yung WH (2000). Calcium influx and calcium-induced calcium release in mechanically stimulated Merkel cells of rat sinus hair type I mechanoreceptors. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 73-81.

Beiras A, García-Caballero T, Espinosa J, Gallego R (1986). Staining of Merkel cells of pig snout epidermis using the uranaffin reaction. Morphometric analysis of neuroendocrine granules. *Differentiation* 32:89-92.

Beiras A, García-Caballero T, Gallego R, Roson E (1987a). Staining of neuroendocrine Merkel cells of human epidermis using the uranaffin reaction. *J Invest Dermatol* 89:366-368.

Beiras A, García-Caballero T, Gallego R (1987b). EM diversity of neuroendocrine (Merkel) cells of the human skin. *Ultrastruct Pathol* 11:59-65.

Beiras A, García-Caballero T, Fernández-Redondo V, Gallego R (1987c). Morphometric characterization of the human neuroendocrine Merkel cells. *J Invest Dermatol* 88:766-768.

Beiras-Fernández A, Gallego R, Blanco M, García-Caballero T, Dieguez C, Beiras A (2004). Merkel cells, a new localization of prepro-orexin and orexin receptors. *J Anat* 204:117-122.

Berman B, Chen VL, France DS, Dotz WI, Petroni G (1983) Anatomical mapping of epidermal Langerhans cell densities in adults. *Br J Dermatol* 109:553-558.

Boeke J (1925). Die intrazelluläre lage der nervenendigungen im epithelgewebe und ihre beziehungen zum zellkern. *Z Mikrpsk Anat Forsch* 2:391.

Boot PM, Rowden G, Walsh N (1992). The distribution of Merkel cells in human fetal and adult skin. *Am J Dermatopathol* 14:391-396.

Botezat E (1908). Die nerven der epidermis. *Anat Anz* 33:45.

Boulais N, Misery L (2007). Merkel cells. *J Am Acad Dermatol* 57:147-65.

Boulais N, Pennec JP, Lebonvallet N, Pereira U, Rougier N, Dorange G, Chesné C, Misery L (2009a). Rat Merkel cells are mechanoreceptors and osmoreceptors. *PLoS One* 4:e7759.

Boulais N, Pereira U, Lebonvallet N, Gobin E, Dorange G, Rougier N, Chesne C, Misery L (2009b). Merkel cells as putative regulatory cells in skin disorders: an in vitro study. *PLoS One* 4:e6528.

**C**auna N (1962). Functional significance of the submicroscopical, histochemical and microscopical organization of the cutaneous receptor organs. *Anat Anz* 111:181-197.

Chen SY, Gerson S, Meyer J (1973). The fusion of Merkel cell granules with a synapse-like structure. *J Invest Dermatol* 61:290-292.

Cheng-Chew SB, Leung PY (1991). Immunocytochemical evidence of a met-enkephalin-like substance in the dense-core granules of mouse Merkel cells. *Cell Tiss Res* 265:611-614.

Cheng-Chew SB, Leung PY (1992). Species variability in the expression of met- and leu-enkephalin-like immunoreactivity in mammalian Merkel cell dense-core granules. A light- and electron-microscopic immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 269:347-351.

Cheng-Chew SB, Leung PY (1993). CGRP-immunoreactivity in Merkel cells and nonmyelinated nerve plexuses of dog skin. *Neuroreport* 4:457-459.

Cheng-Chew SB, Leung PY (1994). Ultrastructural study of the merkel cell and its expression of met-enkephalin immunoreactivity during fetal and postnatal development in mice. *J Anat* 185:511-520.

Cheng-Chew SB, Leung PY (1996). Localization of VIP- and CGRP-like substances in the skin and sinus hair follicles of various mammalian species. *Histochem Cell Biol* 105:443-452.

Collina G, Eusebi V, Capella C, Rosai, J (1998). Merkel cell differentiation in trichoblastoma. *Virchows Arch* 433:291-296.

Crivellato E, Travan L, Damiani D, Fusaroli P, Mallardi F (1994). Visualization of PGP9.5 immunoreactive nerve terminal in the mouse snout epidermis. *Acta Histochem* 96:197-203.

**D**alsgaard C-J, Rydh M, Haegerstrand A (1989). Cutaneous innervation in man visualized with Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5) antibodies. *Histochem* 92:385-389.

Darzynkiewicz Z, Evenson DP, Staiano-Coico L, Sharpless TK, Melamed ML (1979). Correlation between cell cycle duration and RNA content. *J Cell Physiol* 100:425-438.

Diamond J, Mills LR, Mearow KM (1988). Evidence that the Merkel cell is not the transducer in the mechanosensory Merkel cell-neurite complex. *Prog Brain Res* 74:51-56.

Dogiel AS (1903). Ueber die nervenendapparate in der haut des menschen. *Z Wissensch Zool* 75:46.

**E**bara S, Kumamoto K, Rice FL (2003). Confocal microscopic analysis of Merkel innervation in the cat mystacial vibrissa follicles. In: *The Merkel Cell: structure, development, function, cancerogenesis*, eds. Baumann KI, Halata Z, Moll I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 137-141.

Eispert AC, Fuchs F, Brandner JM, Houdek P, Wladykowski E, Moll I (2009). Evidence for distinct populations of human Merkel cells. *Histochem Cell Biol* 132:83-93.

English KB (1974). Cell types in cutaneous type I mechanoreceptors (Haarscheibens) and their alterations with injury. *Am J Anat* 141:105-126.

English KB (1977a). Morphogenesis of Haarscheiben in rats. *J Invest Dermatol* 69:58-67.

English KB (1977b). The ultrastructure of cutaneous type I mechanoreceptor (Haarscheiben) in cats following denervation. *J Comp Neurol* 172:137-164.

English KB, Harper S, Stayner N, Wang ZM, Davies AM (1994): Localization of Nerve growth factor (NGF) and low-affinity NGF receptors in touch domes and quantification of NGF mRNA in keratinocytes of adult rats. *J Comp Neurol* 344:470-480.

English KB, Wang ZZ, Styner N, Stensaas LJ, Martin H, Tuckett R (1992). Serotonin-like immunoreactivity in Merkel cells and their afferent neurons in touch domes from the hairy skin of rats. *Anat Rec* 232:112-120.

Eurell JA, Frappier BL (2006). *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*, 6th Edition. Ames, IA: Wiley-Blackwell, pp. 321-323.

**F**agan BM, Cahusac PM (2001). Evidence for glutamate receptor mediated transmission at mechamoreceptor in the skin. *Neuroreport* 12:341-347.

Fantini F, Johansson O (1995). Neurohistochemical markers in human cutaneous Merkel cells. An immunohistochemical investigation. *Exp Dermatol* 4:365-371.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* 319:1096–1100.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319:1049-1050.

Ferrer L (1994). Estructura y función de la piel. En: *Avances en dermatología canina*, ed. Ferrer L, fascículo 1, Pulso Ediciones, SA, Barcelona, España pp. 5-29.

Fortman GJ, Winkelmann RK (1973). A Merkel cell nuclear inclusion. *J Invest Dermatol* 61:334.



Fox H, Whitear M (1978). Observations on Merkel cells in amphibians. *Biol Cellulaire* 32:223-232.

Frigerio B, Capella C, Eusebi V, Tenti P, Azzopardi JG (1983). Merkel cell carcinoma of the skin: the structure and origin of normal Merkel cells. *Histopathology* 7:229-249.

Fujita T (1989). Present status of paraneuron concept. *Arch Histol Cytol* 52:1-8.

Fujita T, Yoshie S (2000). Merkel cell as a paraneuron. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 51-59.

Fukuda J, Masaki Y, Ishimine H (2003). Staining of living Merkel cells with FM dyes. In: *The Merkel Cell: structure, development, function, cancerogenesis*, eds. Baumann KI, Halata Z, Moll I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 13-18.

**G**allego R, García Caballero T, Fraga M, Beiras A, Forteza J (1995). Neural cell adhesion molecule immunoreactivity in Merkel cells and Merkel cell tumors. *Virchows Arch* 426:317-321.

García-Caballero A, Gallego R, García-Caballero T, Fraga M, Blanco M, Fernández-Redondo V, Beiras A (1997). Cellular y subcellular distribution of 7B2 in porcine Merkel cells. *Anat Rec* 248:159-163.

García-Caballero T, Gallego R, Basanta D, Beiras A (1988). Ultrastructural evidences for a paracrine function of the human neuroendocrine Merkel cells. *Histología Médica*, 4:153-160.

García-Caballero T, Gallego R, Rosón E, Fragas M, Beiras A (1989a). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the neuroendocrine Merkel cells and nerve fibers of pig and human skin. *Histochemistry* 92:127-132.

García-Caballero T, Cuevas J, Gallego R, Rosón E, Forteza J, Beiras A (1989b). Synaptophysin-like immunoreactivity in the Merkel cells of pig-snout skin. *Ultrastruct Pathol*, 13:55-61.

García-Caballero T, Gallego R, Rosón E, Basanta D, Morel G, Beiras A (1989c). Localization of serotonin-like immunoreactivity in the Merkel cells of pig scout skin. *Anat Rec* 225:267-271.

García-Caballero, Pintos E, Gallego R, Parrado C, Blanco M, Bjornhagen V, Forteza J, Beiras A (2003a). MOC-31/Ep-CAM immunoreactivity in Merkel cells and Merkel cell carcinomas. *Histopathology* 43:480-484.

García-Caballero T, Pintos E, Gallego R, Parrado C, Blanco M, Falkmer UG, Falkmer S, Forteza J, Beiras A (2003b). MOC-31, cytokeratin 7 and S100 protein immunoreactivity in Merkel cell and Merkel cell carcinoma. In: *The Merkel Cell: structure, development, function, cancerogenesis*, eds. Baumann KI, Halata Z, Moll I. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 231-236.

Gauweiler B, Weihe E, Hartschuh W, Yanaihara N (1988). Presence and coexistence of chromogranin A and multiple neuropeptides in Merkel cells of mammalian oral mucosa. *Neurosci Lett* 89:121-126.

Gil da Costa RM, Rema A, Pires MA, Gärtner F (2010). Two canine Merkel cell tumours: immunoexpression of c-KIT, E-cadherin, beta-catenin and S100 protein. *Vet Dermatol* 21:198-201.

Ginn PE, Mansell JE, Rakich PM (2007). Skin and appendages. In: *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. ed. Maxie MG, Saunders Elsevier, London, UK. pp.553-781.

Glick AD, Holscher MA, Crenshaw JD (1983). Neuroendocrine carcinoma of the skin in a dog. *Vet Pathol* 20:761-763.

Gottschaldt KM, Vahle-Hinz C (1981). Merkel cell receptors: structure and transducer function. *Science* 214:183-186.

Gottschaldt KM, Vahle-Hinz C (1982). Evidence against transmitter function of met-enkephalin and chemosynaptic impulse generation in "Merkel cell" mechanoreceptors. *Exp Brain Res* 45:459-463.

Gould VE, Lee I, Wiedenmann B, Moll R, Chefjec G, Franke WW (1986). Synaptophysin: a novel marker for neurons, certain neuroendocrine cells, and their neoplasm. *Hum Pathol* 17:979-983.

Gould VE, Moll R, Moll I, Lee I, Franke WW (1985). Neuroendocrine (Merkel) cells of the skin: hyperplasias, dysplasias and neoplasms. *Lab Invest* 52:334-353.

Grim M, Halata Z (2000a). Developmental origin of avian Merkel cells. *Anat Embryol* 202:401-410.

Grimelius L (1968). A silver nitrate stain for  $\alpha_2$  cells in human pancreatic islets. *Acta Soc Med Upsal* 73:243-270.

Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK (2005). Neural y perineural tumors. En: *Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis*, 2<sup>nd</sup> ed., Blackwell Science.

Gu J, Polack JM, Tapia FJ, Marangos PJ, Pearse AGE (1981). Neuron-specific enolase in the Merkel cells of mammalian skin: the use of specific antibody as a simple and reliable histologic marker. *Am J Pathol* 104:63-68.

**H**alata Z (1975). The mechanoreceptors of the mammalian skin. Ultrastructural and morphological classification. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 50:1-123.

Halata Z, Baumann KI (1999). Sensory nerve endings in the hard palate and papilla incisive of the rhesus monkey. *Anat Embryol (Berl)* 199:427-437.

Halata Z, Baumann KI (2000). Topography of nerve terminals in Merkel nerve endings in mammals. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 33-42.

Halata Z, Cooper BY, Baumann KI, Schwegmann C, Friedman RM (1999). Sensory nerve endings in the hard palate and papilla incisiva of the goat. *Exp Brain Res* 129:218-228.

Halata Z, Grim M, Bauman KI (2003). Friedrich Sigmund Merkel and his “Merkel cell”, morphology, development, and physiology: Review and new results. *Anat Rec part A* 271:225-239.

Halata Z, Grim M, Baumann KI (2010) Current understanding of Merkel cells, touch reception and the skin. *Exp Rev Dermatol* 5:109-116.

Halata Z, Spaethe A (1997). Sensory innervation of the human penis. *Adv Exp Med Biol* 424:265-266.

Ham AW, Cormack DH (1985). Sistema Tegumentario (piel y faneras). En: *Tratado de Histología*, ed. Ham AW, Cormack DH, 8ª edición, Interamericana, Madrid, España, pp. 690-691.

Hamasaki K, Seta Y, Yamada K, Toyoshima K (1998). Possible role of serotonin in Merkel-like basal cells of the taste buds of the frog, *Rana nigromaculata*. *J Anat* 193:599-610.

Hanson SR, Hoffman BJ (2000). Transient expression of a fuctional serotonin transporter during late gestation and early postnatal rat development. *Exp Brain Res* 130:401-409.

Hargis AM, Ginn PE (2012). The Integument. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease. 5th. Ed., ed. Zachary JF, McGavin MD, Elsevier Mosby, St. Louis, USA. pp.972-1084.

Harmse JL, Carey FA, Baird AR, Craig SR, Christie KN, Hopwood D, Lucocq J (1999). Merkel cells in the human oesophagus. *J Pathol* 189:176-179.

Hartschuh W, Grube D (1979). The Merkel cell: a member of the APUD system?. Fluorescence and electron microscopic contribution to the neurotransmitter function of the Merkel cell granules. *Arch Dermatol Res* 265:115-122.

Hartschuh W, Reinecke M, Weihe E, Yanaihara N (1984). VIP-Immunoreactivity in the skin of various mammals: immunohistochemical, radioimmunological and experimental evidence for a dual localization in cutaneous nerves and Merkel cells. *Peptides* 5:239-245.

Hartschuh W, Shultz T (1995). Merkel cells are integral constituents of desmoplastic trichoepitelioma: an immunohistochemical and electron microscopic study. *J Cutan Pathol* 22:413-421.

Hartschuh W, Schulz T (1999). Immunohistochemical investigation of the different developmental stages of trichofolliculoma with special reference to the Merkel cell. *Am J Dermatopathol* 21:8-15.

Hartschuh W, Shultz T (1997). Merkel cell hyperplasia in chronic radiation-damaged skin: its possible relationship to fibroepithelioma of Pinkus. *J Cutan Pathol* 24:477-483.

Hartschuh W, Weihe E (1980). Fine structural analysis of the synaptic junction of Merkel cell-axon-complexes. *J Invest Dermatol* 75(2):159-65.

Hartschuh W, Weihe E (1988). Multiple messenger candidates and marker substances in the mammalian Merkel cell-axon complex: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Prog Brain Res* 74:181-187.

Hartschuh W, Weihe E (1989). Pancreastatin-like immunoreactivity in epidermal Merkel cells of pig and man. *Neurosci Lett* 98:258-263.

Hartschuh W, Weihe E, Büchler M, Helmstaedter V, Feurle GE, Forssmann WG (1979). Met-enkephalin-like immunoreactivity in Merkel cells. *Cell Tissue Res.* 201:343-348.

Hartschuh W, Weihe E, Egner U (1989a). Chromogranin A in the mammalian Merkel cell: cellular and subcellular distribution. *J. Invest Dermatol* 93:641-648.

Hartschuh W, Weihe E, Egner U (1990). Electron microscopic immunogold cytochemistry reveals chromogranin A confined to neurosecretory granules of porcine Merkel cells. *Neurosci Lett* 116:245-249.

Hartschuh W, Weihe E, Schulz T (2000). Merkel cell hyperplasia in human skin tumors – potential biological significance and clues to diagnosis in dermatopathology. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 123-134.

Hartschuh W, Weihe E, Yanaihara N (1989b). Immunohistochemical analysis of chromogranin A and multiple peptides in the mammalian Merkel cell: further evidence for its paraneuronal function? *Arch Histol Cytol* 52:423-431.

Hartschuh W, Weihe E, Yanaihara N, Reinecke M (1983). Immunohistochemical localization of Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the Merkel cell. *J Invest Dermatol* 81:361-364.

Hilliges M, Astback J, Wang L, Arvidson K, Johansson O (1996): Protein gene product 9.5-immunoreactive nerves and cells in human oral mucosa. *Anat Rec* 245:621-32.

Hilliges M, Falconer C, Ekman-Ordeberg G, Johansson O (1995). Innervation of the human vaginal mucosa as revealed by PGP9.5 immunohistochemistry. *Acta Anat* 153:119-126.

Hirata K, Nada O (1975). A monoamine in the gustatory cell of the frog's taste organ: a fluorescence histochemical and electron microscopic study. *Cell Tissue Res* 157:101-108.

Hitchcock IS, Genever PG, Cahusac (2004). Essential components for a glutamatergic synapse between Merkel cell and nerve terminal in rats. *Neurosci Lett* 362:196-199.

Horsch D, Weihe E, Muller S, Hancke E (1992). Distribution and coexistence of chromogranin A-, serotonin- and pancreastatin-like immunoreactivity in endocrine-like cells of the human anal canal. *Cell Tissue Res* 268:109-116.

Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD (1993): Regulation of Langerhans cells function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 363:159-163.

**I**gggo A, Muir AR (1969). The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. *J Physiol (Lond)* 200:763.

Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK, Gross TL (2005). En: *Skin Diseases of the Dog and Cat*, 2nd Edition, Wiley-Blackwell publishing.

**J**ohansson L, Tennvall J, Åkerman M (1990). Immunohistochemical examination of 25 cases of Merkel cell carcinoma: a comparison with small cell carcinoma of the lung and oesophagus, and a review of the literature. *APMIS* 98:741-752.

Johnson KO (2001). The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Curr Opin Neurobiol* 11:455-461.

Johnson RD, Halata Z (1991) Topography and ultrastructure of sensory nerve endings in the glans penis of the rat. *J Comp Neurol* 312:299-310.

Joiner KS, Smith AN, Henderson RA, Brawner WR, Spangler EA, Sartin EA (2010). Multicentric cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma in a dog. *Vet Pathol* 47:1090-1094.

**K**im DK, Holbrook KA (1995). The appearance, density, and distribution of Merkel cells in human embryonic and fetal skin: Their relation to sweat gland and hair follicle development. *J Invest Dermatol* 104:411-416.

Kim DK, Holbrook KA (2001). The nerve-dependency of Merkel cell proliferation in cultured human fetal glabrous skin. *Yonsei Med J* 42:311-315.

Kingsmill VJ, Berkovitz BKB, Barret AW (2005). An immunohistochemical analysis of human Merkel cell density in gingival epithelium from dentate and edentulous subjects. *Arch Oral Biol* 50:883-887.

Kobayashi T, Iwasaki T, Amagai M, Ohyama M (2010). Canine follicle stem cell candidates reside in the bulge and share characteristic features with human bulge cells. *J Invest Dermatol* 130:1988-1995.

Konno A, Nagata M, Nanko H (1998). Immunohistochemical diagnosis of a Merkel cell tumor in a dog. *Vet Pathol* 35:538-540.

Kurosumi K, Kurosumi U, Inoue K (1979). Morphological and morphometric studies with electron microscope on the Merkel cells and associated nerve terminals of normal and denervated skin. *Arch Histol Jpn* 42:243-261.



Kurzen H, Kaul S, Egner U, Deichmann M, Hartschuh W (2003). Expression of MUC-1 and EpCAM in Merkel cell carcinomas: implications for immunotherapy. *Arch Dermatol Res* 295:146-154.

**L**acour JP, Dubois D, Pisani A, Ortonne JP (1991). Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis. *Br J Dermatol* 125:535-542.

Laga AC, Lai CY, Zhan Q, Huang SJ, Velazquez EF, Yang Q, Hsu MY, Murphy GF (2010). Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: relevance to melanocyte and merkel cell biology. *Am J Pathol* 176:903-913.

Lazarov N (1994). Primary trigeminal afferent neuron of the cat: II. Neuropeptide- and serotonin-like immunoreactivity. *J Hirnforsch* 35:373-389.

Leff EL, Brooks JSJ, Trojanowski JQ (1985). Expression of neurofilament and neuron-specific enolase in small cell tumors of skin using immunohistochemistry. *Cancer* 56:625-631.

Leonard JH, Cook AL, Van Gele M, Boyle GM, Inglis KJ, Speleman F, Sturm RA (2002). Proneural and proneuroendocrine transcription factor expression in cutaneous mechanoreceptor (Merkel) cells and Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* 101:103-110.

Leong ASY, Phillips GE, Pieterse AS, Milios J (1986). Criteria for the diagnosis of primary endocrine carcinoma of the skin (Merkel cell carcinoma). A histological, immunohistochemical and ultrastructural study of 13 cases. *Pathology* 18:393-399.

Lesko MH1, Driskell RR, Kretzschmar K, Goldie SJ, Watt FM (2013). Sox2 modulates the function of two distinct cell lineages in mouse skin. *Dev Biol* 382:15-26.

Leung MS, Wong CC (2000). Expressions of putative neurotransmitters and neuronal growth related genes in Merkel cell-neurite complexes of the rats. *Life Sci* 66:1481-1490.

Lucarz A, Brand G (2007). Current consideration about Merkel cells. *Eur J Cell Biol* 86:243-251.

Lundberg JM, Hokfelt T (1983). Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends Neurosci* 6:325-333.

Lundquist K, Kohler S, Rouse RV (1999). Intraepidermal cytokeratin 7 expression is not restricted to Paget cells but is also seen in Toker cells and Merkel cells. *Am J Surg Pathol* 23:212-219.

Lyne AG, Hollis DE (1971). Merkel cells in sheep epidermis during fetal development. *J Ultrastruct Res* 34:464-472.

**M**aksimovic S, Baba Y, Lumpkin EA (2013). Neurotransmitters and synaptic components in the Merkel cell-neurite complex, a gentle-touch receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1279:13-21.

Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, Nelson AM, Marshall KL, Wellnitz SA, Firozi P, Woo SH, Ranade S, Patapoutian A, Lumpkin EA (2014). Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* 509:617-621.

Maricich SM, Morrison KM, Mathes EL, Brewer BM (2012). Rodents rely on Merkel cells for texture discrimination tasks. *J Neurosci* 32:3296-3300.

Maricich SM, Wellnitz SA, Nelson AM, Lesniak DR, Gerling GJ, Lumpkin EA, Zoghbi HY (2009). Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science* 324:1580-1582.

Masuda T, Ikeda S, Tajima K, Kawamura T (1986). Neuron-specific enolase (NSE): a specific marker for Merkel cells in human epidermis. *J Dermatol* 13:67-69.

Merkel F (1875). Tastzellen und Taskörperchen bei den Hausthieren und beim Menschen. Arch Mikr Anat 11:636-652.

Merot Y, Mooy A (1989). Merkel cell hyperplasia in hypertrophic varieties of actinic keratoses. Dermatologica 178:189-193.

Miettinen M (1987). Synaptophysin and neurofilament proteins as markers for neuroendocrine tumors. Arch Pathol Lab Med 111:813-818.

Miettinen M, Lehto VP, Asko-Seljavaara S, Pitkänen J, Dahl D, Virtanen I (1983). Neuroendocrine carcinoma of the skin (Merkel cell carcinoma): Ultrastructural and immunohistochemical demonstration of neurofilaments. Ultrastr Pathol 4:219-225.

Mihara M, Hashimoto K, Ueda K, Kumakiri M (1979). The specialized junctions between Merkel cell and neurite: an electron microscopic study. J Invest Dermatol 73:325-34.

Miller MR, Ralston HJ III, Kasahara M (1958). The pattern of cutaneous innervation of the human hand. Am J Anat 102:183.

Miller WH Jr, Griffin CE, Campbell KL (2014). En: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 7th Edition, Elsevier-Mosby.

Mills LR, Diamond J (1995). Merkel cells are not the mechanosensory transducer in the touch dome of the rat. J Neurocytol 24:117-134.

Moll I (1993). Merkel cell distribution in fetal and adult human hair follicles of the scalp. Cell Tiss Res 277:131-138.

Moll I (1994). Merkel cell distribution in human hair follicles of the fetal and adult scalp. Cell Tissue Res 277:131-138.

Moll I, Bohnert E, Herbst C, Förster W, Moll R, Franke WW (1994). Establishment and characterization of two Merkel cell tumor cultures. *J Invest Dermatol* 102:346-353.

Moll I, Kuhn C, Moll R (1995). Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cell while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol* 104:910-915.

Moll I, Lane AT, Franke WW, Moll R (1990a). Intraepidermal formation of Merkel cells in xenografts of human fetal skin. *J Invest Dermatol* 94:359-364.

Moll I, Bladt U, Jung EG (1990b). Presence of Merkel cells in sun-exposed and not sun-exposed skin: a quantitative study. *Arch Dermatol* 282:213-216.

Moll I, Moll R (1992). Early development of human Merkel cells. *Exp Dermatol* 1:180-184.

Moll I, Moll R (1993). Merkel cells in ontogenesis of human nails. *Arch Dermatol Res* 285:36-371.

Moll I, Moll R (2003). Merkel cell carcinoma – a short review. En: *The Merkel Cell: structure, development, function, cancerogenesis*, eds. Baumann KI, Halata Z, Moll I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 179-185.

Moll I, Moll R, Franke WW (1986). Formation of epidermal and dermal Merkel cells during human fetal skin development. *J Invest Dermatol* 87:779-787.

Moll I, Zieger W, Schmelz M (1996a). Proliferative Merkel cells were not detected in human skin. *Arch Dermatol Res* 288:184-187.

Moll I, Paus R, Moll R (1996b). Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density. *J Invest Dermatol* 106:281-286.

Moll I, Gillardon F, Waltering S, Schmelz M, Moll R (1996c). Differences of bcl-2 protein expression between Merkel cells and Merkel cell carcinomas. *J Cutan Pathol* 23:109-117.

Moll I, Roessler M, Brandner JM, Eispert AC, Houdek P, Moll R (2005). Human Merkel cells: aspects of cell biology, distribution and functions. *Eur J Cell Biol* 84:259-271.

Moll I, Troyanovsky SM, Moll R (1993). Special program of differentiation expressed in keratinocytes of human haarscheiben: An analysis of individual cytokeratin polypeptides. *J Invest Dermatol* 100:69-71.

Moll R (1991). Molecular diversity of cytokeratins: significance for cell and tumor differentiation. *Acta Histochem Suppl* 41:117-127.

Moll R, Franke WW, Schiller DL (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24.

Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW (1992). Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 140:427-447.

Moll R, Moll I, Franke WW (1984). Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies: changes of cell density and distribution in fetal and adult plantar epidermis. *Differentiation* 28:136-154.

Moll R, Osborn M, Hartschuh W, Moll I, Mahrle G, Weber K (1986). Variability of expression and arrangement of cytokeratin and neurofilaments in cutaneous neuroendocrine carcinomas (Merkel cell tumors): immunohistochemical and biochemical analysis of twelve cases. *Ultrastruct Pathol* 10:473-495.

Moll R, Schiller DL, Franke WW (1990). Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol* 111:567-580.

Monteiro-Riviere NA (1998): Integument. En: *Textbook of Veterinary Histology*, eds. Dellmann HD, Eurell JA, 5th edition, Williams and Wilkins, Pennsylvania, US, pp. 303-313.

Morrison KM, Miesegaes GR, Lumpkin EA, Maricich SM (2009). Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Dev Biol* 336:76-83.

Munger BL (1965). The intraepidermal innervation of the snout skin of the opossum. A light and electron microscope study with observation of the nature of Merkel Tastzelle. *J Cell Biol* 26:79-97.

**N**afstad PHJ (1984). Evidence of turnover of mammalian Merkel cells. *J Anat* 151:57-64.

Nakafusa J, Narisawa Y, Shinogi T, Taira K, Tanaka T, Inoue T, Misago N (2006). Changes in the number of Merkel cells with the hair cycle in hair discs on rat back skin. *Br J Dermatol* 155:883-889.

Narisawa Y, Hashimoto K (1991). Immunohistochemical demonstration of nerve-Merkel cell complex in fetal human skin. *J Dermatol Sci* 2:361-370.

Narisawa Y, Hashimoto K, Bayless T, Nihei Y, Ishihara M, Lawrence D, Eto H, Hori K (1992a) Cytokeratin polypeptide profile of Merkel cells in human fetal and adult skin: difference of expression of cytokeratins in epidermal and dermal Merkel cells. *J Invest Dermatol* 98:171-180.

Narisawa Y, Hashimoto K, Kohda H (1993a). Merkel cells in human fetal eccrine glands. *Brit J Dermatol* 129:541-546.

Narisawa Y, Hashimoto K, Kohda H (1994a). Merkel cells of the terminal hair follicle of the adult human scalp. *J Invest Dermatol* 102:506-510.

Narisawa Y, Hashimoto K, Kohda H (1994b). Immunohistochemical demonstration of cytokeratin 19 expression in isolated human hair follicles. *J Invest Dermatol* 103:191-195.

Narisawa Y, Hashimoto K, Kohda H (1994c). Immunohistochemical demonstration of the expression of neurofilament proteins in Merkel cells. *Acta Dermatol Venereol (Stockh.)* 74:441-443.

Narisawa Y, Hashimoto K, Kohda H (1996). Merkel cells participate in the induction and alignment of epidermal ends of arrector pili muscles of human fetal skin. *Br J Dermatol* 134:494-498.

Narisawa Y, Hashimoto K, Nakamura Y, Kohda H (1993b). A high concentration of Merkel cells in the bulge prior to the attachment of the arrector pili muscle and the formation of the perifollicular nerve plexus in human fetal skin. *Arch Dermatol Res* 285:261-268.

Narisawa Y, Hashimoto K, Nihei Y, Pietruk T (1992b). Biological significance of dermal Merkel cells in development of cutaneous nerves in human fetal skin. *J Histochem Cytochem* 40:65-71.

Narisawa Y, Kohda H (1995). Merkel cells do not require trophic maintenance from the nerves in adult human skin. *Br J Dermatol* 133:553-556.

Narisawa Y, Tanaka T, Taira K, Misago N (2000). Follicular Merkel cells in different body sites of mice, guinea pigs and rats. En: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 105-113.

Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P. (1986). Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *Cell Biol* 103:2511-2517.

Nickoloff BJ, Hill J, Weiss LM (1985). Canine neuroendocrine carcinoma. A tumor resembling histiocytoma. *Am J Dermatopathol* 7:579-586.

Ninid M, Nakagawa H, Ishibashi Y (1990). The origin and fate of Merkel cell granules – an ultrastructural study. *J Dermatol* 17:218-225.

Ninld M, Nakagawa H, Ishibashi Y (1991). Keratin expression in Merkel cells of fetal rat skin. *J Dermatol* 18:720-724.

Nunzi MG, Pisarek A, Mugnaini E (2004). Merkel cells, corpuscular nerve endings and free nerve endings in the mouse palatine mucosa express three subtypes of vesicular glutamate transporters. *J Neurocytol* 33:359-376.

Nurse CA, Mearow KM, Holmes M, Visheau B, Diamond J (1983). Merkel cell distribution in the epidermis as determined by quinacrine fluorescence. *Cell Tiss Res* 228:511-524.

Ochiai T, Suzuki H (1981). Fine structural and morphometric studies of the Merkel cell during fetal and postnatal development. *J Invest Dermatol* 77:437-443.

Ogawa H (1996). The Merkel cell as a possible mechanoreceptor cell. *Prog Neurobiol* 49:317-334.

Ogawa H (2000). Merkel cells: possible mechanoreceptors. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 83-87.

Ortonne JP, Darmon M (1985). Merkel cells express desmosomal proteins and cytokeratins. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 65:161-164.

Ortonne JP, Petchot-Bacque JP, Verrando P, Pisani A, Pautrat P, Bernerd F (1988). Normal Merkel cells express a synaptophysin-like immunoreactivity. *Dermatologica* 177:1-10.

Ozaki K, Narama I (2009). Merkel cell carcinoma in a cat. *J Vet Med Sci* 71:1093-1096.



**P**arrado C, Björnhagen V, Eusebi V, Falkmer UG, Höög A, García-Caballero T, Pérez de

Vargas I, Falkmer S (1998). Prognosticating tools in primary neuroendocrine (Merkel-cell) carcinomas of the skin: histopathological subdivision, DNA cytometry, cell proliferation analysis (ki-67-immunoreactivity) and NCAM immunohistochemistry. A clinicopathological study in 25 patients. *Pathol Res Pract* 194:11-23.

Pasche F, Merot Y, Carraux P, Saurat JH (1990). Relationship between Merkel cells and nerve endings during embryogenesis in the mouse epidermis. *J Invest Dermatol* 95:247-251.

Pascucci L, Mercati F, Gargiulo AM, Pedini V, Sorbolini S, Ceccarelli P (2006). CD34 glycoprotein identifies putative stem cells located in the isthmus region of canine hair follicles. *Vet Dermatol* 17:244-251.

Patnaik AK, Post GS, Erlandson RA (2001). Clinicopathologic and electron microscopic study of cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma in a cat with comparisons to human and canine tumors. *Vet Pathol* 38:553-556.

Pearse AGE (1980). The neuroendocrine (APUD) cells of the skin. *Am J Dermatol* 2:121-123.

Pinkus F (1902). Ueber einen bisher unbekanntem Nebenapparat am Harsystem des Menschen: Haarscheiben. *Dermatol Z* 9:465.

**R**amieri G, Panzica GC, Viglietti-Panzia C, Mosica R, Springal DR, Polak JM (1992). Non-

innervated Merkel cells and Merkel-neurites complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. *Arch Oral Biol* 37:326-329.

Ramírez GA, Rodríguez F, Herráez P, Castro-Alonso A, Andrada M, Espinosa-de-Los-Monteros A (2015). Ultrastructural characterization of normal Merkel cells in the dog. *Vet Dermatol* 26:328-e69.

Ramírez GA, Rodríguez F, Herráez P, Suárez-Bonnet A, Andrada M, Espinosa-de-Los-Monteros A (2014). Morphologic and immunohistochemical features of Merkel cells in the dog. *Res Vet Sci* 97:475-480.

Ranvier L (1877). De la terminaison des nerfs dans les corpuscles du tact. *C R Acad Sci (Paris)* 85:1020.

Rettig T, Halata Z (1990). Structure of the sensory innervation of the anal canal in the pig. A light- and electron-microscopical study. *Acta Anat (Basel)* 137:189-201.

Retzius G (1894). Einige beiträge zur kenntniss der intraepithelialen endigungsweise der nervenfasern. *Biol Untersuch* 6:62.

Ribeiro-da-Silva A, Kenigsberg RL, Cuello AC (1991). Light and electron microscopic distribution of nerve growth factor receptor-like in the skin of the rat lower lip. *Neuroscience* 43: 631-646.

Rice FL, Kinnman E, Aldskogius H, Johansson O, Arvidsson J (1993). The innervation of the mystacial pad of the rat as revealed by PGP9.5 immunofluorescence. *J Comp Neurol* 337:366-385.

Richards JE, Da Prada M (1977). Uranaffin reaction: a new cytochemical technique for the localization of adenine nucleotides in organelles storing biogenic amines. *J Histochem Cytochem* 25:1322-1336.

Rickelt S, Moll I, Franke WW (2011). Intercellular adhering junctions with an asymmetric molecular composition: desmosomes connecting Merkel cells and keratinocytes. *Cell Tissue Res* 346:65-77.

Righi A, Betts CM, Marchetti C, Marucci G, Montebugnoli L, Prati C, Eusebi LHU, Muzzi L, Ragazzini T, Foschini MP (2006). Merkel cells in the oral mucosa. *Int J Surg Pathol* 14:206-211.

Rindi G, Buffa R, Sessa F, Tortora O, Solcia E (1986). Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. *Histochemistry* 85:19-28.

Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI (1995). Integumentary System. En: *Histology: a Text and Atlas*, ed. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI, 3<sup>rd</sup> edition. Williams & Wilkins, Maryland, USA, pp. 370-373.

**S**alomon D, Carraux P, Mérot Y, Saurat JH (1987). Pathway of granule formation in Merkel cells: an ultrastructural study. *J Invest Dermatol* 89:362-365.

Saurat JH, Didierjean L, Skalli O, Siegenthaler G, Gabbiani G (1984b). The intermediate filament proteins of rabbit normal epidermal Merkel cells are cytokeratins. *J Invest Dermatol*, 83:431-435.

Saurat JH, Merot Y, Didierjean L, Dahl D (1984a). Normal rabbit Merkel cells do not express neurofilament proteins. *J Invest Dermatol*, 82:641-642.

Schlaepfer WW (1987). Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46:117-129.

Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M (1978). Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276:834-836.

Schulz T, Michou E, Hartschuh W, Wuensch PH (2003). Merkel cells in the human fetal and adult esophagus. In: *The Merkel Cell: structure, development, function, cancerogenesis*, eds. Baumann KI, Halata Z, Moll I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 57-64.

Scott MP, Helm KF (1999). Cytokeratin 20: a marker for diagnosing Merkel cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 21:16-20.

Scott SA, Cooper E, Diamond J (1981). Merkel cells as target of the mechanosensory nerves in salamander skin. *Proc R Soc Lond (Biol)* 211:455.

Shimohira-Yamasaki M, Toda S, Narisawa Y, Sugihara H (2006). Merkel cell-nerve cell interaction undergoes formation of a synapse-like structure in a primary culture. *Cell Struct Funct* 31:39-45.

Shultz T, Hartschuh W (1995). Merkel cells in nevus sebaceous. *Am J Dermatol* 17:570-579.

Shultz T, Hartschuh W (1997). Merkel cells are absent in basal cell carcinomas but frequently found in trichoblastomas. An immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 24, 14-24.

Sibley RK, Dahl D (1985). Primary neuroendocrine (Merkel cell?) carcinoma of the skin: an immunohistochemical study of 21 cases. *Am J Surg Pathol* 9:109-116.

Sieber-Blum M, Grim M (2004). The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells. *Birth Defects Research (Part C)* 72:162-172.

Sieber-Blum M, Szeder V, Grim M (2004). The role of NT-3 signaling in Merkel cell development. *Prog Brain Res* 146:63-72.

Sieber-Blum M, Szeder V, Grim M, Halata Z (2003). Mammalian Merkel cells are neural crest derivatives. In: *The Merkel Cell: structure, development, function, cancerogenesis*, eds. Baumann KI, Halata Z, Moll I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 89-96.

Smith KR (1970). The ultrastructure of the human Haarscheibe and Merkel cell. *J Invest Dermatol* 54:150-159.

Smith KR (1977). The haarscheibe. *J Invest Dermatol* 69:68-74.

Straile WE, Tipnis UR, Mann SJ, Clark WH Jr (1975). Lattice and rodlet nuclear inclusions in Merkel cells in rabbit epidermis. *J Invest Dermatol* 64:178-183.

Suzuki H, Baba S, Kamata H, Takahashi F, Hayakawa M, Ishida Y, Tokuhashi K, Murase M (2000). Postnatal morphogenesis and proliferative activity of epidermis in hair discs. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 97-103.

Szeder V, Grim M, Halata Z (2003a). Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Dev Biol* 253:258-263.

Szeder V, Grim M, Kucera J, Sieber-Blum M (2003b). Neurotrophin-3 signaling in mammalian Merkel cell development. *Dev Dyn* 228:623-629.

**T**achibana T (1995). The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* 58:379-396.

Tachibana T, Endoh M, Fujiwara N, Nawa T (2005). Receptors and transporters for serotonin in Merkel cell-nerve endings in the rat sinus hair follicle. An immunohistochemical study. *Arch Histol Cytol* 68:19-28.

Tachibana T, Endoh M, Kumakami R, Nawa T (2003). Immunohistochemical expressions of mGluR5, P2Y2 receptor, PLC-beta1, and IP3R-I and -II in Merkel cells in rat sinus hair follicles. *Histochem Cell Biol* 120:13-21.

Tachibana T, Endoh M, Nawa T (2001). Immunohistochemical expression of G protein  $\alpha$ -subunit isoforms in rat and monkey. Merkel cell-neurite complexes. *Histochem Cell Biol* 116:205-213.

Tachibana T, Fujiwara N, Nawa T (2000). Postnatal differentiation of Merkel cells in the rat palatine mucosa, with special reference to the timing of peripheral nerve development and the potency of cell mitosis. *Anat Embryol* 202:359-367.

Tachibana T, Ishizeki K (1981). Merkel cell development in the wound healing in the labial mucosa of adult rabbits. *Arch Histol Jap* 44:151-165.

Tachibana T, Ishizeki K, Sakakura Y, Nawa T (1984). Ultrastructural evidence for a possible secretory function of Merkel cells in the barbells of a teleost fish, *Cyprinus carpio*. *Cell Tissue Res*, 235:695-697.

Tachibana T, Ishizeki K, Sakakura Y, Nawa T (1989). Immunohistochemical and cytochemical evidence for a possible localization of leucine aminopeptidase in the Merkel cell granule. *Acta Histochem* 86:79-84.

Tachibana T, Nawa T (1980). Merkel cell differentiation in the labial mucous epithelium of the rabbit. *J Anat* 131:145-55.

Tachibana T, Nawa T (2000). Morphological y developmental characteristics of oral mucosal Merkel cells. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 11-21.

Tachibana T, Nawa T (2002). Recent progress in studies on Merkel cell biology. *Anat Sci Int* 77:26-33.

Tachibana T, Nawa T (2005). Immunohistochemical reactions of receptors to met-enkephalin, VIP, substance P, and CGRP located on Merkel cells in the rat sinus hair follicle. *Arch Histol Cytol* 68:383-391.

Tachibana T, Sakakura Y, Ishizeki K, Iida S, Nawa T (1983). An experimental study of the influence of sensory nerve fibers on Merkel cell differentiation in the labial mucosa of the rabbits. *Arch Histol Jpn* 46:469-477.

Tachibana T, Yamamoto H, Takahashi N, Kamegai T, Shibana S, Iseki H, Nawa T (1997). Polymorfism of Merkel cells in the rodent palatine mucosa: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Arch Histol Cytol* 60:379-389.

Tadokoro O, Maeda T, Heyeraas KJ, Vandevska-Radunovic V, Kozawa Y, Hals Kvinnsland I (2002). Merkel-like cells in Malassez epithelium in the periodontal ligament of cats: an immunohistochemical, confocal-laser scanning and immunoelectron-microscopic investigation. *J Periodontal Res* 37:456-63.

Taira K, Narisawa Y, Nakafusa J, Misago N, Tanaka T (2002). Spatial relationship between Merkel cells and Langerhans cells in human hair follicles. *J Dermatol Sci* 30:195-204.

Takahashi-Iwanaga H (2003). The three-dimensional microanatomy of Merkel cells. In: *The Merkel Cell: structure, development, function, cancerogenesis*, eds. Baumann KI, Halata Z, Moll I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 7-12.

Tanaka T, Narisawa Y (2000). Three-dimensional comparative study of Merkel cell distribution in various body sites of guinea pigs and rats. *Arch Dermatol Res* 292:173-179.

Tateishi R, Taniguchi H, Wada A, Horai T, Taniguchi K (1974). Argyrophil cells and melanocytes in esophageal mucosa. *Arch Pathol* 98:87-89.

Tazaki M, Tazaki Y, Inoue T, Shimono M (2000a). Calcium inflow of single Merkel cell in response to direct mechanical stimulation. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands. pp. 63-71.

Tazaki M, Tazaki Y, Inoue T, Shimono M (2000b). Polymorphism of Merkel cells from slowly adapting type I mechanoreceptor in the buccal pouch of the golden hamster. *Biomed Res* 21:45-48.

Thingnes J, Lavelle TJ, Hovig E, et al. (2012) Understanding the melanocyte distribution in human epidermis: an agent-based computational model approach. *PLoS One* 7, e40377.

Tilling T, Wladykowski E, Failla AV, Houdek P, Brandner JM, Moll I (2014). Immunohistochemical analyses point to epidermal origin of human Merkel cells. *Histochem Cell Biol* 41:407-421.

Toker C (1972). Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 105:107-110.

Toyoshima K, Nada O, Shimamura A (1984). Fine structure of monoamine-containing basal cells in the barbels of three species of teleost. *Cell Tiss Res* 235:497-484.

Toyoshima K, Seta Y, Harada H, Toyono T (2000). Morphology and distribution of Merkel cells in some vertebrates. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 3-10.

Toyoshima K, Seta Y, Takeda S, Harada H (1998). Identification of Merkel cells by an antibody to villin. *J Histochem Cytochem* 46:1329-1334.

Toyoshima K, Shimamura A (1988). An immunohistochemical demonstration of neuron-specific enolase in the Merkel cells of the frog taste organ. *Arch Histol Cytol* 51:295-297.

Toyoshima K, Shimamura A (1991). Uranaffin reaction of Merkel corpuscles in the lingual mucosa of the finch, *Lonchula striata* var. *domestica*. *J Anat* 179:197-201.

Turner DF (1983). The morphology and distribution of Merkel cells in primate gingival mucosa. *Anat Rec* 205:197-205.



Tweedle CD (1978). Ultrastructure of Merkel cell development in aneurogenic and control amphibian larvae (*Amblyostoma*). *Neuroscience* 3:481-486.

**U**chigasaki S, Suzuki H, Takano K, Inoue K (2000). Characteristics of Merkel cells in hair follicles in the facial skin. In: *Merkel cells, Merkel cell carcinoma and neurobiology of the skin*, ed. Suzuki H, Ono T, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 3-10.

**V**aigot P, Pisani A, Darmon YM, Ortonne JP (1987). The majority of epidermal Merkel cells are non-proliferative: a quantitative immunofluorescence analysis. *Acta derm Venereol* 67:517-520.

Van Keymeulen A, Mascré G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, De Geest N, Szpalski C, Achouri Y, Bloch W, Hassan BA, Blanpain C (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol* 187:91-100.

Vega JA, Hernández LC, Del Valle ME, Dubovy P, Bengoechea M, Perez-Casas A (1990). Localization of met-enkephalin-like immunoreactivity in the glabrous skin of the cat rhinarium. *Eur J Morphol* 28:69-78.

Verzé L, Viglietti-Panzica C, Stella M, Sica M, Panzica GC (2003). Distribution of GAP-43 nerve fibers in the skin of the adult human hand. *Anat Rec part A* 272:467-473.

Vinores SA, Herman MM, Rubinstein LJ, Marangos PJ (1984). Electron microscopic localization of neuron-specific enolase in rat and mouse brain. *J Histochem Cytochem* 32:1295-1302.

Vos P, Stark F, Pittman RN (1991). Merkel cells in vitro: production of nerve growth factor and selective interactions with sensory neurons. *Dev Biol* 144:281-300.

**W**alsh NMG (2001). Primary neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin: morphologic diversity and implications thereof. *Hum Pathol* 32:680-689.

Walter JH (2001). Cytokeratins in the canine epidermis. *Vet Dermatol* 12:81-87.

Wang TS, Byrne PJ, Jacobs LK, Taube JM. (2001). Merkel cell carcinoma: update and review. *Semin Cutan Med Surg* 30:48-56.

Warner TF, Uno H, Hafez GR, Burgess J, Bolles C, Lloyd RV, Oka M (1983). Merkel cells and Merkel cell tumors. Ultrastructure, immunocytochemistry and review of the literature. *Cancer* 52:238-245.

Weber U, Hartschuh W, Feurle GE, Weihe E (1980). Met-enkephalin-like immuno- and bioreactivity in extract from skin containing Merkel cells. *Neuroscience Letters*, 20:201-204.

Weihe E, Hartschuh W, Nohr D (1991a). Light microscopic immunoenzyme and electron microscopic immunogold cytochemistry reveal tachykinin immunoreactivity in Merkel cells of pig. *Neurosci Lett* 124:260-263.

Weihe E, Hartschuh W, Schäfer MK-H, Romeo H, Eiden L (1998). Cutaneous Merkel cells of the rat contain both dynorphin A and vesicular monoamine transporter type 1 (VMAT1) immunoreactivity. *Can J Pharmacol* 76:334-339.

Weihe E, Horsch D, Eiden LE, Hartschuh W (1991b). Dual presence of chromogranin A-like immunoreactivity in a population of endocrine-like cells and in nerve fibers in the human anal canal. *Neurosci Lett* 130:190-194.

Weihe E, McKnight AT, Corbett AD, Hartschuh W, Reinecke M, Hosterlitz HW (1983). Characterization of opioid peptides in guinea-pig heart and skin. *Life Sci* 33:711-4.

White SD, Yager JA (1995). Resident Dendritic Cells in the Epidermis: Langerhans Cells, Merkel Cells and Melanocytes. *Vet Dermatol*, 6:1-8.

Whitewright M (1989). Merkel cells in lower vertebrates. *Arch Histol Cytol* 52(Suppl):415-422.

Whiteley LO, Leininger JR (1987). Neuroendocrine (Merkel) cell tumors of the canine oral cavity. *Vet Pathol* 24:570-572.

Wiedenmann B, Franke WW (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of  $M_r$  38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 45:1017-1028.

Wilson POG, Chalk BT (1996). The Neuroendocrine System. En: *Theory and Practice of Histological Techniques*, ed. Bancroft JD, Stevens A, 4ª edición, pp. 269-289.

Winkelmann RK (1960). *Nerve endings in Normal and Pathologic Skin: Contributions to the Anatomy of Sensation*. Springfield, III, Charles C Thomas.

Winkelmann RK (1977). The Merkel cell system and comparison between it and the neurosecretory or APUD cell system. *J Invest Dermatol* 69:41-46.

Winkelmann RK (1982). The histochemistry of the Merkel cell neuroepithelial endings in cat and rabbit skin and oral mucosa. *Acta Derm Venereol* 62:383-7.

Winkelmann RK, Breathnach AS (1973). The Merkel cell. *J Invest Dermatol*, 60:2-15.

Wollina U, Mahrle G (1992). Epidermal Merkel cells in psoriatic lesions: immunohistochemical investigations on neuroendocrine antigen expression. *J Dermatol Sci* 3:145-150.

Woo SH, Stumpfova M, Jensen UB, Lumpkin EA, Owens DM (2010). Identification of epidermal progenitors for the Merkel cell lineage. *Development* 137:3965-3971.

Wright MC, Reed-Geaghan EG, Bolock AM, Fujiyama T, Hoshino M, Maricich SM (2015). Unipotent, Atoh1+ progenitors maintain the Merkel cell population in embryonic and adult mice. *J Cell Biol* 208:367-379.

**Y**amashita Y, Toida K, Ogawa H (1993). Observation of Merkel cells with scanning electron microscopy. *Neurosci Lett* 159:155-158.

Yoshie S, Yokosuka H, Kanazawa H, Fukita T (1999). The existence of Merkel cells in the lingual connective tissue of the Surinam caiman, *Caiman crocodiles crocodiles* (order Crocodylia). *Arch Histol Cytol* 62:97-106.

**Z**accone G (1986). Neuron-specific enolase and serotonin in the Merkel cells of conger-eel (*Conger conger*) epidermis. *Histochemistry* 85:29-34.

Zaccone G, Ainis L, Fasulo S, Cascio PL, Mauceri A, Licata A (1989). Merkel cells detected by immunocytochemistry in the epidermis of the fresh-water catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloach.). *Zool Jahrb Anat* 119:129-134.

Zelená, J (1994). Merkel cell receptors. In: *Nerves and mechanoreceptors*, ed. Zelená J, Chapman & Hall, London, UK, pp. 186-217 y 243-260.







## TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS

1. CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL EN LA ESPECIE CANINA. Ramírez GA, Lorenzo H, Rodríguez F, Herráez P, Martín de las Mulas J, Espinosa de los Monteros A.  
*XIV Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria (SEAPV).*
2. IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CANINE NORMAL MERKEL CELLS IN DOGS. Ramírez GA, Herráez P, Andrada M, Fernández A, Castro P, Espinosa de los Monteros A.  
*4th International Merkel Cell Symposium.*
3. DISTRIBUTION OF MERKEL CELLS IN NORMAL SKIN AND MUCOSAE IN DOGS. Espinosa de los Monteros A, Rodríguez F, Martín de las Mulas J, Lara A, Ramírez GA.  
*4th International Merkel Cell Symposium.*
4. ESTUDIOS DE LA CÉLULA DE MERKEL CANINA FETAL Y POSTNATAL: APARIENCIA, DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN. Ramírez GA, Lorenzo H, Arbelo M, Castro A, Lara A, Espinosa de los Monteros A.  
*XVI Reunión de la SEAPV y XII Reunión de la Sociedad Portuguesa de Patología Animal (SPPA).*
5. CORRELACIÓN ENTRE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DE LA CÉLULA DE MERKEL CANINA. Ramírez GA, García-Caballero T, Rodríguez F, Jaber JR, Fernández A, Espinosa de los Monteros A.  
*XVI Reunión de la SEAPV y XII Reunión de la SPPA.*
6. CORRESPONDENCE BETWEEN IMMUNOHISTOCHEMICAL AND ELECTRON MICROSCOPICAL FEATURES OF MERKEL CELLS IN DOGS. Ramírez GA, Fernández A, Rodríguez F, García-Caballero T, Jaber JR, Espinosa de los Monteros A.  
*22nd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP) and 6th Meeting of the European Society of Veterinary Clinical Pathology (ESVCP).*
7. MARCADORES DE ORIGEN NERVIOSO, NEUROPEPTIDOS Y NEUROTRANSMISORES EN LAS CÉLULAS DE MERKEL CANINAS. Ramírez GA, Rodríguez F, Sierra E, Castro A, Espinosa de los Monteros A.  
*XVIII Reunión de la SEAPV.*







# CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MERKEL EN LA ESPECIE CANINA

G. A. Ramírez, H. Lorenzo, F. Rodríguez, P. Herráez, J. Martín de las Mulas\*, A. Espinosa de los Monteros

Departamento de Morfología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria  
\*Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

La célula de Merkel fue descrita por vez primera en 1875 por F. Merkel, quien las denominó como "Tastzellen" (células táctiles) <sup>1</sup>. Son células que se disponen en los estratos basales de la epidermis y del epitelio de las mucosas de mamíferos y aves, así como en folículos pilosos tilótricos y normales. Muchas funciones han sido propuestas para este tipo celular, tales como células mecanorreceptoras de tipo I (importantes para la respuesta adaptativa lenta para mantener el estímulo mecánico), células endocrinas, células precursoras de las células gustativas y células que inducen y participan en el crecimiento de fibras nerviosas y anejos cutáneos <sup>2</sup>.

**El propósito del presente estudio fue caracterizar inmunohistoquímicamente la célula de Merkel en la especie canina, y estudiar su localización y distribución dentro de la piel y las mucosas, observando su relación con otras estructuras.**

Organismo	Mucosa	Piel
Cobayo	Paladar duro	Labio inferior (labio)
	Paladar blando	Labio superior (labio)
	Encía	Labio inferior (mucosa)
	Lengua	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
Bovino	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
Equino	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
Estratificación	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)
	Labio inferior (mucosa)	Labio superior (mucosa)

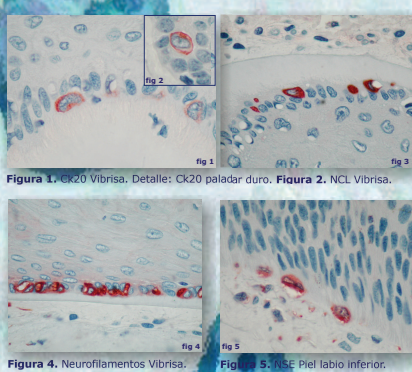
5 perros sexo diferente raza, edad Formol 10% Parafina Cortes seriados 3 I IHQ métodos ABC

Anticuerpo	Tipo	Especificidad	Desenmascaramiento empleado	Dilución	Intensidad de reacción	Patrón de inmunoreacción
Ki 20.8*	Mab	Citoqueratina 20*	Citrato pH 6 100°C	1:50	+++	Patrones homogéneo/granular (retorcimiento de membrana ocasional)
Keratin**	Pob	Citoqueratinas epidérmicas humanas	-	1:150	-	-
NCL S23**	Mab	Citoqueratinas 8 y 18*	Citrato pH 6 100°C	1:20	+++	Citoplásmico homogéneo
RCK 102**	Mab	Citoqueratinas 5 y 8*	Formosa	1:20	-	-
NSE*	Mab	neurofilos humana	Citrato pH 6 100°C	1:1000	+++	Citoplásmico granular
Cromogranin A*	Pob	Cromogranina A humana	Citrato pH 6 100°C	1:1000	+++	Citoplásmico granular (para células secretoras)
Synaptophysin**	Mab	Sinaptofisina humana	Citrato pH 6 100°C	1:25	+++	Citoplásmico granular (para células am. neuronas)
Neurofilament**	Mab	Neurofilamentos 70 y 200 kD	Citrato pH 6 100°C	1:20	++++	Citoplásmico homogéneo
GFAP**	Pob	Proteína glial fibrilar	-	1:150	-	-
Vimentin**	Pob	Vimentina 57kD	-	1:100	-	-
S-100*	Pob	Proteína S100 de vaca	-	1:500	-	-

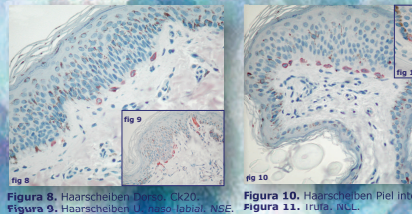
Tabla 1. Localizaciones.

Tabla 2. \*Ordo Lab.; \*\*Euro-Diagnostica; \*Catalogo Mab; Pob: policonal; Mab: monoclonal; -: negativo; +: débil; ++: moderada; +++: intensa.

Los diferentes patrones de inmunoreactividad y la intensidad de reacción observada se presentan en la tabla 2. La reacción siempre fue citoplasmática, si bien cada anticuerpo presentaba características propias.

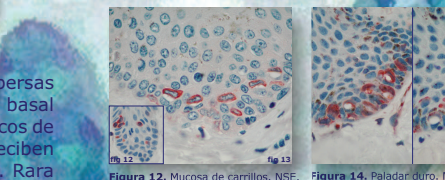


**Piel.** Las células de Merkel se encontraron dispersas por todo el animal, localizándose en el estrato basal de unos pequeños engrosamientos característicos de la epidermis irregularmente distribuidos que reciben el nombre de "Haarscheiben" o "hair discs" <sup>6</sup>. Rara vez se encontraron células aisladas. Las áreas con una alta densidad en células de Merkel fueron la piel de carrillos (sobre todo asociadas a la salida de las vibrisas), trufa y almohadillas (donde la disposición es similar a mucosas), plano nasal, , labios y bordes labiales y unión nasolabial.



De especial interés fueron los patrones de inmunorrección observados con los anticuerpos anti-cromogranina A y anti-sinaptofisina. Mientras que para el primero la reacción se localizó en el lado de la célula más próximo a su unión con la placa terminal axonal, con el segundo la reacción se limitó a la porción citoplasmática opuesta. Estas áreas coinciden con la distribución de los gránulos electrodensos y de las pequeñas vesículas de contenido claro, respectivamente, características de estas células y observadas en estudios de microscopía electrónica <sup>3,4</sup>.

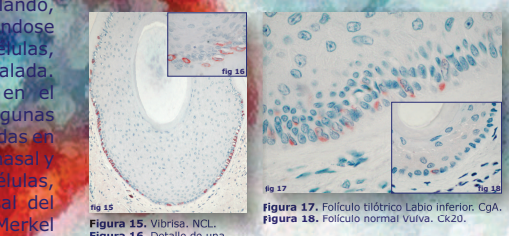
Las células de Merkel se encontraron distribuidas en proporciones diferentes en función del área corporal analizada, y con diferencias entre piel, mucosas y folículos pilosos.



**Mucosas.** En la mucosa oral fue donde se encontró un mayor número de células de Merkel, sobre todo en paladar duro y blando, mucosa de carrillos y encía, distribuyéndose de forma aislada o en grupos de 3-14 células, con una morfología de redondeada a ovalada. La mayoría de ellas se localizaron en el estrato basal del epitelio, si bien algunas células ocasionalmente fueron observadas en estratos más superficiales. En mucosa nasal y genital, se observaron muy pocas células, siempre aisladas y en el estrato basal del epitelio. No se observaron células de Merkel en otras localizaciones mucosas.

Estos resultados sugieren que las pequeñas vesículas claras y los gránulos electrodensos secretores podrían ser orgánulos implicados en dos diferentes caminos de secreción por parte de la célula de Merkel, hecho que ya ha sido demostrado para pequeñas vesículas sinápticas y grandes vesículas electrodensas en neuronas <sup>5</sup>.

**Folículos.** Las células de Merkel fueron encontradas tanto en folículos normales como en folículos tilótricos y vibrisas. En los folículos normales se distribuyeron de manera aislada y dispersas entre el resto de células epiteliales. En los tilótricos de dispusieron en un mayor número e igualmente dispersas, siendo más numerosas en piel del dorso y del rostro. En las vibrisas se encontraron en una alta proporción y casi exclusivamente concentradas en la porción dilatada de las mismas.



Los anticuerpos comerciales empleados en el presente trabajo han mostrado una alta especificidad para el inmunomarcaje de las células de Merkel en la especie canina, demostrándose así su utilidad para el estudio de la distribución de esta población celular.

Las células de Merkel de la especie canina presentan, en general, las mismas características morfológicas, inmunohistoquímicas y de localización que las de otros mamíferos, incluido el hombre, aunque existen diferencias en cuanto a la densidad y a ciertas localizaciones que son propias de esta especie.

- Merkel F. Tastzellen und Tastkörperchen bei den Haustieren und beim Menschen. Arch mikr Anat 1875;11: 636-652.
- Osawa H. Merkel cells: possible mechanoreceptors. In: H. Suzuki and T. Ono (eds) Merkel Cells, Merkel Cell Carcinoma and Neurobiology of the Skin. Elsevier Science 2000; 83-87.
- Hartschuh W, Wehse E, Egnier U. Chromogranin A in the mammalian Merkel cell. J Invest Dermatol 1989;93(3):641-646.
- García Caballero T, Cuevas J, Gallego R, Rosón E, Fortalez J, Beiras A. Synaptophysin-like immunoreactivity in the Merkel cells of pig-snout skin. Ultrastr Pathol 1989;13:55-61.
- Lundberg JM, Hökfelt T. Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. Trends Neurosci 1983; 6:325-333.
- Moll I. Human haarscheiben: development, distribution and keratinocyte differentiation. 3<sup>rd</sup> International Merkel Cell Symposium. November 1999, Japan.





# IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CANINE NORMAL MERKEL CELL

G. A. Ramírez, P. Herráez, M. Andrada, A. Fernández, P. Castro, A. Espinosa de los Monteros

Department of Comparative Pathology, Veterinary Faculty, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain

Merkel cells (MCs) were described in 1785 by F. Merkel in mammalian and avian skin using a staining method based in osmium tetroxide<sup>1</sup>. Nowadays, MCs have been demonstrated in many species by different procedures, mainly immunohistochemistry and electron microscopy methods. Different antibodies have been used for immunohistochemical staining of MCs. In dogs, they have been poorly studied and only few reports of their immunophenotype have been reported<sup>2,3,4,5</sup>.

The aim of this study was to determine the immunohistochemical profile of Merkel cells in the dog, using the most used commercial antibodies reported in the literature to characterize these cells.

Different patterns of immunoreactivity and reaction intensity observed are shown in table 2. The immunoreaction always was located in the cellular cytoplasm, although every antibody presented characteristic properties.

All follicular (figure 1), skin (figure 2) and mucosal MCs reacted with the anti-Ck20 monoclonal antibody. The immunoreaction was distributed homogeneously through the cell cytoplasm, although a granular positive reaction and membrane reinforcement (figure 1) were occasionally seen. Generally, intensity of the immunostaining was 3i. With anti-CKs 5 and 18 monoclonal antibody, the immunoreaction was positive for all MC types, homogeneous, and 3i (figure 3 and 4).

Skin	Mucosa
Nasolabiale elatum Nasal apex and platum nasale Cheeks (skin) Lower lip (skin) Upper lip (skin) Eyelids (skin) Pinna (external side) Pinna (internal side)	Hard palate Soft palate Cheeks (mucosa) Gums Tongue Lower lip (mucosa) Upper lip (mucosa)
Dorsal region Lumbar region Flanks Abdomen and inguinal region Axilla region and chest Nipples Escrotum Vulva (skin) Prepuce (skin) Anocutaneous junction (skin)	Clitoris Vulva (mucosa) Vagina Prepuce (mucosa) Glans penis Eyelid conjunctiva Ocular conjunctiva Third eyelid Anocutaneous junction (mucosa) Anal Nasal Nasal vestibule
Fore limb Hind limb Fore limb distal pads Hind limb distal pads Interdigital skin	Hair Follicles Tychtrichs Vibrissae Normal

5 dogs (2 males/ females)  
Different age and breed

10% buffered formalin (24 h.)

Paraffin

3 μm tissue sections

IHQ (ABC method)

The immunostainings were evaluated separately and results were based upon the consensus of at least two observers. The intensity of immunoreaction was evaluated on a 3-point scale (1i: weak, 2i: moderate, 3i: intense).

Antibodies	Type	Specificity	PROCEDURES			RESULTS	
			Epitope retrieval	Time (min.)	Dilution	Reaction intensity	Immunoreactive patterns
Ks 20.8*	Mab	Cytokeratin 20 <sup>1</sup>	Citrate pH 6 100°C	6	1:50	3i	Homogeneous/ramular and cytoplasmic (membrane reinforcement occasionally)
Keratin**	Pab	Human skin cells cytokeratins	-	-	1:150	-	-
NCL-SD3**	Mab	Cytokeratins 8 and 18 <sup>1</sup>	Citrate pH 6 100°C	6	1:20	3i	Homogeneous and cytoplasmic
RCK 102**	Mab	Cytokeratins 5 and 8 <sup>1</sup>	Protase	10	1:20	-	-
NSE**	Mab	Human v-v-tnolase	Citrate pH 6 100°C	5	1:1000	3i	Granular and cytoplasmic
Chromogranin A*	Pab	Human chromogranin A	Citrate pH 6 100°C	6	1:100	3i	Granular/homogeneous and cytoplasmic (neurite cellular side)
Synaptophysin*	Mab	Human synaptophysin	Citrate pH 6 100°C	6	1:25	2i	Granular and cytoplasmic (opposite to neurite cellular side)
Neurofilament**	Mab	70 and 200 kD neurofilaments protein	Citrate pH 6 100°C	6	1:20	1i/3i	Homogeneous and cytoplasmic
GFAP**	Pab	Glial fibrillary acid protein	-	-	1:150	-	-
Vimentin**	Pab	Vimentin	-	-	1:100	-	-
S-100*	Pab	Cow S100 protein	-	-	1:500	-	-

Table 2. \*DAKO Lab., \*\*EuroDiagnostica Lab.; Moll Catalogue. Mab: monoclonal antibody; Pab: Polyclonal antibody. 1i: weak, 2i: moderate, 3i: intense immunoreaction

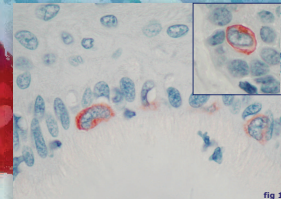


Figure 1. Ck20 Vibrissae. Inset: Ck20 hard palate.

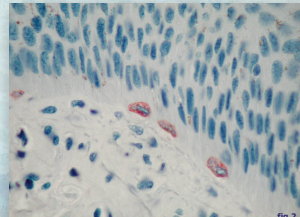


Figure 2. Cytokeratin 20 Lower lip skin.

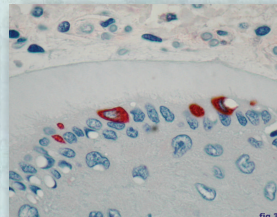


Figure 3. NCL-SD3 Vibrissae.

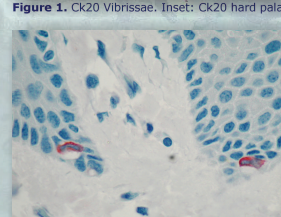


Figure 4. NCL-SD3 Soft palate.

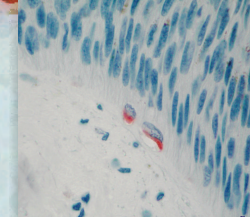


Figure 8. Chromogranin A Lower lip skin.

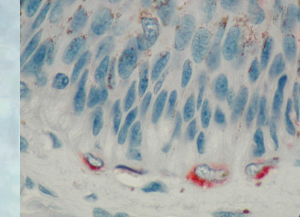


Figure 9. Chromogranin A Cheek skin.

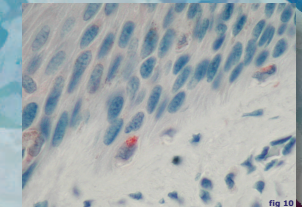


Figure 10. Synaptophysin Ck20 vibrissae (outlet portion of vibrissae)

These immunoreactions coincide with the areas shown by electron microscopy where the distribution of electron-dense granules and small clear-content vesicles respectively are in the highest proportion<sup>6,7</sup>. This fact suggests that secretory electron-dense core granules and small clear vesicles could be involved in two different secretory pathways of canine MCs, as it has been suggested in MCs of pig-snout skin<sup>7</sup> and it has been demonstrated in neurons<sup>8</sup>.

Anti-NSE monoclonal antibody showed an intense granular positive reaction (3i) in all MCs types, distributed in the whole cytoplasm (figure 5 and 6). For anti-NF monoclonal antibody, there was difference in intensity, whereas follicular MCs showed an intense homogeneous cytoplasmatic positive reaction (3i) (figure 7), skin and mucosal MCs appeared with a weak reaction (1i).

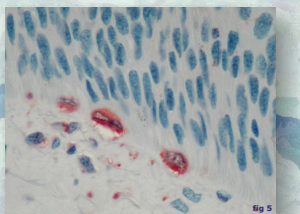


Figure 5. Neuron specific enolase Lower lip skin.

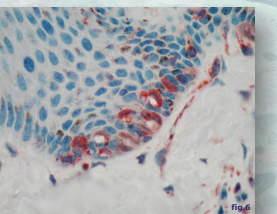


Figure 6. Neuron specific enolase Hard palate.

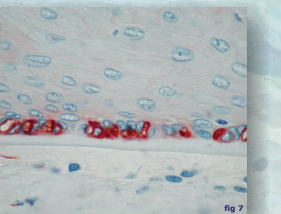


Figure 7. Neurofilaments Vibrissae.

These results demonstrate that commercial monoclonal and polyclonal antibodies can be used in the immunohistochemical characterization of Merkel cells in the dog and the reactions observed with these antibodies are similar to those previously described in other species.

## REFERENCES

- Merkel F. Arch mikr Anat 1875;11:636-52.
- Hartschuh W, Weihe E, Yanaihara N, Reinicke M. J Invest Dermatol 1983; 81:361-4.
- Hartschuh W, Reinicke M, Weihe E, Yanaihara N. Peptides 1984, vol.5:239-45.
- Cheng Chew SB, Leung PY. Neuroreport. 1993; 4(4):457-9.
- Cheng Chew SB, Leung PY. Cell Tissue Res. 1992; 269(2):347-51.
- Hartschuh W, Weihe E, Egner U. J Invest Dermatol 1989;93(5):641-8.
- García Caballero T, Cuevas J, Gallego R, Rosón E, Forteza J, Beiras A. Ultrastr Path 1989;13:55-61.
- Lundberg JM, Hokfelt T. Trends Neurosci 1983;6:325-333.





# DISTRIBUTION OF MERKEL CELLS IN NORMAL SKIN AND MUCOSA IN DOGS

A. Espinosa de los Monteros, F. Rodríguez, J. Martín de las Mulas, A. Lara, G. A. Ramírez

<sup>1</sup> Department of Comparative Pathology, Veterinary Faculty, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>2</sup> Department of Comparative Pathology, Veterinary Faculty, University of Córdoba, Spain

Merkel cells (MCs) were first described by F. Merkel in 1875, who called these cells "Tastzellen" (touch cells).<sup>1</sup> They are found in the basal layer of the epidermis and epithelium of mucosa in mammals, where they are in contact with epidermal cells, as well as in hair follicles. MCs have been related to mechanical perception as slowly adapting type I mechanoreceptors (particularly important for the slowly adapting response to maintained mechanical stimuli).<sup>2</sup> Also, other possible functions such as introduction of growing nerve fibres to their destinations, participation for the morphogenesis of skin appendages<sup>3</sup> and induction for the development of taste buds.<sup>3</sup>

In humans, MCs are located in the epidermis of hairy and glabrous skin, predominantly in sites of high tactile sensitivity such as the plantar and digital skin,<sup>4</sup> and in hair follicles.<sup>5</sup> Snouts, touch domes, sinus hair follicles, lips and hard palate are rich areas in MCs in other mammals,<sup>2</sup> including cats, pigs, guinea pigs, rats and monkeys.

**The purpose of the study was to determine the normal location of Merkel cells in the canine skin and mucosa and the areas in which this cell population reach the higher proportion.**

6 dogs (3 males/ 3 females)  
Different age and breed

10% buffered formalin (24 h.)

Paraffin

3 µm tissue sections

**IHQ (ABC method)**  
anti-Cytokeratin 8, 18 and 20  
anti-Neuron specific enolase  
anti-Neurofilaments  
anti-Chromogranin A  
anti-Synaptophysin

The immunostainings were evaluated separately and results were based upon the consensus of at least two observers. The amount of positive cells was evaluated on a 2-point scale on 3-5 cm tissue sections (+: 1-6 cells, ++: 7-12 cells, +++: > 12 cells).

Skin	MCs	Mucosa	MCs
Head	Nasolabiale planum +++	Hard palate +++	Soft palate ++
	Cheeks (skin) +++	Cheeks (mucosa) +++	Gums ++
	Lower lip (skin) +++	Oral Tongue ++	Upper lip (mucosa) +++
	Upper lip (skin) +++	Upper lip (mucosa) ++	Upper lip (mucosa) ++
	Eye lids (skin) +	Lower lip (mucosa) +++	Upper lip (mucosa) ++
	Pinna (external side) -	Upper lip (mucosa) ++	Upper lip (mucosa) ++
	Pinna (internal side) +	Oral Cillaris +	Vulva (mucosa) -
	Dorsal region +	Genital Vagina -	Vagina -
	Lumbar region +	Flanks -	Prepuce (mucosa) -
	Flanks -	Abdomen and inguinal region +	Glans penis +
Trunk	Axilla region and chest +	Axilla region and chest +	Prepuce (mucosa) -
	Nipples -	Ocular Eyelid conjunctiva -	Ocular conjunctiva -
	Vulva (skin) +	Ocular conjunctiva -	Third eyelid -
	Scrotum -	Nasal Anacutaneous junction (mucosa) -	Anacutaneous junction (mucosa) -
	Prepuce (skin) +	Nasal Nasal vestibule +	Nasal vestibule +
	Anocutaneous junction (skin) +		
	Fore limb +		
Limbs	Hind limb +	<b>Hair Follicles</b>	<b>MCs</b>
	Fore limb digital pads +++	Tylotrichs +++	Tylotrichs +++
	Hind limb digital pads +++	Vibrissae +++	Vibrissae +++
	Interdigital skin +	Normal ++	Normal ++

Table 1. Locations tested and results. +: 1-6 cells, ++: 7-12 cells, +++: > 12 cells.

MCs were found distributed in different proportion according to the corporal area analyzed (table 1), showing differences between skin, mucosa and follicles.

**Skin.** MCs were found dispersed in the skin of the animal, specifically located in the basal cell layer of characteristic small thickenings of the epidermis irregularly distributed called "Haarscheiben" o "hair discs", first described by F. Pinkus in 1902. The areas with high density in MCs were skin of the cheeks (mainly in the vicinity of the vibrissae), nasal apex and digital pads (where the arrangement of MCs is similar than in mucosa), planum nasale, lips and nasolabiale planum. MCs were disposed forming groups and it was rare to found lonely cells.

**Hair follicles.** MCs were observed in normal or guard hair follicles, tylotrich hair follicles and vibrissae. In normal hair follicles, the cells were distributed lonely and scattered in the epithelial cells. In tylotrich hair follicles, MCs were found in higher number and scattered likewise, being more numerous in skin of the dorsum and face. In vibrissae, they were found in the highest proportion and almost exclusively located in the enlarged portion.

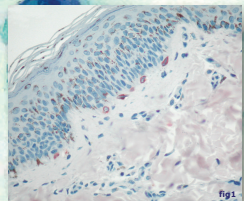


Figure 1. Haarscheiben Dorsal region. Ck20.

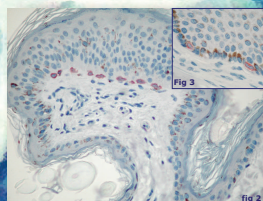


Figure 2. Haarscheiben Interdigital skin. Ck20.

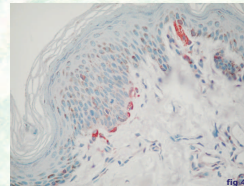


Figure 4. Haarscheiben Nasolabiale planum. NSE.

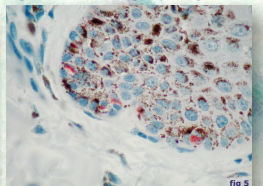


Figure 5. Hind limb digital pad. CgA.

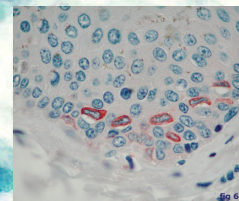


Figure 6. Cheek (mucosa). Cytokeratin 20

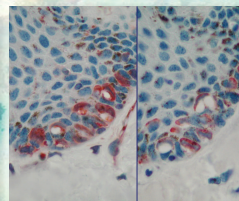


Figure 7. Hard palate. NSE (left) and Ck20 (right).

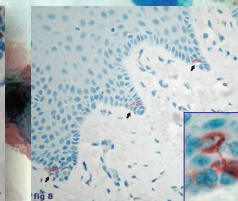


Figure 8. Soft palate. NCL-5D3.

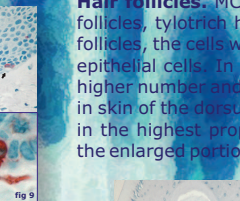


Figure 9. Hard palate. NSE.

**Mucosa.** Oral mucosa was the area where the highest population of MCs was found, mainly in hard and soft palate, internal mucosa of cheeks and gums. They were distributed lonely or forming groups of 3-14 cells, with a round to oval morphology. The larger proportion of them was located in basal layers of the epithelium, although occasionally a few cells were observed in more superficial layers. This spherical cell population was the only observed and dendritic MCs observed by other authors were not noticed.<sup>6</sup> We found evidence of close contact between spherical MCs and nerve terminal (figure 9). In nasal and genital mucosa, a very little number of MCs were seen. They have oval morphology and always were lonely and in the basal layer of the epithelium. MCs were not observed in other mucosal location.

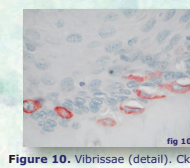


Figure 10. Vibrissae (detail). Ck20.

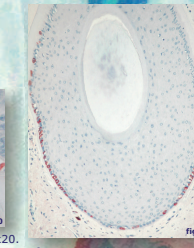


Figure 11. Vibrissae. NCL-5D3.

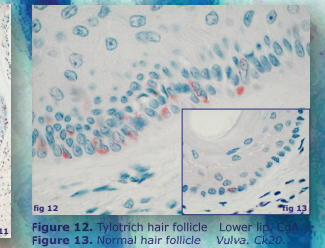


Figure 12. Tylotrich hair follicle Lower lip. Ck20.



Figure 13. Normal hair follicle Vulva. Ck20.

**The results obtained in this study show Merkel cells are widely distributed in the skin and mucosa of the dog and are in concordance with most of reports where location of mammalian Merkel cells has been studied.**

## REFERENCES

- Merkel F. Arch mikr Anat 1875;11:636-652.
- Tachibana T. Arch. Histol. Cytol., 1995; 58(4): 379-396.
- Toyoshima K, Seta Y, Toyono T, Takeda S. J Comp Neurol 1999; 409: 129-140.
- Hartschuh W, Weihe E, Egner U. J. Invest Dermatol 1995; 93(5): 641-648.
- Uchiyasaki S, Suzuki H, Takano K, Inoue K, Inoue T, Ono T, Ono (eds) Merkel Cells, Merkel Cell Carcinoma and Neurobiology of the Skin. Elsevier Science 2000; 105-113.
- Tachibana T, Nawa T. In: H. Suzuki and T. Ono (eds) Merkel Cells, Merkel Cell Carcinoma and Neurobiology of the Skin. Elsevier Science 2000; 11-21.



# Estudios de la célula de Merkel canina fetal y postnatal: apariencia, densidad y distribución

Gustavo A. Ramírez, Héctor Lorenzo, Manuel Arbelo, Ayoze Castro, Ana Lara\*, Antonio Espinosa de los Monteros

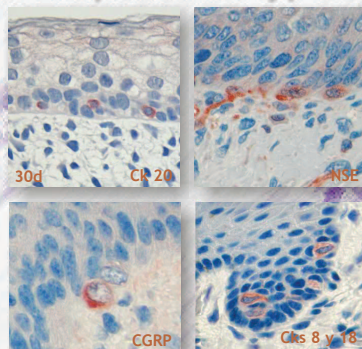
Departamento de Morfología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de GC, España  
\*Department of Veterinary Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Ohio State University, USA

El origen de las células de Merkel (CMs), células neuroendocrinas de epidermis y folículos pilosos, durante el desarrollo fetal es aun materia de debate. Las dos hipótesis propuestas son: 1) a partir de células epiteliales pluripotenciales de la epidermis y 2) una migración de las células desde la cresta neural.

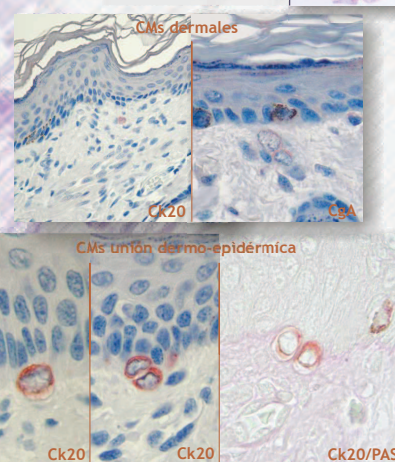
**Objetivo.** Estudiar las características de las CMs en la especie canina durante el desarrollo fetal, comparando los resultados con los obtenidos en los animales adultos, e intentar determinar su posible origen.

## Perfil inmunohistoquímico de las CMs en el periodo fetal y postnatal.

	Fetal	Postnatal	Adulto
AE1/AE3	++	++	+++
Ck20	+++	+++	+++
NCL-5D3 (Cks 8 y 18)	-	+++	+++
Ck7	-	+	+++
NSE	+	+/+	+++
Neurofilamentos	-	+	+++
Proteína S100	-	-	+/+
Gap43	-	-	-
PGP9.5	-	-	+++
Cromogranina A	+	+/+	+++
Sinaptofisina	-	+/+	+++
CGRP	-	+/+	+++
Serotonina	-	-	-
Metencefalina	-	-	-
MOC31/EpCAM	-	-	+



Fetos 30 días (3)  
Recién nacidos (3)  
Formol 10%  
Parafina  
Cortes 3µm  
IHQ método ABC

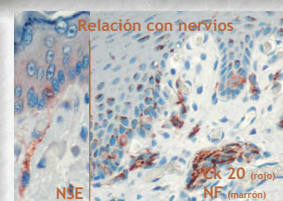
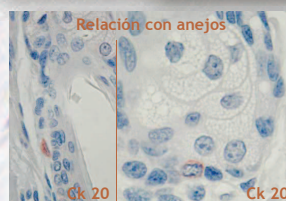
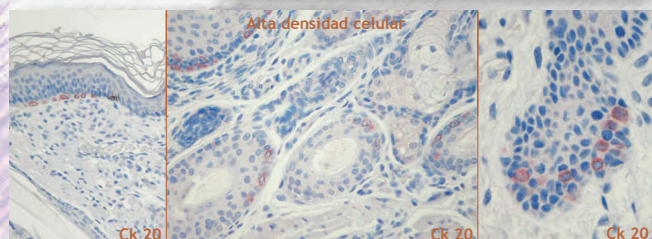


En función de estos resultados, usamos el anticuerpo anti-Ck20 para evaluar la morfología, densidad y distribución de las CMs en los fetos y en los animales recién nacidos.

Ck20 se expresa en las CMs mucho antes que lo hacen otras citoqueratinas de epitelio simple (Dong-Kun, 1995).

## Morfología, densidad y distribución de las CMs en el periodo fetal y postnatal.

	Fetal	Postnatal	Adulto
DENSIDAD CELULAR *	baja	muy alta	depende de localización
MORFOLOGÍA CELULAR	predominio de dendríticas	predominio de globulares	globulares (dendríticas ocasionales)
LOCALIZACIÓN CELULAR			
CMs epidermales	si	si	si
CMs foliculares	si	si	si
CMs dermales	no	si	si (extremadamente raras)
CMs unión dermo-epidérmica	no	si	no
DISPOSICIÓN CELULAR			
Intraepitelial	irregular / desorganizada (principalmente) parabasales, diferencias en la orientación	localización definitiva (grupos) hair-ribbons, tuach domes, folículos (piel) estratos basales (mucosas) localización atípica (aisladas / orientación extraña) parabasales, unión DE	localización definitiva grupos, aisladas muy raras
Dermal	no	dermis superficial	dermis superficial
Conexión con term. nerviosas	no	si (muy evidentes)	si
Asociación a anejos cutáneos	no	si (fol. pilosos, gl. sebáceas, gl. eccrinas)	si (gl. eccrinas)



Nuestros resultados están de acuerdo con lo descrito en otros mamíferos incluido el hombre, donde a medida que el feto se desarrolla, las CMs sufren cambios en su morfología y en su inmunofenotipo, lo que corresponde a una especialización en las funciones que desarrollarán en las distintas localizaciones en el animal adulto.

La presencia de dendritas en las CMs parece estar relacionada a una proliferación activa y/o a una activación de las funciones paracrinas en las áreas donde los apéndices de la piel se están formando y diferenciando. Estos hallazgos sugieren que las CMs epidermales son dianas para los nervios sensoriales y que las CMs dermales contribuyen al desarrollo del plexo cutáneo nervioso en la dermis superficial.

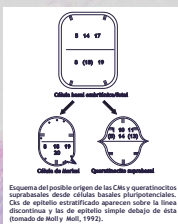
Se hace necesario realizar estudios en producción de hormonas tisulares, citoquinas o factores de crecimiento por parte de las CMs caninas para clarificar su papel en la formación local, crecimiento y diferenciación de los anejos y nervios cutáneos.

## Origen.

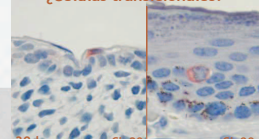
### Migración desde la Cresta Neural

Moll, 1986; Narisawa, 1992; Grim, 2000; Szeder, 2003

1. Su perfil de citoqueratinas difiere profundamente al de los queratinocitos.
2. Células de origen mesenquimal expresan citoqueratinas de epitelio simple.
3. Los nuevos estudios desarrollados en esta línea (ratones transgénicos).
4. Aceptado y demostrado este origen en aves (diferencias en morfología, localización y distribución con respecto a mamíferos).
5. Los tumores de células de Merkel se originan en la dermis, no en la epidermis.



### ¿Células transicionales?



### Célula epidermal basal pluripotencial

Moll, 1986, 1990; LeDouarin, 1982; Narisawa, 1992

1. Formas que parecen intermedias o transicionales entre queratinocitos y CMs.
2. Citoqueratinas como proteínas mayoritarias del citoesqueleto.
3. Presencia de desmosomas y hemidesmosomas.
4. Estudios en piel fetal de mamíferos e invertebrados (denervación, ablación de la cresta neural, xenotrasplantes cutáneos).
5. Las CMs epidermales aparecen antes que las dermales en el desarrollo de la piel fetal.





# CORRESPONDENCE BETWEEN IMMUNOHISTOCHEMICAL AND ELECTRON MICROSCOPICAL FEATURES OF MERKEL CELLS IN DOGS

G. A. Ramírez, A. Fernández, F. Rodríguez, T. García-Caballero\*, J. R. Jaber, A. Espinosa de los Monteros

Department of Comparative Pathology, College of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

\*Department of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, Spain.

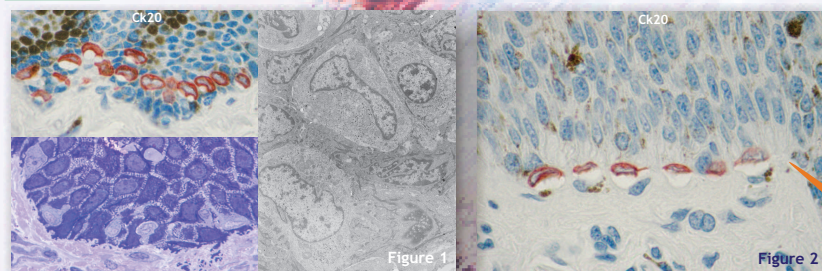
**Introduction.** Merkel cells (MCs) are the neuroendocrine cells of the skin. Their final/normal location is the ectoderm-derived mucosa, the epidermis in glabrous and hairy skin, and the hair follicles, distributed in groups of variable number ("Merkel corpuscles"). MCs are type I slow-adapting cutaneous mechanoreceptors, responsible of the response to a maintained mechanical stimuli. For this reason, MCs establish synapsis-like contacts with enlarged terminal axons of dermal myelinated nerve fibres (Merkel nerve endings).

**Aim/Objective.** Show the correlations between the immunohistochemical and light microscopy features and the electron microscopy characteristics of this cell population. These studies are designed to know the Cutaneous Neuroendocrine Tumor (Merkel cell tumor) in dogs by the knowledge of the normal features of canine MCs.

## Results/Discussion.

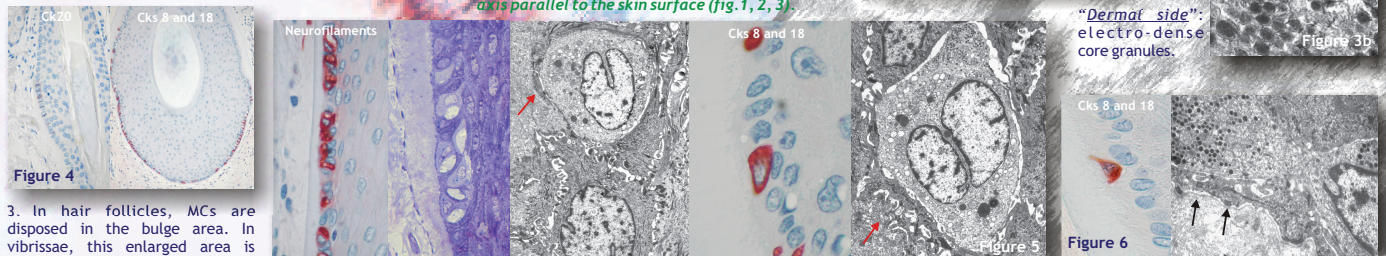
**Location.** Canine MCs do not present significant differences with MCs in other species.

**Orientation.** Spatial orientation of MCs differs between epidermal or follicular MCs.



1. Basal layers of mucosal epithelium and epidermis of glabrous skin, in groups of variable number (2-14 cells; "Merkel corpuscles") or rarely individualized (fig. 1).  
2. Basal layer of the epidermis in hairy skin, in groups ("haarscheibens" or hair discs) (fig. 2).

**A. Mucosal and epidermal MCs: longitudinal axis parallel to the skin surface (fig. 1, 2, 3).**

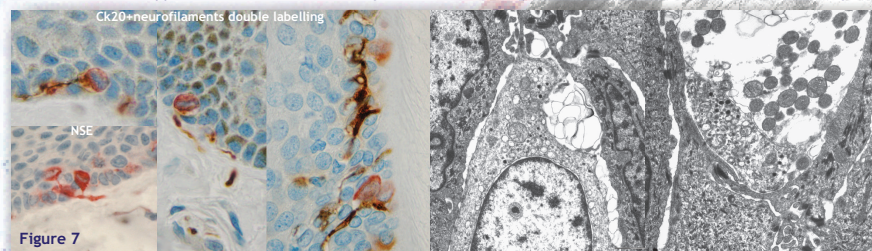


3. In hair follicles, MCs are disposed in the bulge area. In vibrissae, this enlarged area is disposed surrounding the follicle and MCs are intermingled with keratinocytes (fig. 4).

**B. Hair follicles MCs: round to polygonal without parallel orientation to the surface of the skin (fig. 5).**

Cytoplasmic prolongations of keratinocytes separate MCs from basement membrane (figure 5, 6, arrows)

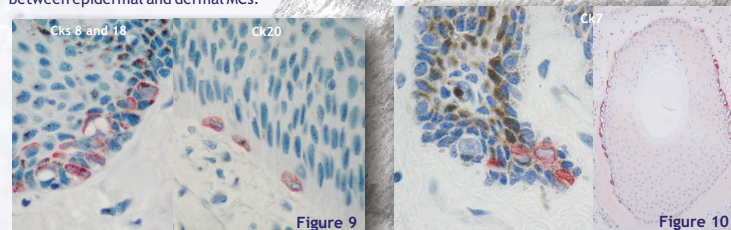
**Nerve terminals.** Enlarged nerve terminals contact with canine MCs in the dermal side of the cell. In hair follicles, the contact is established in the opposite side. These nerve endings are characterized by numerous clear vesicles and mitochondria (fig. 7).



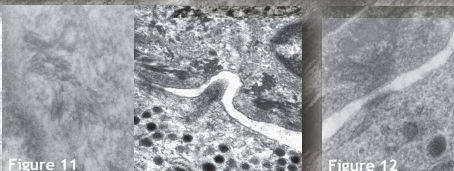
**Immunophenotype.** Canine MCs express epithelial, neural and endocrine markers (table 1).

**Cytokeratins:** Ck20 is the specific marker for canine MCs in skin. Other Cks: 8, 18 and 19 (fig. 9). The expression varies in developmental stage or between epidermal and dermal MCs.

Expression of cytokeratin 7 in canine MCs was strong and common (only observed occasionally in humans MCs in Paget's disease) (fig. 10).



Immunohistochemical pattern: diffuse intracytoplasmic (intermediate filaments observed ultrastructurally and disposed in bundles over the whole cytoplasm, or associated to the spine-like projections) (fig. 11).



Canine MCs (down) present rudimentary desmosomes or hemidesmosomes with keratinocytes (up) (fig. 12).

## Materials and Methods.

Mucosa and skin samples & dogs (3 males/ 3 females) Different age and breed

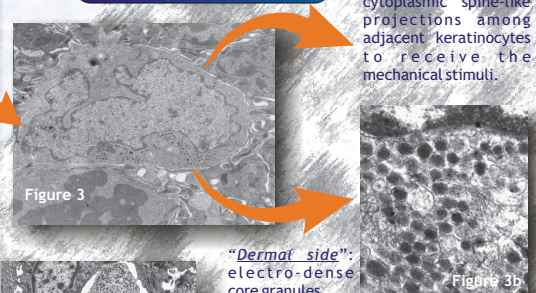
10% buffered formalin (24 h.)  
paraffin-wax  
3 mm tissue sections  
H&E (ABC method)

2.5% glutaraldehyde  
osmium tetroxide  
high MC density (necessity tested by H&E)

Philips CM10 electron microscope

ANTIBODIES	CLONAL ANTIBODIES
CYTOKERATINS	Ck7, Ck8, Ck18, Ck19 and Ck20
NEUROFILAMENTS	Neurofilament
NEURON SPECIFIC PROTEINS	Calcitonin gene related peptide (CGRP) Synaptophysin Neuron specific enolase (NSE)
CHROMOGRANINS	S100 protein Protein gene product 9.5 (PGP.9.5)
MEMBRANE MARKERS	Chromogranin A (CgA) MOC31 (CgA) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)
OTHERS	Vimentin

TABLE 1. Antibodies used for MC identification and study. Immunofluorescent antibodies with positive immunoreaction for canine MCs.

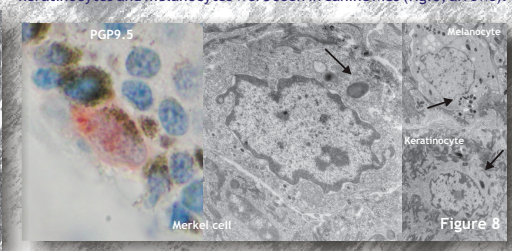


**"Epidermal side":** cytoplasmic spine-like projections among adjacent keratinocytes to receive the mechanical stimuli.

**"Dermal side":** electro-dense core granules.

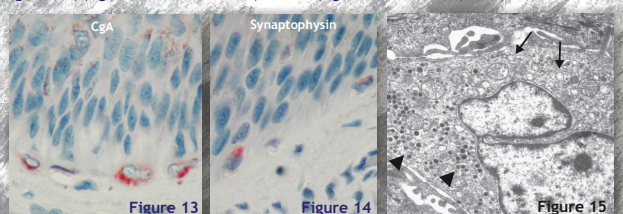
Cytoplasmic prolongations with high density of dense core granules (fig. 6).

**Melanin.** Cytoplasmic granules resembling dense granules founded in keratinocytes and melanocytes were seen in canine MCs (fig. 8, arrows).



**Anti-CgA and anti-CGRP antibodies:** immunoreaction in the cellular side close to the nerve connection (dense core granules) (fig. 13 and 15 arrowhead).

**Synaptophysin expression:** in the opposite cellular side, the far cellular side to axonal contact (small clear content vesicles) (fig. 14 and 15 arrows).



Small clear vesicles and secretory dense core granules may be cytoplasmic organelle implicated in two different pathways of secretion by the MC (fact demonstrated in neurons and paraneurons: Lundberg, 1983; Fujita, 1992; and suggested previously for MCs in pig snout skin: García-Caballero, 1989).

**Conclusions.**  
1. There is a close relation between the immunohistochemical study and the ultrastructure of the canine MCs.  
2. The immunohistochemical and ultrastructural features of canine MCs demonstrated neuroepithelial characteristics.



# Marcadores de Origen Nervioso, Neuropéptidos y Neurotransmisores en las Células de Merkel Caninas

Ramírez GA, Rodríguez F, Sierra E, Castro A, Espinosa de los Monteros A.

Unidad de Histología y Anatomía Patológica. Instituto Universitario de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Las células neuroendocrinas cutáneas o células de Merkel (CMs) componen el sistema neuroendocrino difuso de la piel. Se localizan en la epidermis y epitelio folicular de los vertebrados, especialmente en zonas de alta sensibilidad táctil. Presentan íntimo contacto sináptico con una terminación nerviosa sensorial intraepitelial constituyendo mecanorreceptores de adaptación lenta de tipo I. La inmunohistoquímica ha demostrado la expresión de varias moléculas como adeninas, neuropéptidos, monoaminas, cromograninas, proteínas neuronales específicas y citoqueratinas, lo que sugiere su participación en la regulación del desarrollo del epitelio escamoso, en la acción inductiva para el desarrollo de terminaciones nerviosas, en la secreción paracrina epidermal y en procesos de mecanotransducción. Su transformación neoplásica da como resultado tumores neuroendocrinos cutáneos, descritos en el perro, gato y hombre.

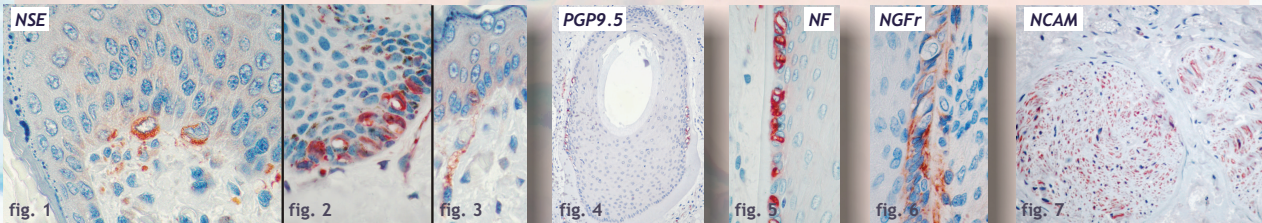
**El propósito del presente trabajo fue determinar si las CMs en individuos adultos de la especie canina expresaban proteínas neuronales, neuropéptidos y otras sustancias implicadas en los procesos de transducción mecanoeléctrica y secreción paracrina.**

Para ello se aplicaron a cortes histológicos, de piel pilosa, piel glabra y mucosa oral, diferentes anticuerpos mono- y policlonales comerciales frente a diferentes marcadores de origen neural, serotonina y neuropéptidos (tabla 1).

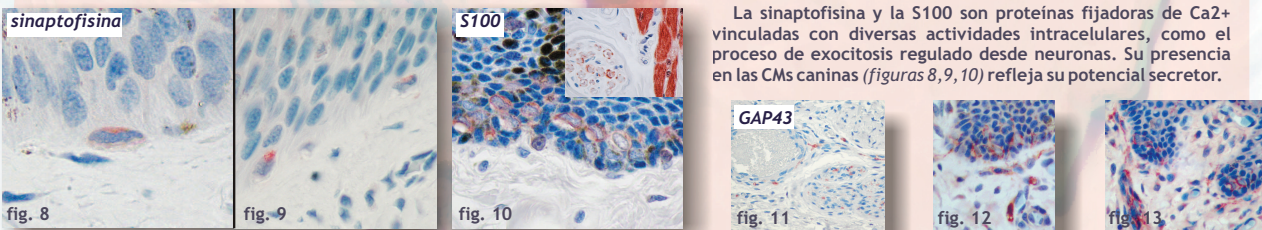
MATERIAL Y MÉTODOS	ANTICUERPO	REACCIÓN	PATRÓN DE REACCIÓN
Piel Pilosa: labios y cara	PGP9.5	++/+++	C/D ó G
Piel Glabra: trufa y plano nasal	NF	++/+++	C/D (G ocasional)
Mucosa Oral: labio, paladar duro	NSE	+++	C/G
Formol 10%	Sinaptofisina	++/+++	C/G
Parafina	Proteína S100	+/+++	C/D (G ocasional)
	NCAM	-	-
	NGFr	-	-
Cortes 3 µm	GAP43	-/+	C/G
	CGRP	+++	C/G
IHQ métodoABC	Metencefalina	-	-
	Serotonina	-	-

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales: antiPGP9.5 (PGP9.5), antiNF (NF), antiNSE (NSE), antiSinaptofisina (Sinaptofisina), antiProteína S100 (S100), antiNCAM (NCAM), antiNGFr (NGFr), antiGAP43 (GAP43), antiCGRP (CGRP), antiMetencefalina (Metencefalina), antiSerotonina (Serotonina). Patrón de reacción: C/D (Cáncer/Diferencial); C/G (Cáncer/Glóbulo). Reacción: ++/+++ (fuerte), +++ (muy fuerte), - (negativa).

**MARCADORES NEURONALES.** La PGP9.5 es una proteína citosólica expresada en neuronas, en fibras nerviosas y en las células neuroendocrinas. Los NF pertenecen a los filamentos intermedios estructurales del citoesqueleto neuronal. La NSE tiene distintas propiedades estructurales y funcionales reflejo de adaptación neuronal. La presencia de estas moléculas en las CMs caninas (figuras 1,2,3,4,5) podría estar relacionada con sus funciones similares a las de las neuronas, confiriendo propiedades estructurales y funcionales de *paraneuronas* (sistema APUD).



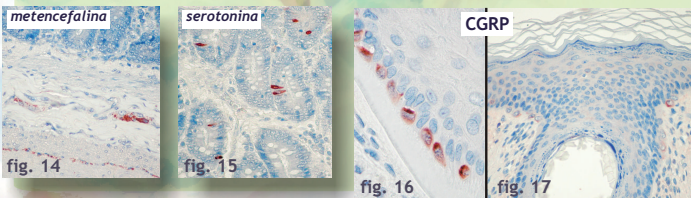
La NCAM (CD56) y el NGF son importantes para el desarrollo, diferenciación y supervivencia del sistema nervioso central y periférico. Ninguno de los dos se expresa en las CMs caninas adultas (figuras 6 y 7). Pese a que los controles positivos demuestran que el anticuerpo utilizado funciona en tejidos caninos. Sería necesario estudiar la presencia de NGFr en las CMs en estadios fetales, donde sí se ha descrito para otros mamíferos.



La sinaptofisina y la S100 son proteínas fijadoras de Ca<sup>2+</sup> vinculadas con diversas actividades intracelulares, como el proceso de exocitosis regulado desde neuronas. Su presencia en las CMs caninas (figuras 8,9,10) refleja su potencial secretor.

La GAP-43 es una proteína de membrana del sistema nervioso central y periférico expresada en altos niveles sólo durante el desarrollo neural y en el tejido nervioso adulto dañado y en regeneración. En condiciones normales no existe expresión por parte de las CMs caninas adultas (figura 11: C+), pero sí fetales (figuras 12 y 13). Cabría estudiar si en los procesos de cicatrización y regeneración de lesiones cutáneas en el perro las CMs caninas podrían expresar esta proteína, como ha sido descrito en humana.

**NEUROPEPTIDOS Y NEUROTRANSMISORES.** Los gránulos electrodensos de las CMs caninas muestran inmunorreacción para el CGRP (figuras 16 y 17), sugerido como neurotransmisor o neuromodulador en la sinapsis entre la CM y la terminación nerviosa. Sin embargo son negativas para la metencefalina (figura 14: C+), implicada en la analgesia y la neurotransmisión en la sinapsis CM-neurita en otras especies.



El papel de la serotonina en las CMs aún no es bien conocido, aunque se ha postulado que podría actuar como una neurohormona o un mediador sináptico que transduce el estímulo recibido desde la célula hasta la terminación nerviosa. El anticuerpo usado resultó negativo en las CMs a pesar de que los controles fueron positivos (figura 15).

La producción y liberación de péptidos por la CM dentro del medio ambiente inmediato podría afectar a las células vecinas de una manera paracrina. CMs que preceden al crecimiento de las fibras nerviosas en el feto humano se observan en las áreas de formación de las glándulas sudoríparas ecresas y de los folículos pilosos. Podrían ser importantes en la formación y mantenimiento de los plexos nerviosos periglandulares y perifolículos, así como en el ciclo del pelo. Algunos de estos péptidos ya ejercen efectos sobre células epidermales, como el CGRP en la función de presentación de antígenos por la célula de Langerhans o el VIP y la sustancia P capaces de promover el crecimiento y la diferenciación de Qs, fibroblastos o células endoteliales.

**Los resultados obtenidos demuestran la expresión de marcadores neuronales en las CMs adultas, lo que apoya su origen de la cresta neural. La expresión de ciertos péptidos como el CGRP señala hacia posibles funciones paracrinas sobre elementos celulares adyacentes. Esta inmunexpresión puede ser útil para la identificación de las neoplasias originadas a partir de este tipo celular en el perro.**

**Propósitos para el futuro:**

1. Estudiar la función de las CMs en piel sometida a alteración patológica, incluyendo enfermedad degenerativa, neoplásica y derivada de irradiación.
2. Estudiar si las CMs caninas adultas expresan otras moléculas de reconocido papel en el desarrollo de estructuras cutáneas, como el VIP o la sustancia P.

Referencias  
 1. Hatanaka M, Yoda S, Yoshida S, 239-245, 1984.  
 2. Abell E, Yoda S, Eur J Cell Biol 84:259-271, 2005.  
 3. Nishimura Y, Yoda S, Anat Rec 255:241-248, 1993.  
 4. Tachibana T, y Hatanaka E, Anat Sci Int 77:26-33, 2002.  
 5. Tachibana T, Anat Histol Cytol 58:463-479, 1995.  
 6. Weitzel L, y cols., Anat Rec part A 272A:467-473, 2003.





