

**“PRESENCIA DE CELULAS DE LANGERHANS EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL ANTES DE
UN TRATAMIENTO PERIODONTAL, EN LA FACULTAD DE
ODONTOLOGIA, DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA”**

TESIS PRESENTADA POR:

DAVID ESTUARDO CASTILLO HERNÁNDEZ

**Ante el tribunal de la Facultad de Odontología de la Universidad de
San Carlos de Guatemala, que practicó el Examen General Público,
previo a optar al título de:**

CIRUJANO DENTISTA

Guatemala, Agosto del 2001

**PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central**

DL
09
T(1100)

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Decano: Dr. Carlos Alvarado Cerezo.
Vocal Primero: Dr. Manuel Miranda Ramírez.
Vocal Segundo: Dr. Luis Alberto Barillas Vásquez.
Vocal Tercero: Dr. César Mendizábal Girón.
Vocal Cuarto: Br. Edgar Areano Berganza.
Vocal Quinto: Br. Sergio Pinzón Cáceres.
Secretario: Dr. Otto Raúl Torres Bolaños.

TRIBUNAL QUE PRACTICO EL EXAMEN GENERAL PUBLICO

Decano: Dr. Carlos Alvarado Cerezo.
Vocal Primero: Dr. Manuel Miranda Ramírez.
Vocal Segundo: Dra. Mayra Sofía Callejas Rivera.
Vocal Tercero: Dr. José Manuel López Robledo.
Secretario: Dr. Otto Raúl Torres Bolaños.

DEDICO ESTE ACTO

- A DIOS: Por darme el don de la vida, y llenar mi vida de bendiciones.
- A MIS PADRES: David Castillo Noriega y Amanda Hernández de Castillo, gracias por su amor y apoyo incondicional y por ser mi mejor ejemplo.
- A MIS HERMANAS: Irma Leticia y Arely Magaly, por el apoyo y cariño que me han brindado en todo momento. Las quiero mucho.
- A MIS ABUELITOS: Carlos Castillo Castillo (Q.E.P.D), Francisca Noriega de Castillo, Magdaleno Hernández Galindo, Saturnina Del Cid de Hernández, con mucho cariño.
- A MIS TIOS: Especialmente a Filiberto Castillo y Kyta Hernández, por el apoyo brindado, gracias por ese cariño.
- A MIS PRIMOS: Con cariño.
- A MI CUÑADO Y SOBRINOS: Kerin, Danielito y Amy.
- A MIS AMIGOS: Por su valiosa y gran amistad en estos años.
- A MIS CENTROS DE ESTUDIO: Por mi formación académica y en especial a la Universidad de San Carlos de Guatemala.

DEDICO ESTA TESIS

Y AGRADEZCO

A mi Patria Guatemala.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A la Facultad de Odontología.

A mis Catedráticos.

A mi Asesora.

Dra. Sofía Callejas Rivera.

A la Familia Barrios García.

Al municipio de Casillas, Santa Rosa.

A todos mis pacientes.

A todas las personas que colaboraron con la realización de la presente investigación.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de tesis titulado "PRESENCIA DE CELULAS DE LANGERHANS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL, ANTES DE UN TRATAMIENTO PERIODONTAL, EN LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS", conforme lo demandan los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala previo a optar al título de Cirujano Dentista.

Deseo manifestar mi más sincero agradecimiento a mi asesora, Dra. Sofía Callejas Rivera por su orientación, paciencia y asesoramiento en la realización de este trabajo de investigación, así como a la Licda. Blanca Callejas Rivera, Dr. Oscar Toralla de León y las señoras técnicas de laboratorio Mayra Duarte de Pérez, Doris Abrego Osorio, por su valiosa colaboración en la realización del estudio de campo de la presente investigación.

Atentamente.

INDICE

• Sumario.....	1
• Introducción.....	3
• Justificación.....	4
• Revisión de Literatura:	
Capítulo I, Inmunidad.....	6
Capítulo II, Células de Langerhans.....	23
Capítulo III, Enfermedad periodontal.....	43
Capítulo IV, Técnicas inmunohistoquímicas de coloración.	60
• Objetivos.....	72
• Variables.....	73
• Metodología.....	77
• Presentación, análisis e interpretación de resultados.....	92
• Discusión de resultados.....	98
• Conclusiones.....	100
• Recomendaciones	101
• Limitantes.....	103
• Anexos.....	105
• Bibliografía.....	108

SUMARIO

Las células de Langerhans tienen participación activa en la respuesta inmune de los sistemas linfoides y también en la reacción sistémica del cuerpo ante las infecciones y heridas, presentando antígenos a los linfocitos T.

El presente estudio tuvo como propósito determinar la presencia o ausencia de células de Langerhans en el epitelio bucal de pacientes que presentaban enfermedad periodontal y que aún no habían sido sometidos a tratamiento periodontal alguno.

Se evaluaron 20 pacientes, que fueron divididos en dos grupos: **Grupo 1**, 10 pacientes con diagnóstico de gingivitis; **Grupo 2**, 10 pacientes con diagnóstico de periodontitis.

En cada paciente se realizó una biopsia de tejido gingival, las cuales fueron fijadas, seccionadas y teñidas a través de técnicas de inmunohistoquímica, en las que por medio de anticuerpos de proteína S-100 se buscó determinar la ausencia o presencia de células de Langerhans. A su vez dichos anticuerpos fueron detectados con métodos de enzima inmunoperoxidasa.

Los resultados obtenidos mostraron que en el grupo de pacientes con diagnóstico de gingivitis (Grupo 1), en un 30% de los mismos se registró presencia moderada de células de Langerhans, en un 60% existió poca presencia de dichas células y hubo ausencia de células de Langerhans en un 10%.

En el grupo de pacientes con diagnóstico de periodontitis (Grupo 2), en un 40% existió presencia moderada de células de Langerhans, en un 50% se observó poca presencia de dichas células y un 10% de los casos no fueron evaluables. Tanto en los casos de gingivitis como de periodontitis, las células inflamatorias estuvieron presentes en todos los pacientes, predominando un infiltrado de monocitos y linfocitos.

Al analizar los valores obtenidos antes de un tratamiento periodontal, se observó que la mayoría de los pacientes con enfermedad periodontal presentaron poca cantidad de células de Langerhans.

Todo lo anterior nos puede llevar a la conclusión de que en presencia de enfermedad periodontal las células de Langerhans tienden a disminuir en número, como consecuencia del ataque constante y persistente de microorganismos de la placa bacteriana, la cual conduce al agotamiento de estas células. Dicha disminución o agotamiento de las células de Langerhans en los tejidos gingivales, puede provocar el progreso de la enfermedad periodontal a estados más avanzados, ya que la escasa cantidad de células de Langerhans no permite una respuesta inmune adecuada.

INTRODUCCION

En mención a los problemas de salud, se relacionan las alteraciones en la cavidad oral, siendo uno de los problemas de mayor incidencia la enfermedad periodontal, la cual a su vez contribuye al deterioro del estado de salud general de una persona.

Las células de Langerhans desempeñan un papel inmunológico de mucha relevancia durante el desarrollo y establecimiento de la enfermedad periodontal. El poder establecer la influencia que tiene el grado de severidad de la enfermedad periodontal, sobre la ausencia o presencia de dichas células, se hace necesario.

En el presente estudio se determinaron los niveles en cantidad de células de Langerhans presentes, así como la ausencia de las mismas, en 20 pacientes que presentaron enfermedad periodontal y que aún no habían recibido el tratamiento periodontal respectivo.

A estos pacientes se les estableció el estado de salud periodontal, con base en las manifestaciones clínicas que presentaban, luego se tomaron muestras de tejido gingival, en las cuales a través de análisis microscópico se determinó la ausencia o presencia de las células en mención. Los resultados obtenidos fueron analizados y discutidos, lo que dio lugar a las conclusiones del presente trabajo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad periodontal es considerada como una enfermedad multifactorial, en donde las células de Langerhans como parte del sistema inmunológico, juegan un papel principal en el establecimiento y progresión de la enfermedad.

Las células de Langerhans son encontradas normalmente en tejido gingival sano, tienen el papel principal de reconocer y procesar los antígenos, para luego presentarlos ante el linfocito T, quien seguidamente se encargará de eliminar el agente extraño (antígeno). Si estas células se encuentran ausentes en el tejido gingival, la respuesta celular inmune se verá alterada y como consecuencia la posibilidad de progreso de la destrucción de tejidos periodontales permanecerá.

El presente estudio determinó la presencia o ausencia de estas células en pacientes con diagnóstico de gingivitis y periodontitis antes del tratamiento periodontal, para posteriormente evaluar la influencia que tiene la enfermedad periodontal sobre la ausencia o presencia de dichas células y de esa manera obtener mayor información sobre los mecanismos inmunes de la enfermedad periodontal.

JUSTIFICACION

Uno de los factores causantes principales para el desarrollo de las enfermedades periodontales es la acumulación de placa bacteriana. Es conocido el papel inmunológico que juegan las células de Langerhans ante la presencia de placa bacteriana y su función como célula presentadora de antígenos ante los linfocitos T.

Al existir una exposición continuada del antígeno (placa bacteriana) sobre los tejidos de soporte dentario, ocurren procesos de inflamación crónica en donde prevalece la presencia de linfocitos T, el poder determinar la presencia o ausencia de estas células en pacientes con procesos periodontales crónicos, permitió establecer la permanencia o agotamiento de dichas células, como presentadoras de antígenos a los linfocitos T y de esa manera asociarlas con el grado de severidad de la enfermedad periodontal.

El presente estudio se realizó con el fin de determinar la presencia o agotamiento de células de Langerhans en pacientes con diagnóstico de gingivitis y periodontitis, debido a que no existe suficiente información bibliográfica en relación a dicho tema, en el medio nacional.

REVISIÓN DE LITERATURA

CAPITULO I

INMUNIDAD

Todo ser viviente está rodeado por microorganismos potencialmente nocivos. Todos los órganos han desarrollado una elaborada red de defensas diseñadas para excluir a estos potenciales invasores o para derrotarlos en el caso de que logran entrar al cuerpo.

El término inmunidad significa entonces, capacidad del cuerpo para protegerse contra agentes específicos, como bacterias, virus, toxinas o células tisulares extrañas.(25)

El proceso de inmunidad se divide en dos tipos:

A. Inmunidad innata

Es una de las dos divisiones funcionales del sistema inmune y actúa como la primera línea de defensa contra agentes infecciosos.

Su característica principal es que “no tiene especificidad”, por lo que se pueden unir a una amplia variedad de microorganismos.

Ante la agresión de algún patógeno, primeramente entran a funcionar una variedad de barreras físicas y bioquímicas en el cuerpo, que forman parte de este sistema, tales como:

- la piel
- el ácido gástrico
- la lisozima en muchas secreciones
- hileras de cilios en la tráquea

Estos hacen que la mayoría de los patógenos sean controlados antes que se establezca la infección.

Si los microorganismos logran penetrar estas barreras, entonces entran en acción los componentes celulares de este sistema.(25)

B. Inmunidad Adquirida

Si la primera línea de defensa, compuesta por las barreras físicas y bioquímicas así como por sus componentes celulares, es sobrepasada, se activará el sistema inmunológico adquirido el cual “presentará una alta especificidad para cada agente infeccioso”, lo cual erradica al agente invasor.

Este sistema también “recuerda” al agente infeccioso, desarrollando una inmunidad frente a la enfermedad que persiste durante el resto de la vida, por lo que sí en el futuro el individuo vuelve a sufrir una infección con el mismo patógeno, las respuestas serán más rápidas y eficaces. (25)

CELULAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO INMUNOLOGICO

Las células que participan en el proceso inmunológico se conocen en conjunto como **leucocitos**. Estos se dividen en varios grupos celulares, de los cuales, unos participan en el sistema de inmunidad innata y otros en el sistema de inmunidad adquirida.(25)

Origen

Todas las células que forman parte del sistema inmunológico provienen de las células pluripotenciales de la médula ósea, de la siguiente manera:

A. Célula progenitora linfoidea. Tiene la capacidad de diferencia en:

A.1 Linfocitos B

A.2 Linfocitos T

B. Célula progenitora mieloidea. Tiene la capacidad de diferenciarse en

B.1 Monocitos

Estos luego de su formación viajan a los tejidos conectivos donde se convierten en **macrófagos**.

B.2 Leucocitos Granulosos

Estos contienen gránulos citoplasmáticos, que les proporcionan un aspecto granuloso, razón por la cual se conocen como leucocitos granuloso, entre los que están:

Neutrófilos

Basófilos

Eosinófilos (25)

Células que participan en la inmunidad innata

Las células que participan en la inmunidad innata son los macrófagos y los neutrófilos quienes se originan de una célula pluripotencial mieloidea y poseen una acción netamente fagocítica, de la palabra griega fago, que quiere decir comer.

Cuando un agente extraño o un microorganismo nocivo penetran al organismo, los neutrófilos y/o macrófagos lo identifican y localizan con el fin de llevar a cabo el proceso de fagocitosis. Antes de que pueda producirse la fagocitosis, el microorganismo tiene que adherirse a la superficie del neutrófilo o del macrófago. En la membrana plasmática de la célula existen receptores adyacentes que se van adhiriendo secuencialmente a la superficie del microorganismo, como consecuencia la membrana plasmática es traccionada alrededor de la partícula hasta que ésta queda encerrada por completo en una vacuola (saco que encierra al microorganismo).

Luego en el transcurso de un minuto, los gránulos citoplasmáticos de las células, se fusionan con la vacuola y liberan su contenido alrededor del microorganismo aprisionado, el cual es sometido a una batería de mecanismos bactericidas para luego ser expulsado.(25)

Células que participan en la inmunidad adquirida

Las células que forman parte de este grupo, son los linfocitos existiendo dos categorías:

A. Linfocitos

B. Linfocitos T

Los leucocitos granulados así como los macrófagos, constituyen la primera línea de defensa. Sin embargo, cuando estas son sobrepasadas se activa el sistema de inmunidad adquirida. Este último se puede dividir a su vez en dos tipos básicos de inmunidad pero estrechamente vinculados entre sí. En uno de ellos, los principales protagonistas son los linfocitos B que desarrollan anticuerpos circulantes que son moléculas globulínicas capaces de atacar al agente invasor, este tipo de inmunidad se llama **Inmunidad Humoral**.

El segundo tipo de inmunidad se logra mediante formación de gran número de linfocitos muy especializados, sensibilizados de manera específica contra el agente extraño. Estos linfocitos sensibilizados tienen la capacidad especial de fijarse al agente extraño y destruirlo. Este tipo de inmunidad se

llama **inmunidad celular**, en donde las células T son las principales que tienen actividad.

Antes de describir la forma en que funcionan e interaccionan los linfocitos B con los linfocitos T, es necesario describir en que consiste un anticuerpo y un antígeno. (2,25)

ANTICUERPOS

Los anticuerpos (Abs) son inmunoglobulinas que pueden reaccionar específicamente con el antígeno (Ag), que estimuló su producción.

La capacidad del sistema inmunitario para reconocer a los antígenos depende de los anticuerpos producidos por las células B y de los receptores de antígeno que expresan las células T. Aunque la forma en que las células T y las células B reconocen a los antígenos son bastante diferentes, ambas poblaciones celulares son capaces de reconocer una amplia gama de antígenos.

La inmunidad frente a un gran número de virus y bacterias se encuentra estrechamente relacionada con la presencia y diversidad de anticuerpos específicos frente a los agentes patógenos invasores.

Los anticuerpos presentan una notable diversidad y proporcionan un número de puntos de unión diferentes, suficiente como para reconocer los millones de formas antigénicas presentes en el entorno. Se ha estimado que el

número de anticuerpos diferentes que produce un individuo es mayor que el número de todas las demás proteínas juntas. De hecho, el número de anticuerpos que producimos es mayor que el número de genes que contiene nuestro genoma. (25, 12)

Estructura

Una inmunoglobulina consta de cuatro cadenas polipeptídicas, divididas de la siguiente manera:

- A. Dos cadenas iguales (que son largas) llamadas también: Cadenas pesadas.
- B. Dos cadenas iguales (que son cortas) llamadas también: Cadenas ligeras.

A su vez cada cadena contiene un segmento particular, denominado **segmento variable**. El segmento variable es como la parte de la llave que es única para un antígeno específico, el cual viene a ser como el candado. Es en este segmento donde el anticuerpo adopta una forma que le permite combinarse con un antígeno específico.

La región que constituye el fragmento de acople al antígeno es conocida como región **FAB** (Fragment Antigen Binding o Fragmento de Acople al antígeno). (25)

La molécula del anticuerpo en otro extremo contiene la región FC, la cual puede activar al complemento o bien unirse a los receptores FC de las células del huésped, tales como neutrófilos, macrófagos y otros fagocitos

mononucleares. De esta manera, el patógeno puede ser ingerido, fagocitado y distribuido en el interior del fagocito. (10)

Formación y origen

De acuerdo con la teoría de la selección clonal, cada persona esta dotada de una gran cantidad de linfocitos, cada uno de los cuales esta capacitado para responder a antígenos diferentes; cuando un antígeno penetra el cuerpo, selecciona al linfocito que este más capacitado, se fija al linfocito y la célula es estimulada a formar una clona de células.

En esta forma las células B se diferencian rápidamente en células plasmáticas y secretan anticuerpos, los cuales serán específicos para el antígeno a que sirvió como agente seleccionador original.(25)

Clases de inmunoglobulinas

IgG

La IgG es la inmunoglobulina sérica más abundante y está distribuida por igual en la sangre y los fluidos extravasculares. Su principal papel es neutralizar las toxinas bacterianas, uniéndose a los organismos, estimulando, por tanto su fagocitosis. Aunque la concentración de IgG en el suero es muy elevada, su concentración en las secreciones es baja.(12)

IgM

Los anticuerpos de la clase IgM son los primeros en formarse tras el contacto con la mayoría de los antígenos, pero se presentan habitualmente en concentraciones mucho más bajas que las IgG. Su síntesis temprana sugiere un importante papel para las IgM en las fases tempranas de la infección.(12)

IgE

Esta clase de anticuerpo es responsable de las reacciones alérgicas agudas, pueden encontrarse mayores concentraciones de estos anticuerpos en pacientes con asma, fiebre de heno y alergias medicamentosas y alimentarias.(12)

IgD

Es una inmunoglobulina que se encuentra en niveles extremadamente bajos en el suero. Aunque su papel en el sistema inmunitario no es claro, existe evidencia que sugiere que es el antígeno receptor en la superficie de los linfocitos. Puede desempeñar un papel importante en el desencadenamiento de la estimulación linfocítica por el antígeno, iniciando así la respuesta inmunológica. (12)

IgA

Es la principal inmunoglobulina en las secreciones exocrinas (saliva, leche, secreciones respiratorias, mucina intestinal y lágrimas). Las células que

producen IgA se concentran en el tejido subepitelial de las glándulas exocrinas y responden a antígeno que se presentan localmente.

Su mecanismo de protección en enfermedades bacterianas, la caries dental y en la fase temprana de la enfermedad periodontal, en la que adhesión y colonización bacteriana de la mucosa o tejidos dentales son etapas necesarias en su patogénesis. Sin embargo, un papel antibacteriano en las lesiones periodontales establecidas es dudoso ya que la saliva no penetra probablemente en las profundidades de la lesión. (12)

ANTIGENO

Cada toxina o cada tipo de microorganismo contiene uno o más compuestos químicos en su constitución, en general se tratan de proteínas, grandes polisacáridos o grandes complejos lipoproteínicos y son uno o más de esos compuestos los que producen inmunidad. Estas sustancias se llaman antígenos. (12)

Originalmente se le conoció así a cualquier molécula capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos por parte de las células B.

Actualmente, el término se aplica a cualquier molécula que pueda ser reconocida específicamente por cualquiera de los elementos del sistema adaptativo, células B, células T o ambas. (25)

Características

- A) Por su especificidad, cada uno de los anticuerpos se une solamente a un antígeno (para el cual es específico) presente en la superficie del microorganismo.
- B) Cada anticuerpo se une a una región concreta de la molécula de antígeno que se denomina **epítopo**.
- C) Los anticuerpos son específicos de un epítopo y no de la molécula de antígeno. (25)

Reacción antígeno-anticuerpo

La función principal de un anticuerpo es unirse a su antígeno. Cada anticuerpo se unirá únicamente con el antígeno, para el cual fue específicamente creado.

La cadena formada por la unión antígeno-anticuerpo, provoca un efecto directo que consiste en la neutralización de toxinas bacterianas o impidiendo la penetración de partículas extrañas a las células del cuerpo. Todo ello lo logran ya que la interacción antígeno-anticuerpo, activa células con acción fagocítica, como neutrófilos y macrófagos a través de la unión de estas últimas a la porción Fc del anticuerpo.(25,12)

Por tanto, si un anticuerpo interactúa con antígenos provenientes de un determinado patógeno, los fagocitos se pueden unir al anticuerpo mediante su receptor Fc, de esta manera el patógeno puede ser ingerido y destruido en el interior del fagocito.

La activación del complemento es otra respuesta que se produce como consecuencia de la reacción antígeno-anticuerpo. El sistema del complemento consta de unas 20 proteínas séricas, una vez activado, ejerce las siguientes acciones:

- A. Destruye las membranas celulares de muchas especies bacterianas
- B. Los productos del complemento que se liberan en esta reacción atraen fagocitos hacia el lugar donde se ha producido la misma.
- C. Los componentes del complemento recubren la superficie bacteriana con lo que los fagocitos pueden reconocer las bacterias o ingerirlas.
- D. Los fagocitos realizan sus actividades antimicrobianas destruyendo y erradicando al agente invasor.(25)

Reconocimiento de Antígenos

Una respuesta inmunitaria consta de dos fases:

- A. Reconocimiento del antígeno.
- B. Reacción para erradicar al antígeno.

En las respuestas inmunitarias las células encargadas de reconocer al antígeno son los linfocitos, tanto los linfocitos B y T reconocen al antígeno por un proceso diferente.(25)

Reconocimiento por las células B

Cada célula B, reconoce a un antígeno determinado, una vez que la célula B, reconoce a su antígeno específico se multiplica, dando lugar a células plasmáticas, que son capaces de producir grandes cantidades de anticuerpos. Los anticuerpos se unen a los patógenos y por una serie de mecanismos activan a células fagocíticas y al complemento los cuales terminan por destruir al agente invasor.(12,25)

Reconocimiento por las células T

Hay varios tipos de células T, cada uno de los cuales ejercen diferentes funciones. Los primeros dos grupos se llaman células T Colaboradoras (Th):

- A. Un grupo interacciona con las células B y promueve su multiplicación, diferenciación y la síntesis de anticuerpos.
- B. Otro grupo interacciona con los fagocitos ayudándoles a destruir patógenos intracelulares.
- C. Un tercer grupo de células T, se encarga de destruir las células del huésped infectadas. Esto se denomina **citotoxicidad**, por lo que se denominan células T citotóxicas (Tc). (12, 25)

Para que se activen estos tres tipos de células, tienen que reconocer a su antígeno. Eso lo logran cuando dicho antígeno se encuentra asociado con unos marcadores conocidos, presentes en las células del propio huésped, que forman parte del llamado **Complejo Principal de Histocompatibilidad, (CPH)**.

Las células T reconocen antígenos que se forman en el interior de ciertas células y que son expuestos en la superficie de las mismas en forma de pequeños fragmentos polipeptídicos.

Por ejemplo, una célula huésped que sufra una infección vírica expresará pequeños fragmentos de proteínas víricas en su superficie, por lo que será reconocida de inmediato por las células T.

Los fragmentos de antígeno son presentados en la superficie celular por un grupo de moléculas especializadas. Estas moléculas están codificadas en un conjunto de genes del denominado complejo principal de histocompatibilidad, por lo que se denominan **moléculas CPH**. (25)

Complejo Principal de Histocompatibilidad

La capacidad del sistema inmunológico para diferenciar entre lo propio y lo ajeno depende de un grupo de antígenos del complejo de principal histocompatibilidad. (29)

Estos antígenos se forman en el interior de ciertas células y después estas mismas las exponen en su superficie pero en forma de fragmentos.

Clasificación:

Los antígenos del complejo de principal histocompatibilidad se clasifican en:

A. Antígeno Clase I: Que también se expresa como “moléculas CPH de clase I”.

B. Antígeno Clase II: Que también se expresa como "moléculas CPH de Clase II". (25)

Ubicación

Los antígenos de clase I: Se encuentran en todas las células nucleadas del cuerpo y se encuentran principalmente en las membranas de las células B, T y macrófagos.

Los antígenos de clase II: Se encuentran en las células B, T, en algunos macrófagos y en pequeñas cantidades en algunas células epiteliales. (12,25)

Funcionamiento

Los antígenos clase I y clase II, específicamente constituyen moléculas, denominadas moléculas CPH clase I y CPH clase II, respectivamente.

Las moléculas CPH clase I y clase II, se forman en el interior de las células mencionadas anteriormente y luego son expuestas en su superficie.

A las moléculas CPH Clase I, se unirá todo aquel antígeno endógeno, es decir aquel que se forma en el interior de una célula, para luego ser expuesto a células que lo destruirán.

A las moléculas CPH clase II, se unirán todos los antígenos exógenos. Estos últimos son denominados así, ya que son presentados en el exterior de la célula infectada, por las moléculas CPH clase II, como pequeños fragmentos. (12,25)

Dichos fragmentos, son resultado del procesamiento de moléculas de antígeno intactas, por células denominadas: Células Presentadoras de Antígenos, CPA.

Las CPA presentan los antígenos procesados a las células T colaboradoras Th. A su vez, las células Th pueden colaborar con las células B, estimulándolas para la producción de anticuerpos contra el antígeno presente en las CPA, y que luego da lugar a la reacción antígeno-anticuerpo.

Las células T colaboradoras Th, también pueden activar a las células T citotóxicas Tc, las cuales por varios mecanismos se encargan de destruir al patógeno invasor. (25)

Células Presentadoras de Antígeno (CPA)

Las células presentadoras de antígeno (CPA), constituyen una población leucocitaria. Pueden actuar como CPA los siguientes elementos celulares. (25)

- A. Células B
- B. Macrófagos
- C. Células Dendríticas
- D. Células de Langerhans

Las células B: Capturan antígenos y los presentan a células T asociadas a moléculas CPH clase II.

Los macrófagos: capturan antígenos, los procesan y exponen los fragmentos resultantes en su superficie, asociados a moléculas CPH de clase II.

Las células dendríticas: Expresan moléculas de clase II e ingieren el antígeno. (25)

Las células de Langerhans: Se describen en el capítulo II.

CAPITULO II

CELULAS DE LANGERHANS

Definición

Las células de Langerhans son macrófagos derivados de la médula ósea con antígenos Ia en su superficie, que fueron identificadas originalmente en la epidermis. (10)

Aunque la síntesis de queratina protectora es claramente una función principal de la epidermis, el descubrimiento de un papel inmunoregulador de la epidermis ha revolucionado los conceptos de su importancia en los mecanismos de defensa del huésped.

En adición a los melanocitos, la epidermis humana contiene otro sistema de células dendríticas, las cuales no producen pigmento. Esta distribución se extiende más allá de la superficie de la piel, incluso más que las células que producen pigmento. Luego de su descubrimiento en 1868, su función permaneció desconocida hasta que se descubrió que son una parte vital del mecanismo inmunológico.(4)

Paul Langerhans, quien describió los islotes celulares pancreáticos que secretan insulina también descubrió las células epidérmicas que llevan su nombre. Dichas células representan de 3-8% de las células de la epidermis, lo que equivale alrededor de 500 a 1,000 células por mm cuadrado.

La célula de Langerhans es un componente epitelial perteneciente al sistema inmune, derivada de un macrófago-monocito en la médula ósea.

Las células de Langerhans se organizan en la médula ósea y se distribuyen en la piel, nódulos linfáticos, amígdalas y membranas mucosas entre otras. Estas son activadas por heridas en los tejidos locales y absorben fluidos y partículas de sus alrededores. Esta célula se localiza en todos los tejidos y epitelios estratificados, en la epidermis de la piel, en la mucosa bucal o encía en una posición suprabasal, esófago, vagina y en los folículos pilosos, glándulas sebáceas y apócrinas, timo y ganglios linfáticos.(4,7,25)

Funciones

La célula de Langerhans es considerada como una célula presentadora de antígenos (CPA), esta célula desempeña un papel importante en la respuesta inmune celular y en el reconocimiento y procesamiento de antígenos para luego presentarlos a los linfocitos o macrófagos. Estas pueden representar el primer contacto de antígenos virales con el sistema celular inmune de la piel y de la mucosa escamosa. Estas células tienen funciones inmunológicas, actúan como células fagocíticas, poseen receptores comunes a los macrófagos (receptores para inmunoglobulina Fc y para el complemento C3) y funcionan como células presentadoras de antígenos para los linfocitos T o B. Estas células participan en la respuesta inmune cutánea y gingival y migran de la piel y encía hacia los nódulos linfáticos. Las células de Langerhans cumplen con la función de fijar y procesar antígenos en la piel o encía.(3)

Las células de Langerhans pueden ser consideradas células “centinelas” del sistema inmune. Debido a esta situación, están entre las primeras células que entran en contacto con partículas y sustancias extrañas que penetran la piel. Esta función es auxiliada por la gran área de superficie creada por los procesos dendríticos de la célula. (21)

Por medio de receptores especializados en la membrana celular, la célula de Langerhans puede reconocer y diferenciar entre moléculas invasoras y moléculas normales. Al enviar esta información al sistema linfoideo, el cuerpo es capaz de montar una respuesta inmunológica defensiva en contra del material extraño. (23)

La creencia de que el papel de los queratinocitos estaba limitado a la síntesis de una áspera cubierta protectora externa para la piel, también ha quedado fuera de actualidad. Los queratinocitos también secretan una gran cantidad de péptidos inmunoestimulatorios de alto peso molecular llamados citocinas epidermales. Una de estas, el **factor epidermal activador de timocitos derivado de células** (ETAF) es también secretado por células de Langerhans.(23)

La célula de Langerhans tiene como función aumentar la respuesta inmune de los sistemas linfoides y también involucrarse en la reacción sistémica del cuerpo a las infecciones y heridas. Debido a que el volumen completo de sangre circula a través de la piel cada cierto tiempo, sustancias inmunoregulatoras liberadas por las células de la epidermis pueden tener una profunda influencia en la capacidad corporal para preparar respuestas

inmunes en casos de infecciones vírales o bacterianas e inclusive crecimientos cancerosos.

Se ha demostrado experimentalmente en ratones que el epitelio deficiente en células de Langerhans (inducido por exposición a luz ultravioleta) es incapaz de montar reacciones de hipersensibilidad. Se especula que las células de Langerhans forman una "red" que convierte a los antígenos aplicados continuamente en inmunogénicos. La ausencia de tal red no permite que el organismo responda adecuadamente. La exposición de la piel a la luz ultravioleta elimina estas células y resulta imposible, por ejemplo, provocar una dermatitis por contacto con haptenos después de este tipo de radiación.

Las células de Langerhans secuestran y presentan antígenos después de la inyección intradérmica de éstos y son la principal fuente de haptenos (dinitro clorobenceno) depositados en la piel. (23)

Las células de Langerhans presentes en la piel caminan a través de los vasos linfáticos aferentes hasta la zona paracortical de los ganglios linfáticos aferentes hasta la zona paracortical de los ganglios linfáticos regionales, en esta zona las células de Langerhans establecen unión con muchas células T. Esta migración constituye un eficaz mecanismo de transporte del antígeno desde la piel hasta las células Th, situadas en los ganglios linfáticos.

Las células de Langerhans contienen grandes cantidades de moléculas CPH Clase II, a quienes se unen los antígenos, para luego presentarlos a las células T.

Las moléculas CPH de clase II, son receptoras especializados de las células de Langerhans, por medio de los cuales pueden reconocer y diferenciar entre moléculas invasoras y moléculas normales.

Por lo tanto, las células de Langerhans, al encontrar una molécula invasora, la asocia a sus receptores especializados (moléculas CPH clase II), por medio de los cuales los transporta hasta el sistema linfoideo, en donde las presenta a las células T quienes organizan luego una respuesta defensiva contra el material extraño. (25)

Origen

Todas las células sanguíneas tienen un origen común en las células hematopoyéticas (formadoras de sangre). Estas células pluripotenciales están presentes en pequeños números en la médula ósea a lo largo de la vida.

Las células de Langerhans están consideradas por unos investigadores como fagocitos, mientras otros las clasifican como leucocitos.

La clasificación de la familia de células de Langerhans presentadoras de antígenos como fagocitos puede ser controversial, pero el desarrollo de estas células aparentemente está muy relacionado al de los monocitos y también fagocitan partículas. Las células de Langerhans están distribuidas en los tejidos y en las zonas T de tejidos linfoides secundarios, lugar al que migran luego de absorber antígenos, allí interactúan con los linfocitos y se les conoce como **células dendríticas interdigitantes**.

Fue propuesta la existencia de la relación entre las células de Langerhans y los melanocitos, enfatizándose que aquellas representaban un estadio inmediato de melanocitos previamente inmaduros, pudiendo estar o no en melanogénesis. Estas células no eran capaces de producir melanina y no contenían gránulos de melanina.

El ciclo de vida de los precursores de células de Langerhans es de 5-14 días. Su número por litro de sangre es desconocido.(10,12)

Aspectos Histológicos

En los tejidos, la célula de Langerhans tiene perfil irregular y hasta ramificado, mide casi el doble de diámetro que los monocitos. Histológicamente, esta célula está clasificada como un histiocito grande que contiene un núcleo oscuro, blando y profundamente dentado, un nucleolo inconspicuo, y un citoplasma claro, pálido, eosinofílico abundante con bordes celulares indefinidos. En inflamación activa, las células de Langerhans son numerosas y se presentan en cúmulo.(16)

CELULAS DE LANGERHANS EN CAVIDAD ORAL

Se ha descrito que las células de Langerhans son componentes epiteliales pertenecientes al sistema inmune. Además dichas células se distribuyen en la piel, nódulos linfáticos, amígdalas y mucosa bucal, entre otras. Para facilitar la comprensión sobre la acción de estas células, específicamente en la mucosa bucal, se hará una descripción

sobre los datos históricos de las mismas, aspectos histológicos y microscópicos en cavidad oral, así como su distribución y función en la cavidad bucal.

Historia

La historia demuestra que para poder determinar el origen y la función de las células de Langerhans se llevaron a cabo varios estudios, entre los que destacan los realizados en mucosa bucal, tanto de animales como de humanos. Por lo que a continuación se describe los principales estudios realizados sobre las células en mención, en relación a la cavidad oral:

Las células dendríticas intraepidérmicas de la piel humana fueron descritas por primera vez en 1868 por Paul Langerhans, quien las observó por medio de coloraciones con cloruro de oro. Debido a la falta de otras investigaciones que confirmaran la presencia de éstas, se admitió que las células descritas raramente eran encontradas, llamándolas células de Langerhans, en 1977. (7)

Fue propuesta la existencia de una relación entre las células de Langerhans y los melanocitos, enfatizándose que aquellas representaban un estado inmediato de melanocitos previamente inmaduros, pudiendo estar o no en melanogénesis. Estas células no eran capaces de producir melanina y no contenían gránulos de melanina. (4)

Tratando de encontrar la relación entre los melanocitos y las células de Langerhans, en 1966, Shroedder y Theilade (27), **observaron la presencia de células de Langerhans por primera vez en la mucosa bucal de humanos.** Sin embargo, fue imposible confirmar esta relación.

En 1977, Stingl et al. (28), propuso que las células de Langerhans podían ser encontradas en piel (dermis y epidermis), **en paladar blando** y se acreditó que las células que se encontraban alrededor de **las crestas de las rugas palatinas en el paladar,** representaban células progenitoras de células de Langerhans.

A partir de 1979, a través de estudios realizados en ratones se indicó que estas células eran derivadas de células precursoras de la médula ósea. Para confirmar este estudio, dos años más tarde se realizaron **injertos de mucosa bucal humana** en ratones, en los cuales se trato de observar la presencia de células de Langerhans. Después de 8 días de realizar el injerto, las células habían sido desaparecidas del epitelio transplantado, en tanto 21 días después, células semejantes habían sido encontradas en gran número sugiriendo que estas células serían originadas del epitelio receptor. Se propuso que el aparecimiento de células de Langerhans, ocurría después de la regeneración del epitelio bucal y probablemente provenían de células de tejido conectivo y médula ósea precursora de células de Langerhans.(7)

En 1988, Newcomb (24), indicó que como parte de la respuesta de células T, las células de Langerhans, migraban a tejido conectivo y epitelial.

Aspectos Microscópicos

En 1966, se encontraron por primera vez, presencia de células de Langerhans en los tejidos de mucosa bucal. Dichas células se encontraron en la capa basal y en la porción superior de la capa espinosa y presentaron características semejantes a los melanocitos, con núcleo irregular, cromatina dorada, y prolongaciones dendríticas con formas filamentosas. (7)

En biopsias de encía insertada sana, fueron encontradas células de Langerhans en la capa intermedia del epitelio de la mucosa adyacente a la unión mucogingival. Histológicamente estas células presentaban núcleos irregulares, con centriolos bien desarrollados. El sistema de golgi estaba presente, pudiéndose identificar los llamados gránulos de Birbeck próximos al mismo. Se encontró poca cantidad de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, lisosoma y ribosomas libres. (7)

En un estudio realizado en 1985, se encontraron en la mucosa bucal, alta concentración de células de Langerhans en la capa suprabasal del epitelio, en tanto pequeños procesos dendríticos fueron encontrados en tejido conjuntivo de la capa basal del epitelio. (15)

Entre las técnicas que se usan para teñir positivamente y detectar las células de Langerhans tenemos la tinción para proteína S-100 (una tinción de inmunoperoxidasa), también se usan las tinciones con HLA-DR y OKT6. Estas células tienen sitios receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G y 3b, un componente del complemento. Esto permite que tinciones histoquímicas marquen estas células. T6 y HLA-DR, son diferentes antígenos que están presentes en la membrana celular y superficie de las células de Langerhans. Se usan anticuerpos monoclonales para reaccionar con estos dos antígenos.(6)

La forma dendrítica o de estrella de las células de Langerhans se muestra con tinciones de impregnación doradas. La célula no contiene desmosomas que la adhieran a células adyacentes, no contiene cúmulos de tonofilamentos y no contiene melanosomas. Sin embargo, contiene vesículas lisas, cuerpos multivesiculares y lisosomas, pero la parte más característica son los gránulos de Birbeck, orgánulos característicos, única y distintivamente para las células de Langerhans. Bajo el microscopio electrónico, estos gránulos se ven como estructuras laminadas hinchadas en un lado como si fueran bastones o raquetas de tenis. Estos están rodeados de membrana, tienen forma de bastón, de 15-50 nm. de largo, 4 nm de ancho, con densidad lineal central y estriaciones claras que irradian de la densidad linear hacia la membrana limitante. También se conocen como gránulos de Langerhans y gránulos vermiformes.(7,16)

Distribución en cavidad oral

En los seres humanos las células de Langerhans se encuentran entre los queratinocitos en todos los niveles suprabasales, aunque no producen queratina. Se encuentran en el epitelio bucal de la encía normal y en pequeñas cantidades en el epitelio del surco; están ausentes o en cantidades muy pequeñas en el epitelio de unión de la encía normal. (8)

En el epitelio oral, existen tres áreas de epitelio:

- 1. Epitelio bucal o gingival**
- 2. Epitelio del surco**
- 3. Epitelio de unión.**

El queratinocito es el principal tipo de célula del **epitelio bucal o gingival**, así como de otros epitelios escamosos estratificados. Otras células que se encuentran en el epitelio son las células claras o no queratinocitos, entre las que se encuentran las células de Langerhans, las de Merkel y los melanocitos.(8)

El epitelio bucal contiene los siguientes tres tipos de células:

1. Melanocitos
2. Células de Langerhans
3. Células inespecíficas

Las células de los tres tipos son estrelladas y poseen prolongaciones protoplasmáticas de diversos tamaños y aspectos.

A estas se les denomina también "células claras" porque en los cortes histológicos aparecen como menos oscuras que las células productoras de queratina circundante.(8)

En 1982, Ahlfors; Larsson; Bergstresser (1), estudiaron la densidad de células de Langerhans en la mucosa bucal humana y concluyeron que la densidad de las células de Langerhans en la mucosa bucal era similar a aquella en la piel. La densidad media/mm² de las células de Langerhans en la superficie de la mucosa bucal del ratón fue de 160 cel/mm² en la mucosa bucal anterior, 640 cel/mm² en la mucosa bucal posterior, 430 cel/mm² en el paladar y 340 cel/mm² en la lengua.

En 1984, se descubrió que la frecuencia de células de Langerhans en la mucosa bucal fue inversamente proporcional al grado de queratinización, habiendo áreas de mucosa bucal que no presentaban células de Langerhans. (7)

La mucosa no queratinizada (paladar blando, vientre de lengua, labios y piso de boca) presentaba grandes cantidades de células de Langerhans, un número aproximadamente igual al de la piel, en tanto que la mucosa queratinizada (paladar duro y encía masticatoria) presentaron una menor cantidad de células de Langerhans. La mucosa no queratinizada presentó cerca de 508+/-110 CL/mm² y la mucosa queratinizada 201+/-97 CL/mm². Estas cantidades son suficientes para

que estas células puedan desempeñar las funciones de células presentadoras de antígenos. (7)

En un estudio realizado en Dinamarca, Juhl (15) analizó la distribución de las células de Langerhans en epitelio gingival humano clínicamente sano:

La mayoría de las células de Langerhans en el **epitelio gingival bucal u oral** son células altamente dendríticas. La distribución es en forma de red con una densidad de $21.0 \pm 3.2 \text{ CL}/0.1 \text{ mm}^2$.

Una distribución similar aunque menos densa fue encontrada en el **epitelio del surco** ($8.6 \pm 3.0 \text{ CL}/0.1 \text{ mm}^2$).

Los números de células de Langerhans en el **epitelio de bolsa** en la periodontitis del adulto fueron significativamente más bajos comparados con el del epitelio orosulcular del tejido sano y comparados con la encía externa de tejido que presentaba enfermedad periodontal.

El epitelio de unión presentaba pocas o ningunas células de Langerhans, de las pocas que se encontraron se identificaron dos tipos:

- 1) Células de Langerhans débilmente teñidas con pocas y cortas dendritas distribuidas de manera desordenada ($2.8 \pm 1.4 \text{ CL}/0.1 \text{ mm}^2$) en las tres cuartas partes apicales del epitelio de unión. La evidencia sugiere que éstas puedan ser células de Langerhans inmaduras.

- 2) Cúmulos de células de Langerhans (9.4 ± 2.9 CL/0.1mm²) con dendritas de grosor y número moderado y con una intensidad de fluorescencia variada; éstas fueron encontradas en unos pocos especímenes en el cuarto coronal del epitelio de unión y en la zona adyacente al epitelio del surco.
- 3) Tales cúmulos pueden representar una variación genuina en la distribución de células de Langerhans o una reacción a la formación inicial o temprana de placa.

De acuerdo con la investigación realizada por Callejas (7) se concluye que las células de Langerhans están presentes tanto en el epitelio gingival de pacientes normales como también en pacientes con enfermedad periodontal. La fracción del volumen de células de Langerhans en el tejido gingival es así: en el epitelio de unión se presenta de manera semejante en pacientes con periodontitis del adulto (1.41%). Periodontitis de progresión rápida (1.44%), Normal (1.97%) y niños (1.77%). El grupo de periodontitis juvenil presenta el valor más alto (2.2%) de la fracción del volumen. El grupo de periodontitis del adulto fue de (0.38%) existiendo una diferencia estadísticamente significativa al ser comparada con otros grupos (0.001).

El tejido gingival, que esta en contacto con la placa bacteriana ya formada desde algún tiempo, presenta una ausencia casi total de células de Langerhans. Este acontecimiento puede ser atribuido a un proceso de tolerancia inmunológica, por la presencia de placa subgingival. La constante remoción de placa bacteriana parece ser de suma importancia para evitar este tipo de reacción inmunológica.

Tipos de células de Langerhans:

Existen dos clases de células de Langerhans.

Las clase I contienen varios gránulos

Las clase II contienen pocos gránulos.

En 1980, Newcomb y Powell (24) compararon el epitelio bucal enfermo con epitelio bucal sano. En el tejido sano hubo 4% de células de Langerhans Tipo I, 40.5% de células de Langerhans Tipo II y 54.1% de células indeterminadas.

En el tejido enfermo las proporciones fueron respectivamente: 29.5% de células de Langerhans Tipo I, 34.4% de células Tipo II y 36.1% de células indeterminadas. Normalmente las células de Langerhans Tipo I se encontraron en el tejido gingival enfermo y las células de Langerhans Tipo II estaban el epitelio gingival sano.

Las células de Langerhans y las células indeterminadas también fueron vistas en el epitelio del surco de especímenes sanos y afectados pero casi no estaban presentes en epitelio de unión.

Función en cavidad oral

Desde 1980, Bos, Burkhardt y Kats (5), le atribuyeron a la mucosa bucal un papel en el sistema inmunológico local, en la cual las células de Langerhans desempeñan un importante papel.

En un experimento se pudo distinguir, que en el interior del epitelio de la mucosa bucal de ratones comunes, hubo un aumento en el número de células de Langerhans, cuando estos fueron expuestos a antígenos exógenos por 10 días. Veinte días después de la exposición al mismo antígeno el número de células de Langerhans disminuyó, probablemente indicando que la homeostasia inmunológica fue alcanzada.

Dentro de las células epiteliales de la mucosa bucal se pueden distinguir tres poblaciones celulares: linfocitos, células de Langerhans y células cerebriformes. La exposición de éstas a microorganismos patogénicos, producía un aumento de las células cerebriformes y de las células de Langerhans, lo que fue interpretado como una respuesta a los antígenos externos, siendo establecida la relación funcional entre ellas. El constante apareamiento de linfocitos es una muestra indicativa de la función adicional del tejido linfoide con las células de Langerhans. (7)

En aplicaciones de carcinógenos químicos en mucosa bucal de Hamster, aplicándose 7, 12 dimetil-benzantraceno (DMBA), diluido en aceite mineral, resultaron alteraciones histológicas en un período de 4 ½ horas a 2 semanas. Entretanto hubo aumento significativo en el número de células de Langerhans, y en la extensión y tamaño de los procesos dendríticos, en comparación con una mucosa no tratada. El mayor efecto de DMBA sobre las células de Langerhans ocurrió 2

semanas después, este aumento de las células de Langerhans fue interpretado como una respuesta inmune prematura. (7)

Ahlfors et al. (1), en 1985, realizaron la determinación numérica de células dendríticas en mucosa bucal de ratones, concluyendo que la densidad de las células de Langerhans en la mucosa bucal, numéricamente son suficientes para desempeñar sus funciones como células presentadoras de antígenos, ante los linfocitos T.

Tratando de relacionar la distribución de linfocitos y células de Langerhans en la mucosa bucal humana normal, se propuso que la relación consistente entre células inmunocompetentes y la mucosa bucal, sugiere la presencia de una barrera de defensa inmunológica local necesaria en el tejido (1)

En tejidos periodontales

Se sabe que los linfocitos T, forman una barrera de defensa inmune en el epitelio gingival. El 70% de estas células se encuentran en la fase inicial de gingivitis experimental, se sabe que normalmente los linfocitos T son encontrados en epitelio bucal sano. Por lo tanto es de esperarse alguna participación de las células de Langerhans. (7)

Tal vez por eso Newcomb et al. (24), en 1982, asociaron la acumulación de placa con el número de células de Langerhans en el epitelio bucal de la encía insertada, observando un aumento en el número de células de Langerhans particularmente en la capa espinosa.

Las células de Langerhans localizadas en epitelio bucal de la encía responderán a la entrada de antígenos de la placa acumulada cerca del área y parecieran interferir con el desenvolvimiento de la respuesta inflamatoria en el tejido conectivo subyacente.

En 1985, se encontró diferencia en el número de células de Langerhans en inflamación crónica asociada con periodontitis, comparada con tejido clínicamente sano. Esto intensifica la idea de la función inmunológica de estas células como respuesta del huésped en enfermedad periodontal crónica. (20)

Tejidos gingivales sanos y enfermos fueron comparados por Newcomb et al. (24), a través de métodos histoquímicos de ATP-asa, anticuerpo monoclonal OKT-6 y anti HLA-DR. En tejido sano las células de Langerhans estaban presentes solamente en epitelio bucal y en el epitelio del surco gingival, localizándose generalmente en la capa basal y estaban ausentes en el epitelio de unión. Entretanto, en el tejido gingival enfermo fue observado un aumento en el número de células de Langerhans en la capa espinosa del epitelio bucal y del epitelio del surco. Las células de Langerhans no fueron encontradas en el epitelio de la bolsa. La libre difusión de antígenos de la placa bacteriana y ocasionalmente las bacterias, por la deficiencia de células de Langerhans en el epitelio de unión y en el epitelio de bolsa, llevarán a una respuesta inmune no apropiada en la encía aumentando el potencial de una reacción inflamatoria. (7)

En 1986 fue observado por Newcomb et. al. (24), un aumento significativo de células de Langerhans tipo I (que contienen muchos gránulos) y una proporción reducida tanto de células de Langerhans tipo II (pocos gránulos) como de células indeterminadas en el epitelio bucal enfermo, cuando fue comparado con epitelio bucal sano. Sin embargo, mientras las células de Langerhans y las células indeterminadas estuvieron presentes en el epitelio del surco gingival sano y enfermo, estuvieron ausentes en el epitelio de unión y en el epitelio de bolsa.

Al estudiar la correlación de las células de Langerhans con la presencia de bacterias en el epitelio bucal de individuos con enfermedad periodontal, se ha observado que la introducción de bacterias de la placa dentobacteriana en el surco gingival, provoca un aumento en el número de células de Langerhans en el epitelio bucal y en el epitelio del surco, con deficiencia de dichas células en el epitelio de unión. La invasión activa de microorganismos intragingivales en el epitelio bucal de la encía enferma provocan a la primera línea de defensa del huésped. El epitelio gingival no sólo es una línea de protección, sino también un elemento activo en la respuesta inmune a la agresión bacteriana.(1)

En la inflamación gingival, para Hitzig et al. (13), la actividad primordial de las células de Langerhans en la respuesta inmunológica de tipo celular depende de la expresión HLA-DR, siendo predominante en los estados moderados de inflamación gingival. Un estado de inflamación severa corresponde a un estado de tolerancia, debido a la inhibición parcial del mecanismo de presentación de antígenos a los

linfocitos T por las células de Langerhans. Concluyendo que la identificación y cuantificación de células de Langerhans podría facilitar la interpretación de los exámenes clínicos, histológicos y biológicos, indispensables en la comprensión de los mecanismos complejos que rigen las enfermedades periodontales inflamatorias.

Tolerancia inmunitaria y agotamiento celular

La tolerancia inmunitaria es un estado de ausencia de respuesta inmunitaria frente a un antígeno determinado, es inducida por la exposición previa a dicho antígeno. (25)

La tolerancia que se produce en las células de Langerhans, puede ser debida a un fenómeno denominado **agotamiento celular**, que se produce al término de una respuesta inmunitaria especialmente intensa.

Una exposición continuada al antígeno, como la que se produce al establecer la inflamación en la enfermedad periodontal, o en casos de enfermedad avanzada, puede estimular a todas las células con capacidad de responder frente al mismo, que se conviertan en células de media vida corta, por lo que al desaparecer estas, pueden no quedar células capaces de responder al mismo antígeno. Esa es la razón por la que al acumularse placa bacteriana e iniciarse la inflamación en los tejidos gingivales, las células de Langerhans aumentan su número, sin embargo, al establecerse la inflamación existe ya una exposición continuada al antígeno, lo cual disminuye su número por efecto del agotamiento.(7, 25)

CAPITULO III

ENFERMEDAD PERIODONTAL

CARACTERÍSTICAS Y ESTRUCTURAS NORMALES DEL PERIODONTO

Estudios han demostrado que la introducción de bacterias formadoras de placa dentobacteriana en el surco gingival produce un aumento en el número de las células de Langerhans en el epitelio bucal y en el epitelio del surco. El epitelio bucal de la encía es la primera línea de defensa de la mucosa bucal en contra de bacterias y agentes invasores que eventualmente provocan la gingivitis y periodontitis. Es precisamente aquí, en el surco gingival y los tejidos de soporte en donde se comprende con más claridad la función de las células de Langerhans en relación con la salud periodontal. (7, 8)

Tejidos de soporte

Los tejidos de soporte del diente, son conocidos colectivamente como el periodonto, del griego peri, que significa alrededor y odontos - diente, están compuestos por las encías, ligamento periodontal, cemento y hueso de soporte y alveolar. (18)

Encía

Es la parte de la mucosa bucal que cubre las apófisis alveolares de los maxilares y rodea al cuello de los dientes. Se divide anatómicamente en áreas: marginal, insertada e interdental. (8)

Encía Marginal o Libre

La encía marginal (no insertada) es el borde de la encía que rodea los dientes a modo de collar. Esta separada de la encía insertada adjunta por una depresión lineal estrecha. De un espesor algo mayor de 1mm generalmente, forma la pared blanda del surco gingival.(8)

Surco Gingival

Es la hendidura o espacio poco profundo alrededor del diente, cuyos límites son, por un lado la superficie dentaria y por otro, el epitelio que tapiza la parte libre de la encía. La determinación clínica de la profundidad del surco gingival es un parámetro importante del diagnóstico. El parámetro clínico utilizado para determinar la profundidad del surco es la introducción de un instrumento metálico y el cálculo de la distancia que penetra. La profundidad de sonda de una encía clínicamente normal es de 2-3 mm. (8)

Encía Insertada

Es continuación de la encía marginal, es firme, elástica y aparece estrechamente unida al periosteo del hueso alveolar.

El ancho de la encía insertada es la distancia entre la unión mucogingival y el surco de la encía libre. Su ancho difiere en las diferentes áreas de la boca. Es generalmente mayor en la región incisiva (3.5 a 4.5 mm en el maxilar y 3.3 a 3.9 mm en la mandíbula) y menos en las regiones posteriores (1.9 mm en el maxilar y 1.8 mm en la mandíbula).

Encía Interdental

La encía interdental ocupa el nicho gingival que es el espacio interproximal, apical al área de contacto dental, puede ser piramidal o tener forma de col. En la primera, hay una papila con la punta inmediatamente debajo del punto de contacto. El col es una depresión que conecta las papilas vestibulares y linguales y se adapta a la forma del área de contacto interproximal.(8)

CARACTERÍSTICAS CLINICAS NORMALES DE LA ENCIA

Color

El color de la encía insertada y marginal es rosa coral, que se produce por:

- El aporte sanguíneo
- El espesor y grado de queratinización del epitelio

- Presencia de células que contienen pigmentos (8,11)

Tamaño

Se debe a la suma de volumen de los elementos celulares, intercelulares y su vascularización.(8)

Contorno

El contorno o forma de la encía varia y depende de:

- La forma de los dientes
- La alineación de los dientes en la arcada
- De la localización y tamaño del área del contacto proximal.
- De las dimensiones de los nichos gingivales vestibular y lingual

La encía marginal rodea los dientes en forma de collar y sigue las ondulaciones de la superficie vestibular y lingual. En dientes con labioversión, el contorno arqueado normal se acentúa y la encía se localiza más apicalmente. En dientes con linguoversión, la encía es horizontal. (8)

Consistencia

La encía es firme y resistente a excepción del margen gingival movable. Debido a la fuerte unión de fibras del tejido conectivo supravascular al cemento y hueso. (8,11)

Textura de Superficie

La superficie presenta pequeñas depresiones y elevaciones que le dan la apariencia de cáscara de naranja. (8)

La encía insertada es punteada, la encía marginal no lo es. Este punteado varía con la edad, es menos sobresaliente en la niñez que en la edad adulta, es más frecuente en la superficie vestibular que en la lingual. (11)

Posición

Se entiende como posición, al nivel en que la encía marginal se une al diente. Cuando el diente erupciona en la cavidad bucal, el margen y el surco están en la punta de la corona, a medida que la erupción avanza se observa que el margen y el surco están más cerca de la raíz. (8)

ESTRUCTURA BASICA DEL APARATO DE INSERCIÓN PERIODONTAL

Estructura y función

El aparato de inserción periodontal que fija los dientes en los maxilares, lo constituyen, cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal. Dicho ligamento funciona como mecanismo de soporte y fijación dental. El epitelio de unión y la inserción epitelial son elementos íntimamente ligados al aparato de inserción periodontal.(8,11)

Cemento

El cemento es un tejido duro que se presenta en capas alrededor de la raíz dental. Existen dos clases: acelular y celular. El acelular que es el primero en formarse cubre aproximadamente los dos tercios cervicales de la raíz, no contiene células, se forma antes de que el diente alcance el plano oclusal. El cemento que se forma después es más irregular y suele contener células en espacios individuales. Este cemento se denomina celular.

El asentamiento del cemento continúa después que el diente entra en contacto con su antagonista funcional y prosigue durante toda la vida.(8,11)

Proceso Alveolar

El proceso alveolar es el hueso que forma y sostiene los alvéolos de los dientes. Se forma cuando el diente erupciona a fin de proporcionar unión ósea al ligamento periodontal en formación. (8)

El hueso alveolar fija el diente y sus tejidos blandos de revestimiento y elimina las fuerzas generadas por el contacto intermitente de los dientes, masticación, deglución y fonación. (18)

Al hacer erupción los dientes y formarse la raíz se produce una densa capa cortical del hueso adyacente al espacio periodontal. Esta capa es denominada lámina dura. Esta placa ósea presenta numerosos agujeros para combinar con los del ligamento periodontal. (18, 19)

Ligamento Periodontal

Es la estructura de tejido conectivo que rodea la raíz y la conecta con el hueso. Esta incluido en el espacio entre las raíces de los dientes y el hueso alveolar que rodea al diente, a un nivel aproximado de 1mm apical con respecto a la unión cemento adamantina. Los elementos más importantes del ligamento periodontal son fibras principales, las cuales son de colágena, estas se insertan en el cemento presente en la porción radicular y el hueso, formando la inserción del ligamento periodontal. (8, 11)

Epitelio de unión

Consiste en una banda a modo de collar, de epitelio escamoso estratificado, que está adherido a la superficie dentaria (adherencia epitelial) por una lámina basal. El epitelio de unión se adhiere al cemento afibrilar cuando lo hay sobre la corona y al cemento radicular de manera parecida. La inserción del epitelio de unión al diente se refuerza con las fibras gingivales, que ligan la encía marginal contra la superficie dentaria. Por esta razón el epitelio de unión y las fibras gingivales se consideran como unidad funcional, denominada unión dentogingival. (8)

Inserción epitelial

La interfase epitelio de unión superficie dentaria esta representada por la lámina basal interna y hemidesmosomas, constituyendo la estructura que actualmente se denomina inserción epitelial.(8)

MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA GINGIVITIS

Al evaluar los aspectos clínicos de la gingivitis es necesario ser sistemático. El acceso clínico sistemático requiere de un examen ordenado de la encía: color, tamaño, y forma, consistencia, textura de la superficie, posición, facilidad y gravedad de la hemorragia y dolor.(8)

Hemorragia gingival

Los dos primeros síntomas que preceden a la gingivitis son:

- A. Aumento en la producción del líquido gingival.
- B. Hemorragia del surco gingival con un sondeo suave.

La hemorragia aparece antes que el cambio de color u otros signos de inflamación. Los tejidos gingivales inflamados sangran al sondeo debido a que el revestimiento epitelial de una bolsa infectada es delgado o tiene microcirculación. (8,11)

Cambios de color

La encía se torna rojiza cuando:

- A: Aumento de aporte sanguíneo en el sitio inflamado.
- B. Grado de queratinización epitelial se reduce o desaparece.

El color rojo o azulado es causado por la proliferación vascular y la reducción de la queratinización provocada por la compresión epitelial del tejido inflamado (8, 11).

Cambios en la Consistencia

La tumefacción o edema gingival es una característica frecuente en tejidos gingivales inflamados, el agrandamiento gingival edematoso se debe a la acumulación de líquidos en el tejido conectivo inflamado. El líquido es suero que emerge de los vasos sanguíneos con permeabilidad aumentada por la inflamación local. (11)

Los cambios clínicos pueden variar tanto en la gingivitis aguda como en la crónica.

Gingivitis Crónica

- A. Hinchazón Húmeda, que con la presión se comprime y forma fosetas.
- B. Suavidad y friabilidad marcadas, con fácil fragmentación a la exploración de la sonda y áreas superficiales de enrojecimiento y descamación como cabezas de alfiler.
- C. Consistencia firme.(8)

Gingivitis Aguda

- A. Hinchazón difusa y ablandamiento.

B. Esfacelación con partículas como hojuelas grises de restos que adhieren a la superficie erosionada.

C. Formación de vesículas.(8)

Cambios en la textura

La pérdida del punteado de la superficie es un signo temprano de gingivitis.

Presenta también una superficie satinizada.(8,11)

Cambios en la posición

La recesión es la exposición de la superficie radicular por la migración apical de la encía. En la etiología de la recesión gingival se implican los siguientes factores.(8)

- técnica de cepillado defectuosa
- malposición dentaria
- Fricción de los tejidos blandos
- Inflamación gingival
- Inserción alta del frenillo

MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA PERIODONTITIS

El término enfermedad periodontal en general abarca todas las enfermedades del periodonto.

La periodontitis es uno de los tipos de enfermedad periodontal más frecuente y resulta de la extensión del proceso inflamatorio iniciado en la encía hacia los tejidos periodontales de soporte.

Se habla de periodontitis cuando se pierden tanto la inserción del ligamento periodontal como el soporte óseo alveolar. A esto se vincula la migración apical del epitelio de unión hacia apical de la unión cemento-esmalte. , desarrollándose la bolsa periodontal.(8)

Bolsa Periodontal

Es un surco gingival profundizado por enfermedad: siendo una de las características clínicas más importantes de la enfermedad periodontal.

Consiste en la migración del epitelio de unión hacia apical y su separación de la superficie del diente.(8)

Patogénesis

La formación de bolsa empieza como un cambio inflamatorio en la pared de tejido conectivo del surco gingival y se produce por la placa bacteriana. Como resultado de la inflamación la porción coronal del epitelio de unión está sujeta a la invasión de leucocitos polimorfonucleares. Cuando el volumen de leucocitos polimorfonucleares alcanza aproximadamente el 60% o más de epitelio de unión este tejido se separa de la superficie de diente. Por lo que el fondo del surco migra hacia apical.(8)

Forma de Determinarla

El único método exacto para detectar y medir las bolsas periodontales es la exploración cuidadosa con una sonda periodontal.

Hay dos tipos de profundidades de la bolsa: la biológica o histológica y la clínica o de sondeo.

La profundidad biológica: Es la distancia entre el margen gingival y la base de la bolsa (el extremo terminal del epitelio de unión). Esto puede medirse solo en secciones histológicas.

La profundidad clínica o de sondeo: Es la distancia en la cual un instrumento adecuado (sonda) penetra dentro de la bolsa.

Técnica de sondeo: La sonda debe insertarse paralela al eje vertical del diente y cambiar en circunferencia alrededor del diente para detectar las áreas de penetración más profundas.(8,17)

Lesiones en furcaciones

El término lesión de furcación se refiere a los trastornos que ocurren con frecuencia, en las cuales las bifurcaciones y trifurcaciones de los dientes multirradiculares están denudadas por la enfermedad periodontal. Los tipos de lesión de furca se clasifican como Grados I, II, III y IV:

Grado I: Se presenta pérdida ósea incipiente

Grado II: Se presenta pérdida ósea parcial

Grado III: Se presenta pérdida ósea total con abertura completa de la furcación.

Grado IV: Similar al Grado III, pero con recesión gingival y exposición de la furcación. (8)

Movilidad Dental

La inflamación al presentarse en el ligamento periodontal contribuye a la movilidad del diente. El exudado inflamatorio reduce el soporte del diente por la degeneración y destrucción de las fibras principales y un rompimiento en la continuidad entre la raíz y el hueso. La movilidad dental se clasifica así:

Grado I: Movilidad de la corona dentaria de 0,2 - 1mm en dirección horizontal.

Grado II: Movilidad de la corona dentaria que excede 1mm en dirección Horizontal.

Grado III: Movimiento de la corona dentaria también en dirección vertical. (17)

Pérdida de Hueso

La pérdida de hueso se revela únicamente para datos radiográficos.

Se origina por factores locales que se clasifican en dos grupos:

A. Los que causan inflamación gingival.

B. Los que causan traumatismo por oclusión.

La pérdida ósea producida por la extensión de la inflamación gingival es responsable de la reducción de altura del hueso alveolar, mientras que el traumatismo por oclusión produce pérdida ósea lateral a la superficie radicular.(8)

Tipos de periodontitis:

La periodontitis del adulto a su vez se clasifica como temprana, moderada o leve.

Periodontitis temprana:

- Hay bolsas poco profundas de 4-5 mm.
- Pérdida ósea de leve a moderada.
- Topografía insatisfactoria y movilidad dental ligera.

Periodontitis moderada ó leve

- Existen bolsas profundas de 7mm o más.
- Muchas áreas con pérdida ósea grave.
- Patrones de movilidad dental avanzada (11)

Las bolsas pueden sangrar al ser examinadas con posible exudado hemorrágico, supurativo y acuoso.

Entre los cambios más notables que presenta la encía, se encuentran:

- a. Enrojecimiento
- b. Tumefacción e inflamación

- c. Indicios de fibrosis o recesión
- d. Acumulación de placa y cálculos subgingivales. (11)

RELACION DE LAS CELULAS DE LANGERHANS CON ENFERMEDAD PERIODONTAL

Las células de Langerhans desempeñan un papel de defensa de la mucosa bucal. Secciones de biopsias de la encía en casos de enfermedad periodontal mostraban un aumento en los números de células de Langerhans. Se ha sugerido, entonces, que las células de Langerhans reaccionan con antígenos en el proceso de penetración del epitelio. Se inicia con una respuesta inmunológica precoz inhibidora o preventiva de una mayor penetración antigénica de los tejidos.(7,25)

Los hallazgos comprueban que los cambios en las células epiteliales gingivales ocurren en la enfermedad periodontal y estos cambios son análogos a los cambios que ocurren en las enfermedades dermatíticas y sugieren que el epitelio desempeña un papel en la homeostasis gingival y en la patogénesis de la enfermedad periodontal. (23) Es por esto que el epitelio gingival no es solamente una línea de protección, mas bien es un elemento activo en la respuesta inmune a la agresión bacteriana.

Un estudio llevado a cabo por Moughal, Adonogianaki y Kinane (20) registró los cambios en los números de células de Langerhans dentro de la gingiva durante el estudio de una gingivitis de 21 días provocada experimentalmente:

Los CD1a son antígenos específicos a las células de Langerhans y los timocitos, en la encía sana, los CD1a están limitados a las células de Langerhans que se observan a través del espesor del epitelio externo y del epitelio orosulcular. Los números de células de Langerhans expresados en el epitelio orosulcular eran similares a los números de la encía externa.(7)

Anticuerpos monoclonales a CD1a (específicos para las CL y timocitos) y HLA-DR antígenos de mayor histocompatibilidad clase II - (MHC) fueron usados para identificar a las CL dentro de las biopsias gingivales.(7)

Mientras se acumula la placa y se desarrolla una inflamación inicial existe un incremento en el número de células de Langerhans CD1a+. El número de células de Langerhans alcanzo su máximo nivel al día 7 y permaneció alto (día 14). Al desarrollarse la inflamación se presentó una reducción estadísticamente significativa en el número de células de Langerhans CD1a+ al llegar al día 21 ($p=0.028$). (7)

El incremento inicial, seguido por una disminución en el número de células de Langerhans CD1a+ mientras aumentaba la inflamación, sugiere que ocurre una migración de células de Langerhans dentro del epitelio gingival y esto puede representar un importante evento temprano durante la respuesta inmune de la encía contra la placa. Este incremento inicial, y consecuente disminución en el número de células se produce a consecuencia de un proceso denominado **tolerancia inmunitaria**, que provoca la disminución de dichas células al establecerse la enfermedad o cuando ésta se encuentra en estado avanzado. (7, 25)

La fracción del volumen de células de Langerhans en el tejido gingival es así: en el epitelio de unión se presenta de manera semejante en pacientes con periodontitis del adulto (1.41%). periodontitis de progresión rápida (1.44%), normal (1.97%) y niños (1.77%). El grupo de periodontitis juvenil presenta el valor más alto (2.2%) de la fracción del volumen. Sin embargo, estos resultados no fueron analizados estadísticamente. El grupo de periodontitis del adulto fue de (0.38%) existiendo una diferencia estadísticamente significativa al ser comparada con otros grupos (0.001). (7)

El tejido gingival, que está en contacto con la placa bacteriana ya formada desde algún tiempo, presenta una ausencia casi total de células de Langerhans. Este acontecimiento puede ser atribuido a un proceso de tolerancia inmunitaria.(7, 25)

CAPITULO IV

TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS DE COLORACION

Las técnicas para coloración inmunohistoquímica, tienen como objetivo final identificar componentes celulares, y antígenos específicos producidos por las células. Dichos objetivos se cumplen al llevar a cabo ciertos procedimientos que se describen a continuación:

Procedimiento de fijación

Un espécimen contiene solamente una cantidad finita de antígeno. Cada paso en el procesamiento del espécimen destruye antígenos. Las técnicas de inmunoperoxidasa pueden localizar solamente aquellos antígenos en un espécimen que permanece reconocible por el anticuerpo. Por esta razón, la fijación juega un papel importante en la coloración por peroxidasa.

El resultado de la coloración por inmunoperoxidasa dependerá de la cantidad de espécimen de tejido usado. Si el tejido fue inapropiadamente fijado y procesado podrán resultar una serie de defectos. Mientras que el propósito primario de la coloración es localizar el antígeno, la principal meta de la fijación es preservar aquel antígeno. El antígeno debe ser fijado, liberado y estar accesible para el anticuerpo primario.

Si el antígeno no es fijado, será lavado el espécimen y no tendremos coloración. Si las células alrededor no son fijadas, la morfología resultante

interferirá con la interpretación apropiada. De modo contrario, el exceso de fijación puede causar problemas tales como la desnaturalización y encubrimiento del antígeno. La fijación óptima será aquella que producirá una buena morfología con el menor tiempo de concentración.(6)

El antígeno también debe estar libre para ligarse con el anticuerpo primario. Si el antígeno se difunde a partir de su lugar de síntesis, puede ser efectuada una interpretación incorrecta. Cuando exista menor antígeno, habrá más probabilidad de su difusión, y más intensa deberá ser la fijación. En este caso, un fijador de ligación cruzada como la formalina prevendrá la difusión del antígeno.

Si el antígeno no es accesible al anticuerpo primario, entonces ninguna ligación ocurrirá. Uno de los efectos del exceso de fijación por un fijador de ligación cruzada es la formación de un excesivo número de ligadores al punto que pueden cubrir al antígeno e impedir el acceso del anticuerpo. Otro problema que ocurre es cuando el fijador altera la estructura del antígeno, haciéndolo irreconocible para el anticuerpo. Un antígeno mayor es más complejo y por lo tanto es necesaria una fijación más cuidadosa para prevenir al encubrimiento y las alteraciones estructurales que afectan el acceso del anticuerpo al antígeno.

Obviamente, la fijación apropiada del antígeno es la piedra fundamental de la técnica de la inmunoperoxidasa, pues sin esto, los resultados serán en vano. Debe ser observado, también que dependiendo del tamaño, estructura y naturaleza del antígeno a ser localizado, un protocolo de fijación apropiado necesita ser desarrollado. Una situación óptima involucra especímenes de

cada antígeno sometidos a varios fijadores por diferentes intervalos de tiempo para identificar las mejores condiciones de preservación de un antígeno.

Existen varios fijadores que funcionan bien con la mayoría de los antígenos, y en muchos casos, los procesos especiales pueden ser necesarios al mínimo. Para una fijación óptima, y para prevenir defectos de coloración, las siguientes condiciones deben ser observadas:

- No se debe permitir que los especímenes se resequen, y estos deben ser colocados dentro del fijador lo más pronto posible. Los lavados celulares deben ser fijados lo más rápido posible para asegurar la preservación del antígeno.
- Bloques pequeños de tejido, no mayores de 2 cm cuadrados por 4 mm de espesura, deben ser colocados en un mínimo de 200 ml de fijador. Bloques grandes de tejido impedirán la completa penetración del fijador, resultando en una coloración no específica.
- Después de la fijación, los especímenes de tejido, deben ser lavados para remover el exceso de fijador que puede causar defectos de coloración.

El más práctico, y probablemente, el mejor fijador es la formalina tamponada a 10%. Debido a sus características de ligación cruzada, es un fijador especialmente bueno para los antígenos pequeños como hormonas. Entretanto, el tiempo de fijación es crítico para impedir el encubrimiento del antígeno. Las inmunoglobulinas son especialmente susceptibles al exceso de

fijación con formalina. En estos casos, el tratamiento con enzimas proteolíticas digerirá el exceso de ligadores de aldehído y expondrá al antígeno.(6)

La formalina debe ser fresca y tamponada para un pH de 7.0-7.6. Como es un fijador de acción lenta, soluciones ácidas pueden causar alteraciones estructurales y arruinar la morfología. Debido a este problema de encubrimiento del antígeno, la fijación debe ser al menor tiempo posible para conseguir una buena morfología; usualmente 6-12 horas. La fijación residual por períodos más largos de tiempo puede exhibir una intensa coloración dependiendo de la concentración del antígeno presente.

Tampón neutro de formalina a 10%, pH 7

Formalina (formaldehído 40%)	100ml
Fosfato de sodio dibásico, anhídrido	6.5gr
Fosfato de sodio monobásico, monohidratado	4.0gr
Agua destilada	900ml

Otros fijadores excelentes son: el fijador de Zenker y el de Bouin.(6)

Procesamiento

Después de la fijación, los especímenes de tejido pueden ser deshidratados, aclarados y embebidos de acuerdo con las técnicas rutinarias de procesamiento. Para mejores resultados, los especímenes deben ser inmersos en parafina pura, porque ésta puede ser completa y fácilmente removida del tejido en el momento de la coloración. El plástico contenido

en algunos medios de inmersión es a menudo difícil de remover, y puede causar coloraciones no específicas e inhibición de las coloraciones específicas. Desde que los laboratorios rutinariamente usan medios de inmersión conteniendo plástico, ciertas precauciones deben ser tomadas:

1. Si el medio de inmersión es calentado a temperaturas superiores a los 62° C, los plásticos comenzarán a formar polímeros. Estos polímeros son difíciles de remover de los tejidos, y pueden embotar la cuchilla del micrótopo. Consecuentemente, los baños de parafina deben tener una temperatura máxima de 60°C para prevenir la polimerización.
2. Para evitar la remoción completa del medio de inmersión, las láminas deben ser colocadas a 60° C por un período de 30 minutos antes de la desparafinización. La temperatura no debe exceder 60° C para prevenir la desnaturalización del antígeno y el daño a la morfología celular.
3. Luego de ser extraídas del horno, las láminas deben ser inmediatamente transferidas para un baño recién preparado de xileno de tolueno. No se debe permitir que la parafina se solidifique antes de la desparafinización, pues esto impedirá los efectos del derretimiento. El xileno o el tolueno pueden ser usados para desparafinizar. Algunos investigadores mencionan que el tolueno es más efectivo para la completa remoción del medio.
4. Para la remoción eficiente del plástico, no más que 50 láminas deben ser elaboradas en un mismo baño de 250 ml de xileno, antes que este sea tocado. Esto parece ser un punto insignificante, mas es crítico en

cantidades de coloración de fondo. Cuanto menor sea el número de láminas procesadas en un baño del xileno, más completamente será removido el medio de inclusión.

5. Si más de 20 láminas son colocadas en un baño de 250 ml al mismo tiempo, la circulación de xileno puede no ser suficiente. Por esta razón, cuando se procesan muchas láminas al mismo tiempo, debe ser usado un segundo baño xileno recién preparado.

Si todas estas precauciones fueron observadas, no habrá problema de coloración de fondo no específica debido al residuo plástico. Este tipo de interferencia es fácilmente identificado por una coloración pálida que se extiende alrededor del espécimen tisular. Todas las otras coloraciones de fondo son confinadas dentro de los bordes del espécimen.

Se procederá a realizar el desparafinado y la rehidratación de los cortes obedeciendo esta secuencia:

1. Colocar el xilol por 5 minutos (3 baños)
2. Colocar el alcohol etílico absoluto por 5 minutos (2 baños)
3. Colocar el alcohol etílico a 95% por 5 minutos (2 baños)
4. Colocar en alcohol etílico a 50% por 5 minutos (1 baño)
5. Colocar en solución salina tamponada (SST) pH 7.4 por 5 minutos.(6)

Método de la inmunoperoxidasa

Los procedimientos de inmunoperoxidasa incluyen cortes de parafina, cortes de congelamiento y cortes citológicos que permiten visualizar componentes de la célula en una variedad de especímenes. Para un antígeno específico se puede determinar que tipo de células produce esta sustancia en tejidos normales o neoplásicos, niveles de sustancia producida, intensificación de células de origen desconocido y determinación y diferenciación de células tumorales.

La coloración por inmunoperoxidasa comprende el uso de anticuerpos y la enzima peroxidasa. La peroxidasa es comúnmente utilizada por diversas razones:

- Su pequeño tamaño no impedirá la ligación de anticuerpos a sitios adyacentes.
- Es fácilmente obtenida en forma altamente purificada de manera que la posibilidad de contaminación es minimizada.
- Es muy estable, y por tanto puede permanecer inalterada durante su preparación, almacenamiento y aplicación.
- Solamente pequeñas cantidades están presentes en los especímenes deciduales, y la actividad de esta peroxidasa endógena es fácilmente suprimida.

- Existe una gran disponibilidad de cromógenos que pueden actuar sobre la peroxidasa para formar un producto final colorido que se precipitará sobre el antígeno a ser localizado.
- Es barata.(6)

Método de coloración

Hay cuatro métodos principales de coloración de inmunoperoxidasa que puede ser utilizada para localizar antígenos celulares: El directo, el indirecto, PAP y el método de avidina-biotina. Cada uno de ellos tiene ciertas ventajas y desventajas que pueden ser evaluadas antes de seleccionar el procedimiento más efectivo para el trabajo a ser realizado.

Los procedimientos de inmunoperoxidasa incluyen cortes de parafina, cortes de congelamiento y cortes citológicos que permiten visualizar componentes de la célula en una variedad de especímenes. Para un antígeno específico se puede determinar que tipo de células produce esta sustancia en tejidos normales o neoplásicos, niveles de sustancia producida, intensificación de células de origen desconocido y determinación y diferenciación de células tumorales. (6)

Método Directo

El medio más simple para localizar un antígeno es usar un anticuerpo específico contra él. En el método directo de inmunoperoxidasa este anticuerpo específico está químicamente ligado a la peroxidasa. El reagente

conjugado será aplicado al espécimen y reaccionará con el antígeno. El sustrato aplicado producirá un producto final colorido que se precipitará en el lugar y por tanto, marcará el antígeno localizado.

La técnica directa puede ser efectuada rápidamente con pocas posibilidades de reacciones inespecíficas. La principal desventaja es que para cada antígeno que debe ser localizado, un anticuerpo conjugado diferente es necesario. Si un anticuerpo no puede ser obtenido en su forma conjugada, entonces el usuario tendrá que elaborar esta conjugación o escoger otro procedimiento.

La aplicación más común del método directo de inmunoperoxidasa es para la detección de inmunoglobulinas, complemento y depósitos de inmunocompuestos en las biopsias de riñón de pacientes con varios tipos de dolencia renal. Estos mismos antígenos pueden también ser localizados en las biopsias de piel en casos de lupus eritematoso sistemático y otras alteraciones de tejido conectivo. Los antígenos más comúnmente identificados en estos casos son IgG, IgA, IgM, C3 y C4. (6)

Método Indirecto

En la aplicación indirecta, un anticuerpo no-conjugado se ligará a un antígeno no específico. Para localizar esta ligación, un conjugado anticuerpo- peroxidasa necesita ser ligado al primer anticuerpo. Por ejemplo, si un anticuerpo primario fue producido en conejo, el conjugado de anticuerpo secundario necesita ser específico para el anticuerpo del conejo. Se agrega, entonces el sustrato para localizar la reacción.

Este método es más versátil que el método directo porque una gran variedad de anticuerpos primarios producidos en el mismo animal, puede ser usado ventajosamente con cualquier anticuerpo primario, cuando un conjugado anticuerpo-peroxidasa está disponible. Entretanto, el procedimiento toma diez veces más tiempo para ser completado que el método directo y existe una mayor posibilidad de que ocurran reacciones no específicas.

El uso primario de la técnica indirecta de inmunoperoxidasa es identificar anticuerpos en suero de pacientes con varias dolencias autoinmunes, bacterianas y parasitarias. En este procedimiento, el suero del paciente es aplicado al espécimen conteniendo el antígeno, en lugar del anticuerpo primario. El conjugado secundario anticuerpo-peroxidasa es específico para la inmunoglobulina humana. Si el paciente tiene un anticuerpo que pueda reaccionar con el antígeno del espécimen, el conjugado peroxidasa anti-inmunoglobulina humana se ligará al anticuerpo del paciente, y mostrará coloración positiva para el antígeno. Si el suero del paciente no contiene anticuerpo para aquel antígeno, el anticuerpo secundario no se ligará, y no será vista la coloración del antígeno. Los anticuerpos más comúnmente identificados son contra antígenos nucleares tiroideos, mitocondrias y musculatura lisa, *treponema pallidum*, virus de herpes simplex y citomegalovirus. (6)

Método PAP

Este método utiliza tres reagentes: anticuerpo primario, anticuerpo secundario y complejo PAP- compuesto de una enzima peroxidasa y un anticuerpo anti-peroxidasa. El anticuerpo primario es específico para el

antígeno. El secundario o anticuerpo “ligador” es capaz de ligar al anticuerpo primario y al complejo PAP, pues ambos son producidos en la misma especie animal.

Funcionalmente, el anticuerpo ligador es agregado en exceso de modo que apenas uno de sus sitios Fab se unirá con un anticuerpo primario dejando al otro libre para ligarse al complejo PAP. Una enzima peroxidasa es visualizada a través de una reacción substrato-cromógeno.

La ausencia de anticuerpos conjugados en este método significa una mayor sensibilidad que aquella atribuida a las técnicas directas e indirectas. Esto es bastante evidente en los tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, en donde una buena coloración puede ser observada al momento en que el mismo antígeno fue destruido por la fijación y el procesamiento. Debido a esta pérdida de antígeno durante la fijación, las técnicas directa e indirecta, deben ser realizadas en cortes congelados para obtener resultados consistentes. La mayor flexibilidad del método PAP en el procesado de especímenes parece ser compensada por el aumento del tiempo necesario para este método. Una de las aplicaciones más importantes del método PAP, es en la determinación del origen de tumores por la identificación de antígenos específicos producidos por las células. Esto permite una clasificación más clara – especialmente en tumores mal diferenciados y metastásicos – que aquella obtenida basada en morfología. El hecho de que el método PAP pueda ser aplicado a las fijaciones de rutina como material embebido en parafina, torna innecesario el uso de tejidos congelados, permitiendo así mismo, realizar estudios retrospectivos.

Algunos de los marcadores tumorales comúnmente usados son: antígenos específicos de próstata (PSA) para identificar tumores de origen prostático; inmunoglobulinas tales como las cadenas leves Kappa y Lambda, IgG, IgA e IgM para distinguir linfomas de células B de carcinomas indiferenciados; proteína ácida fibrilar glial (GFA) que tiñe todos los tumores de origen glial, primarios y metastásicos; y gonadotropina corionica humana (HCG) que puede ser localizada en las células trofoblásticas normales en los elementos trofoblásticos de los tumores de células germinativas del ovario, testículo y sitios extra gonadales. (6)

Procedimiento Técnica de PAP

El procedimiento para la técnica por el método PAP, se describe en la metodología del presente estudio.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la presencia de células de Langerhans en pacientes con enfermedad periodontal, antes de un tratamiento periodontal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar la presencia de células de Langerhans en pacientes con gingivitis antes de ser tratados periodontalmente.
2. Determinar la presencia de células de Langerhans en pacientes con periodontitis antes de ser tratados periodontalmente.
3. Determinar la presencia de células inflamatorias en pacientes con enfermedad periodontal antes de ser tratados periodontalmente.

VARIABLES

DEFINICIÓN

ENFERMEDAD PERIODONTAL:

Término que abarca en general todas las enfermedades del periodonto y que son clasificadas de acuerdo a ciertas manifestaciones clínicas.

MANIFESTACIONES CLINICAS:

Signos que presenta la encía libre, encía adherida o el aparato de inserción epitelial, que nos indiquen presencia de enfermedad periodontal.

CELULA DE LANGERHANS:

Componente epitelial, perteneciente al sistema inmune, cuya función es el reconocimiento y procesamiento de antígenos, para luego presentarlos a las células inflamatorias.

CELULAS INFLAMATORIAS:

Participan en la respuesta inmune como medio de defensa, cuyo objetivo final es la eliminación de un agente extraño (antígeno).

INDICADORES

ENFERMEDAD PERIODONTAL:

- Gingivitis
- Periodontitis

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS:

- Color: Aumentado o disminuido.
- Contorno: Aumentado o disminuido
- Consistencia: Firme o friable.
- Tamaño: Aumentado o disminuido
- Exudado Hemorrágico: Espontáneo o provocado
- Cálculos: Supragingivales o subgingivales.
- Movilidad: Grado I, II o III.
- Factores Irritantes: Prótesis, ortodoncia, restauraciones con márgenes desbordantes.
- Lesión mucogingival: Fístula o absceso, recesión gingival.

CELULAS DE LANGERHANS

PRESENCIA: Con base en el análisis histológico, luego de la tinción con s-100 las células que se tiñen positivamente tienen una forma

dendrítica o de estrella, mostrándose con tinciones de impregnación café a nivel de la capa suprabasal.

NIVEL DE PRESENCIA, GRADO 1 : Se observa bajo el lente microscópico moderada cantidad de células de Langerhans.

NIVEL DE PRESENCIA, GRADO 2 : Luego del análisis histológico se observa poca cantidad de células de Langerhans.

AUSENCIA : No se observa bajo el lente microscópico las características propias de las células de Langerhans.

CELULAS INFLAMATORIAS

PRESENCIA: Luego del estudio microscópico se observan células con las siguientes características:

- Linfocitos, con núcleo grande que llena casi toda la célula, dejando sólo un estrecho anillo de citoplasma.
- Neutrófilos, con un núcleo muy polimorfo, suele constar de tres a cinco lóbulos, irregularmente ovoides unidos por filamentos delgados.
- Monocitos, su núcleo suele estar excéntrico y es ovoide, su citoplasma es relativamente abundante, su núcleo también puede tener forma de herradura.

El núcleo de todas las células anteriormente descritas, se tiñe de color morado.

AUSENCIA: No se observan componentes celulares, con las características propias de las células inflamatorias.

METODOLOGIA

1. SELECCION DE LA MUESTRA

Previa la autorización de dirección de clínicas y de los pacientes que fueron seleccionados para estudio, se procedió a la recolección de la muestra de la siguiente manera:

Se seleccionó una muestra conformada por 20 pacientes de las clínicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Dicha población, se dividió en dos grupos, cada uno de ellos contó con un total de diez personas. Los grupos se clasificaron de la siguiente forma:

- **Grupo I:** 10 pacientes con diagnóstico de gingivitis, bajo los siguientes criterios clínicos:

Presencia de signos de inflamación gingival como cambios de coloración, cambio en la consistencia, presencia de exudado hemorrágico, espontáneo y/o provocado, cambio en el contorno gingival, presencia de placa bacteriana, cálculos, bolsas no mayores de 3 mm. Dichos datos se recopilaron en la ficha clínica para examen periodontal, diseñada para tal fin.

- Grupo II: 10 pacientes con diagnóstico de periodontitis, bajo los siguientes criterios clínicos:

Signos de inflamación gingival, presencia de bolsas periodontales mayores de 4 mm, presencia de placa bacteriana y cálculos.

En todos los pacientes se verificó la ausencia de tratamiento periodontal previo.

2. APLICACION DE LA FICHA CLINICA, PARA EXAMEN PERIODONTAL

2.1 DATOS GENERALES

El primer paso fue anotar el nombre del examinador, seguido por los datos generales del paciente.

En el renglón del nombre se anotaron apellidos y nombres completos de los pacientes.

En la casilla de la fecha se anotó la fecha en la que se efectuó el examen.

Se anotó la edad en años cumplidos. También se anotó el número correlativo de la ficha de cada paciente para el presente estudio.

2.2 EVALUACION DE LAS MANIFESTACIONES CLINICAS

SONDEO PERIODONTAL: Primeramente se determinó la profundidad en milímetros del surco gingival a partir del margen gingival de las piezas dentales evaluadas y se anotaron los números de la profundidad coronalmente a cada pieza dental presente en el odontograma de la ficha clínica.

El sondeo periodontal, se llevó a cabo en 6 piezas dentales tanto de la arcada superior como de la arcada inferior. Las piezas dentales evaluadas fueron:

Cuadrante superior derecho: Piezas 2, 3, 6 y 8.

Cuadrante superior izquierdo: Piezas 14 y 15

Cuadrante inferior izquierdo: Piezas 18, 19, 22 y 24

Cuadrante inferior derecho: Piezas 30 y 31

En el diagrama de las casillas, la evaluación se llevó a cabo de la siguiente forma:

COLOR: Se anotó con un C+, en caso se encontrara un color más intenso, o bien C- al encontrar el color más pálido.

CONTORNO: Se escribió una cruz (+), si la encía se observaba con contorno irregular o agrandamiento del mismo.

CONSISTENCIA: Se anotó con una (+), cuando se observó una encía friable, en situación normal no se hizo anotación.

TAMAÑO: En caso de edema de la encía, se escribió Eam, si la alteración se suscribía a la encía marginal, Eap si estaba limitado a la encía papilar, Eaa si se extendía a la encía adherida.

EXUDADO: En este encasillado se anotó Ehp , al comprobarse exudado hemorrágico provocado y Ehe si era espontáneo.

CALCULOS: Se anotó con una (+), en las casillas correspondientes a las piezas dentarias, donde se detectó la presencia de los mismos.

MOVILIDAD: Se anotó con M1, si el movimiento bucolingual no era mayor de 1 mm., si era mayor de 1 mm pero menor de 2 mm correspondió a M2 y si sobrepasaba de esta medida se anotaba con M3.

FACTORES IRRITANTES: Se anotó con una (+), si se encontraban márgenes de restauraciones desbordantes, empaques de comida, etc.

LESION MUCOGINGIVAL: Se escribió con una (+), en caso existía inserciones de frenillos altas, grosor de encía adherida insuficiente (menor de 2mm).

CARIES: En caso de caries superficial se escribió Cs. Y Cp en caso de caries profunda.

Signos clínicos, tales como abrasión, facetas de desgaste, mal posición e hipersensibilidad, no se tomaron en cuenta para el diagnóstico de enfermedad periodontal, en el presente estudio.

Al finalizar la evaluación de las manifestaciones clínicas anteriormente descritas, y de acuerdo a la condición de las mismas, se determinó el diagnóstico de la enfermedad periodontal presente en cada paciente.

3. REMOCION DE TEJIDO GINGIVAL

La remoción de tejido gingival se realizó con el fin de determinar la presencia o ausencia de células de Langerhans en el mismo, por medio de análisis histológicos.

Para realizar dicha remoción, se les explicó previamente a los pacientes la manera en que se llevaría a cabo el procedimiento en mención y se les pidió su autorización para realizarlo.

Al contarse con el consentimiento del paciente, se llevó a cabo la remoción de dicho tejido, bajo los siguientes lineamientos:

Pacientes con diagnóstico de gingivitis: Se seleccionó la región a nivel de encía adherida que presentaba mayor inflamación.

Pacientes con diagnóstico de periodontitis: Se seleccionó el área a nivel de encía adherida que presentó la mayor bolsa periodontal.

Luego haciendo uso de un cartucho de anestesia: Lidocaína 1:100,000 con vasoconstrictor epinefrina al 2%, aguja desechable y jeringa aspiradora, se colocó anestesia local en el área donde se realizaría la biopsia incisional.

Al comprobarse la sedación local, se retiró el tejido gingival, con un punch no. 3.

Posterior a la remoción del tejido gingival se colocó clorhédina en el lugar y gasas estériles.

4. MANEJO DE LA BIOPSIA INCISIONAL

4.1 FIJACION EN FORMALINA

Una vez efectuada la remoción, se procedió a fijar el tejido gingival en un frasco de vidrio con formalina al 2%, para evitar la alteración de los componentes de dicho tejido.

Las biopsias fijadas en formalina fueron debidamente identificadas, colocándoles la siguiente información:

- a) Iniciales correspondientes al nombre del paciente.
- b) Diagnóstico de la enfermedad periodontal presente.
- c) Área bucal de la cual se removió el tejido.
- d) Número correlativo del paciente.

4.2 INCLUSION EN PARAFINA

Las biopsias fueron llevadas al laboratorio de Histopatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Dichas muestras fueron incluidas en parafina, para luego ser incrustadas en bloques de madera para el endurecimiento de la misma.

5. PREPARACION DE LOS CORTES

Los bloques de parafina que contenían las muestras de tejido fueron colocados en el micrótopo, en el cual a través de sus cuchillas, se realizaron cortes de tejido de 3 micras. Posteriormente, dichos cortes fueron colocados sobre los respectivos portaobjetos (láminas).

6. DESPARAFINADO Y DESHIDRATACION DE LOS CORTES

Se realizó conforme a la metodología utilizada en el laboratorio de Histopatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Los cortes de tejido colocados en los portaobjetos, fueron colocados en un horno a 37°C por 10 minutos, para eliminar parcialmente los excesos de parafina.

Luego de ser extraídas del horno, las láminas fueron transferidas a un recipiente conteniendo Xilol, componente que es usado para desparafinar, durante un tiempo de 15 minutos.

Al terminar de desparafinar los cortes, se procedió a realizar la deshidratación de los mismos, obedeciendo la siguiente secuencia:

- a) Se colocaron las láminas que contenían los cortes en un recipiente con alcohol etílico absoluto, por 5 minutos, se realizaron dos baños.
- b) Posteriormente, se trasladaron a otro recipiente con alcohol etílico al 95%, durante 5 minutos, realizándose dos baños.
- c) Luego se colocaron en otro recipiente que contenía alcohol etílico al 70%, por 5 minutos, llevándose a cabo dos baños.
- d) Seguidamente, se colocaron en un nuevo recipiente que contenía alcohol etílico al 50%, durante 5 minutos, realizándose un solo baño.
- e) Por último, las láminas fueron lavadas con solución salina tamponada (SST), pH 7.4, por 5 minutos y secadas cuidadosamente con papel absorbente.

7. TINCION INMUNOHISTOQUIMICA

La técnica de tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo con proteína s-100, usando el método PAP. El kit inmunológico que se usó para dicha técnica fue adquirido directamente de la compañía Sigma-Aldrich con sede en Estados Unidos.

Previo a la tinción se corroboró que los cortes histológicos mantuvieran la integridad de los tejidos, los que no cumplieron con este requisito fueron repetidos.

El método de coloración PAP, utiliza tres reagentes:

- a) ANTICUERPO PRIMARIO: Es específico para el antígeno que da lugar al apareamiento de células de Langerhans.
- b) ANTICUERPO SECUNDARIO: Sirve de unión entre el anticuerpo primario y el complejo PAP que es el tercer reagente, posee dos sitios de unión, uno para el anticuerpo primario y otro para el complejo PAP.
- c) COMPLEJO PAP: Está formado por una enzima peroxidasa y un anticuerpo anti-peroxidasa. La enzima peroxidasa de este complejo es visualizada histológicamente luego de ser marcada con un componente llamado cromógeno, a través de dicha marcación las células de Langerhans son identificadas.

La técnica de coloración, por medio del método PAP, se llevó a cabo en un laboratorio particular y se realizó bajo la secuencia recomendada por el fabricante.

- a) Se marcó con un lápiz de diamante alrededor de cada corte a teñir.

- b) Se colocaron las láminas en un plano y sobre las muestra de tejido, se colocaron 5 microlitros de peróxido de hidrógeno al 3%, utilizando una micropipeta de 50 microlitros para ello. Luego se incubó por un tiempo de 10 minutos, a una temperatura de 25 °C.
- c) Se sacaron las láminas de la incubadora y se lavaron con solución salina tamponada (SST), pH 7.4, durante 15 minutos, fueron secadas cuidadosamente.
- d) Sobre cada muestra de tejido, se colocó una gota de albúmina, se incubó por 10 minutos a una temperatura de 25 °C , luego de eso se retiraron las láminas de la incubadora y cuidadosamente se eliminaron los excesos de albúmina, no se lavó.
- e) Seguidamente, sobre cada muestra de tejido se colocó 5 microlitros del anticuerpo primario para antígeno específico y posteriormente se incubó por dos horas a una temperatura de 25 °C. Concluidas las dos horas fueron retiradas dichas láminas de la incubadora y se lavaron con SST, durante 15 minutos. Luego se secaron.
- f) Posteriormente, se agregó en cada muestra de tejido 5 microlitros del anticuerpo secundario y se incubó por 30 minutos, concluidos los mismos, se retiraron las láminas de la incubadora y se lavaron con SST, durante 15 minutos. Luego se secaron cuidadosamente.

- g) Se colocó sobre cada muestra de tejido 5 microlitros del Complejo Peroxidasa y se incubó por 30 minutos a una temperatura de 25° C, transcurrido ese lapso de tiempo se lavó con SST, durante 15 minutos. Luego se secaron cuidadosamente.
- h) Se agregó 5 microlitros del Cromógeno para conseguir el producto final teñido, se incubó por 10 minutos a una temperatura de 25° C, se lavó con SST por 15 minutos y luego se secó.

8. TINCIÓN FINAL

Las láminas fueron sumergidas en un recipiente conteniendo hematoxilina, durante 30 segundos con el fin de teñir el fondo de los tejidos, luego se lavó con agua y posteriormente se cubrieron las láminas, con cubreobjetos.

9. ANALISIS HISTOLOGICO

Se realizó un análisis a nivel microscópico, en cada una de las muestras, haciendo uso del microscopio de luz, marca Zeiss cp-Achromat, del laboratorio de Histopatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, en dicho microscopio se utilizó un lente 0.25 x 40.

A nivel histológico se llenó una hoja recolectora de datos del paciente que incluyó:

NUMERO CORRELATIVO DEL PACIENTE

Se anotó en la casilla correspondiente a esta información, el número del paciente, según el orden en que fue evaluado.

DIAGNOSTICO

Se anotó gingivitis o periodontitis, como diagnóstico final, según las manifestaciones clínicas que presentó cada paciente al inicio de la evaluación clínica.

PRESENCIA DE CELULAS DE LANGERHANS , NIVEL 1

En el encasillado correspondiente se anotó con una X, cuando se observó presencia de células de Langerhans, en una cantidad moderada.

PRESENCIA DE CELULAS DE LANGERHANS, NIVEL 2

En esta casilla se anotó con una X, cuando se observó poca cantidad de células de Langerhans presentes.

AUSENCIA DE CELULAS DE LANGERHANS

Se anotó con una X, en el encasillado correspondiente, cuando no se observaron células con las características propias de las células de Langerhans.

CASOS NO EVALUABLES

Se anotó con una X, en aquellos casos en los cuales, no fue posible evaluar la presencia de células de Langerhans, debido al deterioro de los tejidos.

PRESENCIA DE CELULAS INFLAMATORIAS

En esta casilla se anotó con una cruz (+), cuando la cantidad de células inflamatorias presentes era poca y con dos cruces (++) cuando se encontraron en una cantidad moderada.

AUSENCIA DE CELULAS INFLAMATORIAS

Se anotó con una X, al encontrar casos en los que no se observaron presencia de células inflamatorias.

10. TABULACION DE LA INFORMACIÓN

Se procedió a tabular los datos obtenidos para su respectiva presentación. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de los mismos para luego realizar la interpretación, discusión, recomendaciones, limitaciones y conclusiones.

PRESENTACION ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Durante la realización del presente estudio se evaluó la presencia o ausencia de células de Langerhans, en 20 pacientes con enfermedad periodontal. Dichos pacientes no habían sido tratados periodontalmente. Los pacientes se clasificaron en dos grupos y los resultados obtenidos fueron:

HALLAZGOS CLINICOS EN EVALUACIÓN PERIODONTAL

Gingivitis. De los 10 pacientes evaluados, 8 presentaron cambios de color y contorno. El tamaño y consistencia de la encía estuvo alterado en 6 pacientes. Todos los pacientes presentaron exudado hemorrágico y presencia de placa dentobacteriana mayor del 20%. Presencia de cálculos se observó en 6 pacientes. En 3 de los mismos se encontraron factores irritantes. El promedio de profundidad al sondeo fue de 2.26 mm.

Periodontitis. De los 10 pacientes evaluados, en todos se encontró cambios de color, contorno, presencia de exudado hemorrágico, de placa dentobacteriana mayor del 20% y cálculos. El tamaño y la consistencia de la encía, estuvo alterado en 8 pacientes. En 4 de los mismos se encontraron factores irritantes. Se observó lesión mucogingival en 3 pacientes. El promedio de profundidad al sondeo fue de 4.3 mm. (Ver Cuadro No. 1).

HALLAZGOS A NIVEL HISTOLOGICO

Gingivitis. De los 10 pacientes estudiados se obtuvo: Presencia moderada de células de Langerhans en un 30% (3 pacientes), poca presencia de las mismas se observó en un 60% (6 pacientes). Hubo ausencia de las células en mención en un 10% (1 paciente).

Periodontitis. De los 10 pacientes evaluados se obtuvo: Presencia moderada de células de Langerhans en un 40% (4 pacientes), poca presencia de las mismas se observó en un 50% (5 pacientes). En la misma determinación de células de Langerhans, un paciente no fue evaluable, que representa el 10%.

Tanto en los casos de gingivitis como de periodontitis, las células inflamatorias estuvieron presentes en todos los pacientes, en una cantidad moderada, predominando un infiltrado de monocitos y linfocitos. (Ver Gráfica No. 1).

De los 20 pacientes evaluados, se observó que 11 pacientes (55%) presentaron poca cantidad de células de Langerhans y 7 pacientes (35%) presentaron moderada cantidad de dichas células. (Ver Cuadro y Gráfica No. 2).

CUADRO No. 1

Hallazgos clínicos registrados en 20 pacientes con enfermedad periodontal, sin haber recibido tratamiento periodontal, de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala período 2,000-2,001

Diagnóstico	Gingivitis	Periodontitis
X Sondeo periodontal (mm.)	2.26	4.3
Aumento de color	8	10
Contorno irregular	8	10
Cambio en la consistencia	6	8
Aumento de tamaño	6	8
Presencia de exudado hemorrágico	10	10
Placa bacteriana > al 20%	10	10
Presencia de cálculos	6	10
Presencia de movilidad	0	0
Presencia de factores irritantes	3	4
Lesión mucogingival	0	3

Fuente: Datos obtenidos durante la investigación

CUADRO No. 2

Hallazgos histológicos registrados en 20 pacientes con enfermedad periodontal, que aún no habían recibido tratamiento periodontal, de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala período 2,000-2,001

Hallazgos histológicos	Dx. Gingivitis		Dx. Periodontitis		Total	
	No. de casos	%	No. de casos	%	No. de casos	%
Presencia de Células de Langerhans Nivel 1	3	30	4	40	7	35
Presencia de Células de Langerhans Nivel 2	6	60	5	50	11	55
Ausencia de células de Langerhans	1	10	0	0	1	5
Casos no evaluables	0	0	1	10	1	5
Total	10	100	10	100	20	100
Presencia de células inflamatorias	10	100	10	100	20	100
Ausencia de células inflamatorias	0	0	0	0	0	0

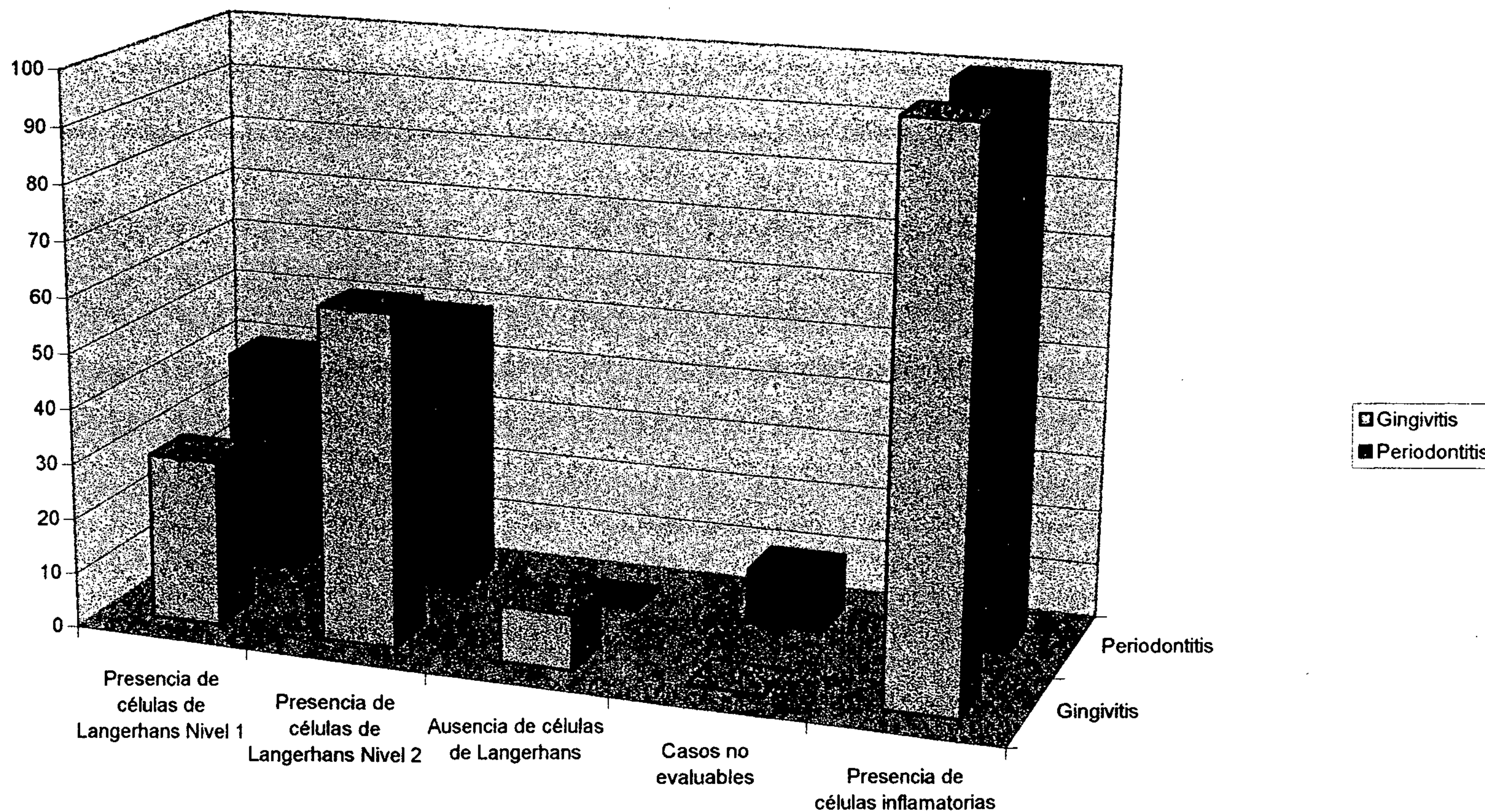
Nivel 1 : Moderada cantidad

Nivel 2 : Poca cantidad

Fuente: Datos obtenidos durante la investigación

Gráfica No. 1

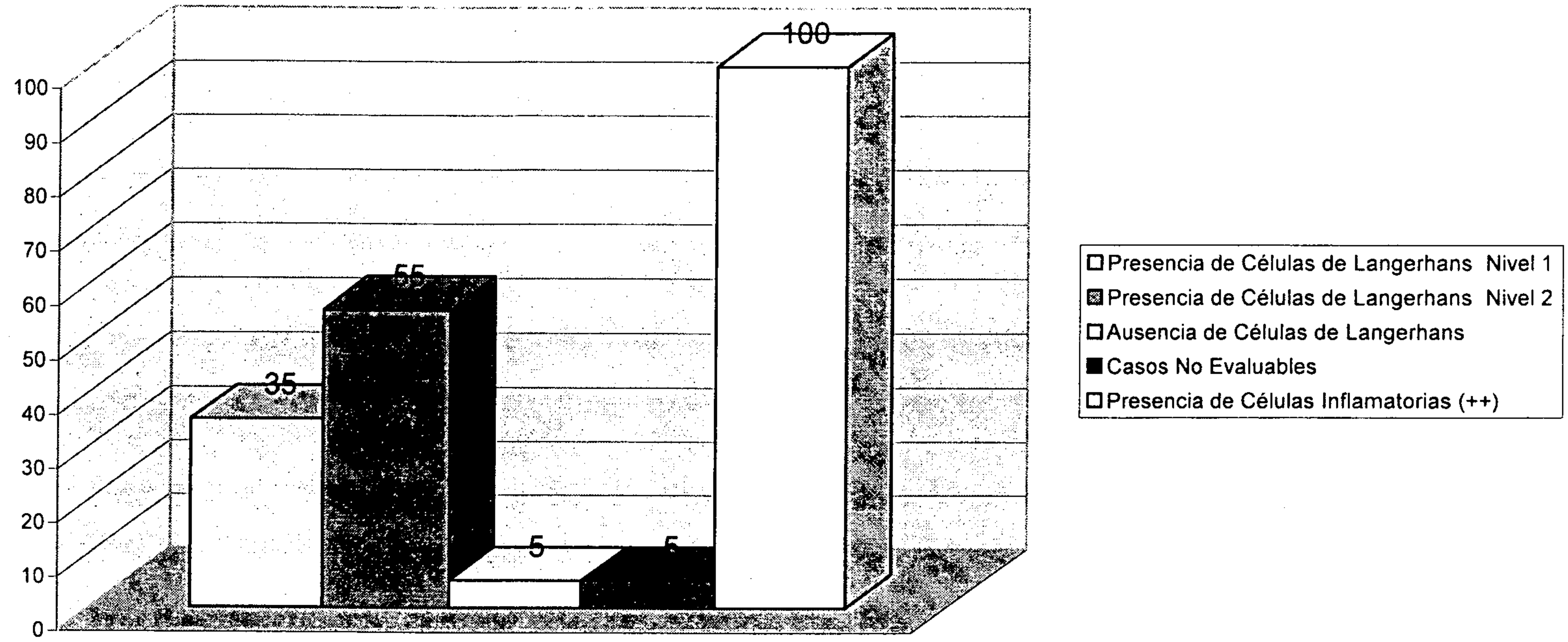
Promedio de presencia y ausencia de Células de Langerhans e inflamatorias, en 10 pacientes con diagnóstico de Gingivitis y 10 pacientes con diagnóstico de periodontitis, antes del tratamiento periodontal



Nivel 1: Moderada cantidad
Nivel 2: Poca cantidad
++ : Moderada cantidad

Gráfica No. 2

Promedio de Presencia y Ausencia de Células de Langerhans e Inflamatorias, en 20 pacientes con enfermedad periodontal antes del tratamiento periodontal.



97

Nivel 1 = Moderada cantidad
 Nivel 2 = Poca cantidad
 ++ = Moderada Cantidad

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente trabajo pretendió determinar en una muestra pequeña, la presencia de células de Langerhans en encía adherida y en la parte interna del surco gingival. Se sabe que en tejidos periodontales clínicamente sanos las células de Langerhans están presentes, puesto que su papel fundamental es de reconocer el antígeno y presentarlos a linfocitos para su destrucción.

Los pacientes evaluados en este estudio presentaron placa bacteriana, la cual actúa como un agente agresor o en otras palabras como antígenos, puesto que dentro de los constituyentes de la placa bacteriana tenemos bacterias y productos bacterianos. El papel de las células de Langerhans es el de capturar a las bacterias y presentarlas ante el linfocito T.

Según los resultados obtenidos en este estudio, se puede observar que en el tejido conectivo había infiltrado inflamatorio predominantemente linfocitario y monocítico, pero la cantidad de células de Langerhans no fue proporcional a la cantidad de células presentes en el infiltrado, como se menciona en los estudio de Juhl (15), y Moughal (20).

La ausencia o poca presencia de células de Langerhans en tejido gingival, coincide con los hallazgos presentados por Callejas (7), Carranza (8), Juhl (15), donde se mencionó poca cantidad de células de Langerhans en epitelio del surco y ausencia en el epitelio de unión, lo

cual permite la libre difusión de los antígenos de la placa bacteriana, promoviendo una respuesta inapropiada de los tejidos gingivales, aumentando el proceso inflamatorio. La falta de células de Langerhans en epitelio de la bolsa, puede ser debido al agotamiento de la célula, ante el ataque constante y persistente de microorganismos de la placa, definitivamente esto permite el establecimiento permanente de enfermedad periodontal.

No todos los pacientes que presentan clínicamente gingivitis progresan a estados de periodontitis, para que esto suceda tienen que ocurrir una serie de cambios en el medio oral y en el hospedero. Si las células de Langerhans que son en realidad macrófagos ubicados en el epitelio, debido a su ausencia o agotamiento, no son capaces de poder cumplir su función inmunológica, es muy posible que la enfermedad periodontal pueda progresar a estados más avanzados.

Por lo anteriormente expuesto, podemos concluir que los pacientes que presentaron clínicamente enfermedad periodontal, tipo gingivitis y periodontitis, cuando la enfermedad periodontal se encuentra en la fase aguda (cambio de color, contorno, consistencia, presencia de exudado hemorrágico), en la mayoría de los pacientes las células de Langerhans se presentaron muy escasas y no hay una respuesta inmune adecuada puesto que no habrá una célula presentadora de antígeno para el linfocito T.

CONCLUSIONES

1. Se determinó que en la mayoría de los pacientes evaluados, las células de Langerhans se presentaron en pocas cantidades en el epitelio del surco y ausentes en el epitelio de unión.
2. El presente estudio evidencia que el ataque constante y persistente de microorganismos de la placa bacteriana, conduce al agotamiento de las células de Langerhans.
3. Se determinó que en todos los pacientes examinados, existió un abundante infiltrado inflamatorio, predominantemente linfocitario y monocítico.
4. No hubo relación directamente proporcional entre la cantidad de células inflamatorias y la cantidad de células de Langerhans, presentes en tejido gingival.
5. La disminución o agotamiento de las células de Langerhans, en los tejidos gingivales, puede traer como consecuencia el progreso de la enfermedad periodontal a grados más severos.
6. La escasa cantidad de células de Langerhans no permite una respuesta inmune adecuada.

RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio similar, que determine la presencia o ausencia de células de Langerhans, en los mismos pacientes que constituyeron la muestra del presente estudio, posterior al tratamiento periodontal, no solamente para aportar datos comparativos, sino también para conocer la influencia que puede tener el tratamiento periodontal sobre la ausencia o presencia de dichas células.
2. A Odontólogos y estudiantes de Odontología se recomienda tomar en cuenta la condición de la enfermedad periodontal, no sólo desde el punto de vista clínico y/o radiográfico, sino también desde el punto de vista inmunológico.
3. A los catedráticos del área de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, incluir dentro de los temas de enfermedad periodontal, no solamente la base fisiológica de la misma, sino también su base inmunológica.

4. Instruir y motivar a los pacientes con enfermedades periodontales crónicas, a mantener hábitos de higiene dental rigurosos, y así evitar acumulación de placa bacteriana por períodos largos y con ello contrarrestar el agotamiento de células inmunes.

5. Proveer un micrótomo (instrumento de laboratorio, utilizado para realizar cortes histológicos, para visualizarlos posteriormente en el microscopio de luz) bajo un adecuado funcionamiento al laboratorio de Histopatología de la Facultad de Odontología, en razón a que el actual ya no cumple satisfactoriamente su función, lo que puede conducir en algunos casos, a dar diagnósticos histopatológicos equivocados.

LIMITANTES

1. El costo del kit inmunológico S-100 (agente localizador de células de Langerhans, mediante la identificación de anticuerpos) es muy elevado, lo que limita obtener una muestra mayor de pacientes.
2. Durante la elaboración de los cortes de las biopsias incisionales, se observó que las cuchillas del micrótopo utilizado en el laboratorio de histopatología de la Facultad de Odontología, no están en condiciones adecuadas, lo que provocó en algunos casos, cortes demasiado gruesos y en otros el deterioro de los mismos, por lo que fue necesario repetir dichos cortes en un laboratorio particular.
3. El manejo de las muestras de tejido gingival, desde la realización de la biopsia incisional hasta la preparación de la muestra para estudio microscópico, es muy delicada, debido a que son muchos los procedimientos técnicos que se realizan sobre dichas muestras, lo que provocó en algunos casos, el deterioro de las mismas.

4. La técnica inmunohistoquímica con proteína S-100, recomienda el uso de un agente bloqueador, para sujetar el anticuerpo primario a la muestra de tejido. Sin embargo, por ser su costo muy alto, y muy dificultoso poder encontrarlo, se sustituyó por albúmina, la cual fue hecha a base de clara de huevo en el laboratorio de veterinaria.

5. En Guatemala no existe un laboratorio en donde se trabaje la técnica inmunohistoquímica con proteína S-100, por lo que fue difícil conseguir los reactivos adicionales no presentes en el kit inmunológico.

Anexos

FICHA PARA EXAMEN PERIODONTAL

NOMBRE DEL EXAMINADOR-----NOMBRE DEL PACIENTE-----

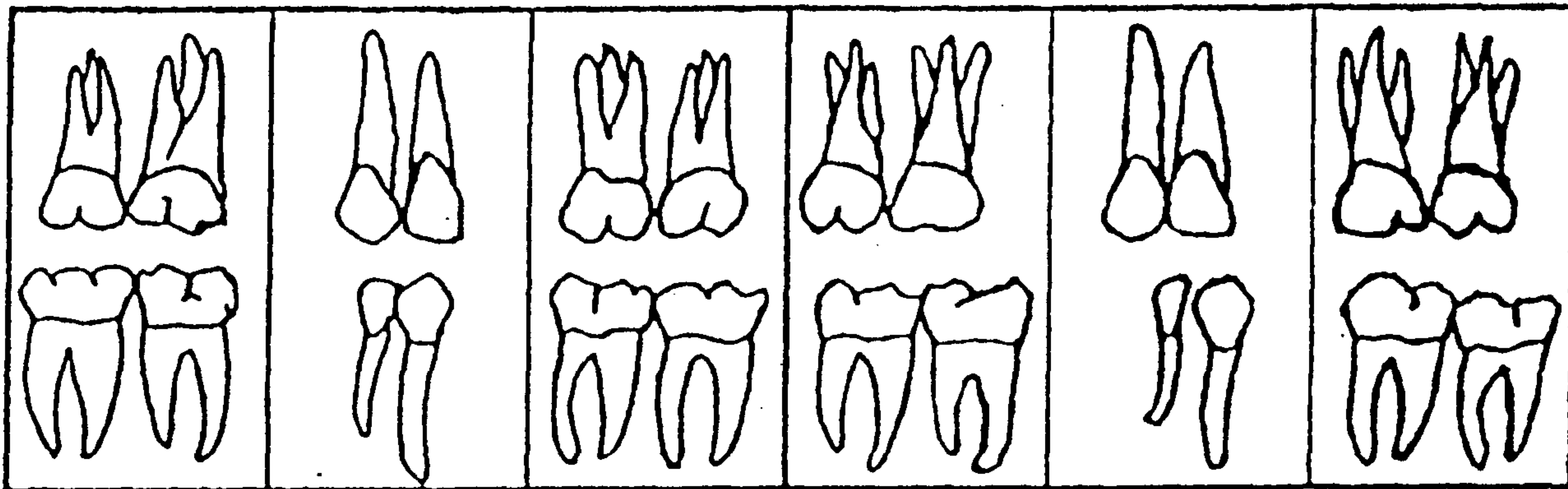
EDAD-----FECHA-----No FICHA CLINICA-----

Persepsibilidad													
Malposición													
Desgaste													
Abrasión													
Caries													
Lesión M-G													
Fac. Irritantes													
Movilidad													
Cálculos													
Exudado													
Tamaño													
Consistencia													
Contorno													
Color													

2 3 6 8 14 15 2 3 6 8 14 15

B U C A L

P A L A T A L



B U C A L

L I N G U A L

31 30 24 22 19 18 31 30 24 22 19 18

Color													
Contorno													
Consistencia													
Tamaño													
Exudado													
Cálculos													
Movilidad													
Fac. Irritantes													
Lesión M-G													
Caries													
Abrasión													
Desgaste													
Malposición													
Persepsibilidad													

Hoja recolectora de datos histológicos, en 20 pacientes con enfermedad periodontal, sin recibir tratamiento periodontal.

Paciente	Diagnóstico	Presencia de Células de Langerhans, Nivel 1	Presencia de Células de Langerhans, Nivel 2	Ausencia de Células de Langerhans.	Células de Langerhans, casos no evaluables.	Presencia de células inflamatorias	Ausencia de células inflamatorias
	Gingivitis					++	
1			X			++	
2			X			++	
3		X				++	
4				X		++	
5			X			++	
6		X				++	
7			X			++	
8		X				++	
9			X			++	
10			X			++	
	Periodontitis						
11		X				++	
12		X				++	
13		X				++	
14			X			++	
15			X			++	
16			X			++	
17			X			++	
18			X			++	
19					X	++	
20		X				++	

Nivel 1= Moderada cantidad

Nivel 2= Poca cantidad

++ = Moderada cantidad.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Ahlfors, E. E., P. A. Larsson, P. R. Bergstresser. -- *Langerhans cell surface densities in rat oral mucosa and human buccal mucosa.* -- pp. 390-397. -- En *Journal of Oral Pathology.* -- Vol.14, no.5 (May. 1985)
- (2) Barrett, James T. -- *Inmunología Medica.* -- 5 ed. -- México : Nueva Editorial Interamericana., 1990. -- pp. 45 - 58.
- (3) *Biología* / Claude A. Villee ... [et. al.] ; trad. por Laura María Mayela Zertruche Rodríguez. -- 4 ed. -- México : Editorial McGraw Hill Interamericana. 1996. -- pp. 110-113.
- (4) Breatnach, A. S. -- *A new concept of the relation between the Langerhans cell and the melanocyte.* -- pp. 279-81. -- *Journal Investigation Dermatologie.* -- Vol. 40 (1963)
- (5) Bos, I., A. Burkhardt. -- *Interepithelial cells of the oral mucosa.* -- pp. 65 - 81. -- *Journal Oral Pathology.* -- Vol. 9, no. 2 (Mar.1980)
- (6) Bourne, Janice A. -- *Manual de técnicas de coloracao por imunoperoxidase* / Janice A. Bourne ; trad. por Maria Leine Guion. -- Brasil : Departamento de Patología - FOB/USP Disciplina de Fisiopatología de Mucosa Bucal, 1989. -- pp. 103-105, 110-113.
- (7) Callejas, Mayra Sofia. -- *Determinacao de células de Langerhans no tecido gengival.* -- Tesis (Cirujano Dentista) -- Brasil : Bauru, FOB/USP. Disciplina de Periodontia, 1991. -- pp. 23-33.
- (8) Carranza, Fermín A. -- *Periodontología, Clínica de Glickman* / Fermín A. Carranza ; trad. Por Laura Elías Urdapilleta, Enriqueta Ceron Rossains. -- 7ª ed. -- México : Interamericana McGraw Hill, 1993. -- pp. 19-21.



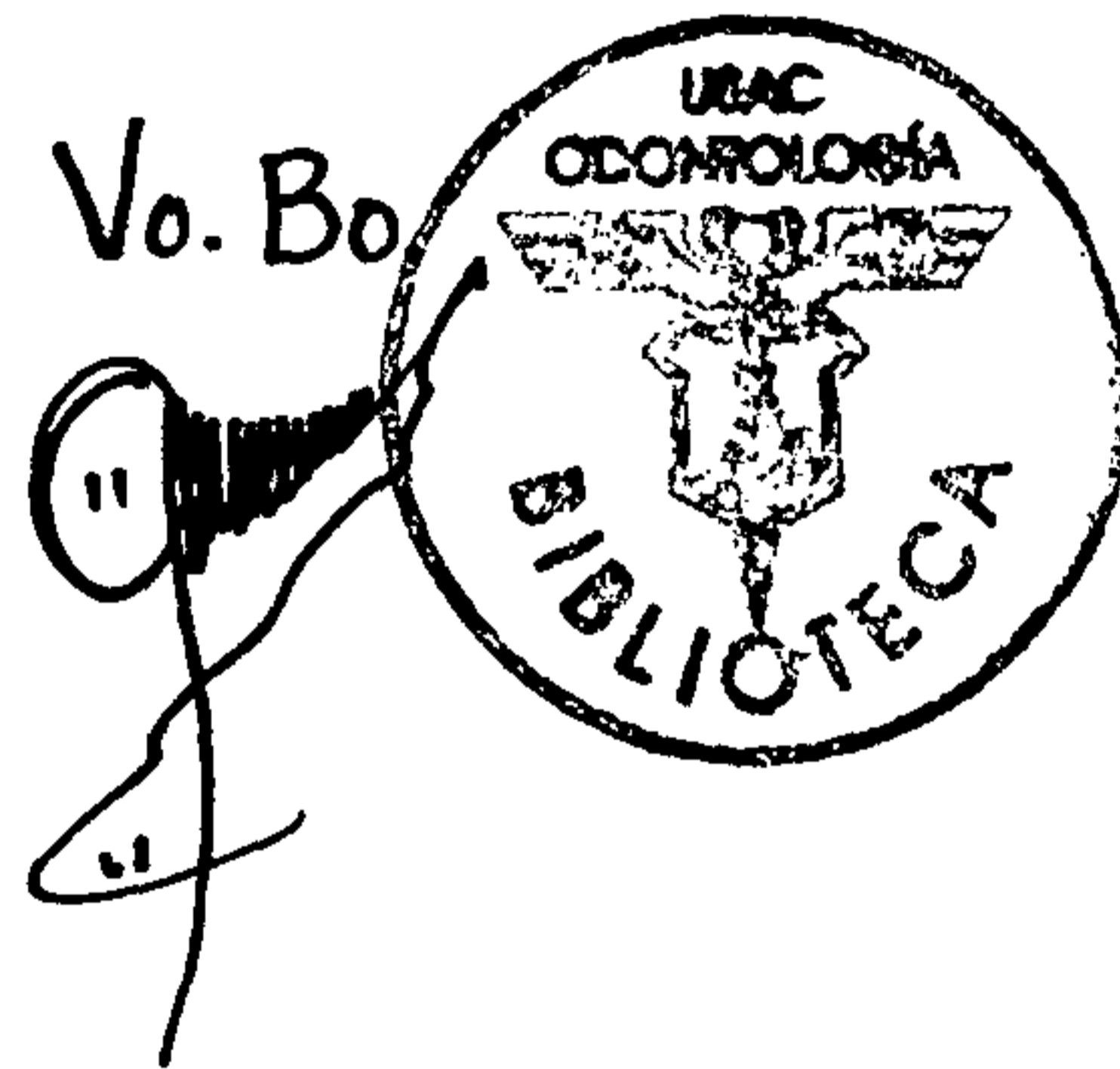
- (9) Curtis Helena. -- *Biología* / Helena Curtis ; trad. por Anamar Sánchez de Espilleta. -- 4a ed. -- México : Editorial Panamericana, 1992. -- pp. 85-88.
- (10) Fudenberg, Hugh. -- *Inmunología clínica* / Hugh Fudenberg ; trad por Fernando Sauder. -- 3ª ed. -- México : Editorial El Manual Moderno, 1982. -- pp. 35-50.
- (11) Genco Robert J. -- *Periodoncia* / Robert J. Genco, Henry M. Goldman., D. Walter Cohen ; trad. por Claudia P. Cervera Pineda, Rossanna Senties Castelló. -- México : Nueva Editorial Interamericana 1993. -- pp. 24-29
- (12) Guyton, Arthur. -- *Textbook of medical physiology*.-- 7th ed. -- Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1986. -- pp. 34-37.
- (13) Hitzig C., R. A. Monteil, Charbit, M. Teboul. -- *Quantification of T6+ and HLA/DR+ cells in normal and inflamed human Gingival*. -- Nice, France : Universtite de Nice, Faculte de Chirurgie Dentaire, Departement de Paradontologie. -- (Febrero 1999). s. p.
- (14) Jaskits, Silvia... [et. al.] -- *CD34⁺ cell-derived CD14⁺ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-1-dependent manner* pp. 4869-4877. En : *The Journal of Immunology*. No. 163 (1999).
- (15) Juhl, M., K. Stoltze, J. Reibel. -- *Distribution of Langerhans cells in clinically healthy human gingival epithelium with special emphasis on junctional epithelium*. -- En : *Scandinavian Journal of Dentistry*. (june 1988).
- (16) Leeson, C. Roland. - - *Atlas de histología* / C. R. Leeson, S. T. Leeson, A. A Paparo ; trad. por Elizabeth Ruge. -- 2 Ed. -- México : Editorial Interamericana, 1990. -- pp. 35-59.
- (17) Lindhe, Jan. -- *Periodontología Clínica* / Jan Lindhe ; trad. por Jorge Frydman. -- 2ª ed. -- Buenos Aires : Editorial Médica Panamericana, 1992. -- pp.21-22.



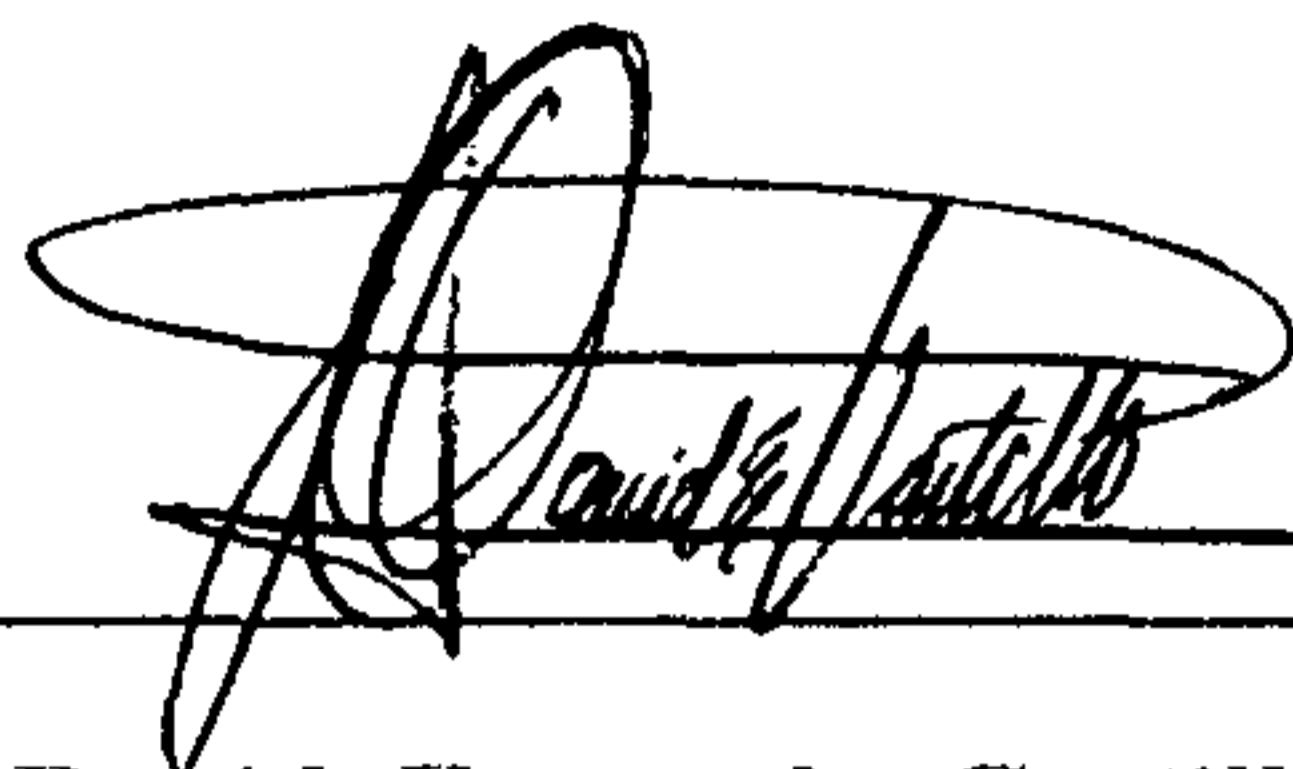
- (18) Matta, Hector. -- *Determinación del índice comunitario de necesidades de tratamiento periodontal, en estudiantes de 15 años de edad de institutos básicos nacionales en los departamentos de Sacatepéquez y Chimaltenango (Región central)*. -- Tesis (Cirujano Dentista) -- Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Odontología, 1998. -- pp. 27-35.
- (19) Morales, Rita. -- *Estado de salud periodontal de mujeres embarazadas en el último trimestre de gestación y un mes post parto, evaluación fluido crevicular, Ph, enzima aspartato amino transferasa, tipo de exudado*. -- Tesis (Cirujano Dentista) -- Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Odontología, 1998. -- pp. 16-19.
- (20) Moughal N. A., E. Adonogianaki, D. F. Kinane. -- *Langerhans cell dynamics in human gingiva during experimentally induced inflammation*. -- United Kingdom: Department of Oral Medicine and Pathology, Glasgow Dental Hospital & School. -- (1990). -- pp. 54-70.
- (21) Murray, Patrick. -- *Microbiología Medica* / Patrick Murray ; trad. por José A. Ramos Tercero. -- México : Mosby-Doyma Libros, 1995. -- pp. 34-35.
- (22) Murray Robert K. -- *Bioquímica de Harper* / Robert K. Murray ; trad. por María del Rosario Carsolio. -- 13^a ed. -- México : Editorial El Manual Moderno, 1993. -- pp. 156-180.
- (23) New Encyclopaedia Britannica : Macropaedia. -- 15th ed. -- United Kingdom : Britannica Publishing House, 1991. -- Vol. 21, pp. 691.
- (24) Newcomb, G. M., R. N. Powell. -- *The ultrastructure of human gingival Langerhans cells in health and disease*. -- pp. 737-34. -- Arch. Oral Biol. -- Vol. 31, no. 11, (Nov. 1986).



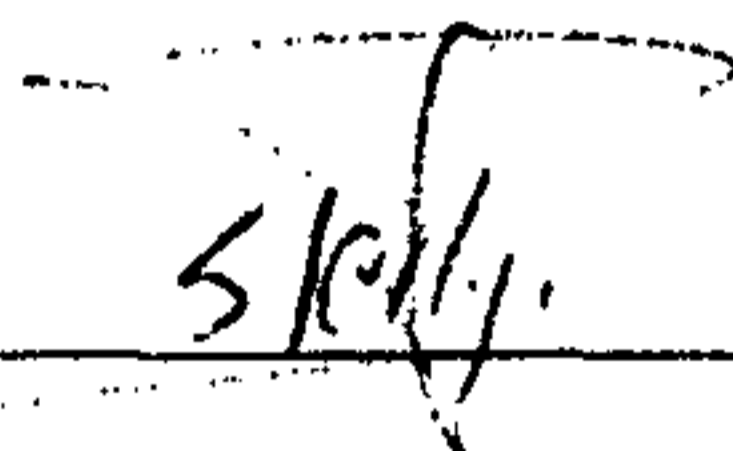
- (25) Roitt, Ivan. -- *Inmunología* / Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male. -- Madrid: Editorial Harcourt Brace de España, 1998. -- pp. 7-34, 18-31, 106-138.
- (26) Rowden, G. -- *Immuno - electron microscopic studies of surface receptors and antigens of human Langerhans cells.* -- pp. 593- 608. -- En : British Journal of Dermatology. -- Vol .97, no. 6, (Dec. 1977)
- (27) Schroeder, H., J. Theilade J. -- *Electron microscopy of normal human gingival epithelium.* -- pp. 95-119. -- En : Journal Periodontologie. -- Vol. 1, (1966)
- (28) Stingl, G... [et. al.] -- *Analogous functions of macrophages and Langerhans cells in the initiation in the immune response.* -- pp. 59 - 64. -- En : Journal Investigation Dermathologie. -- Vol. 71, no.1, (Jan.1978)



17 JUL. 2001



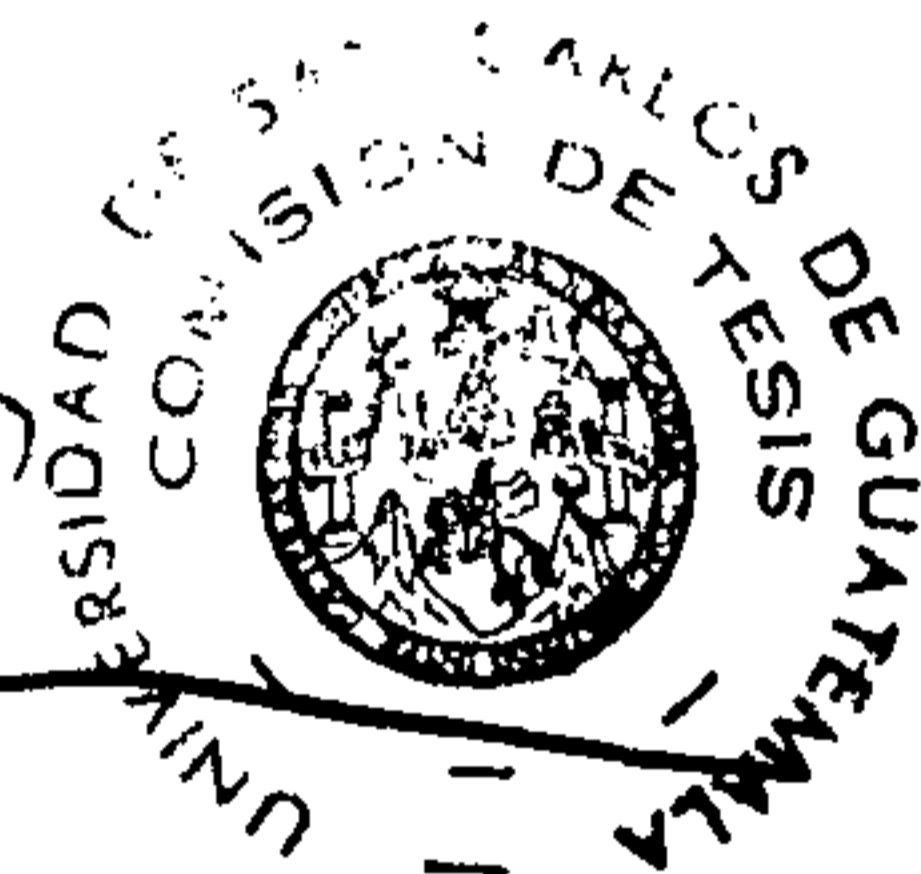
David Estuardo Castillo Hernández
Sustentante



Dra. Mayra Sofia Callejas Rivera
Asesora

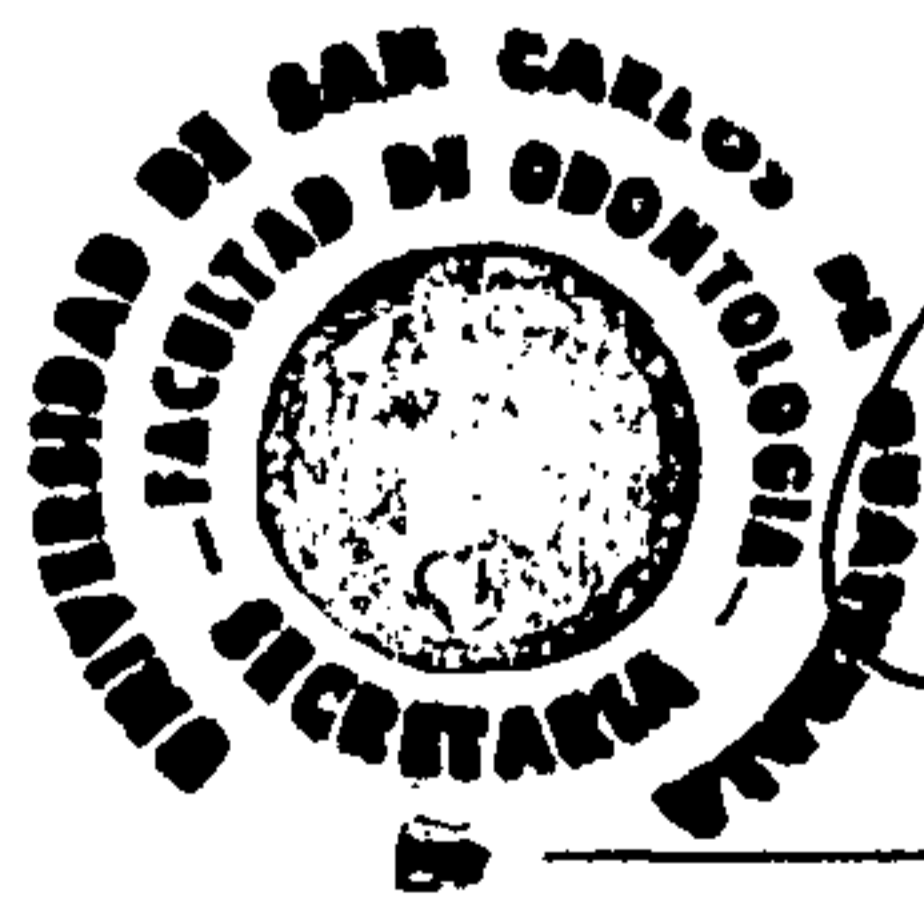


Dra. Ingrid Arreola Smith
Comisión de Tesis



Lic. Amanda López de León
Comisión de Tesis

Vo. Bo.
IMPRIMASE



Dr. Otto Raúl Torres Bolaños
Secretario