



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

CUANTIFICACION DE CELULAS DE LANGERHANS
EN LESIONES DE VERRUGA VULGAR, PAPILOMA,
LEUCOPLASIA Y LIQUEN PLANO CON PROTEINA
S - 100

Roberto Santa Ponce Bravo

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A N :
MOUSAFI MOALEM, AMNON
MONTAÑO GONZALEZ SARA ANGELICA

ASESOR: DRA. SANTA PONCE BRAVO

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CUANTIFICACION DE CELULAS DE LANGERHANS
EN LESIONES DE VERRUGA VULGAR, PAPILOMA,
LEUCOPLASIA Y LIQUEN PLANO CON PROTEINA S-100.

INDICE

I. INTRODUCCION.....	1
Resumen	
Abstract	
A) ANTECEDENTES.....	3
1.- Células de Langerhans:	
2.- Verruga vulgar.....	6
3.- Papiloma.....	7
4.- Lesiones blancas	9
4.1. Lesión precancerosa	9
4.2. Leucoplasia.....	9
4.3. Displasia epitelial.....	11
4.4. Liquen plano.....	12
B) HIPOTESIS Y OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
II. MATERIALES Y METODOS.....	16
III. RESULTADOS	23
IV. DISCUSION.....	41
V. CONCLUSIONES.....	42
VI. BIBLIOGRAFIA.....	43

RESUMEN

Las CLs son células dendríticas no queratinocitos localizados en la región basal y suprabasal de los epitelios bucales, de piel y otras mucosas. Sus procesos dendríticos se extienden entre los queratinocitos, su función es fagocítica y se pueden encontrar en condiciones normales y patológicas en los epitelios.

En nuestro estudio observamos que existe mayor incidencia de lesiones en los pacientes de sexo femenino que en el masculino (Gráficas 2-6). La cuantificación realizada permite establecer que las células se encuentran en mayor cantidad en las verrugas vulgares extraorales (Tabla 2) que en las intraorales (Tabla 1). En las lesiones de papilomas, 6 casos tenían CLs siendo mayor la cantidad en pacientes jóvenes que en adultos (Tabla 3). Comparando estas dos lesiones que clínicamente son muy parecidas podemos hacer notar que la lesión viral tiene incremento en CLs, pero no así en las lesiones blancas donde notamos una baja o nula respuesta de CLs. Las 5 lesiones leucoplásicas no muestran CLs y en las lesiones de Liquen plano solamente un caso fué positivo con un número muy reducido (Tabla 4).

La presencia o ausencia de infiltrado inflamatorio no se relaciona con la cantidad de CLs ni con el tamaño de la superficie epitelial. Es importante establecer si las CLs tienen la capacidad de multiplicarse en el epitelio o si migran de la médula ósea hacia el sitio de la lesión. Al entender estos mecanismos se podrá determinar el comportamiento biológico de las lesiones epiteliales.

ABSTRACT

Langerhans cells (LCs) are a special type of dendritic cells that are usually present in the suprabasal regions of stratified squamous epithelium, they have several dendritic processes extending between keratinocytes. The aim of this study was to determine quantitatively the number of LCs in epithelial lesions immunostained with an antibody against S-100 protein. The cells are found along the length of the suprabasal region from infectious, benign and premalignant epithelial lesions. Our results showed an increase in the number of LCs in extraoral *Verruca vulgaris* than intraoral ones (Tables 1 and 2). Papilloma lesion of young people has higher number of LCs than those an adult (Table 3). All leukoplakia lesions were negative to LCs. One case of Lichen planus was positive to LCs (Table 4).

One case of normal tissues was positive to LCs as is shown in Table 5. The number of LCs in normal tissue, leukoplakia and Lichen planus lesions are however significantly less than that in the infectious and benign lesions. In view that in the 5 premalignant lesions (leucoplakia) the number of LCs were depressed, this finding can suggest that the lesions have more potential to malignization (Table 2,5 and 6).

We have not found any relationship between inflammatory infiltration, epithelial area with the number of LCs in any lesion. We found an increased number of LCs in viral lesions, This may be related with the virus as a stimuli.

A) ANTECEDENTES

1.- CELULAS DE LANGERHANS

Las células de Langerhans (CLs) fueron descubiertas en 1868 por Paul Langerhans. Se han descrito en las superficies epidérmicas y en diferentes epitelios (1,2), incluyendo epitelio bucal (3).

Las CLs son dendríticas no queratinocitos, del epitelio bucal y de la piel, localizadas con frecuencia en la capa espinosa (4), pero se han observado también en las capas basal y suprabasal del epitelio bucal.

Las CLs tienen origen en la médula ósea (5), y pertenecen a la población mononuclear fagocítica y migran a los diferentes epitelios.

Ultraestructuralmente se observa que contienen abundante retículo endoplásmico rugoso, gran cantidad de mitocondrias, un aparato de Golgi bien desarrollado, filamentos de vimentina, microtúbulos y antígenos de proteína S-100 (6, 7, 8, 9, 10, 11).

Las CLs se dividen en dos tipos de acuerdo a la apariencia del núcleo:

Tipo I. Se localizan suprabasalmente, son altamente dendríticas, con citoplasma electrolúcido y numerosos gránulos específicos, el núcleo es redondo u ovoide con nucleolo central y heterocromatina dispersa.

Tipo II. Se localizan en la capa basal, de núcleo irregular con predominio de heterocromatina densa, con citoplasma más electrodensos y pocas dendríticas (10,12).

En ambos tipos de células el citoplasma es abundante con filamentos, pocos lisosomas, y con frecuencia mitocondrias dilatadas. Las CLs son ligeramente más pequeñas que los queratinocitos, con los cuales no tienen uniones intercelulares.

En la mucosa oral las CLs varían su número en diferentes regiones epiteliales de un mismo individuo y en las distintas especies (13).

En los epitelios no queratinizados existe un mayor número de CLs, que en los queratinizados, y sólo pocas regiones no tienen CLs (14).

En condiciones normales de la mucosa encontramos CLs en el epitelio oral y sulcular, presentando diferentes sitios de localización dependiendo del área de la mucosa. En la mucosa bucal se localizan suprabasalmente, mientras que en el paladar predominan en el estrato espinoso, en los bordes laterales de la lengua y en el piso de la boca, se observan cerca de la superficie basal (5).

Se ha observado que el número de CLs aumenta en el epitelio oral y sulcular enfermo.

La función de las CLs como un componente importante en el sistema inmune de la mucosa oral, se ha determinado en estudios "in vitro", como la habilidad de presentar antígenos a los linfocitos T, simultáneamente alogénicos y singénicos en la reacción de leucocitos mixtos. A su vez, funcionan como fagocitos mononucleares y otros investigadores sugieren que pertenecen al linaje de células dendríticas linfoides.

De los antígenos expresados por las CLs dos pertenecen al gen de histocompatibilidad (complejo HLA) localizado en el sexto cromosoma, el cual codifica dos tipos de proteínas que regulan la respuesta inmune a antígenos extraños. También en éste gen se encuentran subregiones que degeneran en proteínas antigénicas llamadas HLA-DR-DQ (formalmente denominadas HLA-DC-DS (15, 16) y DP (17, 18). Estos antígenos pueden ser expresados por todas las células inmunocompetentes incluyendo las CLs, y participan en la presentación de los antígenos extraños a los Linfocitos Y cooperadores (19).

Se considera a las CLs como reguladoras del crecimiento epitelial así como productoras de un inhibidor de la proliferación celular semejante al de las chalonas (6). A su vez forman con las células T epidermotrópicas, los queratinocitos y los nódulos linfáticos, los tejidos linfoides asociados a piel; lo cual las determina como células presentadoras de antígenos y estimuladoras alogénicas para preparar a los linfocitos T en el epitelio estableciendo acumulaciones in situ.

A su vez pueden tener contacto con alérgenos y, estimular la reacción mixta piel-linfocito.

Se ha sugerido que las CLs pertenecen a un sistema inmune periférico mediado por células, por lo que se piensa la inflamación en el epitelio bucal.

Con la técnica de hematoxilina y eosina las CLs no pueden ser identificadas; por lo que se usa la impregnación de oro que fue empleada por Paul Langerhans hace 100 años, sin embargo, por necesitar ésta técnica una preparación activa, los resultados carecen de consistencia. Se han empleado técnicas de inmunohistoquímica para localizar a las CLs como ATPasa, B glucoranidasa (1).

Actualmente se utiliza la proteína S-100, con la que las C.L. se tiñen positivamente, también con lisosoma, anticuerpos MT1, LN3, anti CD1, CD3 y CD4. Usando estas técnicas, se ha observado que el número de CLs está alterado en lesiones epiteliales (18, 20).

2.- VERRUGA VULGAR

Neoplasia benigna frecuente de la piel.

Etiología

Es causada por el Papilomavirus.

Características clínicas

Son proyecciones papilares que pueden encontrarse en labios, dentro de la boca, o en cualquier parte de la piel (manos, dedos). Las lesiones bucales se generan por autoinoculación al succionarse los dedos o morder las uñas.

Características histológicas

Se observa una lesión papilar con tallos conjuntivos muy vascularizados cubiertos por epitelio escamoso estratificado. En la porción más superficial de las papilas, el epitelio es paraqueratinizado y entre ellas es hiperqueratósico (21).

Diagnóstico diferencial

Papiloma, Condiloma acuminado, Molusco contagioso, Hiperplasia epitelial focal.

Tratamiento

Extirpación quirúrgica.

3.- PAPILOMA

Es una neoplasia benigna de origen epitelial (22).

Etiología

Es debida a la infección por el Papilomavirus humano DNA (VPH). Se han encontrado más de 50 distintos genotipos del VPH; en la cavidad bucal los tipos más frecuentes son 13 y 32 (23).

Características clínicas

El papiloma se caracteriza por presentar crecimiento exofítico con proyecciones dactiliformes pequeñas que le dan un aspecto de "coliflor". Su base generalmente es pediculada y bien circunscrita, se presenta como lesión única, aunque puede encontrarse como lesión múltiple. Su tamaño no rebasa un centímetro de diámetro (24).

Se encuentra localizada con mayor frecuencia en la lengua, labios, mucosa bucal, encía y paladar, preferentemente en la zona adyacente a la úvula, su color varía según su localización, puede ser del mismo color de los tejidos adyacentes o algo más enrojecido, si está en una zona de poco traumatismo hasta una coloración blanca. Se han reportado casos de Papiloma en el tracto del seno nasal donde la mayoría de los casos están involucrados los senos maxilares, con o sin la pared lateral nasal (25).

Características histopatológicas

La lesión está compuesta por epitelio escamoso estratificado que prolifera hacia el tejido conectivo subyacente, presenta un patrón complejo de múltiples prolongaciones digitales de epitelio escamoso estratificado, alrededor de un núcleo central de tejido conectivo vascular. La superficie está cubierta por una capa engrosada de paraqueratina u ortoqueratina. Las células epiteliales no son atípicas y sólo en algunos casos se llega a observar actividad mitótica considerable, por lo que rara vez llegan a malignizarse. El tejido conectivo presenta infiltrado inflamatorio crónico.

Existen estudios en los cuales se ha observado que la presencia del VPH (tipos 5, 8, 16, 18, 21, 26, 27), está asociada con la transformación maligna (26).

Diagnóstico diferencial

Verruga vulgar, Xantoma verrugiforme, Disqueratoma verrucoso, Condiloma acuminado (28), cuando la lesión es grande puede confundirse con la variación papilar de un carcinoma epidermoide bien diferenciada, en ambas se puede encontrar una superficie ligeramente ulcerada (24).

Tratamiento

Excisión quirúrgica, criocirugía, electrodesecación o ablación con rayo laser, generalmente no hay recidiva, cuando ocurre deja cicatriz residual.

4.- LESIONES BLANCAS

9

4.1. Lesión precancerosa

Es un tejido de morfología alterada, más propenso a cancerizarse que el tejido equivalente de apariencia normal (OMS 1972).

4.2. LEUCOPLASIA

Es una placa blanca que no se puede caracterizar clínica ni patológicamente como ninguna otra enfermedad (OMS 1978; 26).

Etiología

Es variada, debido a factores intrínsecos predisponentes, y factores locales extrínsecos, como tabaco, alcohol (29), sepsis bucal, irritación local, sífilis, deficiencia vitamínica, alteraciones endocrinas, galvanismo y radiación actínica en los casos de Leucoplasia de labios (28, 29).

Características clínicas

Las lesiones muestran gran variedad en su tamaño, localización y apariencia. Se ha visto que son más frecuentes en varones de edad avanzada; cuando se presenta en mujeres, aparece en una etapa más temprana (28).

Se presenta preferentemente en la mucosa bucal y comisuras labiales, seguidos por la mucosa alveolar, lengua, labio, paladar duro y blando, piso de la boca y encía (28, 29).

Las placas de Leucoplasia varían desde un área blanca no palpable y translúcida, hasta lesiones induradas, gruesas, fisuradas, papilomatosas. En otras ocasiones, la superficie se observa arrugada y al tacto es siente áspera. El color puede ser blanco, gris o blanco amarillento, cuando se consume mucho tabaco adquiere un color pardo amarillento.

Esta placa blanca no puede ser raspada, ni eliminarse.

El aspecto clínico de la lesión, no puede determinarnos el potencial agresivo de la lesión, ya que de acuerdo a diferentes estudios hechos por Shafer, Pindborg y Waldron se demostró que lesiones aparentemente pequeñas e inocuas,

mostraron ser un cancer invasivo, por lo que el diagnóstico únicamente se establece en base a la biopsia y exámen histopatológico (28, 29).

Características histológicas

La observación microscópica de las Leucoplasias bucales muestran diferentes aspectos morfológicos como hiperqueratosis que dentro de sus variedades puede ser hiperortoqueratosis o hiperparaqueratosis; acantosis o hiperplasia epitelial (28, 29) que también pueden presentar cambios en el epitelio como displasias que van de leve a severa o francos carcinomas.

Hiperortoqueratosis

Aumento anormal del grosor de la capa de ortoqueratina o estrato córneo en un sitio específico donde normalmente existiría o no ortoqueratina de un determinado grosor (28,29).

Hiperparaqueratosis

Es el aumento en el grosor de la capa de paraqueratina (persistencia de núcleos o remanentes nucleares en la capa de queratina), en un sitio que en condiciones normales se tiene un determinado grosor o bien, en los lugares donde habitualmente no exista paraqueratina (28, 29).

Acantosis

Es la variación en el grosor del estrato espinoso. Puede ser grave con elongación, engrosamiento, embotadura y confluencia de las invaginaciones dermoepiteliales o de su elongación. Este fenómeno es independiente a la capa hiperortoqueratósica o hiperparaqueratósica que la cubra.

Hiperplasia

Es el aumento de tamaño de un órgano o de un tejido, a partir de un aumento en el número de células parenquimatosas específicas, siendo normal la disposición y las mismas células (30).

4.3. DISPLASIA EPITELIAL

Son alteraciones generales del epitelio (OMS 1978). Según el centro de referencia colaborativa para lesiones precancerosas bucales de la OMS (1978), señala que en la Displasia epitelial pueden ocurrir las siguientes alteraciones:

1. Pérdida de la polaridad de las células basales.
2. Presencia de más de una capa de células de aspecto basaloide.
3. Alteraciones en la relación núcleo-citoplasma.
4. Papilas de la rete en forma de gotas.
5. Estratificación irregular del epitelio.
6. Aumento en la cantidad de figuras mitóticas. Pueden encontrarse mitosis anormales, discariosis.
7. Presencia de figuras mitóticas en capas superficiales del epitelio.
8. Pleomorfismo celular.
9. Hiperchromatismo nuclear.
10. Nucleolos agrandados.
11. Menos cohesión celular.
12. Queratinización celular individual, perlas epiteliales dentro de la capa espinosa (28,29).

El criterio para distinguir entre una displasia leve, moderada, severa, hasta carcinoma in situ depende de la experiencia del patólogo (31).

4.4. LIQUEN PLANO (LP)

Es una lesión inflamatoria crónica relativamente común que puede presentarse en la mucosa y piel (21, 27,32).

Etiología

Idiopática, aunque se piensa que inicia como una respuesta celular para inducir el antígeno presente en la capa de los queratinocitos basales (27,32).

Características clínicas

Las lesiones de liquen plano en piel son papulas pequeñas, angulares y de superficie plana, su diámetro es de unos milímetros. Estas lesiones pueden estar circunscritas o unirse en forma gradual hasta formar placas de mayor tamaño, cada lesión esta cubierta por una escama fina y brillante. Inicialmente los lesiones aparecen de color rojo, que después adquieren un tono púrpúreo o violáceo y posteriormente aparece un color pardusco sucio, con un centro umbilicado. En la superficie se observan líneas blanco-grisáceas muy finas que son características y son llamadas estrías de Wickham. El sintoma primario del LP es el intenso prurito.

Generalmente aparecen en las superficies de flexión de muñecas y antebrazos, parte interna de rodillas, muslos y en la región sacra. La cara no suele ser atacada (24,28).

El LP se puede asociar con problemas sistémicos como hipertensión, diabetes o problemas inmunológicos [presencia de HLA (33)], así como también por factores psicossomáticos, hereditarios, uso de medicamentos o alérgicos (27,32).

En la cavidad bucal las pápulas son blanco-grisáceas aterciopeladas y filiformes con disposición lineal, anular o reticular que forman placas con aspecto de encaje o reticulares, anillos y bandas sobre la mucosa vestibular y menor cantidad en labios, lengua y paladar que en su superficie se observan también las estrías de Wickham (24,28).

Características histológicas

Los hallazgos microscópicos característicos de las lesiones de LP son hiperqueratosis o hiperortoqueratosis con un marcado engrosamiento de la capa granulosa, acantosis, con edema intracelular de células espinosas, en ocasiones la elongación del epitelio papilar le dan un aspecto de "dientes de sierra", necrosis o degeneración hidrópica de células basales, que es mínima. La membrana basal aparece intacta y su estructura es normal o puede existir una liquefacción de ésta. También se observa una banda de infiltrado linfocitario por debajo del epitelio.

No existe una verdadera disqueratosis. En estudios histoquímicos se observó que la alteración básica estaba en la degeneración de las capas inferiores del epitelio. El microscopio electrónico reveló, una irregularidad de la membrana nuclear de células, un engrosamiento, granulación y desorientación de tonofilamentos epiteliales, así como una pérdida de hemidesmosomas.

Diagnóstico

El diagnóstico debe incluir no sólo datos histológicos sino ayudarse con las manifestaciones y datos clínicos, que en algunos casos son definitivos para el diagnóstico.

Diagnóstico diferencial

En Leucoplasia bucal, Lupus eritematoso discoide crónico, Péfigo benigno de la membrana mucosa, Péfigo vulgar, Eritema multiforme, Sífilis, Edema.

Tratamiento

No existe un tratamiento efectivo para el LP, básicamente es empírico y se basa en tratamientos paliativos, sistémicos y tópicos, como corticoesteroides, anestesia local (en casos de LP erosivo). El LP es una lesión que con el tiempo puede llegar a desaparecer.

JUSTIFICACION

Aun existe controversia respecto a las funciones específicas de las CLs no se ha determinado si éstas sufren alguna división mitótica en el epitelio en caso de enfermedad o de lesiones, o ellas acuden desde la médula ósea; sería de suma importancia poder determinar en que parte de su recorrido sufren el proceso de diferenciación, o si desde el momento de estar en la médula ósea, ya sus características morfológicas son las de una célula de Langerhans bien diferenciada.

Aún con los adelantos técnicos las CLs, tienen áreas, funciones y mecanismos de acción desconocidos, se sabe que están presentes en el epitelio y que en ciertas alteraciones patológicas existe un aumento del número de ellas y en otras condiciones una disminución. No se conoce con certeza como es que llegan al epitelio, o el mecanismo por el cual son llamadas, ó si su replicación es a nivel de la médula ósea únicamente, ó tienen la capacidad de reproducirse en el epitelio por medio de una célula "madre"; así como su comportamiento en la regeneración, control de la proliferación y queratinización del epitelio.

B) HIPOTESIS Y OBJETIVOS ESPECIFICOS

HIPOTESIS ALTERNA

La cantidad de Linfocitos en tejido conectivo está relacionado con el número de células de Langerhans en lesiones de origen epitelial, por lo que a menor cantidad de linfocitos, mayor cantidad de CLs.

El número de CLs en las diferentes displasias epiteliales es directamente proporcional al grado de alteración, por lo tanto a mayor diferenciación mayor cantidad de CLs.

HIPOTESIS NULA

Las CLs no tienen ninguna relación con la respuesta inflamatoria.

El número de CLs no es directamente proporcional al grado de alteración epitelial, por lo tanto no están involucradas en su comportamiento biológico.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar cuantitativamente el número de CLs en lesiones infecciosas, precancerosas y neoplásicas benignas de origen epitelial, utilizando como marcador el anticuerpo "proteína S-100".

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar la cantidad de CLs en epitelio bucal de personas sin alteración en mucosa.
- Determinar la cantidad de CLs en lesiones de origen viral (Verruga vulgar).
- Determinar la cantidad de CLs en neoplasias benignas de epitelio (Papiloma).
- Cuantificar el número de CLs en lesiones preneoplásicas (Leucoplasia).
- Comparar la cantidad de CLs en epitelio bucal sano y con alteraciones (Verruga vulgar, Papiloma, Leucoplasia y Líquen plano).
- Comparar la cantidad de CLs en procesos infecciosos, neoplásicos benignos y preneoplásicos malignos.
- Determinar si el número de CLs es ó nó directamente proporcional al infiltrado inflamatorio.
- Establecer si la cantidad de CLs es directamente proporcional con el tamaño de la lesión.
- Relacionar la edad, sexo, tamaño y localización, con el número de CLs en diferentes lesiones.

II. MATERIALES Y METODOS

Muestras de tejido.

Se revisó el archivo del Laboratorio de Patología Bucal de la División de estudios de Postgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM, del año 1986-1990, seleccionandose al azar 37 casos que incluyen Verruga vulgar, Papilomas y Lesiones blancas, con rango de edad general de 7-77 años y con una \bar{X} = 35.41 años, veinticuatro pacientes corresponden al sexo femenino (68.56%), y once al sexo masculino (31.41%), y dos casos que no tenían datos de edad, sexo y localización de la lesión.

En los dieciseis casos de Verrugas vulgares (43.24%, Gráfica 1) diez casos corresponden a Verrugas vulgares intraorales y seis casos de Verruga vulgar extraoral, los pacientes tenían un rango de edad de 9-58 años (Gráfica 2), y cuatro pacientes sin datos de edad, con una \bar{X} = 27.92 años. Diez de los casos corresponden al sexo Femenino (71.42%) y cuatro al sexo Masculino (28.57%; Gráfica 3), así como dos casos sin datos de sexo.

En los doce casos de Papiloma (32.43%; Gráfica 1), los pacientes tenían un rango de edad de 7-62 años (Gráfica 2), y una \bar{X} = 34.5 años. Nueve de los casos corresponden al sexo Femenino (75%), tres al sexo Masculino (25%; Gráfica 4 y 6).

De las nueve Lesiones blancas (24.32%; Gráfica 1), tres corresponden a Displasias epiteliales leves, dos a Displasias epiteliales severas y 4 casos a Liquen plano. Los pacientes tenían un rango de edad de 28-77 años (Gráfica 2), y una \bar{X} = 47.55 años. Cinco casos corresponden al sexo Femenino (55.55%) y cuatro al sexo masculino (44.44%; Gráfica 5 y 6).

Se revisaron además once casos de tejido normal, donados por pacientes voluntarios de la Facultad de Odontología.

La edad de los pacientes osciló entre los 7-77 años (\bar{X} = 35.41 años), correspondiendo 24 pacientes al sexo Femenino (68.56 %), y 11 al sexo Masculino (31.41 %), y dos casos que no tenían datos de edad, sexo, ni localización.

Las muestras fueron fijadas en solución neutra de formalina y embebidas en parafina, se cortaron a 5 micrómetros y se tñieron con H/E (21), y con la técnica de Inmunohistoquímica Biotina-Avidina peroxidasa.

MATERIAL

EQUIPO

Histokinette
Microtomo y cuchillas
Centrífuga
Mezcladora para microtubos
Plancha
Microscopio de campo claro
Ocular milimetrado
Fotomicroscopio
Refrigerador
Congelador
Batería para tinción con Hematoxyilina y Eosina
Batería para tinción con Inmunoperoxidasa
Canastillas para tinción
Micropipeta de 1000 ul
Micropipeta de 200 ul
Micropipeta de 20 ul
Pipeta de bomba GR 10
Cronómetro
Lápiz de diamante
Pinzas
Tijeras

CRISTALERIA

Portaobjetos con pantalla y cubreobjetos
Pipetas de 10 ml
Frascos con tapa de rosca de 5 ml
Frascos con tapa de rosca de 1000 ml
Frascos de Coplin
Vaso de precipitado de 2000 ml
Vaso de precipitado de 1000 ml
Vaso de precipitado de 500 ml
Vaso de precipitado de 100 ml
Vaso de precipitado de 25 ml
Matraz Erlenmeyer de 2000 ml
Matraz Erlenmeyer de 1000 ml

Matraz Erlenmeyer de 500 ml
Probeta de 1000 ml
Probeta de 500 ml
Probeta de 100 ml
Probeta de 50 ml
Cajas de Petri

OTROS ACCESORIOS

Botes de plástico de 400 ml
Botes de plástico de 200 ml
Botes de plástico de 50 ml
Botes de plástico de 15 ml
Tubos de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml
Colgadero redondo de flotación para tubos de 1.5 ml
Puntas para micropipetas de 0-200 ml

REACTIVOS

Silano
Hematoxilina de Meyer
Eosina
Cloruro de sodio (NaCl)
Cloruro de potasio (KCl)
Fosfato de potasio (KH₂PO₄)
Fosfato de sodio (Na₂HPO₄)
Etanol
Metanol
Xileno
Ácido clorhídrico concentrado (HCL)
Hidróxido de Amonio (NH₄OH)
Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)
Tris base (ph=8)
Tetraclorhidrato de diaminobenzidina (DAB)
Suero de caballo concentrado
Agua desionizada
Agua destilada

ANTICUERPOS

Proteína S-100 (Anticuerpo policlonal Rabbit Anti-Cow S -100).
Anticuerpo anti-conejo. Biotinylated Anti-Rabbit IgG.
Biotina Avidina (ABC Kit Vector Laboratories, Inc.).

PREPARACION DE SOLUCIONES

METANOL (para reprimir la actividad de la peroxidasa endógena)

Para preparar 50 ml. En 50 ml de metanol se mezclan 300 ml de H₂O₂ al 0.6%.

SOLUCION SALINA AMORTIGUADA (PBS)

Preparación de 2 litros de PBS

Reactivos

1) Pesar:	
20 g.	NaCl
0.50 g.	KCl
2.89 g.	Na ₂ HPO ₄
0.50 g.	KH ₂ PO ₄

2) Disolver: Los reactivos se colocan en un matraz y se disuelven lentamente en 1800 ml de agua desionizada utilizando el agitador magnético.

3) Medir pH: Se mide el pH el cuál debe ser de 7.2 y se agrega agua hasta tener exactamente 2 litros (usar probeta).

Si el pH es menor de 7.2 se usa el ion NaOH (Hidróxido de Sodio)

Si el pH es mayor de 7.2 se agrega HCl (Acido Clorhídrico)

4) Vaciado: Se va vaciando en tubos de 400 ml, poniendo 200 ml en cada uno.

5) Esterilización: Se esteriliza a 15 libras de presión durante 20 minutos.

SUERO NORMAL AL 10% [BLOCKING BUFFER (BB)]

Para preparar 1 litro de suero se utiliza:

900 ml de PBS
100 ml de Suero de caballo concentrado

Todo ésto se mezcla perfectamente, se vacía en tubos de plástico de 15 ml, se puede congelar a -20 grados C, conservándose por largo tiempo y se va utilizando según se requiera.

TETRACLORHIDRATO DE DIAMINIOBENZIDINA (DAB)

3'-3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), es un sustrato de peroxidasa necesario para el uso de inmunoblott y procedimientos de tinciones inmunohistológicas. Este sustrato produce un producto final insoluble de color café que puede ser observado visualmente.

Este sustrato se prepara según las instrucciones del fabricante.

1 M (MOLAR) TRIS BASE pH=8.0

Trizma Base (Tris (hidroximetil) aminomethane)
 Grado de reactivo: Pureza del 99.9%
 Ciertos electrodos de pH no dan resultados exactos con el tris buffer.

Se prepara a temperatura ambiente
 Para preparar 1M (Molar) se necesita:
 1 litro de Agua desionizada
 Para obtener un pH=8.0
 Si el pH es menor de 8.0 se agrega hidróxido de sodio
 Si el pH es mayor de 8.0 se agrega ácido clorhídrico

PREPARACION DEL REACTIVO ABC (1:100)

4.5 ml de A (Avidina)
 4.5 ml de B (Enzima Biotinilada)
 0.5 ml de C (Blocking Buffer (BB))

Todas las sustancias se vierten en un frasco de cristal con tapa de rosca de 5 ml y se combinan con la ayuda de la mezcladora para microtubos, todas las preparaciones deben conservarse en refrigeración, en el momento de utilizarse, se colocarán en hielo para su mejor conservación.

NOTA: El reactivo ABC debe ser preparado aproximadamente 30 minutos antes de su aplicación y mantenerse en un recipiente con hielo.

PREPARACION DEL SUBSTRATO DAB

4.25 ml de Agua desionizada
 0.25 ml de 1 M de Tris-base (pH=8.0)
 5.0 ml de H2O2 (se agrega al final) (concentración
 final de 0.03%)
 0.5 ml de DAB

La preparación de este substrato debe realizarse en la obscuridad al igual que su aplicación sobre los cortes.

Todos los ingredientes se mezclan perfectamente, solo se añade el peróxido de hidrógeno al final, para evitar la actividad de la peroxidasa.

PROCEDIMIENTO

TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA

El procedimiento utilizado es el "Biotin Avidin" inmunoperoxidasa (Biotina-Avidina). Una vez obtenidos los cortes, se limita el contorno del tejido con un lápiz de diamante, se procede a desparafinizar (xilol, tres cambios) y rehidratar con agua desionizada durante 30 seg. y se sumergen en Metanol (300 ml de 0.6% de H2O2 en 50 ml de metanol) durante 1 hora a temperatura ambiente (para reprimir la actividad de la peroxidasa endógena). Los cortes se lavan con PBS.

Después de ésto, se colocan los cortes dentro de las cajas de Petri, las cuales tienen en el fondo papel filtro humedecido con agua desionizada, lo cual permite mantener un ambiente húmedo, evitando así la desecación del tejido, posteriormente se aplica suero normal por 1 hora para bloquear la actividad no específica ("blocking Buffer" suero de caballo al 10% en PBS, centrifugado por un minuto para remover los restos). Posteriormente los cortes se drenan y colocan nuevamente dentro de las cajas de Petri y se aplica sobre el tejido los anticuerpos (proteína S-100) y se incuban durante la noche a 4° C.

Al día siguiente los cortes se lavan con PBS, se colocan dentro de las cajas de Petri (debe evitarse que el tejido se deshidrate) y se aplican los segundos anticuerpos que corresponden al anticuerpo policlonal Anti-conejo (Rabbit Anti-Cow S-100) el Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, INC. y se incuban durante una hora a temperatura ambiente. Después los cortes se lavan con PBS y

se incuban con los reactivos intermediarios ABC (1:100) (los cuales son moléculas de peroxidasa biotinilada, enlazadas en una formación tridimensional a través de "Avidina") por una hora a 4° C. Nuevamente se lavan con PBS, se le añade el sustrato de tetraclorhidrato de diaminobenzidina ("diaminobenzidine tetrahydrochloride" (DAB)) (compuesto con agua desionizada, 1M tris base con un pH=8, DAB y H₂O₂, la preparación y el proceso debe realizarse en cuarto oscuro), se incuban exactamente por 10 minutos a temperatura ambiente. El producto de ésta reacción enzimática es un precipitado de color café oscuro. Este precipitado localiza la posición de los complejos de antígeno.

Los cortes se lavan con agua desionizada y se contrastan con Hematoxilina de Harris (33).

III. RESULTADOS

De acuerdo a la técnica de inmunoperoxidasa con proteína S-100, las células de Langerhans se tiñen de color café obscuro, tanto su cuerpo como sus proyecciones dendríticas. Para establecer la diferenciación entre Melanocitos (células dendríticas Figs 1A y B), Macrófagos (Figs 2A y B) o, zonas desmosómicas (Figs 3A y B), de aquellas lesiones que son S-100 positivas, se revisaron para descartar lo anterior laminillas teñidas con H/E. Para la identificación de CLs se tomaron en cuenta tres criterios: 1) Estar localizados basal y/o suprabasalmente; 2) Observar todo el cuerpo celular y 3) Por lo menos un proceso dendrítico (Figs 4A y B).

VERRUGA VULGAR

INTRAORAL

De los 10 casos revisados se encontró que sólo 5 fueron positivos a CLs (Tabla 1), encontrándose de 6-191 CLs en la totalidad de la superficie, obteniéndose un rango de 0.5-3.93 CLs por mm², con una \bar{X} = 1.168 y una s = 1.66 (Tablas 6 y 7; Fig. 5A).

EXTRAORAL

De los 6 casos revisados, 5 fueron positivos a CLs (Tabla 2), encontrándose un rango de 8-241 CLs en la totalidad de la superficie, con un rango por mm² de 1.43-15.95 CLs, con una \bar{X} = 6.52 y s = 6.69 (Tablas 6 y 7)

PAPILOMA

De los 12 casos revisados, 6 fueron positivos a CLs (Tabla 3), con un rango de 12-113 CLs en la totalidad de la superficie, y un rango por mm² de 0.8-16.82 CLs con un \bar{X} = 2.44 y s = 4.88 (Tablas 6 y 7; Fig. 5B).

LESIONES BLANCAS

De los 9 casos revisados, sólo uno fue positivo (Liquen plano; Tabla 4), con \bar{X} = 0.55 y s = 1.66 (Tablas 6 y 7).

TEJIDO NORMAL

Se revisaron 11 laminillas de tejido normal, de los cuales sólo uno fue positivo a CLs, con un total de CLs igual a 9, y con número de CLs por mm² de 2.13, con un \bar{X} = 0.194 y s = 0.642 (Tabla 6).



Fig. 1: (A) Tinción con H-E donde se observa la presencia de melanocitos (ML) en toda la capa basal en una verruga vulgar a 20x (B) en la misma lesión con el anticuerpo proteína S-100 se observan los melanocitos en la capa basal y CLs el estrato espinoso.

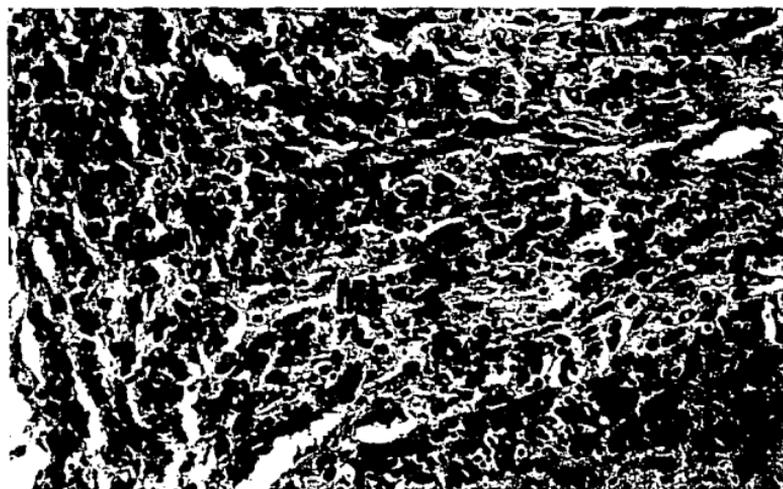
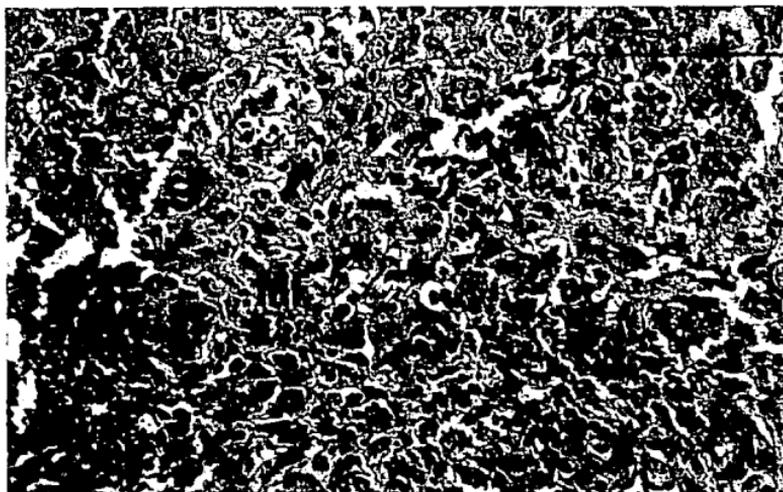


Fig. 2. Es necesario establecer la diferencia entre macrófagos (MF) y CLs (A); con H-E se observa en una displasia epitelial macrófagos (B) que son positivos al Ab proteína S-100 (aumento de 40X).

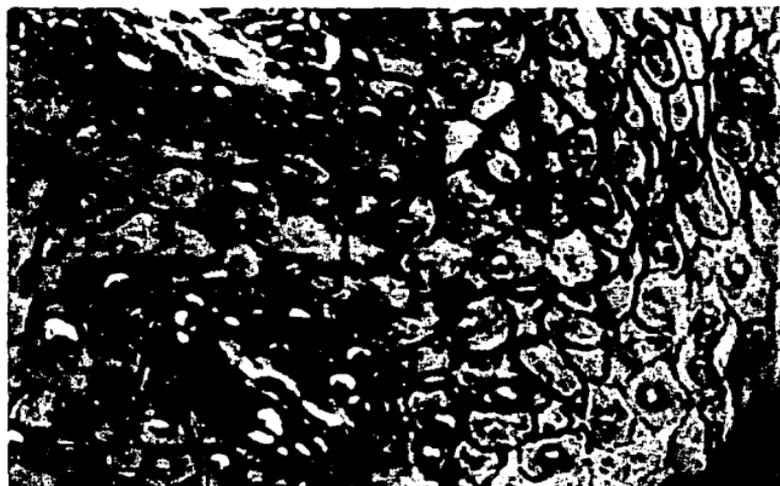


Fig. 3. (A) con H-E en la displasia epitelial se observan las uniones desmosómicas (B) que con el Ab proteína S-100 pueden ser positivas y confundirse con CLs (flechas).

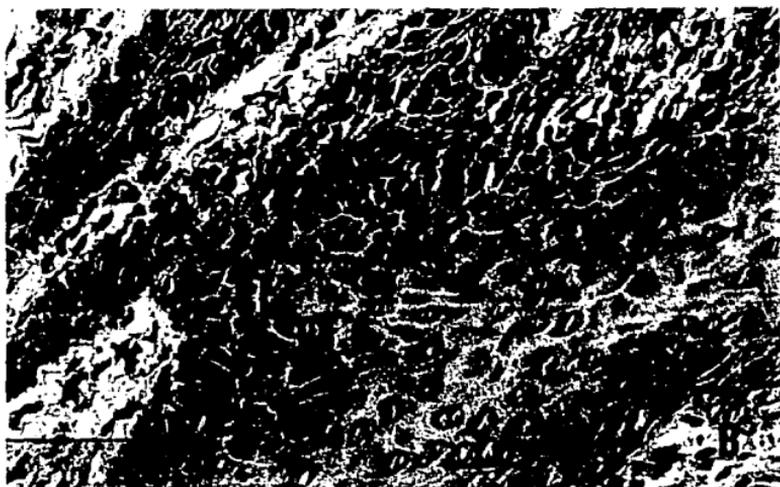
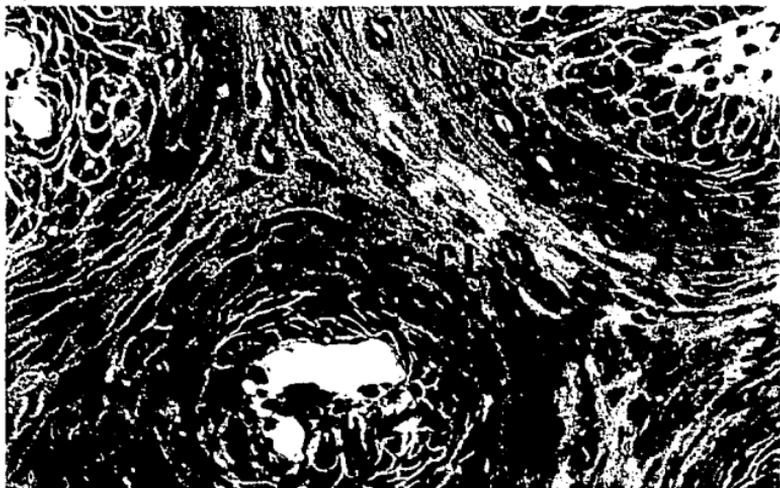


Fig. 4. Proteína S-100. Las células se localizan tanto (A) en el estrato basal como suprabasal, observándose todo su cuerpo celular con una o más procesos dendríticos (B) observadas en una verruga vulgar (40x).

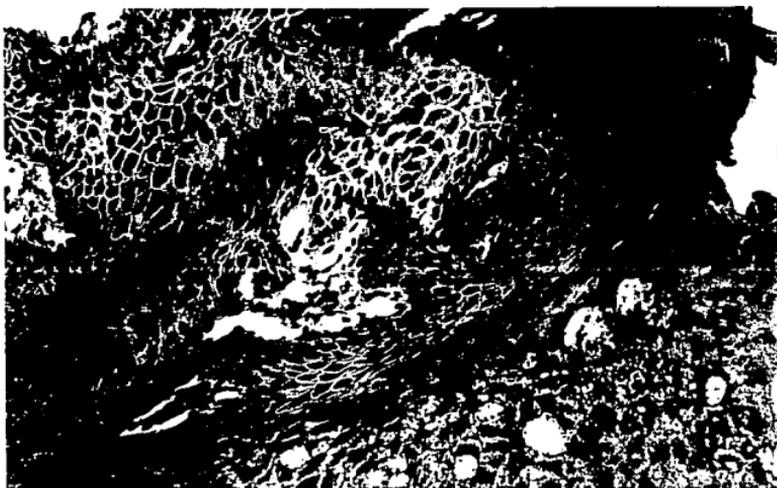
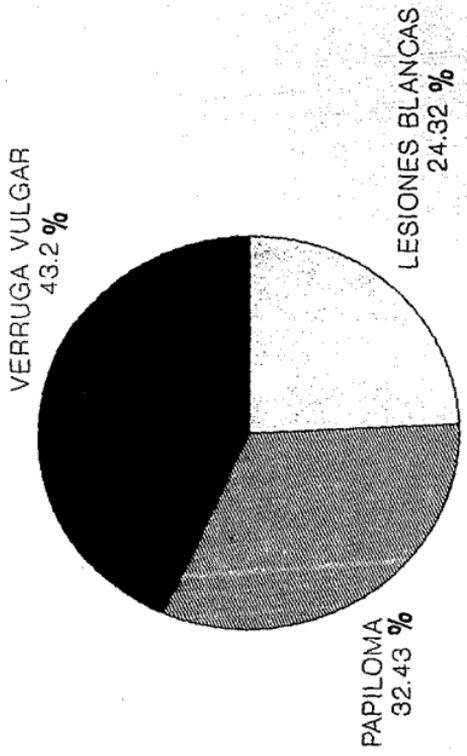


Fig. 5. Proteína S-100. (A) Las lesiones de verruga vulgar presentan mayor cantidad de CLs a 20x (B) que los papilomas (20x), podemos observar que en ambas figuras el cuerpo celular y las proyecciones dendríticas de las CLs.

Grafica 1. Porcentaje de cada lesion



Grafica 2. Distribución de Número de Casos Examinados por Edad

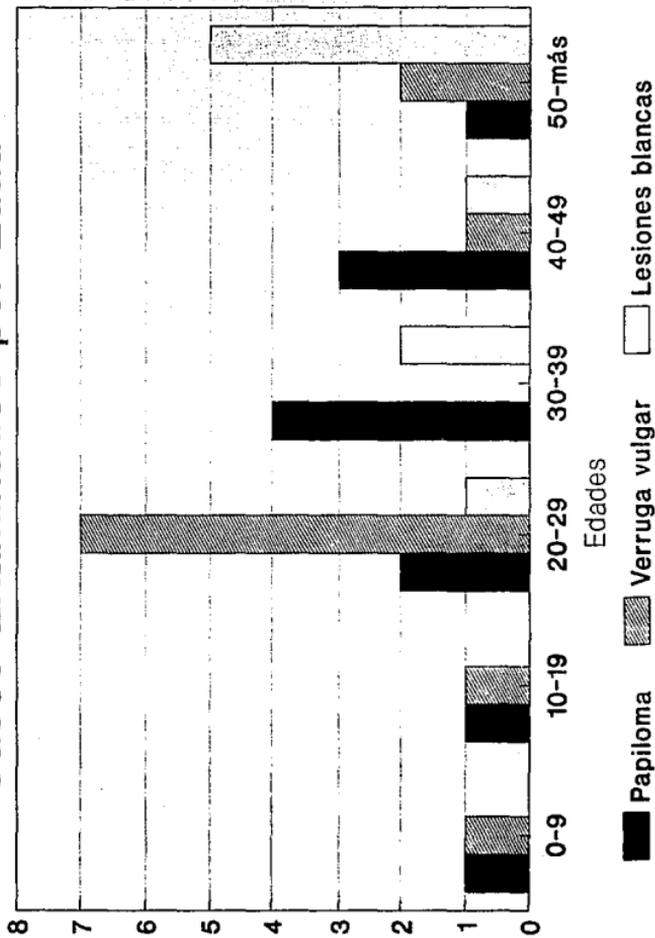


TABLA 1.- VERRUGA VULGAR: CUANTIFICACION DE CELULAS DE LANGERHANS
EN LESIONES INTRAORALES POR MEDIO DE PROTEINA S-100.

Caso	Año	Edad	Sexo	Sitio de la lesion	Superficie epitelial (mm2)	Total de CL	No. de CL por mm2.
FO213	87	58	F	Encia sup	9.28	6	0.65
FO079	86	54	F	BLeng der	16.0	8	0.5
FO138	88	29	F	MBuc der	50.24	0	0
FO111	88	28	F	BLeng	34.08	0	0
FO043	87	19	F	VentLeng	1.12	0	0
FO196A	87	9	F	Lengua	38.88	108	2.77
FO196B	87	9	F	MBuc der	49.92	191	3.83
FO257	88	-	F	DorsLeng	24.48	0	0
FO260	88	SIN DATOS			31.68	124	3.93
FO070	89	SIN DATOS			22.4	0	0

CL = Células de Langerhans

F = Femenino, M = Masculino

BLeng = Borde de Lengua; DorsLeng = Dorso de Lengua; VentLeng =
Cara ventral de la lengua; MBuc = Mucosa bucal;

Grafica 3. Frecuencia de Verruga vulgar en Sexo Masculino y Femenino

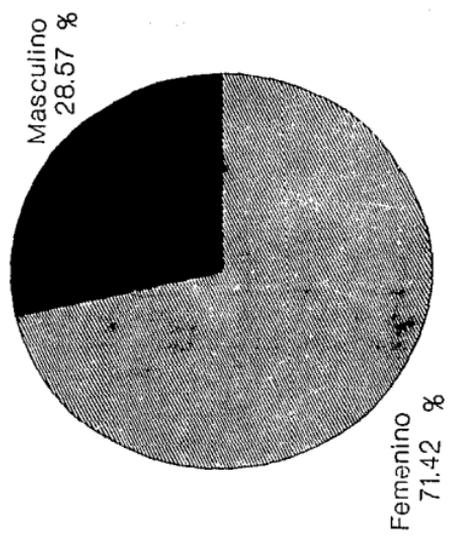


TABLA 2.- VERRUGA VULGAR: CUANTIFICACION DE CELULAS DE LANGERHANS EN LESIONES EXTRAORALES POR MEDIO DE PROTEINA S-100.

Caso	Año	Edad	Sexo	Sitio de la lesion	Superficie epitelial (mm2)	Total de CL	No. de CL por mm2.
FO103	88	41	M	Parpado	9.6	131	13.64
FO356	86	25	M	Axila	1.84	8	4.34
FO136	88	25	F	Cuello der	9.12	145	15.95
FO148	87	22	M	PNar der	64.0	241	3.76
FO265	88	22	M	Ded indic	29.44	42	1.43
FO295C	87		F	Ortejo	8.0	0	0

CL = Células de Langerhans

F = Femenino, M = Masculino

PNar = Piso de la nariz; Cuello = Area lateral; Ded indic = Dedo indice.

TABLA 3.- DETERMINACION DE CELULAS DE LANGERHANS CON PROTEINA
S-100 POR EN PAPILOMAS.

Caso	Año	Edad	Sexo	Sitio de la lesion	Superficie epitelial (mm2)	Total de CL	No de CL por mm2
FO211	86	62	F	Piso boca	16.92	0	0
FO127A	86	49	M	PLeng	30.16	25	0.8
FO127B	86	49	M	Lab inf	33.63	0	0
FO464	90	46	F	Lengua	9.12	0	0
FO412	90	36	F	Pal blan.	19.2	30	1.56
FO262B	86	35	F	MBucal izq	39.2	113	2.88
FO262C	86	35	F	ComLab izq	1.92	12	6.25
FO036	86	34	F	MLab. inf	31.36	0	0
FO201	86	23	F	Com Lab	2.08	35	16.82
FO104	87	21	F	Lab inf	12.48	12	0.98
FO329	86	17	M	Encia 2,3	1.92	0	0
FO411	90	7	F	Encia	11.52	0	0

CL = Células de Langerhans.

F= femenino; M= masculino

MLab. = mucosa labial; PLeng= punta de lengua; Com Lab = comisura labial; MBucal = mucosa bucal; Pal blan. = paladar blando.

Grafica 4. Frecuencia de Papiloma en Sexo Masculino y Femenino

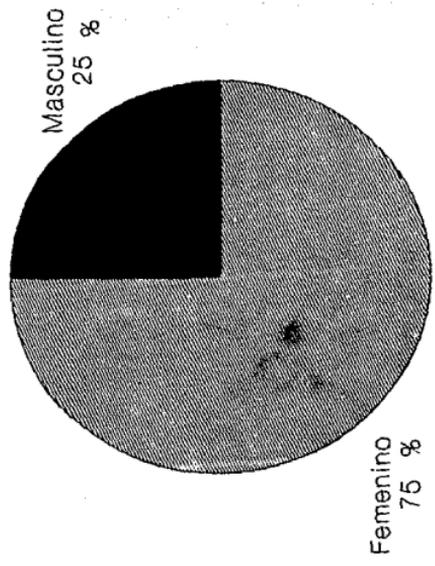


TABLA 4.- DETECCION DE CELULAS DE LANGERHANS POR PROTEINA S-100
EN LESIONES DIAGNOSTICADAS CLINICAMENTE COMO LEUCOPLASIA Y LIQUEN
PLANO

Caso	Año	Edad	Sexo	Sitio de la lesion	Superficie epitelial (mm ²)	Total de CL	No de CL por mm ²	Diagnos. histopatológico
FO021	87	33	F	PisBoc	3.52	0	0	Atip epite severa.
FO053	87	77	M	Encia	11.2	0	0	Liquen plan
FO189	87	30	F	BPleng	25.92	0	0	Atip epite severa
FO151	88	53	F	MBuc der	0.96	5	5	Liquen plan
FO381	89	50	F	FMB der	2.56	0	0	Liquen plan
FO353	90	48	M	RRe inf	9.56	0	0	Atip epite leve
FO354	90	53	M	MBuc	3.2	0	0	Leucoedema
FO496	90	28	M	Ventleng	13.44	0	0	Atip epite leve
FO512	90	55	F	MBuc izq	17.6	0	0	Liquen plan

CL= Células de Langerhans

F= femenino; M= masculino

BPleng= borde posterior de la lengua; PisBoc= piso de la boca;

MBuc= mucosa bucal; FMB= fondo de mucosa bucal; Ventleng= cara

ventral de la lengua; RRe= reborde alveolar.

Hiperq= hiperqueratosis; Atip epite= atipia epitelial; Liquen

plan= Liquen plano.

Grafica 5. Frecuencia de Lesiones blancas en Sexo Masculino y Femenino

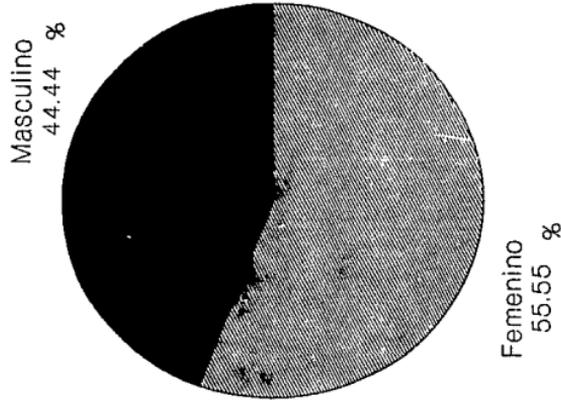


TABLA 5.- Muestras de tejido sano. Cuantificación de
 Celulas de Langerhans con proteína S-100.

Muestra	Año	Edad	Sexo	Sitio de muestra	Superficie epitelial (mm2)	Total de CLs	No de CLs por mm2
FOI252	92	23	F	Paladar	5.12	0	0
FOI254	92	24	M	Paladar	2.56	0	0
FOI256	92	23	M	Lengua	6.4	0	0
FOI257	92	22	F	MBucal	10.56	0	0
FOI259	92	21	F	MBucal	1.92	0	0
FOI260	92	22	M	MBucal	4.8	0	0
FOI261	92	23	F	RAlveolar	57.6	0	0
FOI262	92	21	F	RAlveolar	4.08	9	2.13
FOI263	92	24	M	RAlveolar	3.6	0	0
FOI264	92	23	F	MBucal	2.24	0	0
FOI265	92	24	M	MBucal	13.92	0	0

CLs= Células de Langerhans
 F= Femenino; M= Masculino
 MBucal = Mucosa bucal
 RAlveolar= Reborde alveolar

Tabla 6. Media (\bar{x}), desviación estandar (S) y variación de cada lesión.

Lesión	\bar{x}	S	Variación
VV intraoral	1.168	1.66	3.43
VV extraoral	6.52	6.69	14.52
Papiloma	2.44	4.88	16.02
Lesiones blancas	0.55	1.66	5.0
Tejido normal	0.194	0.642	2.13

La variación se determinó entre el mayor y menor número de CLs

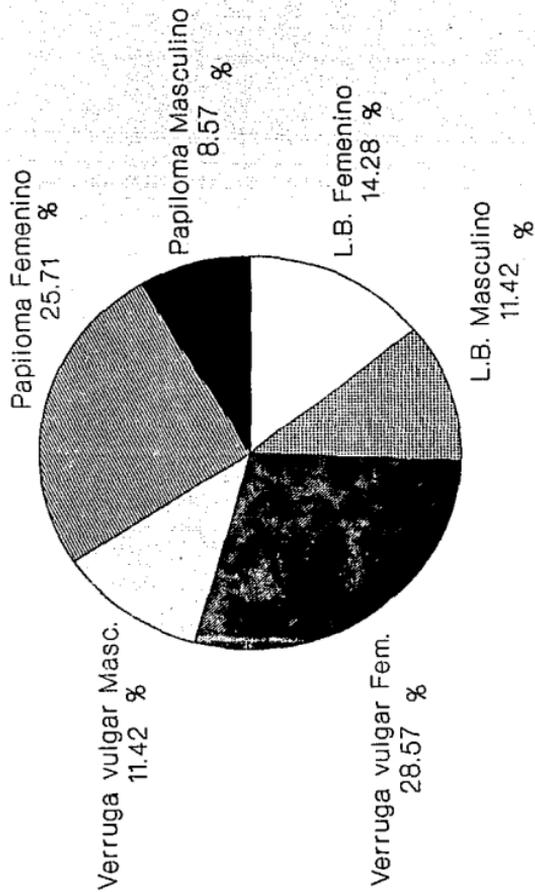
Tabla 7. Comparación entre sexo y tipo de lesión.

Lesión	Sexo	Número de casos	Porcentaje total entre lesión	Porcentaje por lesión
VV	M	4	11.42%	28.57%
	F	10	28.57%	71.42%
Papiloma	M	3	8.57%	25%
	F	9	25.71%	75%
Lesiones blancas	M	4	11.42%	44.44%
	F	5	14.28%	55.55%

M= masculino, F= femenino.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Grafica 6. Frecuencia de Lesiones Epiteliales en Sexo Masculino y Femenino



IV. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio piloto no coinciden con los hallazgos de Bachin (4) en tejido normal. De los once casos revisados de los pacientes donadores (sin ninguna alteración en mucosas y en su estado de salud en general) solo se encontró una muestra positiva a proteína S-100 (Tabla 5), lo que posiblemente indica que no se encuentra en pacientes con mucosa sana lo que pone en duda los hallazgos de Cruchley (5).

Es importante hacer notar que las lesiones virales estimulan en mayor grado la presencia de CLs principalmente en aquellas localizadas extraoralmente (Tabla 2) y que a pesar de que se trata de un epitelio queratinizado esto no interfiere en el número de CLs como sucede en cavidad bucal expuesto por Daniels (14), que menciona que en los epitelios queratinizados se encuentra menor cantidad de CLs pero ¿Qué pasa con aquellas lesiones en las cuales no existe respuesta de CLs?. Esto llama la atención porque tanto lesiones de gran tamaño no influye para que las CLs estén presentes, pero quizá sí la presencia de infiltrado inflamatorio crónico es abundante o escaso esto podrá influir en el número de CLs presentes en cada tipo de lesión ya sea de origen viral (Tablas 1 y 2) o neoplásico benigno (Tabla 3) o maligno.

Entonces el estudio y comprensión de las CLs puede ayudar para encontrar ciertas respuestas que expliquen el desarrollo de lesiones infecto contagiosas en la población infantil y juvenil mexicana Sedano (34), Donohue (35) así como también para explicar el comportamiento biológico de lesiones neoplásicas benignas y preneoplásicas malignas que día con día se incrementan en la población adulta joven y que se va agudizando entre los adultos (36) llevando consigo a un comportamiento más agresivo que puede llevar a la muerte del individuo.

La cantidad de CLs que fueron encontradas en las lesiones de Liquen plano contradicen lo expuesto por Chou (19) y Cruchley (5) que señalan en este tipo de lesiones un incremento significativo de CLs, Farthing (18) (Tabla 4).

V. CONCLUSIONES

1. Independientemente del infiltrado inflamatorio, las CLs pueden estar o no presentes.

2. En la mayoría de las lesiones premalignas no se encontraron CLs.

3. Probablemente la presencia del virus (Papilovirus) estimula la presencia de CLs.

4. En las lesiones premalignas, tal vez no existan factores estimulantes suficientes para inducir la presencia de CLs o, estos factores estimulantes de la quimiotaxis de CLs se encuentran ocultos y no sean captados por ellos.

5. No existe una relación directa entre el tamaño de la superficie epitelial y la cantidad de CLs.

6. La cantidad de CLs que se presentan en lesiones de mucosa bucal es menor que en las lesiones de piel.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Wolf K. (1967) The fine structure of the Langerhans cell granule. *J. Cell Biol.* 35, 468-473.
- 2.- Wolf K. (1972) The Langerhans cell. *Curr. Prob. Derm.* 4, 79-145.
- 3.- Daniels TE (1984) Human mucosal Langerhans cells: Postmortem identification of regional variation in oral mucosa. *J. Invest Dermatol* 82:21
- 4.- Baehim, V; Fejerskow, O; Davelstien, E. (1989) Langerhans cells in oral epithelium of chronically inflamed human gingival. *J. Periodont Res* 24, 127-136.
- 5.- Cruchley, AT; Williams, D.M; Farthing, P.M.; Lesh, C.A.; Squire, C.A. (1989) Regional variation in Langerhans cell distribution and density in normal human oral mucosa determined using monoclonal antibodies against CD1, HLADR, HLADQ, and HLADP. *J. Oral Pathol. Med.* 18, 510-516.
- 6.- Schweizer, J. and Marks, F. (1977) A developmental study of the distribution and frequency of Langerhans cells in relation to formation of patterning in mouse tail epidermis. *The J. Invest. Dermatol.* 69, 198-204.
- 7.- Van Mens and J. James (1979) The Langerhans cells density of palatal epithelium in denture and non denture wearers, as correlated with other parameters of the palatal mucosa. *J. of Oral Rehabilitation.* 6, 337-344.
- 8.- Kurihara, K. and Hashimoto, N. (1985) The pathological significance of Langerhans cells in Oral cancer. *J. Oral Pathol.* 14, 289-298.
- 9.- Charbit, Y, Monteil RA, Hitzig C, Sauget P, Benaiche N, Jasmin JR. (1986) S-100 immunolabelling of langerhans cells in oral epithelium. *J Oral Pathol.* 15, 419-422.
- 10.- Newcomb G.M. and Powell R.N. (1986) The ultrastructure of human gingival Langerhans cells in Health and disease. *Archs Oral Biol.* 31 (11), 727-734.
- 11.- Francis C.A. and Farthing P.M. (1989) The response of Langerhans cells to palatal cover plates in the rat. *Archs oral Biol.* 5, 377-381.

- 12.- Breatnach AS (1977) Variations in ultrastructural appearance of Langerhans cells in normal human epidermis. Br. J. Derm. suppl. 15, 97-14.
- 13.- van Loon LAJ, Krieg SR, Davidson CL, Bos JD (1989) Quantification and distribution of lymphocytes subsets and Langerhans cells in normal human oral mucosa and skin. J. Oral Pathol Med. 18, 197-201.
- 14.- Daniels T.E , O. Shwartz, V. Larsen, E. Dabelsteen and Pingbord (1985) Langerhans cells in candidal leukoplakia. J. Oral Pathol. 14, 733-739.
- 15.- Walsh L.J., Powell R.N. , Seymour G.J. and Newcomb G.M. (1984) Loss of Langerhans cells from gingival tissue maintained in organ culture. J. of Oral Pathology. 13, 604-613.
- 16.- Barrett AW, Williams DM, Scott J. (1991) Effect of tobacco and alcohol consumption on the Langerhans cells population of human lingual epithelium determined using a monoclonal antibody against HLADR. J. Oral Pathol Med. 20, 49-52.
- 17.- Pitilaga, Arachchi A; Crane IJ; Scully C; Prime SS. (1989) Epithelial dendritic cells in pathological human oral tissues. J Oral Pathol Med. 18, 11-16.
- 18.- Farthing PM, Matear P, Cruchley AT. (1990) The activation of Langerhans cells in oral lichen planus. J. Oral Pathol Med. 19, 81-85.
- 19.- Chou MJ, Daniels TE. (1989) Langerhans cells expressing HLA-DQ, HLA-DR and T6 antigens in normal oral mucosa and lichen planus. J. Oral Pathol Med. 18, 573-576.
- 20.- Ishii T, Walsh LJ, Seymour GJ, Powell RN. (1990) Modulation of Langerhans cells surface antigen expression by recombinant cytokines. J. Oral Pathol Med. 19, 355-359.
- 21.- Regezi J.A. y Sciubba J.. Patología Bucal, editorial Interamericana Mc Graw Hill, pag. 109-114, 177-180, 182-184.
- 22.- Syrjänen S., Syrjänen KJ and Lamberg MA. (1986) Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions using in situ DNA-hybridization applied on paraffin sections. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 62:660-667.
- 23.- Young SK and Min KW. (1991) Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 71:726-729.

- 24.- Mc Carthy PhL and Shklar G (1980). Diseases of oral mucosa; segunda edición. Lea & Febiger Philadelphia, 203-223.
- 25.- Arendt DM, Platkajs MA, Lesby TS and Scofield HH. (1986). Cylindrical cell papilloma. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 61:382-387.
- 26.- Bouquot JE., Weiland LH and Kurland LT. (1988) Leukoplakia and carcinoma in situ synchronously associate with invasive oral/oropharyngeal carcinoma in Rochester, Minn., 1935-1984. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 65:199-207.
- 27.- Baudet-Pommel M., Janin-Mercier A. and Souteyrand P. (1991). Sequential immunopathologic study of oral lichen planus treated with tretinoin and etretinate. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 71:197-202.
- 28.- Shafer W, Hine M y Levy B. (1991) Tratado de Patología Bucal. Editorial Interamericana, 4ª Ed. pag. 82-88, 92-100, 757-751, 841-846.
- 29.- Pindborg JJ. (1981). Cancer y Precancer bucal. Editorial Panamericana. pag. 29,30.
- 30.- Van der Waal I. and Maurits WA. Oral Pathology; Quintessence publishing Co., Inc. 1988, pag. 32.
- 31.- Creath CJ, Cutter G, Bradley DH, and Wright JT. (1991) Oral leukoplakia and adolescent smokeless tobacco use. Oral Sur. Oral Med. Oral Pathol. 72:35-41.
- 32.- Diccionario Médico Roche. (1993). Ediciones Doyma Barcelona España, pag. 934.
- 33.- Pindborg JJ and Reibel J. (1985) Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. J. of oral pathol. 14:698-708.
- 34.-Lacy MF, Reade PC and Hay KD. (1983). Lichen planus: A theory of pathogenesis. Oral Surg. 56 (5): 521-526.
- 35.- Porter K and Klouda P. (1993). Class I and II HLA antigens in British patients with oral lichen planus. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 75:176-80.
- 36.- Luna LG (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd. Ed. Washington, pag. 258.

37.- Sedano H.O., Carreon FE, Garza de la GML. (1989) Clinical parodontal abnormalities in mexican children. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 68:300-311.

38.- Donohue A., Aguirre A., Leyva E., Ledezma C., Aldape B., and Lara A., (1991) Prevalence of oral mucosal disturbance in adult mexican population. J. Dentan Research. 70: especial issue: 304.

39.- Ponce S., Franco F., Portilla J., (1990) Isolation and identification of Candida in lesions of oral mucosa. J. of Dental Research 69: especial issue.