

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MAESTRÍA EN MEDICINA ESTOMATOLÓGICA

EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y
SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LESIONES DE
PACIENTES CON ESTOMATITIS AFTOSA RECURRENTE

Trabajo especial presentado ante la
ilustre Universidad Central de
Venezuela por la
Odontóloga Rosalba Gutiérrez Escalante
para optar al título de Magíster Scientiarum en
Medicina Estomatológica

Caracas, 2004

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MAESTRÍA EN MEDICINA ESTOMATOLÓGICA

EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y
SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LESIONES DE
PACIENTES CON ESTOMATITIS AFTOSA RECURRENTE

Autor: Od. Rosalba Gutiérrez Escalante

Tutor: Dra. María Correnti de Plata

Caracas, 2004

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida y bendecirme todos los días,

A mis padres y a mi hermana Olga Cecilia.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora: Dra. María Correnti por su excelente asesoramiento y guía durante la realización de la tesis.

A la Lic. Maira Avila del Instituto de Oncología y Hematología del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, por ser mi maestra y enseñarme con paciencia y comprensión.

Al Sr. Alexis Blanco y especial recuerdo del Sr. Meléndez † del Instituto de Oncología y Hematología del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, por su amabilidad y cortesía, que bueno es contar con una mano amiga.

Al Dr. Héctor Arrechdera, Dra. Miriam Strauss, Marianela, Noraidis, Alegna, Rosa, José Gregorio y a todo el gran equipo de la Sección de Biología Celular del Instituto de Medicina Tropical “Dr. Félix Pifano” de la Facultad de Medicina, por sus instrucciones oportunas y disposición para facilitar mi trabajo, por hacerlo ameno y agradable, por brindarme su amistad y compañía, gracias son una verdadera familia.

Al Dr. Félix Tapia, Lic. Nilka Díaz, Lic. Miguel Marzal, del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biomedicina, por su importante contribución y ayuda desinteresada, compartir sus conocimientos y su infraestructura, muchas gracias por su profesionalismo.

A mi colega Od. Floribel Cedeño de la Cátedra de Histología de la Facultad de Odontología, por tu tiempo, orientación y apoyo para la culminación de la tesis. ¡MUCHISIMAS GRACIAS!

A todos mis profesores de la Maestría, principalmente a las profesoras Celenia Pérez, Cecilia Jiménez, Magdalena Mata y al profesor German Pardi, por sus enseñanzas y auténtica vocación docente: ¡EJEMPLOS A SEGUIR!

A mi colega Od. Romy Casbarro, por tus consejos sinceros y apropiados, ¡GRACIAS AMIGI! por todas tus recomendaciones.

A mis compañeros de la Maestría: Tatiana López, Ramón Kkilikan y Octavio Arriaga, por ser los MEJORES.

A mi tía Dra. María Escalante de Rotundo por tu dedicación y atención durante todo mi post-grado y en especial con la elaboración de la tesis.

A la Dra. Helen Rivera por su cooperación en el procesamiento de los resultados histopatológicos.

Especialmente al Ing. Gustavo Torres no solamente por ser “mi traductor simultáneo”, sino por tu valioso esfuerzo en animarme en los momentos más importantes, por tu apoyo moral, por tu amistad incondicional, por tus indicaciones siempre pertinentes, por tu influencia y energía positiva, por tus palabras alentadoras, en fin, por toda tu colaboración, ¡MIL GRACIAS!

LISTA DE CONTENIDOS

	Página
1. Introducción	
1	
2. Antecedentes de la Investigación	4
1. Etiología	5
1.1. Factores Inmunológicos	7
1.2. Factores Genéticos	23
1.3. Aspectos Microbiológicos	26
1.4. Condiciones Sistémicas asociadas con la EAR	33
1.5 Otros factores vinculados con la EAR	42
2. Epidemiología	48
2.1. Características Clínicas	50
3. Diagnóstico	57
4. Tratamiento	61
Objetivos Generales y Específicos	67
3. Materiales y Métodos	69
4. Resultados	79
5. Discusión	118
6. Conclusiones	144
7. Referencias	
147	

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Población Estudiada.	96
Gráfico 2: Promedios de Edad de la Población Estudiada.	97
Gráfico 3: Distribución de la Población Estudiada por Género.	98
Gráfico 4: Distribución de la Población Estudiada según los tipos de EAR.	100
Gráfico 5: Distribución por Género y Tipos de EAR.	101
Gráfico 6: Enfermedades y Condiciones Sistémicas presentes en el grupo de pacientes con EAR.	102
Gráfico 7: Promedio de subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y CD8+ en tejidos de pacientes con EAR y en el grupo control.	105
Gráfico 8: Promedio de Linfocitos T CD4+ y CD8+, según el tipo de EAR.	107
Gráfico 9: Expresión de la Molécula de Adhesión ICAM-1 en tejidos de pacientes con EAR y en el grupo control.	109
Gráfico 10: Expresión de la Molécula de Adhesión ICAM-1 en pacientes según el tipo de EAR.	111

Gráfico 11: Expresión de la Molécula de Adhesión VCAM-1 en tejidos de pacientes con EAR y en el grupo control.	113
Gráfico 12: Expresión de la Molécula de Adhesión VCAM-1 en pacientes según el tipo de EAR.	114

LISTA DE FOTOS

	Página
Foto 1: EAR tipo Menor.	99
Foto 2: EAR tipo Mayor.	99
Foto 3: Histopatología.	103
Foto 4: Histopatología.	103
Foto 5: Histopatología.	103
Foto 6: Histopatología.	103
Foto 7: Linfocitos T citotóxicos CD8+ en tejidos de pacientes con EAR 10X.	104
Foto 8: Linfocitos T citotóxicos CD8+ en tejidos de pacientes con EAR 40X.	104
Foto 9: Linfocitos T ayudadores-inductores CD4+ en tejidos de pacientes con EAR 10X.	106
Foto 10: Linfocitos T ayudadores-inductores CD4+ en tejidos de pacientes con EAR 40X.	106
Foto 11: Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en tejidos de pacientes con EAR 10X.	108
Foto 12: Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en tejidos de pacientes con EAR 10X.	108
Foto 13: Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en tejidos de pacientes con EAR 40X.	108

Foto 14: Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en tejidos de pacientes con EAR 40X.	110
Foto 15: Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en tejidos de pacientes con EAR 40X.	110
Foto 16: Expresión de la Molécula de Adhesión VCAM-1 en tejidos de pacientes con EAR 40X.	112
Foto 17: Expresión de la Molécula de Adhesión VCAM-1 en tejidos de pacientes con EAR 10X.	112
Foto 18: Expresión de la Molécula de Adhesión VCAM-1 en tejidos de pacientes con EAR 40X.	112

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I: Moléculas de Adhesión Epitelial Bucal.	115
Tabla II: Etapas clínicas de la EAR.	116
Tabla III: Frecuencia de pacientes con EAR según localización de la lesión.	117

RESUMEN

La Estomatitis Aftosa Recurrente (EAR) es una condición muy común, caracterizada por la recurrencia de úlceras en la mucosa bucal no queratinizada, estas lesiones son dolorosas y a menudo son la fuente de mucha preocupación para los pacientes.

En la actualidad las investigaciones dirigidas a determinar la etiología de la EAR, se enfocan hacia el componente inmunológico, la evidencia más relevante indica que los individuos afectados, presentan defectos de la respuesta inmunitaria mediada por células. Adicionalmente, existe mucha atención en destacar la importancia de las moléculas de adhesión en el reclutamiento del infiltrado inflamatorio en la EAR.

La presente investigación determinó la densidad de las subpoblaciones linfocitarias y la expresión de las moléculas de adhesión en tejidos de pacientes con EAR, con la finalidad de aportar datos sobre nuestra población, que ayuden a la selección de tratamientos adecuados para nuestros pacientes.

Los resultados sugieren la implicación de los linfocitos T, y por tanto, de una respuesta inmune mediada por células activadas en la patogénesis de la EAR, y que las moléculas de adhesión juegan un papel importante en las interacciones celulares, en la inmunidad y en el reclutamiento del infiltrado celular inflamatorio en esta lesión, que consiste predominantemente de linfocitos.

I. INTRODUCCIÓN

La Estomatitis Aftosa Recurrente es una enfermedad común en humanos, dentro de la cavidad bucal es la afección ulcerativa más frecuente de los tejidos blandos de las mucosas. Estas ulceraciones están caracterizadas por ser dolorosas, superficiales, solitarias o múltiples limitadas a la mucosa no queratinizada. Pueden dificultar actividades tales como hablar, comer y deglutir, afectando negativamente la calidad de vida del paciente. Sus síntomas son exacerbados y a menudo debilitantes en individuos inmunosuprimidos (Birek, 1999; Greenberg y Pinto, 2003).

La palabra “afta” proviene del griego que significa úlcera. Por consiguiente la nomenclatura “úlceras aftosas” es en cierta forma redundante pero la literatura médica continua refiriéndose a esta lesión bucal como úlceras aftosas (Fischman, 1994). Acoplado esto con el término “estomatitis” denota que estas ulceraciones son específicas de la mucosa bucal por lo que el término “estomatitis aftosa” en lugar de “úlceras aftosas” es considerado una terminología más precisa y adecuada (Casiglia, 2002).

La gran morbilidad causada por las lesiones y la alta prevalencia en la población general, hacen la comprensión de este fenómeno de gran importancia. Las investigaciones epidemiológicas de la EAR revelaron un amplio rango de ocurrencia (5-60%), dependiendo de las características del grupo de estudio y el modo de evaluación (Katz y col, 2001).

La etiología es desconocida considerada multifactorial, controversial y todavía no aclarada en su mecanismo etiopatogénico. La mayoría de las publicaciones consideran los factores inmunológicos como responsables directos o indirectos favorecedores de la aparición de las lesiones. En este sentido varios autores entre ellos, Porter y col. (1998) y López y Bermejo (1998) señalan la probable existencia de un fenómeno de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, que en personas genéticamente predispuestas y en presencia de una serie de factores asociados, desencadenarían las aftas.

Otras condiciones se han planteado, como alteraciones hormonales, estrés, traumatismo, hipersensibilidad a productos alimenticios, deficiencias de vitamina B₁₂, ácido fólico y hierro; aunque ninguna se considera como factor primario importante para el desarrollo de las aftas, cualquiera puede tener un papel

modificador o desencadenante (Woo y Sonis, 1996). También existen reportes que involucran factores genéticos y microbiológicos. Algunos investigadores han observado una asociación entre EAR y la reactivación del virus varicela-zoster y citomegalovirus (Pedersen y Hornsleth, 1993).

En la actualidad numerosas investigaciones acerca de la etiología de la EAR se centran en anormalidades inmunitarias. El objetivo del presente estudio fue evaluar el aspecto inmunológico destacando la respuesta celular y el papel que cumplen las moléculas de adhesión en la interacción celular. Este tipo de investigación no ha sido efectuada en nuestro país por lo que fue realizada con pacientes seleccionados de la Facultad de Odontología, ya que allí se brinda atención a un gran número de pacientes, por ser una institución de referencia nacional, determinando de esta manera la relación de las alteraciones inmunológicas con dicha patología en nuestra población. Además esta investigación revisa los factores etiopatogénicos actualmente asociados, la evaluación clínica de los pacientes y describe las opciones de tratamiento presentes para esta condición.

II. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

La Estomatitis Aftosa Recurrente (EAR) está definida como la presencia de úlceras recurrentes confinadas a la mucosa bucal, en pacientes sin otros signos o síntomas de enfermedad subyacente. Aproximadamente 1 de 5 personas en el mundo están afectadas, con una edad común de inicio entre los 10-19 años. En los países angloparlantes estas lesiones se conocen comúnmente como “canker sores” (Brice y col, 2000).

A pesar de la prevalencia de la EAR, la etiología de la enfermedad no está clara y resulta un enigma para los investigadores, ya que lesiones clínicas asociadas con gran número de procesos locales y sistémicos muy dispares muestran los mismos rasgos histopatológicos (Ship y col, 2000).

El término griego *aphthae* fue inicialmente usado en relación a las enfermedades de la boca y esta acreditado a Hipócrates (460-370 A C). La Estomatitis Aftosa Recurrente fue descrita por primera vez en 1888, y ahora es la enfermedad de la cavidad bucal más prevalente y conocida en seres humanos. Está caracterizada por ser una ulceración espontánea, auto-limitada a la mucosa bucal, dolorosa, poco profunda, que recurre a

intervalos variables en pacientes sin otros signos de enfermedad, dando como resultado una notable discapacidad. Las lesiones pueden presentarse únicas o en grupos y usualmente afecta la mucosa no queratinizada (Ship y col, 2000).

1. ETIOLOGÍA

La EAR es una enfermedad muy común cuya etiología no se conoce con exactitud, diversos factores etiológicos han sido involucrados en esta enfermedad y una colección considerable de evidencias sugiere una predominante base inmunológica. También una fuerte predisposición genética ha sido demostrada. Además un número de factores predisponentes locales y generales han sido detectados y pueden jugar un papel importante (Miller y col, 1980).

La mayoría de los pacientes con EAR están, por lo demás sanos y aunque la EAR es una entidad aislada, en algunos pacientes, la presencia de lesiones crónicas de EAR se asocia con procesos sistémicos. Los trastornos sistémicos más comúnmente asociados con lesiones aftosas crónicas y recidivantes son el síndrome de Behçet y los trastornos con malabsorción gastrointestinal crónica, especialmente la

enfermedad de Crohn y la enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca) (Sedghizadeh y col, 2002). A menudo, los síndromes de malabsorción son leves o incluso, asintomáticos, pero aun así parecen capaces de producir deficiencias nutricionales de ácido fólico, vitamina B12 y hierro, todas han sido relacionadas con úlceras aftosas recidivantes crónicas (Neville y col, 2002).

Muchos pacientes relacionan los episodios ulcerosos con la ingesta de ciertos alimentos, especialmente frutos secos y chocolate, mientras que otros presentan asma crónica y/o alergias múltiples. Se ha hallado correlación con el ciclo menstrual, períodos de estrés, ansiedad y con antecedentes familiares de las mismas lesiones.

Sin embargo, hasta la fecha, ninguna etiología principal ha sido descubierta. Dada la gran variedad de trastornos asociados, no se ha elaborado todavía ninguna teoría patogénica unificadora, salvo que las lesiones parecen relacionarse con el sistema inmunitario.

Esta enfermedad esta fácilmente identificada y diagnosticada, así como sus características clínicas están bien definidas. Ya

que una sola causa no ha sido establecida como determinante en la aparición de la EAR, la presente investigación describe los diversos factores relacionados con la presencia de la lesión.

1.1 FACTORES INMUNOLÓGICOS

Respuesta celular

En la actualidad las investigaciones dirigidas a determinar la etiología de la EAR se enfocan hacia el componente inmunitario, aunque en el futuro podrían identificarse agentes etiológicos específicos. Sin embargo, sean cuales sean los agentes desencadenantes, son las interacciones del sistema inmunitario, encargado de proteger y reparar al organismo, las que contribuyen principalmente a la magnitud del proceso patológico.

La evidencia inmunológica más importante indica que los individuos afectados por esta enfermedad podrían sufrir un defecto de la respuesta inmunitaria mediada por células. Existen estudios que indican que en las etapas muy tempranas de la afección pueden observarse linfocitos T CD4, a los que se les adjudica una función de mediadora de la inflamación. Se ha detectado que las células basales del área afectada expresan de una manera temprana antígenos leucocitarios humanos HLA-DR,

lo que sugiere también un papel para estas células. Puesto que se requieren antígenos HLA-DR para presentar un antígeno a las células inmunocompetentes, podría especularse que estas células son autoantígenos que se presentan a los linfocitos T infiltrantes, lo cual conduciría a la destrucción de las células basales (Lindemann y col, 1985; Savage y col, 1988).

El principal apoyo para una base inmunitaria se relaciona con alteraciones del número de los subtipos de células T en la sangre periférica en comparación con los controles, los individuos con EAR muestran una relación alterada de células CD4 y CD8. Diversos estudios *in vitro* como los de Thomas y col. en 1990, han demostrado que los linfocitos T presentes en las personas afectadas tenían actividad citotóxica para las células epiteliales gingivales en cultivos, pero no así para otras células epiteliales. También los trabajos tanto de Pedersen y col. en 1991 como los de Savage y Seymour en 1994 demostraron un aumento de linfocitos T (CD8) en pacientes con EAR. Apoyando estos hallazgos se encuentran los estudios de Ratis y col. (1991), en muestras de sangre periférica de pacientes con EAR los cuales presentan aumentos en los niveles de los linfocitos T CD8+ y/o disminución de los linfocitos T CD4+.

En los estudios realizados *in vitro* por Natah y col. en 2000, indicaron que los leucocitos sanguíneos periféricos de los pacientes con la EAR, presentaban aumento en la citotoxicidad hacia el epitelio de la mucosa bucal, reforzando de esta manera que la EAR puede representar una reacción tipo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo a la mucosa bucal. Este concepto está apoyado por el conocimiento que las células mononucleares sanguíneas periféricas de los pacientes con EAR, (pero no con enfermedad activa) causan lisis de las células de la mucosa bucal, que expresan antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I y II. Más importante, aún es que las células T CD4+ sanguíneas periféricas de los pacientes con EAR también pueden causar lisis epitelial (Savage y Seymour, 1994). Es factible entonces, que las reacciones citotóxicas mediadas por las células T CD4+ y CD8+ ocurren en la EAR.

Existe evidencia sustancial indicando que la EAR es resultado de una respuesta inmune predominantemente mediada por células y en base a los reportes anteriores, en la actualidad se piensa que la EAR depende de una disfunción inmunológica local, en la cual los linfocitos T desempeñan una función significativa. Sin embargo, la naturaleza del estímulo que inicia el proceso aún es un enigma. El agente causante puede ser un

antígeno endógeno (autoinmunitario) o exógeno (hiperinmunitario) o podría ser un factor inespecífico como el traumatismo, en el cual pueden estar implicados mediadores químicos propios de la respuesta inmunitaria.

Respuesta humoral

Entre los cambios reportados en los parámetros inmunes en la EAR, existen hallazgos ambiguos en relación a los niveles séricos de los isotipos de las inmunoglobulinas. La primera observación de la deficiencia de las subclases de las IgG data de casi 30 años (Terry, 1968), observó que una o más de una de las cuatro subclases estaban disminuidas en el suero de unos pocos pacientes quienes sufrían de susceptibilidad aumentada a las infecciones y también en el suero de algunos donantes de sangre saludables. En vista de la probabilidad que la EAR tiene una base inmunológica muchas investigaciones han examinado los niveles séricos de las subclases de la IgG en los pacientes con EAR.

Scully y col. en 1983, reportaron aumentos de las inmunoglobulinas A, G, D y E en el suero de diferentes grupos de pacientes con EAR. En otro estudio, Porter y col. en 1992 evaluaron los niveles de anticuerpos en 71 pacientes con EAR

tipo Menor y no hallaron deficiencias en los niveles séricos en las subclases de la IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄). En contraste, Vicente y col. en 1996, estudiaron 34 pacientes (23 con EAR activa y 11 con EAR inactiva) y reportaron niveles séricos significativamente más bajos de la IgG₂ en la etapa inactiva de la enfermedad, sugiriendo que los niveles séricos de esta subclase de IgG así como el nivel de la IgA total, pueden sufrir cambios transitorios dependiendo de los diferentes periodos de la enfermedad.

Recientemente, Sistig y col. (2002) reportaron que los niveles de las subclases salivales de las inmunoglobulinas IgG₁ - IgG₄ así como de IgA₂, están aumentadas en pacientes con EAR en la fase aguda, pero ha sido difícil comparar estos resultados con otros datos publicados anteriormente, porque la información sobre los niveles de la IgA salival están limitados a la determinación de la IgA total, en vez de las subclases de IgA, además no hay datos sobre las subclases de la IgG en saliva.

A pesar de las investigaciones existentes no hay una teoría unificadora de la inmunopatogénesis de la EAR. Parece que la ulceración es debida a la acción citotóxica de los linfocitos y monocitos sobre el epitelio bucal, pero el desencadenante de

estas respuestas permanece sin aclarar, lo que plantea el estudio de otros componentes del sistema de la respuesta inmunológica.

Moléculas de adhesión celular

Dentro del sistema de defensa, las moléculas de adhesión celular (MACs) están localizadas en las superficies de todas las células, donde ellas se unen a moléculas de la matriz extracelular, o a los receptores presentes sobre otras células. La adhesión de la célula es crítica en los procesos dinámicos, necesarios para la morfogénesis de los tejidos en el desarrollo y el mantenimiento de tejidos complejos diferenciados en los organismos adultos. Las MACs tienen la capacidad de conectar el exterior de la célula con el interior. Ellas forman enlaces estructurales entre el citoesqueleto de la célula y la matriz extracelular o entre células, y también funcionan como receptores señalizantes, transduciendo señales iniciadas por interacciones celulares las cuales regulan procesos muy diversos, incluyendo la división de las células, la migración y la diferenciación.

Las moléculas de adhesión celular son esenciales para el mantenimiento de la estructura estable del epitelio escamoso

estratificado. En el epitelio normal, los queratinocitos están unidos a los otros y a la membrana basal subyacente. La adhesión celular, sin embargo, debe ser dinámica para facilitar la movilidad y el recambio de las células.

Actualmente nuevas MACs están siendo todavía identificadas, y las familias que agrupan estas moléculas se están volviendo muy complejas. Se describen, cuatro grupos principales: las integrinas, las caderinas, las selectinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) (Tabla I). Un grupo separado incluye moléculas tales como la CD44, la cual no cae dentro de ninguna de las otras categorías específicas. Las selectinas y las moléculas de la superfamilia de las Ig están expresadas principalmente por células involucradas en la inflamación y en reacciones basadas en la inmunidad (p. ej. los leucocitos y las células endoteliales) (Thomas y Speight, 2001).

Integrinas

Las integrinas son una familia heterodimérica, de glucoproteínas transmembrana catión-dependientes, halladas virtualmente en todas las células y son la familia más grande de receptores de adhesión-matriz extracelular. Como mediadoras de la adhesión celular, están involucradas en muchos procesos

dinámicos que regulan las vías de señalización celular, tales como la proliferación, migración, supervivencia de las células y diferenciación (Hynes, 1992).

Cada integrina consiste de una subunidad α y una β la cual se asocia en una manera no covalente, para formar heterodímeros funcionales. Dieciséis subunidades α y ocho subunidades β han sido identificadas, y estos se combinan para formar más de 20 receptores, cada cual exhibe un perfil diferente de enlace-ligando. La mayoría de las células expresan por lo menos una, y usualmente varias, la integrina heterodimérica, aunque algunas integrinas son específicas del tejido, como por ejemplo las integrinas β_2 están expresadas únicamente sobre los leucocitos.

La mayoría de las células de los mamíferos constitutivamente expresan múltiples integrinas, y muchas de estas pueden ser receptores para el mismo ligando. Las distintas integrinas no están restringidas a un tipo de célula, sugiriendo que la multiplicidad del reconocimiento del ligando no es un reflejo de simples diferencias al tipo específico de célula. El aparente alto grado de redundancia de las integrinas, sugiere que diferentes integrinas median diferentes funciones o diferentes aspectos de

la misma función por medio de la transducción de diferentes señales.

Caderinas

Las caderinas son glucoproteínas transmembrana, de cadena-simple que funcionan de una manera calcio-dependiente. Juegan un importante papel en la clasificación de las células y el reconocimiento durante el desarrollo y están consideradas ser importantes reguladoras de la morfogénesis en varios órganos. La sobre-regulación o sub-regulación de la expresión de las caderinas se correlaciona con una variedad de eventos morfogénéticos que involucran agregación o desagregación de la célula. Sin embargo, en el post-desarrollo, las caderinas continúan siendo expresadas en altos niveles en virtualmente todos los tejidos sólidos. A medida que las caderinas están funcionando, la activación de otras MACs tiene poco efecto en la adhesión célula-célula. Por consiguiente parece que las caderinas juegan el principal papel en mantener el contacto físico célula-célula (Takeichi, 1990 y 1991).

Selectinas

Las selectinas son una familia de proteínas transmembrana tipo 1 de cadena simple halladas en las plaquetas, leucocitos,

linfocitos y células endoteliales (Tedder y col, 1999). Cada selectina está compuesta de un orden de dominios discretos de proteínas. Están caracterizados por un dominio unido a la lectina (la cual da a la familia su nombre).

La familia selectina de las moléculas de adhesión, predominantemente median la fijación inicial de los leucocitos a las células endoteliales, las cuales permiten a los leucocitos rodar a lo largo de la pared del vaso (Tedder y col, 1999). El rodamiento del leucocito y la subsiguiente extravasación en los sitios de inflamación involucran una serie de complejas interacciones entre las múltiples familias de las moléculas de adhesión, incluyendo las integrinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los tres miembros de la familia de la selectina son: las selectinas-L, -E y -P (CD62L, E, y P, respectivamente).

La selectina-L está constitutivamente expresada en esencialmente todos los neutrófilos sanguíneos y los monocitos, en la mayoría de las células T y B producidas en la sangre, sobre una subclase de células natural killer y sobre células hematopoyéticas inmaduras (Lewinsohn y col, 1987). La selectina-L media la unión del leucocito para activar el endotelio en los sitios de inflamación, y en la unión del linfocito a las

vénulas endoteliales altas de los ganglios linfáticos periféricos durante el regreso del linfocito (Tedder y col, 1999). Ya que la selectina-L es ampliamente expresada, esta juega un papel en el tráfico de todos los linajes de leucocitos.

La selectina-P es expresada sobre las plaquetas activadas y las células endoteliales estimuladas. Esta selectina esta constitutivamente sintetizada y es almacenada en los gránulos α de las plaquetas y en los cuerpos Weibel-Palade de las células endoteliales. Es rápidamente redistribuida a la superficie de la célula, seguida a la estimulación de la célula (McEver y col, 1989), pero la expresión es de vida corta. La selectina-P media tempranamente la adhesión de los neutrófilos y los monocitos, para activar a las plaquetas y a las células endoteliales (Tedder y col, 1999).

La expresión de la selectina-E está limitada al endotelio, principalmente el endotelio responde a estímulos inflamatorios (Bevilacqua y col, 1989). La selectina-E media la adhesión de los neutrófilos, monocitos y algunas células T de memoria al endotelio vascular (Tedder y col, 1999).

Superfamilia de la Inmunoglobulina

La superfamilia de la inmunoglobulina (SFlg) abarca una diversa colección de moléculas que comparten la estructura básica de las inmunoglobulinas e incluye la familia de la molécula de adhesión intercelular (ICAM), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), molécula de adhesión celular neural (NCAM) y la molécula de adhesión celular del endotelio de la plaqueta (PECAM) (Simmons, 1999). No todos los miembros de las SFlg funcionan de la misma manera: la adhesión puede ser dependiente del calcio (ICAM-1, VCAM, PE-CAM) o calcio-independiente (N-CAM, CEA). Las uniones pueden ser heterotípicas (La ICAM-1 es reconocida por las integrinas β_2 halladas en las células sanguíneas blancas, la VCAM reconoce la integrina $\alpha_4\beta_1$ que se encuentra en los linfocitos) o pueden ser homotípicas, la (PECAM [CD31] reconoce otras moléculas PECAM como su ligando) (Albeada y Buck, 1991).

Los miembros de las SFlg son particularmente importantes en la inflamación y en las reacciones basadas en la inmunidad. Ellas están involucradas en el tráfico de células, incluyendo la extravasación de células blancas y linfocitos residentes a los ganglios linfáticos (ICAM-1, ICAM-2, VCAM, PECAM-1) (Springer, 1990; Butcher, 1991).

Molécula de adhesión intercelular-1 (CD54)

La ICAM-1 esta ampliamente distribuida tanto en las células linfoides como en las no-linfoides y está constitutivamente expresada en las células endoteliales vasculares y en los linfocitos T y B activados. Tienen una distribución total similar a la de la molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, el antígeno leucocitario humano (HLA)-DR (Wawryck y col, 1989). La ICAM-1 está marcadamente sobre-regulada por una variedad de estímulos inflamatorios, tales como el factor de necrosis tumoral y la interleucina-1 (Dustin y col, 1986), y parece que esta sobre-regulación es importante en la adhesión y migración de los neutrófilos circulantes y monocitos, los cuales unen la ICAM-1 *vía* sus integrinas $\beta 2$. Muchos tipos de células, incluyendo las células epiteliales, pueden ser inducidas para expresar altos niveles de ICAM-1 después de la exposición al interferón- γ , una citocina producida por los linfocitos (Nickoloff y col, 1990). Los estudios funcionales han demostrado que la expresión de la ICAM-1 en los queratinocitos aumenta la migración de las células inflamatorias y la fijación *vía* receptor integrina $\beta 2$ hallada en las células sanguíneas blancas (Dustin y col, 1988).

Molécula de adhesión celular vascular-1 (CD106)

La VCAM es una molécula de adhesión inducible por citoquinas hallada en las células endoteliales, células dendríticas y macrófagos tisulares (Osborn y col, 1989). Está sobre-regulada por los mismos mediadores inflamatorios como la ICAM-1 y sobre el mismo curso de tiempo. La VCAM expresada en células endoteliales activadas por las citocinas, une a la integrina $\alpha_4\beta_1$ a los linfocitos T (Elices y col, 1990).

Molécula de adhesión célula endotelial-plaqueta (CD31)

La PECAM (CD31) está altamente expresada sobre las células endoteliales en las uniones intercelulares, sobre las subclases de las células T, y, en menos extensión, sobre la mayoría de los otros leucocitos (Muller y col, 1993). La PECAM se une a sí misma homotípicamente (Fawcett y col, 1995) y a la integrina $\alpha\beta_3$ heterotípicamente (Buckley y col, 1996) y es requerida para la migración transendotelial de los leucocitos a través de las uniones intercelulares de las células endoteliales (Muller y col, 1993).

Los queratinocitos bucales no expresan constitutivamente la ICAM-1 excepto en el epitelio de la unión (Crawford y Hopp, 1990), aunque la alta expresión de la ICAM-1 ha sido reportada

en las células epiteliales bucales en cultivo (Li y col, 1996). La ICAM-1 es, sin embargo, inducible mediante citocinas en las células epiteliales bucales y parece facilitar la acumulación intraepitelial de los linfocitos T o neutrófilos. En la piel humana, la expresión de la ICAM-1 se correlaciona con la acumulación de linfocitos T en el epitelio (Nickoloff y col, 1990), y los queratinocitos bucales basales y las células de Langerhans expresan la ICAM-1 en el liquen plano (Walton y col, 1994). La inducción de la expresión de la ICAM-1 por los queratinocitos ha sido también reportada en la ulceración bucal recurrente (Healy y Thornhill, 1999).

Actualmente existe mucha atención en el papel del endotelio vascular en el reclutamiento de los infiltrados inflamatorios, como el que presenta la EAR. Histológicamente, las lesiones tempranas de EAR, muestran un denso infiltrado linfocítico perivascular, aún antes de que se desarrolle la úlcera, el cual llega después a ser más difuso y mezclado con el influjo de leucocitos polimorfonucleares a medida que la lesión de desarrolla. Las moléculas de adhesión de células endoteliales pueden jugar un papel fundamental en este proceso, incluyendo las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas: la molécula de adhesión celular vascular-1

(VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1). Además, las células endoteliales activadas expresando estas moléculas, pueden convertirse en el blanco para el daño citotóxico, contribuyendo a la ruptura del tejido que ocurre en los sitios de la ulceración (Healy y Thornhill, 1999).

Ciertamente, la VCAM-1 y la ICAM-1 son esenciales para la unión de las células inflamatorias a las células endoteliales. En reportes previos, las formas circulantes de estas moléculas han sido detectadas en un número de procesos de enfermedad vasculítica. La EAR tiene algunas características de un proceso de enfermedad vasculítica. La EAR comúnmente es una condición aislada pero algunas veces está asociada con enfermedades sistémicas (p. ej. la enfermedad de Crohn), la enfermedad celíaca y es una característica del síndrome de Behçet, una condición en la cual la vasculitis se piensa que juega un papel dominante. Esta asociación ha conducido a la sugestión que un proceso vasculítico puede ser la base de la patogénesis de la EAR (Schroeder y col, 1984; Healy y col, 1997).

1.2. FACTORES GENÉTICOS

La herencia y la genética parecen estar vinculados a la transmisión de la EAR. En algunos individuos, la EAR puede tener una base familiar, posiblemente más del 40% de los pacientes con EAR pueden tener una historia familiar indeterminada de ulceración bucal. Los pacientes con una historia familiar positiva de EAR pueden desarrollar úlceras bucales a una edad más temprana y tener síntomas más severos que los individuos afectados sin historia familiar de ulceración bucal (Sircus y col, 1957).

En una encuesta realizada por Eversole y col. (1982) a estudiantes de odontología, el 35% describieron que uno o los dos padres también tenían una historia de úlceras. En 1980, Miller y col. investigaron 530 familias e indicaron que los niños tienen mayor probabilidad a sufrir de EAR si uno o ambos padres tenían una historia de la enfermedad.

La probabilidad de hermanos (no gemelos) de desarrollar la EAR esta influenciada por el estado de la EAR de los padres, y hay una alta correlación de la EAR en gemelos idénticos (Miller y col, 1977 y Nsamba y col, 1986).

Varios estudios iniciales han fallado en demostrar las asociaciones significativas entre un haplotipo particular de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y la EAR (Platz y col, 1976; Dolby y col, 1977). Otros estudios posteriores han reportado resultados heterogéneos en cuanto a la variedad de asociaciones. Ha sido sugerido por Challacombe y col. en 1977 un aumento no significativo en las frecuencias de los haplotipos HLA-A2 y Aw-29 en los pacientes con EAR, y una asociación con el HLA-B12 fue reportada por Lehner y col, (1982) y Malmström y col, (1983); pero no confirmada por los trabajos reportados por otros como Gallina y col, (1985) y Ozbakir y col, (1987).

Una asociación significativa entre el HLA-DR2 (usualmente en el haplotipo HLA-DR2/B12) y la EAR ha sido observada, pero el estudio del grupo evaluado consistió solamente de 17 pacientes (Lehner y col, 1982). En un estudio realizado por Ozbakir y col, en 1987 en pacientes turcos con EAR, la frecuencia del HLA-B5 estaba aumentada pero no significativamente cuando se comparó con los sujetos control saludables. En otro reporte la frecuencia del HLA-DR4 estaba reducida en una cohorte de pacientes griegos (Albanidou-Farmaki y col, 1988). En la investigación realizada por Gallina y col, (1985), la frecuencia del HLA-B5

estaba reducida, pero el HLA-DR7 aumentó significativamente en pacientes sicilianos con EAR.

En algunos pero no todos los grupos, también se ha reportado que puede haber una asociación negativa de la EAR con las series HLA-DQ, que pueden ayudar a diferenciar a la EAR del síndrome de Behçet (Lehner y col, 1982). La cercana asociación tanto del síndrome de Behçet y de la EAR con el HLA-B51 sugiere una relación en la cual este locus, puede no ser el locus primario responsable en vez, de algunos otros genes cercanos a aquellos que controlan las proteínas de impacto térmico (heat shock) y el factor de necrosis tumoral (Mizuki y col, 1995).

Muchos estudios han destacado un probable papel del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) en la EAR. Han sido detectado niveles elevados del TNF- α , en biopsias de tejidos de úlceras (Buno y col, 1998; Natah y col, 2000) y los leucocitos circulantes de pacientes con EAR son capaces de secretar niveles más altos de TNF que los observados en los controles (Taylor y col, 1992). Además, se ha postulado que el efecto terapéutico de la talidomida y los corticosteroides en la EAR esta mediado por su

habilidad para inhibir la producción del TNF (Jacobson y col, 1997; Ek y col, 1999).

Pero un estudio reciente de Bazrafshani y col, en 2002 acerca de la asociación de la EAR tipo Menor con la herencia de genes específicos que presentan polimorfismos para el TNF- α y TNF- β , fracasaron en identificar cualquier asociación significativa, concluyendo que no parece ser un factor importante para determinar la susceptibilidad a la EAR.

En las investigaciones existentes, no se ha podido demostrar una asociación consistente y significativa entre la EAR y un antígeno HLA particular o un haplotipo determinado serológicamente. Esto puede reflejar que se están comparando trabajos con números inadecuados de pacientes y/o antecedentes étnicos variables de los pacientes evaluados, más que la carencia de cualquier base inmunogenética para la EAR (Porter y col, 1998).

1.3 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS (virales y bacterianos)

El estreptococo bucal fue previamente sugerido como un agente importante en la patogénesis de la EAR, tanto como

patógenos directos o como un estímulo antigénico, culminando en la génesis de anticuerpos que pueden reaccionar cruzadamente con los determinantes antigénicos de los queratinocitos (Lindemann y col, 1985). La forma L inicial aislada de los pacientes con EAR fue tipificada como *S. sanguis*, pero más tarde los análisis revelaron que este organismo era actualmente una especie de *S. mitis* (Hoover y Greenspan, 1983). Mientras que algunos estudios han expuesto títulos elevados de anticuerpos séricos anti-estreptococo viridans entre los pacientes con EAR, otras investigaciones han obtenido resultados contradictorios (Donatsky, 1976). Adicionalmente la respuesta mitogénica *in vitro* del linfocito frente a *S. sanguis* y *S. mitis* en los pacientes con EAR, no son significativamente diferentes de aquellos en los sujetos control (Gadol y col, 1985; Greenspan y col, 1985).

Más recientemente, se ha demostrado la reactividad cruzada entre una proteína de shock térmico estreptocócica de 60-65-kDa y los niveles significativamente elevados de anticuerpos séricos contra la proteína de shock térmico de la mucosa bucal observada en la EAR (Lehner y col, 1991). También hay reactividad cruzada entre la proteína de shock térmico de 65 kDa y la proteína de shock térmico mitocondrial humana de 60 kDa.

De este modo, el desarrollo de la EAR puede ser una respuesta mediada por las células T a los antígenos del *S. sanguis*, que reaccionan cruzadamente con la proteína de shock térmico mitocondrial, e inducir de esta forma, el daño en la mucosa bucal (Hasan y col, 1995).

Helicobacter pylori

El microorganismo *Helicobacter pylori*, antiguamente llamado *Campylobacter pylori*, es un organismo microaerofílico, espiral, gram-negativo, que ha sido indicado ser el factor causante de una gran proporción de pacientes con úlceras estomacales y gastritis crónica activa (Chaun, 2001). No ha sido bien establecido, si la cavidad bucal es un refugio viable permanente del *H. pylori* o simplemente sirve como la vía de transmisión para otros sitios (Mravak-Stipetic y col, 1998). Considerando la similitud de las características histológicas entre las úlceras gástricas y las úlceras aftosas bucales, y en vista del hecho que la EAR a menudo responde al tratamiento con un amplio espectro de antibióticos, tales como la tetraciclina, es razonable asumir que *H. pylori* puede también estar involucrado en el desarrollo de la EAR. Sin embargo, hay limitada evidencia en lo concerniente a la colonización o el posible papel del *H. pylori* en la EAR (Birek y col, 1999).

Los estudios sobre la prevalencia de este microorganismo en la cavidad bucal varían dependiendo de la técnica de detección empleada. Un estudio de Song y col. en 2000, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) encontraron una tasa de prevalencia del 97% en la cavidad bucal, independientemente del estado de la infección gástrica, sugiriendo que el *H. pylori* puede ser parte de la flora bucal normal. Sustentando estos hallazgos está el reporte de Berroteran y col, (2002).

El *Helicobacter pylori* ha sido detectado en el tejido lesionado de úlceras bucales indefinidas (Leimola-Virtanen y col, 1995) y empleando la técnica de PCR se ha observado el microorganismo en hasta el 72% de las úlceras EAR examinadas, pero en ninguna de las muestras de saliva o placa de los mismos pacientes (Birek y col, 1999). Esto sugiere que el *H. pylori* puede tener un papel etiológico en la EAR y que su presencia en las úlceras no es probablemente debida a su contaminación de otras fuentes. Sin embargo, este hallazgo no está apoyado por otros estudios, aunque las diferencias metodológicas pueden explicar tal disparidad de resultados, por lo tanto, el papel del *H. pylori* en la patogénesis de la EAR todavía no está claro (Riggio y col, 2000; Pavelic y col, 2000; Victória y col, 2003).

Infección viral

Muchos científicos han enfocado sus investigaciones hacia una etiología infecciosa de la EAR. A causa, de la frecuencia de la infección en la cavidad bucal y quizás en parte debido a la similitud en la aparición y duración, el virus herpes humano (VHH) ha sido un blanco favorito de esos estudios. Algunos grupos han encontrado asociaciones entre la EAR y los virus herpes, incluyendo el virus Epstein Barr, citomegalovirus y el virus varicella zoster (Sun y col, 1998).

Brice y col, en 2000 utilizaron la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para examinar la mucosa bucal y los leucocitos sanguíneos periféricos para la presencia del virus herpes simple 1 y 2, virus varicela zoster, virus Epstein Barr, citomegalovirus, virus herpes humano-6 y virus herpes humano-7. Estos investigadores no hallaron ninguna diferencia en cuanto a la presencia del ADN de los virus herpes entre los casos de EAR y los controles normales. Los resultados de este estudio no sustentan un papel directo de alguno de los VHH en la patogénesis de la EAR y argumenta que la presencia de estos virus sea probablemente debido a un flujo normal.

Una asociación de la EAR con los adenovirus ha sido sugerida, pero los adenovirus son organismos ubicuos, y estos resultados necesitan confirmación (Sallay y col, 1975).

La posible asociación de la EAR con los virus herpes 1-6 también había sido revisada con anterioridad (Pedersen, 1993). El ARN complementario al virus herpes simple (VHS) ha sido detectado en las células mononucleares circulantes en algunos pacientes con EAR (Eglin y col, 1982). Las partículas parecidas al virus han sido observadas en algunos tejidos en el síndrome de Behçet pero no en la mucosa bucal y no han sido confiablemente demostradas en la EAR. El virus herpes simple no ha sido exitosamente aislado de material de las lesiones. Solamente cerca de un tercio de los pacientes con EAR son VHS-seropositivos y el VHS fue raramente detectado en tejido lesionado por la reacción en cadena de la polimerasa en el estudio realizado por Studd y col. en 1991.

Sin embargo, las pruebas serológicas de los niveles de los anticuerpos IgM e IgG para el virus varicela zoster (VVZ) pueden estar elevados en algunos pacientes con EAR (Pedersen y Hornsleth, 1993), sugiriendo una asociación entre la reactividad del VVZ y la EAR. Además, el ADN del VVZ puede ser detectado

por PCR en el tejido lesionado; aunque, la contaminación es posible y puede sustentar estas observaciones. Pero hay pocos datos reportados para sugerir que antivirales anti-virus herpes tales como el aciclovir son de beneficio terapéutico en el manejo de la EAR (Pedersen y col, 1993).

Así mismo existen datos serológicos y de biología molecular contradictorios sobre la frecuencia de detección de la infección del citomegalovirus y del virus varicela zoster en pacientes con EAR. Los anticuerpos para el citomegalovirus (CMV) pueden estar significativamente elevados en algunos pacientes con la EAR (Pedersen y Hornsleth, 1993) y el ADN del CMV ha sido detectado en ulceraciones bucales indefinidas en personas no infectadas por el VIH (Leimola-Virtanen y col, 1995).

En los datos reportados por Di Alberti y col. (1997), el ADN del virus herpes humano 6 (VHH-6) y del VVH-7 no pudo ser demostrado en la EAR, pero el ADN del VHH-8 se encontró presente en las úlceras bucales relacionadas con pacientes VIH.

En un trabajo realizado por Ghodratnama y col, en 1997, detectaron el ADN del virus herpes humano-6 (VHH-6) en 6 de 21 lesiones de EAR, pero estos resultados no fueron

estadísticamente más altos que los detectados en la población control. Los mismos autores en otra investigación en 1999, reportaron que el 95% de los pacientes tenían anticuerpos IgM para el VHH-6, lo cual condujo a sostener que la reactivación del HHV-6 puede jugar un papel en el desarrollo de la EAR.

Las evidencias aportadas por los trabajos mencionados no reflejan datos epidemiológicos definitivos para sustentar una etiología infecciosa viral para la EAR.

1.4 CONDICIONES SISTÉMICAS ASOCIADAS CON LA EAR

La etiología precisa de la EAR no se conoce. Numerosas asociaciones de enfermedades han sido propuestas; sin embargo, estos vínculos son a menudo tenues y/o poco significativos para el desarrollo de la ulceración de la EAR (Porter y col, 2000).

Enfermedad de Behçet

La enfermedad de Behçet es una vasculitis ampliamente diseminada de origen desconocido que clásicamente se presenta como una tríada de ulceración bucal, ocular y genital. La condición es endémica alrededor de la base Mediterránea y en el

Japón (Kaklamani y col, 1998). El diagnóstico requiere de úlceras aftosas recurrentes y la presencia de alguno de los dos siguientes: ulceración genital, lesiones de los ojos típicas definidas, lesiones de la piel típica definida o una prueba de patergia positiva según el Criterio para el diagnóstico de la enfermedad de Behçet (1990). Las aftas casi siempre son la manifestación inicial de la enfermedad. Aunque cualquier tipo de EAR puede ser vista en individuos con la enfermedad de Behçet, las aftas mayores son significativamente más comunes que en aquellos con EAR idiopático (Krause y col, 1999).

La mayoría de los pacientes con EAR no presentan ningún signo o síntoma de alguna afección subyacente. En contraste, mientras una ulceración parecida a la EAR puede ocurrir en la enfermedad de Behçet, ésta ahora se reconoce como una enfermedad multisistémica, afectando particularmente otras superficies mucocutáneas, los ojos (p.ej. uveítis), el sistema músculo esquelético, neurológico, hematológico, gastrointestinal y otros sistemas. La EAR no tiene una distribución geográfica notable, no tiene asociaciones con los antígenos leucocitarios humanos similares a aquellos de la enfermedad de Behçet, y tiene algunas, pero no todas, de las anomalías inmunológicas que surgen en la enfermedad de Behçet. A

diferencia de la enfermedad de Behçet, la EAR no conduce a una morbilidad significativa o mortalidad (Schreiner y Jorizzo, 1987; Arbesfeld y Kurban, 1988).

Enfermedades inflamatorias intestinales

Existen varias enfermedades gastrointestinales que pueden manifestarse con la EAR, incluyendo la enfermedad celíaca y la enfermedad de Crohn (Casiglia, 2002).

Enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca)

La enfermedad celíaca es una condición relacionada con la intolerancia del intestino delgado al gluten. El gluten y su compuesto constitutivo la gliadina son péptidos de alto peso molecular hallados ubicuamente en el trigo, centeno, avena y productos de la cebada. El diagnóstico de la (EC) puede ser difícil, especialmente a causa que los pacientes pueden exhibir un amplio espectro de signos y síntomas.

La enfermedad celíaca se caracteriza por lo siguiente: elevados anticuerpos séricos IgA antiendomisiales, malabsorción de nutrientes en el intestino delgado, evidencia histológica de atrofia de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado después de la biopsia, mejoría clínica e histológica después de

una estricta dieta libre de gluten, recaída clínica con desafío al gluten (Farell y col, 2001).

Algunos autores han reportado que los individuos con EAR tienen un aumento de la prevalencia de la enfermedad celíaca y han sugerido que las aftas bucales pueden ser un indicador o signo temprano de la EC (Lahteenoja y col, 1998).

Otros reportes como los de Ferguson y col, (1980) y Veloso y Saleiro (1987), indican que menos del 5% de los pacientes ambulatorios quienes inicialmente presentan EAR, están propensos a tener enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca). Estos pacientes con EAR pueden no siempre tener síntomas gastrointestinales u otras características clínicas sugestivas de enfermedad celíaca pero usualmente tienen deficiencias de folato, algunas veces presentan anticuerpo antireticulina.

También se ha observado que el haplotipo del HLA-DRW10 y DQW1 puede predisponer a los pacientes con enfermedad celíaca a la EAR (Meini y col, 1993). También puede haber pacientes ocasionales, quienes tienen EAR con evidencia clínica o histológica no detectable de enfermedad celíaca en la biopsia

del yeyuno, quienes todavía responden a una dieta sin el gluten (Wright y col, 1986). No obstante, el retiro del gluten pocas veces resulta en un beneficio significativo y puede simplemente reflejar la marcada respuesta placebo en la EAR (Hunter y col, 1993).

Sedghizadeh y col, (2002) exponen que no existen grandes estudios controlados basados en la población que evalúen la prevalencia de la EAR en los pacientes celíacos, por lo que son necesarios estudios adicionales multi-institucionales basados en población más extensa para ayudar a elaborar la relación entre la EC y la EAR.

Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn es una enfermedad intestinal inflamatoria crónica de origen desconocido. La EAR ha sido citada como una de las más comunes manifestaciones extra-intestinales de la enfermedad, ocurriendo en el 10% de los pacientes. La presencia de las aftas puede bien ser la manifestación inicial de esta enfermedad en hasta el 60% de los pacientes y con frecuencia precede otros síntomas gastrointestinales, incluso puede ser el único signo presente de la enfermedad de Crohn (Casiglia, 2002).

Disfunción de neutrófilos

Algunas enfermedades de neutrófilos se manifiestan como ataques periódicos de fiebre y aftas. Estos incluyen el síndrome de fiebre periódica, aftas, faringitis y adenitis (PFAPA), el cual originalmente fue descrito por Marshall y col, en 1987, y la neutropenia cíclica (Scholl, 2000). Ambos ocurren más comúnmente en niños y se manifiesta como episodios de fiebre, malestar, aftas y adenopatía cervical, durando de cuatro a ocho días. Las condiciones normalmente son benignas y autolimitantes (Casiglia, 2002).

Deficiencias Hematínicas

Diversos estudios realizados en EEUU, Reino Unido y España, han demostrado que las deficiencias hematínicas (hierro, ácido fólico o vitamina B₁₂) son dos veces más frecuentes en los pacientes con EAR que en los controles, entre ellos los niveles de ferritina sérica o hierro son las deficiencias más comunes que se presentan en un 11% al 36% de los pacientes con EAR. Por lo que ha sido propuesta una evaluación hematológica completa de los pacientes con EAR para revelar estados de deficiencia (Challacombe y col, 1977; Barnadas y col, 1997; Porter y col, 1993, 1998, 2000).

Los niveles de hemoglobina generalmente están dentro del rango normal en los pacientes con EAR. Sin embargo, estados anémicos subyacentes son a menudo descubiertos en la evaluación y la terapia de reemplazo puede ser indicada para resolver las úlceras. La evaluación hematológica de los niños con EAR también se recomienda, porque se ha reportado que el 21% de los pacientes tienen algún tipo de anormalidad hematológica, la mayoría notablemente con deficiencias latente de hierro sin anemia (Ship y col, 2000).

En dos estudios realizados por Nolan y col en 1991, en una cohorte de pacientes escoceses con EAR, observaron la deficiencia de vitamina B1, B2 y/o B6, y después del tratamiento de reemplazo de las vitaminas por tres meses, el número de días de las úlceras disminuyó significativamente. Adicionalmente, la sensibilidad a aditivos de los alimentos tales como el ácido benzoico (preservativo de alimentos) o cinamaldehido (agente de sabor) fue hallado en pacientes con EAR quienes estaban hematológicamente normales y no respondían a la terapia de vitamina B1 y B6. Los pacientes mostraron mejoría de la EAR después de una subsiguiente anulación del alergeno.

Sin embargo, existen trabajos que no apoyan este concepto, un estudio de Olson y col, (1982) evaluaron 90 pacientes con EAR para anomalías hematológicas (ácido fólico o hierro), no hallaron diferencias estadísticas cuando se comparó con los pacientes de control.

Hipersensibilidad

La alergia o atopia, puede jugar un papel en la EAR. Mientras algunas investigaciones hallaron la presencia de la EAR en 30-56% de pacientes atópicos, otros grupos han fallado en demostrar una asociación significativa (Wilson, 1980; Wray y col, 1982; Eversole y col, 1982). Ha sido postulado que ciertos elementos de las comidas pueden actuar como alérgenos y precipitar ataques de EAR. En uno de los estudios realizados por Nolan y col, en 1991; con un grupo de 21 pacientes con EAR, encontraron que 20 pruebas fueron parche-positivas a uno o más alérgenos. Los dos alérgenos más comunes fueron el cinamaldehído y el ácido benzoico. Estos pacientes fueron asesorados para evitar los alérgenos y en un seguimiento, el 38% reportó que no habían tenido subsecuentes ulceraciones, mientras que un 62% describió una mejoría significativa. Otros investigadores como Ogura y col, en 2001 también reportaron

que individuos con EAR tenían ingesta más altas de cinamaldehído y ácido benzoico que aquellos del grupo control.

Algunos pacientes con EAR correlacionan el inicio de sus úlceras a la exposición a ciertos alimentos, pero estudios controlados han fallado en revelar un papel causal a pesar del hecho que ciertos alimentos desencadenan reacciones de picazón positivas en la piel, las cuales evocan dolor cuando son aplicadas tópicamente a las úlceras aftosas. La manipulación dietética, en raras ocasiones mejora a los pacientes con EAR (Porter y col, 2000).

Las reacciones de hipersensibilidad en la cavidad bucal pueden ser inducidas por una variedad de alérgenos, por ejemplo: alimentos, goma de mascar, mentas, materiales dentales, metales y medicamentos pero son con frecuencia difícil de diagnosticar (Ship y col, 2000).

Los anticuerpos a la leche de vaca y a la proteína del trigo (enfermedad celíaca) han sido demostrados en pacientes con EAR. Las estrictas dietas de eliminación que involucran leche de vaca y gluten (trigo, cebada y avena) han resultado en la resolución o mejoramiento de las aftas persistentes en más del

25% de los pacientes. Sin embargo, muchos alimentos que son comúnmente alergénicos (por ejemplo: fresa, tomate y nuez) no han sido casualmente asociados con la EAR (Barrons, 2001).

Es bien sabido que las lesiones de EAR están asociadas con dolor y malestar, y la presencia de lesiones dificulta la ingesta de alimentos y bebidas en pacientes con EAR. Por consiguiente, es posible que el patrón de ingesta de alimentos característico en los pacientes con EAR, pueda ser el resultado de su aparición (Ogura y col, 2001).

1.5 OTROS FACTORES VINCULADOS CON LA EAR

Trauma

El trauma físico local, puede iniciar úlceras en personas susceptibles a la EAR, y no es común en las superficies queratinizadas o en pacientes que fuman tabaco (Porter y col, 1998).

En el trabajo de Eversole y col. (1982) con un grupo de estudiantes universitarios con EAR, el 38% de ellos refirieron que sus úlceras fueron ocasionadas por trauma. En estudios controlados donde los pacientes fueron deliberadamente

sometidos a heridas por medios mecánicos, entre un 40% y 100% de los pacientes con una historia de EAR desarrollaron úlceras en el sitio de la herida, mientras que no se observaron en los sujetos control (Wray y col, 1981; Buno y col, 1998). Apoyando esta asociación se incluye el estudio de Rees y Binnie (1996) el cual involucró 128 pacientes y el 16% de ellos declaró que tuvo un accidente traumático asociado con su EAR. Esto puede ser una manifestación de Koebnerización o el fenómeno isomorfo, el cual ha sido descrito en muchas otras enfermedades cutáneas incluyendo la enfermedad de Behçet (Miller, 1982). En conclusión, los individuos con una historia de EAR pueden tener más posibilidad de desarrollar úlceras después de un trauma en la mucosa sana.

Estrés

Las enfermedades psicológicas han sido propuestas en iniciar algunos episodios de EAR, pero hay escasos datos para sugerir una fuerte conexión entre el estrés psicológico y la EAR, o que la EAR causa un significativo trastorno psicológico (Porter y col, 1998).

Está comprobada la mayor incidencia de EAR en situaciones de desequilibrio nervioso, como ocurre en personas sometidas a

choques emotivos, alteraciones del hipotálamo, estrés emocional, etc. (López y Bermejo, 1998).

En investigaciones como las de McCartan y col. (1996); Eisen y Lynch (2001), han demostrado elevación de los niveles de cortisol en pacientes con EAR y con altos rasgos de ansiedad o estados de depresión, lo que demuestra que el estrés puede, en determinados pacientes, desencadenar las lesiones.

El estrés emocional y ambiental puede preceder el 60% de los casos donde se presenta la úlcera por primera vez e involucra el 21% de los episodios recurrentes. Una frecuencia de EAR del 31-66% ha sido reportada entre estudiantes de medicina y odontología, comparada con 10-20% de la población general (Rees y Binnie, 1996).

La terapia antidepresiva ha sido reportada que reduce la incidencia de las úlceras, aunque los esfuerzos para mostrar una asociación entre el estrés de la vida y la EAR ha sido ampliamente infructuosa (Pedersen, 1989).

Hormonas y Ciclo Menstrual

Se han relacionado con frecuencia los ciclos menstruales con las aftas, desconociéndose su mecanismo etiopatogénico. Así nos podemos encontrar con: aftas catameniales anteriores a la menstruación. Quizás por alteraciones endocrinas que provocarían desequilibrios hormonales, especialmente el aumento de la progesterona y la disminución de los estrógenos. Ello conllevaría una disminución de la cornificación mucosa y un aumento de la fragilidad epitelial, y por lo tanto la aparición de las aftas; y aftas postovulatorias que tendrían el mismo mecanismo de producción, por disminución de estrógenos y aumento de la progesterona (Ship y col, 2000).

Una minoría de mujeres con EAR tiene ulceración bucal cíclica relacionada a la fase lútea del ciclo menstrual, presumiblemente moduladas por los cambios en los niveles de progestagenos y de este modo un recambio defectivo en el epitelio de la mucosa bucal. No obstante, una revisión de la literatura pertinente, falló en encontrar alguna asociación entre la EAR y los corticosteroides sexuales femeninos alterados (Ferguson y col, 1984; McCartan y Sullivan, 1992).

Uso del Tabaco

El uso del tabaco ha sido claramente demostrado que tiene una correlación negativa con la EAR, debido a que la condición es significativamente menos común entre aquellos que usan tabaco, incluyendo tabaco sin humo (Axéll y Henricsson, 1985; Tuzun y col, 2000; Boulinguez y col, 2000). Ha sido postulado que este efecto puede ser atribuido a un aumento de la queratinización de la mucosa, en respuesta a los agentes inhalados. Sin embargo, también puede ser debido a la absorción sistémica de nicotina, la utilización de parches de nicotina ha sido indicada de tener un efecto terapéutico en la EAR (Scheid y col, 2000).

Ha sido notado que la prevalencia de la EAR es más baja en los fumadores comparada con los no-fumadores, y que dejando de fumar, algunos individuos parecen desarrollar EAR por primera vez, o que la EAR pre-existente se exacerba. Aunque la relación a la inversa entre el hábito de fumar y la EAR es una percepción comúnmente sostenida, pocas investigaciones lo han estudiado específicamente. Todas las que se han realizado están confiadas en entrevistas, cuestionarios o reportes personales del estado del fumador (Shapiro y col, 1970; Grady y col, 1992; Tuzun y col, 2000).

Sin embargo, se ha demostrado que estos métodos de valoración de la condición de fumar, pueden ser inexactos ya que los fumadores pueden ocultar su condición de fumar o desestimar su nivel de fumar (Pérez-Stable y col, 1995).

Aunque el hábito tabáquico ha sido implicado como un factor protector en la EAR, pocos estudios han comparado la prevalencia de fumar de los pacientes con EAR, con la población control. Un estudio de Atkin y col. (2002) comparando los niveles sanguíneos de cotinina en un grupo de 84 pacientes con EAR tipo Menor y 81 individuos control emparejados por edad y género, hallaron que habían significativamente menos fumadores en la población con EAR que en el grupo control y que el promedio del nivel de cotinina entre los fumadores en la población con EAR fue también significativamente menor que en la población control, indicando niveles más bajos de consumo de cigarrillos en los pacientes con EAR que en los controles que fuman, por lo que este estudio epidemiológico respalda la asociación negativa entre la EAR y el hábito tabáquico.

2. EPIDEMIOLOGÍA

La EAR afecta, en algún grado, desde el 6 al 66% de la población dependiendo del grupo estudiado o de la demografía del sujeto y las mujeres tienen una incidencia ligeramente más alta que los hombres. Los estudios de población han reportado la EAR cerca de un 2% de adultos suecos examinados. Esta es una condición común que afecta hasta un 20% de la población en algún momento de sus vidas (Axéll y Henricsson, 1985; Bagán y col, 1991; Vincent y col, 1992; Reichart, 2000).

La ulceración usualmente comienza en la segunda década, la edad pico de aparición de la EAR está entre 10 y 19 años. Cerca del 1% de los niños en los países desarrollados pueden tener úlceras bucales recurrentes, aunque el 40% de los grupos de niños seleccionados pueden tener una historia de EAR, iniciando la ulceración antes de los 5 años de edad. Después de la niñez y de la adolescencia, puede continuar a través de la totalidad de la vida y sin preferencia relacionada a la ubicación geográfica o edad, género o raza (Field y col, 1992; Kleinman y col, 1994; Porter y col, 1998).

Jaber y col, en 2001, reportaron que los niños de nivel socio-económico más alto, están comúnmente más afectados que aquellos de los grupos socio-económicos bajos. Se ha demostrado la influencia del nivel socioeconómico de la población estudiada que sufre de EAR, siendo más elevado el porcentaje en la clase social alta, en comparación con los niveles socioeconómico bajos.

Estudios realizados en grupos seleccionados, tales como estudiantes de medicina y odontología, ha sido observado con una frecuencia tan alta como 50% a 60%. Hay alguna evidencia que la condición tiene una prevalencia más alta en adultos jóvenes o durante la infancia, disminuyendo tanto en incidencia como en severidad con la edad (Reichart, 2000; Casiglia, 2002).

Aunque la enfermedad no muestra predilección por la raza, es especialmente común en Norteamérica que en otros continentes (Embil y col, 1975). Afecta con menos frecuencia a sujetos de raza negra, y en cuanto a la estacionalidad pueden aparecer en cualquier época del año, aunque con un ligero predominio en la primavera y en el otoño (Gándara y col, 2002).

2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Se han identificado tres tipos de EAR. La clasificación de la EAR está basada fundamentalmente en el tamaño de las lesiones, número, frecuencia de recurrencia, severidad, sanación y la localización de la ulceración (Rees y Binnie, 1996; Woo y Sonis, 1996; Shashy y Ridley, 2000).

La EAR tiene tres presentaciones principales:

1. EAR Menor
2. EAR Mayor
3. EAR Herpetiforme

Todas las formas de EAR se presentan como úlceras recurrentes, dolorosas. En ocasiones, los pacientes experimentan síntomas prodrómicos de hormigueo o ardor antes de la aparición de las lesiones. Las úlceras no van precedidas por vesículas y están localizadas en la mucosa no queratinizada.

Estomatitis Aftosa Recurrente Menor

Es la variedad más común y está caracterizada por úlceras recurrentes, redondas u ovals, superficiales, claramente definidas, usualmente menores de 10 mm de diámetro, dolorosas

(los pacientes a menudo se quejan de dolor desproporcionadamente intenso para el tamaño de la lesión), cubierta por una pseudomembrana blanco-grisácea, envuelta por un delgado halo eritematoso. La localización más común es en las superficies no queratinizadas móviles tales como mucosa labial y bucal, piso de la boca y la superficie ventral o lateral de la lengua, no es común en la encía, paladar o dorso de la lengua. Estas lesiones son autolimitantes y curan de 10-14 días sin tratamiento y no dejan cicatriz (Ship y col, 2000; Neville y col, 2002).

Afecta cerca de un 80% de los pacientes adultos y niños. La EAR Menor es la forma más común de EAR en la niñez (Field y col, 1992; Rogers, 1997; Ship y col, 2000; Porter y col, 2000).

Estomatitis Aftosa Recurrente Mayor

Descrita por Sutton en 1911, como *peradenitis mucosa necrótica recurrente*, este término es un nombre inapropiado ya que se creyó que esta forma era una entidad separada y fue sustituido por EAR Mayor (Lehner, 1968). En la actualidad se considera como la expresión más grave de la EAR y es la forma menos común aproximadamente de 10% a 15% de todas las EAR (Rogers, 1997). Para otros investigadores la EAR Mayor es

responsable del 7-22% de los casos (Wray y col, 1982; Bagán y col, 1991).

Las lesiones de EAR Mayor son similares en apariencia a las de la EAR Menor; pero son más severas, más grandes, pueden exceder 10 mm de diámetro y se pueden aproximar a los 3 cm., son más profundas, ovals o irregulares, pueden aparecer de una a cinco al mismo tiempo y pueden coalescer (Casiglia, 2002).

Estas lesiones tienen predilección por los labios, paladar blando y fauces, aunque pueden afectar cualquier sitio. Estas lesiones persisten por semanas a meses, causando dolor significativo y disfagia.

Las lesiones profundas y persistentes pueden infectarse secundariamente con organismos bacterianos y hongos. Cuando se produce su reparación suele aparecer una cicatriz con retracción tisular, es raro en la superficie mucosa de la boca, ya que las lesiones sanan sin formación evidente de cicatriz.

La EAR Mayor usualmente tienen su comienzo después de la pubertad y es crónica, persistiendo hasta por 20 años o más (Scully y Porter, 1989).

Son frecuentemente halladas en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los cuales pueden desarrollar estas lesiones en cualquier sitio dentro de la boca (Muzyka y Glick, 1994; McPhail y Greenspan, 1997).

Estomatitis Aftosa Recurrente Herpetiforme

Es el tipo menos común y la peor diagnosticada, fue descrita primero por Cooke en 1960. A menudo se confunden con infecciones primarias por el virus del herpes simple, ya que clínicamente se parecen mucho. Afecta de un 5% a 10% de pacientes con EAR (Wray y col, 1982; Bagán y col, 1991; Rogers, 1997).

Esta es caracterizada por brotes o racimos de pequeñas, múltiples, recurrentes, dolorosas úlceras que se diseminan y pueden estar distribuidas por toda la cavidad bucal. Tanto como 100 úlceras pueden estar presentes en un momento dado, midiendo cada una de 2-3 mm de diámetro, aunque ellas tienden a fusionarse produciendo úlceras grandes e irregulares.

Cada episodio puede durar semanas o meses y algunos pacientes pueden presentar lesiones casi continuamente a lo largo de varios años. Durante ataques prolongados, unas lesiones se reparan mientras aparecen continuamente otras nuevas. Han sugerido que la EAR Herpetiforme puede tener una predisposición femenina y además una edad más tardía de inicio que otros tipos de EAR o representa un espectro de trastornos bucales manifestándose como úlceras recurrentes (Lehner, 1977; Porter y Scully, 1991).

La EAR Herpetiforme se denominó de esta manera, por su parecido a las infecciones herpéticas; sin embargo, las condiciones no están relacionadas y esta nomenclatura desafortunada puede contribuir a la confusión entre estos dos diagnósticos distintos.

El curso de un episodio típico de la EAR ha sido dividido por Stanley en 1972 en cuatro etapas descriptivas (Tabla N° II).

1. La etapa premonitoria (0-24 horas). Una sensación de hormigueo, tensión, hiperestesia, quemazón, dolor, se desarrolla durante las primeras 24 horas. Un infiltrado mononuclear se encuentra debajo del epitelio.

2. La etapa preulcerativa (18-72 horas). La membrana superficial comienza a blanquearse, con un infiltrado mononuclear sub-epitelial, edema y licuefacción degenerativa de las células epiteliales más profundas.

3. La etapa ulcerativa (1-16 días). La membrana blanquecina se desprende con reemplazo del coágulo fibrinopurulento, los neutrófilos son gradualmente sustituidos por los eosinófilos y además de células plasmáticas.

4. La etapa de sanación (4-35 días). El tejido de granulación se organiza y puede guiar a una mínima cicatrización. El epitelio abarca el defecto mucoso.

- Estomatitis Aftosa Menor -



- Estomatitis Aftosa Mayor -



- Estomatitis Aftosa Herpetiforme -



3. DIAGNÓSTICO

Las características clínicas de la EAR son de esencial importancia ya que no hay una prueba de laboratorio específica de diagnóstico disponible. El diagnóstico de la EAR por consiguiente está realizado principalmente sobre la base de la historia, presentación clínica y exclusión de otros trastornos ulcerativos que pueden asemejarse a las aftas (Lozada-Nur y Ficarra, 1990; Bachtiar y col, 1998; Scully y col, 2003).

Una muestra histopatológica raramente se requiere para el diagnóstico de la EAR, a causa de la naturaleza no específica de la úlcera. Sin embargo, si se sospecha de otro trastorno mucocutáneo bucal, entonces una biopsia puede ser necesaria (Ship y col, 2000).

Los exámenes de laboratorio están indicados en pacientes con EAR Mayor cuando: esta empeorando, cuando comienza después de los 25 años de edad o cuando hay otros signos y síntomas asociados. Las pruebas de laboratorio pueden incluir

un contaje sanguíneo completo, niveles de hierro/folato/Vit. B12, y concentraciones de anticuerpos anti-nucleares para excluir desordenes autoinmunes (Porter y col, 1993; Stoopler y Sollectio, 2003).

Pruebas de Inmunofluorescencia

Los estudios realizados con técnicas de inmunofluorescencia directa o indirecta demuestran que no son sensibles, por consiguiente no deberían ser utilizados excepto para excluir otras enfermedades de las mucosas bucales, por ejemplo: pénfigo y penfigoide. Las pruebas de inmunofluorescencia directa han demostrado que complejos inmunes circulantes pueden jugar un papel en el tejido dañado de la EAR, aunque los hallazgos usualmente no son específicos (Malmström y col, 1983; Reimer y col, 1983; VanHale y col, 1984).

Aspectos Histopatológicos

No existen características microscópicas diagnósticas de la EAR. Los hallazgos histológicos no son específicos. La histopatología presenta las características típicas de una ulceración inespecífica con pérdida brusca de un sector del epitelio con necrosis y corion con hiperemia y presencia de infiltrado inflamatorio. En la luz de la ulceración se muestra gran

cantidad de neutrófilos, linfocitos, monocitos y proliferación de microorganismos; y en los bordes y fondo proliferación endotelial y fibroblástica con formación de tejido de granulación (Reichart y Philipsen, 1999).

Histológicamente las lesiones tempranas de la EAR muestran un denso infiltrado perivascular linfocítico, aún antes de que se desarrolle la úlcera, la cual llega después a ser más difusa y mezclada con el influjo de leucocitos polimorfonucleares a medida que la lesión se desarrolla. Esta apariencia ha conducido a la sugerencia que un proceso vasculítico puede ser la base de la patogénesis de la EAR (Schroeder y col, 1984).

Sin embargo, estudios prospectivos revelan que en la etapa anterior a la ulceración se encuentran células mononucleares en la submucosa y tejidos perivascuales. Entre estas células predominan los linfocitos T CD4, pronto superados por los linfocitos T CD8 a medida que se desarrolla la etapa ulcerativa. Los macrófagos y las células cebadas se alojan usualmente en la base de la úlcera. Algunos investigadores han descrito eritrocitos y neutrófilos extravasados en la etapa inicial de estas lesiones, lo cual apoya un factor etiológico de vasculitis por complejos inmunitarios (Landesberg y col, 1990; Pedersen y col, 1992).

Durante la fase preulcerativa o prodrómica pueden observarse discretos cambios tisulares. Estos consisten en un ligero infiltrado de linfocitos T (colaboradores/inductores), concentrado en zonas perivasculares del tejido submucoso. Posteriormente se observan células T en el epitelio, con vacuolización y necrosis de algunas células epiteliales y, finalmente, con desintegración y ulceración del epitelio. Durante esta segunda fase el tejido conjuntivo contiene infiltrados densos de linfocitos del subtipo T CD8 (supresores/citotóxicos). Los infiltrados perivasculares del tejido submucoso son más profundos de lo habitual en la respuesta celular inflamatoria ante laceraciones leves en pacientes sin EAR. La superficie de la úlcera esta recubierta por un exudado fibrinopurulento y en los márgenes una zona de tejido de granulación, con abundantes neutrófilos, macrófagos y células plasmáticas, pero escasos mastocitos y eosinófilos. Los neutrófilos polimorfonucleares son el tipo de célula predominante en la lesión establecida. Durante la fase de cicatrización se produce una transformación normal de tejido de granulación en tejido fibroso, con emigración epitelial sobre la superficie. Durante esta fase final los linfocitos T predominantes vuelven a ser de la población CD4 (Schroeder y col, 1984; Wray y Charon, 1991; Savage y Seymour, 1994).

4. TRATAMIENTO

El tratamiento de la EAR tiene 4 metas principales: el tratamiento de la úlcera (para promover la sanación y reducir la duración), el tratamiento del dolor (para reducir la morbilidad y mejorar la función), el tratamiento nutricional (para asegurar la ingesta adecuada de alimentos) y el control de la enfermedad (para prevenir la recurrencia y disminuir la frecuencia).

Muchos pacientes con EAR experimentan varios episodios al año en el cual las lesiones sanan dentro de 5 a 10 días. Estos pacientes pueden solamente requerir terapia paliativa para el dolor. Sin embargo, el paciente que experimenta múltiples episodios cada mes y/o presenta síntomas de dolor severo y dificultad para comer, beber, masticar y deglutir, debe ser considerado para una terapia más extensiva de droga.

La evidencia para apoyar la terapia de droga para la EAR ha mejorado recientemente, en parte, a causa de la mayor prevalencia de pacientes inmunocomprometidos con EAR tipo Mayor. Adicionalmente a las drogas, varias modalidades de tratamiento para las deficiencias nutricionales y enfermedades

sistémicas han sido evaluadas por sus efectos sobre la EAR y han reportado resultados con éxito variable. La mejor alternativa terapéutica debería apuntar a la meta de un tratamiento primario, basado en la severidad de la enfermedad; debe ser apoyado por evidencia científica; y debe tener un alto índice terapéutico con pocos o tolerables efectos secundarios (Phelan y col, 1991; Hizawa y col, 1994; Jacobson y col, 1997).

Línea primaria de tratamiento

Para el tratamiento primario de las lesiones de EAR se utilizan agentes tópicos anti-inflamatorios, los glucocorticoides tópicos que han demostrado eficacia para la EAR son el fluocinonide, la triamcinolona y el clobetasol. De los cuales, el fluocinonide o el clobetasol, usado solo o mezclado con Orabase (un adherente de la mucosa), puede ser preferible para el tratamiento de la EAR recurrente. Otra pasta tópica con propiedades anti-inflamatorias y antialérgicas es el amlexanox al 5%, el cual ha demostrado seguridad clínica y eficacia en varios estudios clínicos controlados (Greer y col, 1993; Binnie y col, 1997). El amlexanox es un inhibidor tópico de la liberación de los mediadores de la inflamación por los mastocitos, neutrófilos y células mononucleares. En una formulación al 5%, disminuye sanando en tiempo, pero no afecta la recurrencia. Los efectos

colaterales del amlexanox incluyen ardor bucal, sensación de picazón y mucositis (Vincent y col, 1992; Miles y col, 1993; Khandwala y col, 1997).

Los enjuagues tópicos pueden también proporcionar efectivamente alivio sintomático para la EAR Menor. Estos enjuagues pueden ser utilizados solos o en combinación con otras drogas tópicas. Una disminución en la severidad o en el número de úlceras puede ser observada durante el tratamiento con esos enjuagues; sin embargo, ninguno proporciona prevención o sanación. El sucralfato, proporciona una cubierta protectora, puede ser útil para el alivio del dolor resultado de la EAR tipo Menor (Rattan y col, 1994). El elixir de dexametasona (0.5 mg/5 mL), utilizado como un lavado bucal o gárgaras, puede ser útil para úlceras múltiples menores, mayores o herpetiformes que son difíciles de tratar con geles tópicos (Brown y col, 1990; MacPhail y col, 1992). La tetraciclina puede reducir la duración de la úlcera, tamaño y dolor a causa de su habilidad para reducir la actividad colagenasa (Häyrinen-Immonen y col, 1994).

El lauril sulfato de sodio, un detergente comúnmente usado en las pastas dentales, ha sido reportado que aumenta la tasa de recurrencia de la EAR en muchos estudios (Fakhry-Smith y col,

1997; Healy y col, 1999). Este efecto puede estar relacionado a la desestabilización de las membranas celulares mediante el lauril sulfato de sodio y su capacidad desnaturalizadora, lo cual aumenta la permeabilidad de la mucosa bucal y puede ocasionar descamación epitelial de los tejidos blandos bucales (Herlofson y col, 1996). Los pacientes con reacciones adversas relacionadas al lauril sulfato de sodio deben usar pastas dentales que no lo contengan.

Línea secundaria de tratamiento

Para el paciente cuyos síntomas no son aliviados mediante la línea primaria de tratamiento o cuyos signos y síntomas garantizan una modalidad de tratamiento más agresiva, la prednisona debería ser considerada tanto para los pacientes VIH negativos como para los pacientes VIH positivos (Vincent y col, 1992; MacPhail y col, 1992; Yel y col, 1994). La prednisona, un agente anti-inflamatorio e inmunosupresivo, puede usarse en combinación con geles tópicos y enjuagues. El uso de la prednisona tiene potencialmente serios efectos secundarios, incluyendo insomnio, nerviosismo, aumento del apetito, indigestión, diabetes mellitus, hirsutismo, dolor en las articulaciones y glaucoma. Cabe destacar, sin embargo, que varios estudios han reportado que los efectos secundarios

pueden ser minimizados, especialmente cuando la prednisona se combina con otro agente inmunosupresivo, la azatioprina y no es usada por períodos de tiempo extensos (de Asis y col, 1995; Le Thi Huong y col, 1993).

Los efectos secundarios de la azatioprina incluyen trombocitopenia, leucopenia, infecciones secundarias, anemia, náuseas, vómitos, anorexia, diarrea y linforreticulosis, y otras tales como el linfoma no-Hodgkin después de la terapia a largo plazo (Connell y col, 1994; Forbes y Reading, 1995).

Línea terciaria de tratamiento

La talidomida es un inhibidor del factor de necrosis tumoral- α que ha mostrado ser un tratamiento efectivo para la EAR severa, a pesar de los significativos efectos colaterales. La terapia de talidomida ha sido investigada ampliamente en pacientes VIH positivos (Paterson y col, 1995; Bonnetblanc y col, 1996; Jacobson y col, 1997).

La talidomida primero fue comercializada en Europa en 1957 como un agente sedante no adictivo, pero fue retirada del mercado europeo en 1961, después del descubrimiento de su teratogenicidad y prohibida en EEUU. La talidomida ha retornado

al terreno médico, con la aprobación de la Administración de Drogas y Alimentos en EEUU como un tratamiento para el eritema leproso nodoso en julio 1998 (Moraes y Russo, 2001).

Además la talidomida presenta características anti-inflamatorias así como propiedades anti-angiogénicas. Varios informes han sido publicados reportando resultados positivos cuando se tratan úlceras recurrentes severas con la talidomida (Revuz y col, 1990).

El clínico debe sopesar cuidadosamente tanto los beneficios como los riesgos del uso de la talidomida, reservándola para los casos más resistentes y severos de la EAR tipo Mayor. La talidomida esta considerada ser el último recurso para el manejo de la EAR severa (Greenberg y Pinto, 2003).

Otras drogas inmunomodulantes y anti-inflamatorias, incluyendo la colquicina, la ciclosporina, la pentoxifilina, la azelastina, el levamisol y la dapsona, han mostrado alguna efectividad para el tratamiento de la EAR. La mayoría de estas drogas requieren más investigación para demostrar seguridad y el uso efectivo en pacientes con EAR (Ship y col, 2000).

OBJETIVOS GENERALES

Evaluar la relación existente entre las subpoblaciones linfocitarias y la expresión de las moléculas de adhesión en tejidos de pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente que asisten al Servicio de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en lesiones de pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente y en el control sano.

- Relacionar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en lesiones de pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente y en el control sano.

- Caracterizar el infiltrado inflamatorio en las lesiones de pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente, determinando la densidad de las subpoblaciones de linfocitos T ayudadores-inductores CD4+ y linfocitos T citotóxicos CD8+.

- Evaluar la densidad de las subpoblaciones de linfocitos T ayudadores-inductores CD4+ y linfocitos T citotóxicos CD8+ con respecto a los tipos de Estomatitis Aftosa Recurrente.

- Relacionar las condiciones sistémicas del grupo de pacientes con lesión con la presencia de la patología.

- Asociar la frecuencia de la enfermedad según edad y género en el grupo de pacientes estudiados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Grupo de estudio

Se incluyeron diecinueve pacientes tratados en el Servicio de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, de los cuales quince presentaban EAR Menor y cuatro tenían EAR Mayor, el tipo de ulceración aftosa fue determinada de acuerdo al criterio de Lehner (1968). Todas las lesiones estaban en la etapa ulcerativa (6-8 días de evolución). Ninguno de los pacientes tuvo tratamiento previo para sus aftas.

El consentimiento informado por escrito fue obtenido de todos los pacientes y de los representantes de los menores de edad, previo a la toma de las muestras del grupo con EAR, de acuerdo al lineamiento sobre investigación implicando a sujetos humanos (Widdop, 1991; Schafner, 1991; Seear y Walters, 1991).

Toma de la biopsia

Todas las lesiones fueron removidas, usando una técnica estándar para biopsia excisional, bajo anestesia local.

Grupo control

El grupo control seleccionado al azar, incluyó muestras de encía de diez pacientes sin historia de EAR, los cuales tenían indicadas cirugías periodontales por razones protésicas o estéticas, referidos al Servicio de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela.

Los criterios de exclusión para todos los pacientes fueron los siguientes:

1. Embarazo.
2. Historia de alguna enfermedad sistémica en la cual la ulceración bucal pueda ser una característica, tales como: enfermedad de Behçet, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa.
3. Pacientes con tratamientos de corticosteroides, drogas inmunomoduladoras o citotóxicas.
2. Pacientes con VIH o SIDA.

Todas las muestras fueron fijadas en la mezcla O.C.T. (Tissue-Tek, Lab-Tek Products, Miles Inc. USA) e inmediatamente fueron congeladas a una temperatura de -70° C hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

Todas las muestras congeladas fueron cortadas en el crióstato, en cortes de 4 micras de espesor. Luego los cortes fueron colocados en las láminas porta-objetos, previamente desengrasadas, recubiertas con una sustancia adhesiva (Poli-L-Lisina/PLL) e identificadas con lápiz de diamante. Una vez cortada la muestra, se desecaron los cortes durante toda la noche, para favorecer la preservación de la morfología tisular.

Fijación

Los cortes se fijaron con acetona a temperatura ambiente, durante 10 min. y luego se dejaron secar completamente. Las láminas se envolvieron en papel de aluminio y se almacenaron a -20° C hasta su procesamiento.

Adicionalmente solo las muestras del grupo con EAR fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina para el estudio histopatológico de rutina y posterior descripción del infiltrado.

Soluciones

⊗ Solución Buffer o Tampones:

Buffer Fosfato Salino (PBS)

Solución Madre: NaCl 180 gr.

NaH₂PO₄ 33 gr.

K₂HPO₄ 188 gr.

Solución de Trabajo: (1 litro)

40 ml solución madre

960 ml agua destilada

☼ Solución Buffer Acetato:

Buffer Acetato 0,1 M pH 5,3 (para 1 litro):

Acetato de Sodio x 3H₂O 0,1M (13,61 gr/lit) 790 ml

Acido Acético 0,1M (5,75 ml/lit) 210 ml

☼ Buffer de Revelado:

9,5 ml de buffer acetato 0,1 M pH 5,3

50 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%

500 µl de AEC en solución

☼ Aminoetilcarbazole en solución: (AEC)

20 mg de AEC en 2,5 ml de N,N Dimetilformamida

☼ Solución para desengrasar láminas (para 100 ml):

30 ml ácido acético

40 ml agua destilada

30 ml alcohol ácido o metanol

⊗ Hematoxilina de Mayer:

1 gr. hematoxilina

1 lt agua destilada

0,2 gr. iodato de sodio

50 gr. amonio o potasio de aluminio

1 gr. ácido cítrico monohidratado

50 gr. hidrato de clorato

⊗ Gelatina Glicerizada:

60 ml agua destilada

10 gr. gelatina

70 ml glicerina

1 ml fenol

Anticuerpos utilizados

Se utilizaron anticuerpos primarios mononucleares específicos para detectar: las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, los linfocitos T ayudadores-inductores CD4+, y los linfocitos T citotóxicos CD8+.

Anticuerpos primarios: Las diluciones óptimas para todos los anticuerpos primarios fueron determinados por titulación. La dilución utilizada para las moléculas ICAM-1 y VCAM-1 fue de 1:150, y para los subtipos CD8 y CD4 fue de 1:50. Todos los anticuerpos fueron Marca DAKO.

Anticuerpo secundario: Se utilizó un segundo anticuerpo (BHAM biotinylated horse anti-mouse, Marca VECTOR). Se usó la IgG biotinilada, lo cual permitió su afinidad con el complejo ABC (Avidina-Biotina-Inmunoperoxidasa). La dilución del anticuerpo secundario fue de 1:30.

Todos los anticuerpos fueron diluidos en una solución buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 (Tapia y col, 1994).

Procedimientos técnicos de inmunohistoquímica

Se realizó el Método Avidina-Biotina Inmunoperoxidasa (Hsu y col, 1981; Tapia y col, 1994).

- Se hidratan las láminas en PBS 1x durante 5 min.
- Se inhibe la Peroxidasa Endógena con H₂O₂ al 3% en agua destilada incubando en cámara húmeda durante 10 min.
- Se lavan las láminas en PBS 1x durante 5 min.

- Se incuban con el Anticuerpo Primario durante 30 min. en cámara húmeda.
- Se lavan las láminas en PBS 1x durante 5 min.
- Se incuban durante 30 min. con el Anticuerpo Secundario en cámara húmeda.
- Se lavan las láminas en PBS 1x fresco, durante 5 min.
- Se incuban por 15 min. con el complejo ABC Elite (Avidin-Biotin Complex VECTOR), (10 μ l A + 10 μ l B + 1000 μ l PBS 1x) en cámara húmeda.
- Se lavan por 5 min. en PBS 1x. Se descarta el PBS.

Revelado

Para el revelado de las láminas se utiliza la mezcla cromógeno-sustrato constituida por buffer acetato 0,1 M pH 5,3, AEC (solución de 3-amino-9-etil-carbarzole) diluido en dimetilformamida y peróxido de hidrógeno al 3%, por 7-10 min. Se lavan las láminas una por una con agua corriente.

Se colorean los cortes con Hematoxilina de Mayer por 1 min. Se lavan las láminas y se sumergen en agua corriente durante 5 min.

Montaje

Los cortes se cubrieron con gelatina glicerizada y se les colocó un cubre-objeto para preservarlas y posteriormente observarlas al microscopio de luz.

Cuantificación

Para los linfocitos T CD4+ y CD8+: Las células fueron contadas utilizando un microscopio de luz y un monitor calibrado, el cual está calibrado para determinar el número de células por mm² a una magnificación de 40x. Se consideraron como positivas solo las células que presentaban núcleo coloreado de rojo parduzco (Tapia y col, 1994).

Para las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1: Se observaron las láminas a microscopía óptica y para el análisis de la expresión se consideraron dos variables: localización e intensidad de la inmunotinción.

Con respecto a la localización se dividió de manera separada: epitelio y corion. Para la ICAM-1 se consideraron las variables endotelio del corion, infiltrado sub-epitelial y epitelio. Y para la VCAM-1 se consideraron las variables endotelio del corion e infiltrado sub-epitelial.

En cuanto a la intensidad de la inmunotinción para la ICAM-1 y VCAM-1 fue clasificada semicuantitativamente usando 4 puntos de la escala descrita por Messadi y col. (1987), la cual fue modificada para este estudio:

- 0= no hay inmunotinción,
- 1= inmunotinción débil,
- 2= inmunotinción moderada,
- 3= inmunotinción fuerte o intensa.

La inmunotinción de la ICAM-1 en los queratinocitos también fue clasificada semicuantitativamente de acuerdo al criterio utilizado por Norris y col. (1991), y se adaptó para esta investigación:

- 0= no hay inmunotinción en los queratinocitos,
- 1= inmunotinción débil en los queratinocitos basales,
- 2= inmunotinción moderada en los queratinocitos basales,
- 3= inmunotinción fuerte en los queratinocitos basales y hasta la mitad del epitelio.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados utilizando los programas Excel Microsoft Office XP y SPSS 11.0, a través de éstos se obtuvieron los siguientes valores estadísticos.

Para las variables cuantitativas: Media aritmética y la desviación estándar. Y para las variables cualitativas: la Mediana y el porcentaje.

Para la comparación entre los datos obtenidos y con el fin de estudiar la existencia de las diferencias estadísticamente significativas se usaron las siguientes medidas: la prueba *t* de Student, con el fin de comparar los promedios; Kruskal-Wallis para comparar las medianas y la prueba Chi-cuadrado para comparar los porcentajes. Se consideró como nivel de significancia estadística $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Se evaluó un total de 29 individuos, que fueron seleccionados del Servicio de Clínica Estomatológica y Periodoncia de la Facultad de Odontología, de los cuales 19 pacientes presentaban Estomatitis Aftosa Recurrente, éstos formaron el grupo con lesión y 10 individuos sanos, los cuales conformaron el grupo control, respectivamente (Gráfico N° 1).

Distribución del grupo de pacientes por edad:

Con respecto a la edad, se encontró que el promedio de edad del grupo con lesión fue de 39.58 ± 9.33 años ($X \pm EMS$). Este grupo abarcó un rango de edades desde 9 hasta 82 años; incluyendo a un niño, un adolescente y tres adultos jóvenes, entre otros.

El grupo control presentó un promedio de 34.40 ± 11.47 años ($X \pm EMS$). Los promedios de las edades de los dos grupos estudiados no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Gráfico N° 2).

Distribución del grupo de pacientes por género:

Al agrupar los pacientes por género, el grupo con lesión comprendió 19 pacientes, de cuales 13 fueron del género femenino (68.42%) y 6 del masculino (31.58%). En el grupo control 8 fueron del género femenino (80%) y 2 del masculino (20%). En ambos grupos predominaron los pacientes del género femenino (Gráfico N° 3).

Distribución del grupo de pacientes con lesión según el tipo de Estomatitis Aftosa Recurrente:

En esta investigación se presentaron dos de los tres tipos de Estomatitis Aftosa Recurrente: el tipo Mayor (EAR Mayor) y la Menor (EAR Menor) (Fotos N° 1 y 2). No se presentó ningún caso del tipo Herpetiforme.

En cuanto a la distribución de los tipos de EAR: el 78.95% de casos fueron de la EAR tipo Menor (15/19) y el 21.05% de los casos de la EAR tipo Mayor (4/19) (Gráfico N° 4).

Distribución del grupo de pacientes con lesión por género y tipo de Estomatitis Aftosa Recurrente:

Al agrupar los pacientes con lesión por género y tipo de EAR, se detectó que:

Los pacientes con el tipo de EAR Menor: el 52.6% de ellos fueron del género femenino (10/15), mientras que el 26.3% conformaron el género masculino (5/15).

Los pacientes con el tipo de EAR Mayor: el 15.8% de ellos correspondieron al género femenino (3/4) y solo el 5.3% de los pacientes fueron del género masculino (1/4) (Gráfico N° 5).

Distribución del grupo de pacientes con lesión según la localización de la Estomatitis Aftosa Recurrente:

La Tabla III muestra que la ubicación más frecuente de la Estomatitis Aftosa Recurrente fue en la cara interna de los carrillos y labios (5/19) representando el 26.3% así como en la cara interna de los labios y lengua en (5/19) representando igualmente el 26.3%. Tres pacientes (3/19) presentaron lesiones solo en la cara interna de los carrillos (15.8%). Dos pacientes (2/19) presentaban lesiones en cara interna de carrillos y lengua (10.5%).

La EAR también se localizó en la cara interna de carrillo, cara interna de labio y cara ventral de la lengua en (1/19) correspondiendo al 5.3%. Un paciente presentó la lesión en cara interna de carrillo y fondo del vestíbulo (5.3%). Otro paciente

presentó la lesión en el fondo del vestíbulo y la cara interna de labio, (5.3%) y finalmente un paciente mostró la lesión solamente en la cara interna del labio (Tabla N° III).

Distribución del grupo de pacientes con lesión según sintomatología, enfermedades y condiciones sistémicas:

Al realizar la anamnesis, todos los pacientes sin distinción de género y edad manifestaron sintomatología dolorosa. En cuanto a las condiciones y enfermedades refirieron: la menopausia y el ovario poliquístico; la epilepsia y la hipertensión arterial respectivamente.

De las 13 pacientes del género femenino del grupo con lesión, 3 presentaron menopausia y representaron el 30.0% (3/19), una paciente con ovario poliquístico en tratamiento con anticonceptivos orales correspondiendo al 10.0% (1/19). Otras, dos pacientes (2/19) presentaron epilepsia (20.0%) y una de ellas también en tratamiento con anticonceptivos. Del mismo grupo, dos pacientes (2/19) presentaron hipertensión arterial y conformaron el 20.0% (Gráfico N° 6).

Distribución del grupo de pacientes con lesión según hábitos:

Referente a los hábitos del grupo con lesión, un paciente (1/19) manifestó tomar aproximadamente dos cervezas diariamente y otro paciente refirió el consumo frecuente de gomas de mascar (chicle) con sabor a menta y canela, representando el 20.0% (2/19). Ningún paciente presentó el hábito tabáquico (Gráfico N° 6).

1. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE LAS BIOPSIAS DE PACIENTES CON ESTOMATITIS AFTOSA RECURRENTE.

Los resultados del estudio histopatológico de las muestras con EAR reportaron: Úlcera Crónica Inespecífica. El diagnóstico microscópico de todas las lesiones fue similar y se describe: ausencia total o parcial del epitelio, infiltrado inflamatorio subepitelial y en la lámina propia predominantemente de linfocitos y plasmocitos, con algunos eosinófilos. También se observó presencia de material fibrinoide, necrosis y la base de la úlcera con abundantes leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (Fotos N° 3, 4, 5, 6).

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PRESENTES EN EL INFILTRADO CELULAR EN EL GRUPO DE PACIENTES CON ESTOMATITIS AFTOSA RECURRENTE Y EN EL GRUPO CONTROL SANO.

Densidad de los subtipos linfocitarios: linfocitos T ayudadores-inductores CD4+ y linfocitos T citotóxicos CD8+,

en tejidos de pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente y en el grupo control sano:

Los valores fueron expresados en los promedios de las células por $\text{mm}^2 \pm$ el error estándar de la media ($x \pm \text{ESM}$).

Densidad de linfocito T citotóxico CD8+:

Se destacó la presencia de un gran número de linfocitos T CD8+ en el corion de los tejidos de los pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente (Fotos N° 7 y 8). Igualmente se observaron muchos linfocitos T CD8+ en el epitelio. La densidad promedio de los linfocitos T CD8+ fue de $1089.9 \pm 143.7 \text{ cel/mm}^2$ ($x \pm \text{ESM}$).

En relación al grupo control se observaron escasas células en el corion y se encontró que la densidad promedio fue de $85.9 \pm 13.1 \text{ cel/mm}^2$ ($x \pm \text{ESM}$). Esto permite decir que, el grupo con lesión presentó un valor de densidad promedio de linfocitos T CD8+, mayor al del grupo control y la diferencia entre ambos valores es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Gráfico N° 7).

Densidad de linfocito T cooperador-inductor CD4+:

En los tejidos de los pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente, se presentó gran cantidad de linfocitos T CD4+ localizados en el corion, pero escasas células en el epitelio (Fotos N° 9 y 10). La densidad promedio de los linfocitos T CD4+ fue de 986.8 ± 121.7 cel/mm² ($x \pm ESM$).

Respecto al grupo control, se observaron escasos linfocitos T CD4+ en el corion cercano al epitelio. Se encontró que la densidad promedio fue de 112.7 ± 16.1 cel/mm² ($x \pm ESM$). Esto permite decir que, el grupo con lesión presentó un valor de densidad promedio de linfocitos T CD4+, mayor al del grupo control y la diferencia entre ambos valores es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Gráfico N° 7).

Relación entre las subpoblaciones linfocitarias CD4+/ CD8+:

Cuando analizamos la proporción de los linfocitos T CD4+/CD8+: El valor del grupo con lesión fue 0.91, éste es menor y con diferencia estadísticamente significativa al valor de la proporción de los pacientes del grupo control, la cual fue de 1.31 ($p < 0.05$).

Densidad de las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y T CD8+ según el tipo de Estomatitis Aftosa Recurrente:

Cuando determinamos los linfocitos T CD4+ y T CD8+ según el tipo de Estomatitis Aftosa Recurrente, encontramos que:

En cuanto a los linfocitos T CD4+, la densidad promedio para la EAR Menor fue de 982.5 ± 137.3 cel/mm² (x±ESM) y para el tipo Mayor de 1002.8 ± 21.5 cel/mm² (x±ESM).

En lo referente a los linfocitos T CD8+, la densidad promedio para la EAR Menor fue de 1085.8 ± 159.4 cel/mm² (x±ESM) y para el tipo Mayor de 1105.3 ± 70.6 cel/mm² (x±ESM).

Aun cuando en ambos casos la densidad promedio fue mayor en la EAR Mayor, no se encontró entre ambos tipos diferencia estadísticamente significativa (Gráfico N° 8).

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN EL GRUPO DE PACIENTES CON ESTOMATITIS AFTOSA RECURRENTE Y EN EL GRUPO CONTROL SANO.

3.1 Expresión de la Molécula de Adhesión ICAM-1 en tejidos de pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente en relación con el grupo control:

Para el análisis de la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 se consideraron dos variables: localización e intensidad de la inmunotinción.

La variable localización del inmunomarcaje positivo, se dividió de manera separada para la evaluación de la expresión:

- 1) en las células endoteliales de los vasos sanguíneos que se localizan en el corion, cercano al epitelio,
- 2) en el infiltrado celular en el corion, y
- 3) en los queratinocitos.

La variable intensidad de la inmunotinción se clasificó en: fuerte, moderada, débil y no hay expresión (Messadi y col, 1987; Norris y col, 1991).

Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en las células endoteliales de los vasos sanguíneos del corion:

Todos los individuos estudiados mostraron inmunotinción positiva para la molécula de adhesión ICAM-1 en las células endoteliales de los vasos del corion. Dentro del grupo con lesión,

se observó fuerte en el 73.7% de los pacientes (14/19) (Fotos N° 11, 12 y 13). Mientras que solo el 26.3% (5/19), la expresaron moderadamente (Gráfico N° 9).

También todos los pacientes del grupo control expresaron la molécula de adhesión ICAM-1 en las células endoteliales de los vasos del corion; pero en contraste al grupo con lesión, la inmunotinción se mostró débil en un 60.0% de ellos (6/10) y moderada en un 40.0% (4/10) (Gráfico N° 9).

Se encontró una mayor expresión en los individuos con lesión con respecto a los del grupo control; siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en el infiltrado celular en el corion:

Cuando estudiamos la expresión de la glucoproteína en las células del infiltrado en el corion, ésta muestra en la mayoría de los casos un inmunomarcaje fuerte, en otros se observó moderado, débil o no se detectó evidencia de la expresión.

Casi todos los pacientes del grupo con lesión (16/19), expresaron fuertemente la ICAM-1 en las células del infiltrado,

representando el 84.2%. Solo en el 15.8%, la expresión observada fue moderada y en algunas células del infiltrado (3/19).

En el infiltrado celular de los tejidos del grupo control, el 40.0% de los pacientes (4/10), expresaron débilmente la ICAM-1 y en el 60.0% (6/10), no se observó la expresión (Gráfico N° 9).

Al igual que el caso anterior, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las expresiones del grupo con lesión y el sano ($p < 0.05$).

Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en el epitelio:

La expresión de la ICAM-1 en los queratinocitos de los tejidos de los pacientes con EAR fue un rasgo prominente y mostró la característica “malla de gallinero”, apariencia de inmunotinción positiva, de la membrana del queratinocito de la capa basal (Fotos N° 14 y 15).

Al analizar la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en el epitelio de los pacientes con EAR, el 47.4% de éstos (9/19) mostraron en los queratinocitos expresión fuerte de la molécula, en grupos de queratinocitos y algunos de ellos se extendieron

hasta casi la mitad del epitelio. En el otro 47.4% (9/19) la expresaron moderadamente y también de manera focal. Solamente el 5.2% (1/19), mostró expresión débil en queratinocitos aislados (Gráfico N° 9).

Con respecto a la distribución del inmunomarcaje en el grupo control, se mostró débil en algunas zonas del epitelio en (2/10) de los individuos, representando el 20%. En un paciente (10%), se observó una expresión moderada y en los demás (7/10) no se detectó la presencia de la molécula de adhesión ICAM-1 en el estrato epitelial, representando el (70%) (Gráfico N° 9).

Igualmente que en los casos anteriores, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las expresiones del grupo con lesión y el control, resultando mayor la expresión del grupo con lesión ($p < 0.05$).

Expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 según el tipo de Estomatitis Aftosa Recurrente:

De acuerdo al tipo de EAR, tanto en el tipo Menor como en el tipo Mayor, la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 se mostró fuerte en los vasos sanguíneos del corion, en los queratinocitos y también en el infiltrado celular sub-epitelial.

En la EAR tipo Menor, la molécula de adhesión ICAM-1 a nivel del endotelio se observó con un inmunomarcaje fuerte en el 57.9% de los casos (11/15) y solo en el 21.1% (4/15), se expresó de forma moderada. Igualmente en el infiltrado, se detectó una marcada expresión en el 63.2% de casi todos los casos (12/15), mientras que en el 15.8% (3/15) se expresó de manera moderada. A nivel de los queratinocitos se mostró fuerte en el 36.8% de los casos (7/15), en el otro 36.8% se observó moderada en (7/15), y únicamente en el 5,3% fue débil (1/15) en este tipo de Estomatitis Aftosa Recurrente.

Referente a la EAR tipo Mayor, la molécula de adhesión ICAM-1 a nivel del endotelio se expresó fuerte en el 15.8% (3/4) y solo en un caso se expresó moderadamente, representando el 5.3%. Con respecto al infiltrado celular en todos los casos (4/4) se observó una fuerte expresión, correspondiendo al 21.1%. En el epitelio se presentó inmunotinción aumentada en un 10.5% (2/4) y en el otro 10.5% se expresó moderadamente (2/4) (Gráfico N° 10).

3.2. Expresión de la Molécula de Adhesión VCAM-1 en tejidos de pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente en relación con el grupo control:

Para analizar la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1, también se consideraron las variables localización e intensidad de la inmunotinción.

Con respecto a la localización, la zona del corion, se dividió separadamente para analizar la inmunotinción positiva en:

- 1) en el endotelio de los vasos sanguíneos y
- 2) en el infiltrado celular.

Igualmente la intensidad de la inmunotinción fue clasificada en: fuerte, moderada, débil y no hay expresión (Messadi y col, 1987).

Expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en las células endoteliales de los vasos sanguíneos del corion:

Cuando analizamos el grupo con lesión, la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 se observó fuerte en la mayoría de los pacientes (13/19) en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y se mostró selectiva, ya que no en todo el contorno del vaso se detectó la expresión, representando el 68.4%. Mientras el 31.6% (6/19) presentó inmunotinción moderada de la molécula de adhesión VCAM-1, la cual se mostró en grupos de células endoteliales (Fotos N° 16 y 17).

En cuanto al inmunomarcaje en el grupo control, el 70.0% de los pacientes (7/10), no expresaron la molécula de adhesión VCAM-1. Aunque en el 30.0% de los individuos (3/10), fue débil; se mostró en pocos vasos y no en todo el contorno del mismo (Gráfico N° 11).

Se encontró una mayor expresión en los individuos con lesión con respecto a los del grupo control; siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en el infiltrado celular del corion:

En relación a la inmunotinción en el grupo con lesión, el 63.2% de los casos (12/19) expresaron la molécula de adhesión VCAM-1 fuertemente en grupos de células aisladas. Y en el 36.8% (7/19), la expresaron moderadamente también en grupos de células aisladas (Foto N° 18).

Al contrario de los pacientes con lesión, en el grupo control no hubo expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en el 50.0% (5/10) de los individuos. En el otro 50.0% (5/10) se observó expresión débil, en células aisladas (Gráfico N° 11).

Semejante al caso anterior se encontró una mayor expresión en los individuos con lesión con respecto a los del grupo control; siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 según el tipo de Estomatitis Aftosa Recurrente:

Al relacionar la VCAM-1 según el tipo de EAR Mayor y Menor, se destaca que en ambos se presenta fuerte y moderada tanto en el endotelio como en el infiltrado.

En la EAR tipo Menor, la molécula VCAM-1 se detectó fuerte en el endotelio de los vasos sanguíneos en (11/15) representando el 57.9% y en el 21.1% se mostró moderada (4/15). En el infiltrado celular del corion se expresó fuerte en el 42.1% de los casos (8/15) mientras en el 36.8% (7/15) se expresó moderadamente en este tipo de estomatitis.

En cuanto a la EAR tipo Mayor, la inmunotinción de la VCAM-1 en los vasos sanguíneos se expresó fuerte en un 10.5% de (2/4) y en el otro 10.5% fue de manera moderada. En el infiltrado celular del corion se expresó fuertemente en todos los casos (4/4) representando el 21.1% (Gráfico N° 12).

GRÁFICOS Y FOTOS

Gráfico N°1

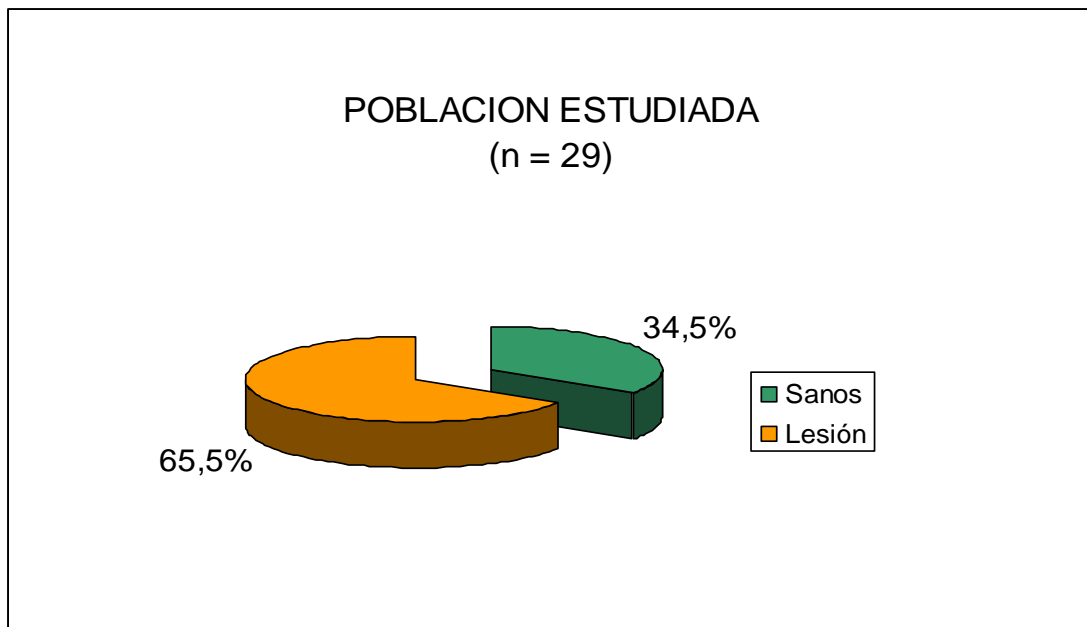


Gráfico N°2

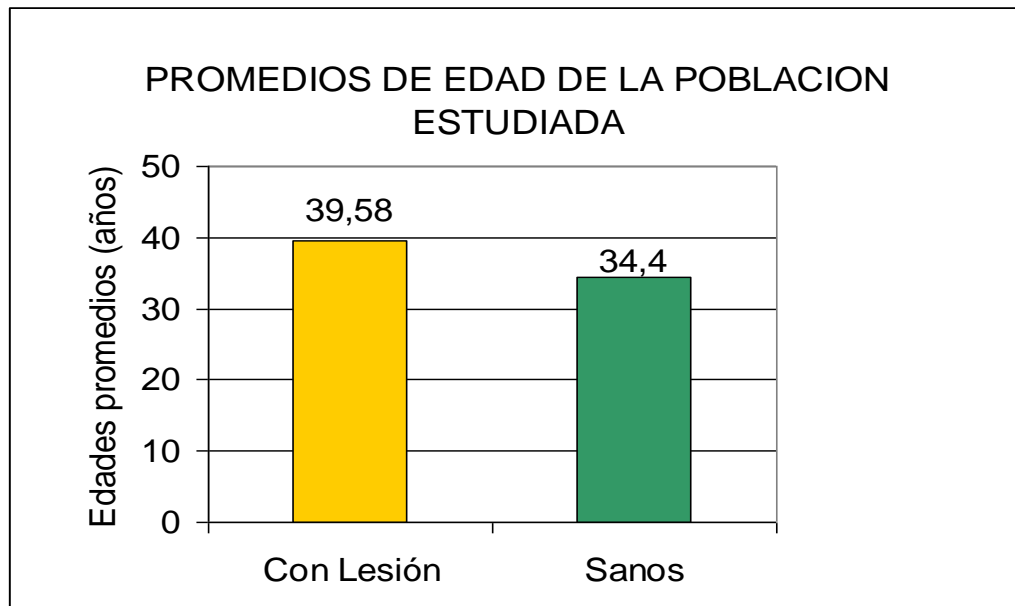


Gráfico N°3

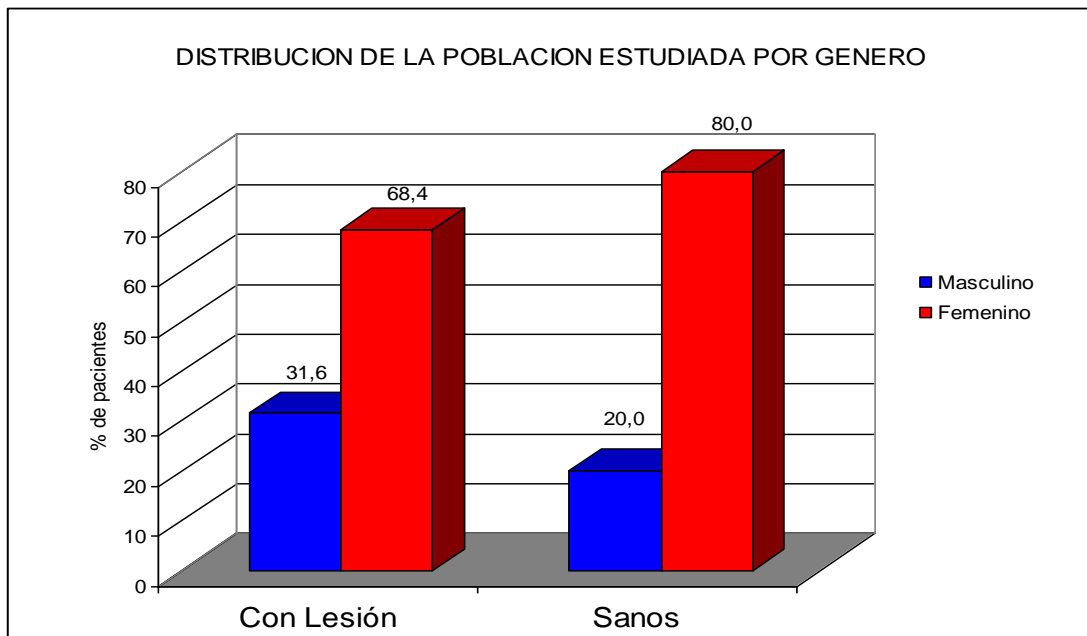


Foto N° 1
Estomatitis Aftosa Menor

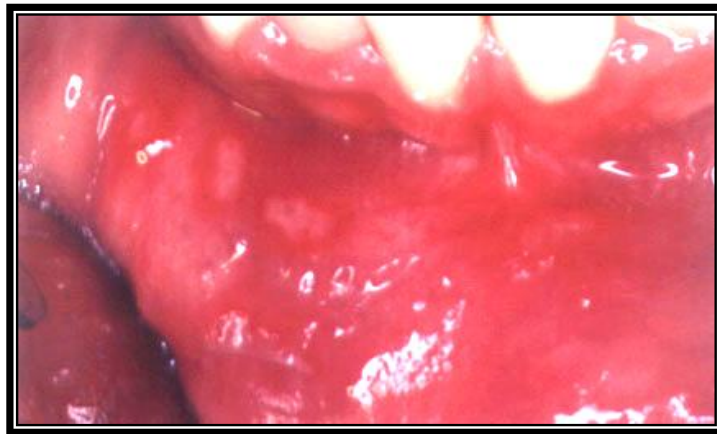


Foto N° 2
Estomatitis Aftosa Mayor

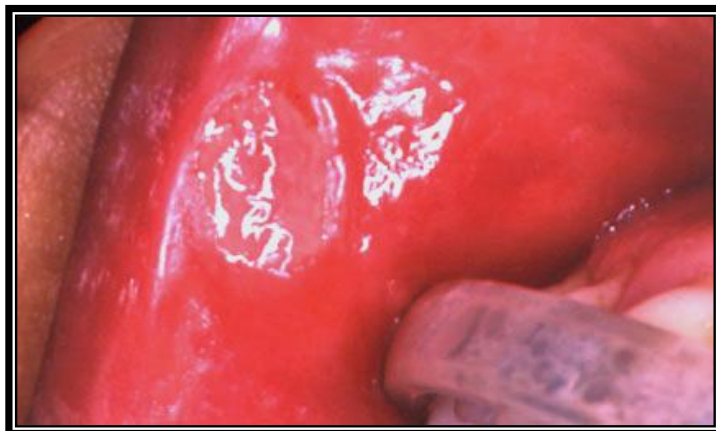


Gráfico N°4

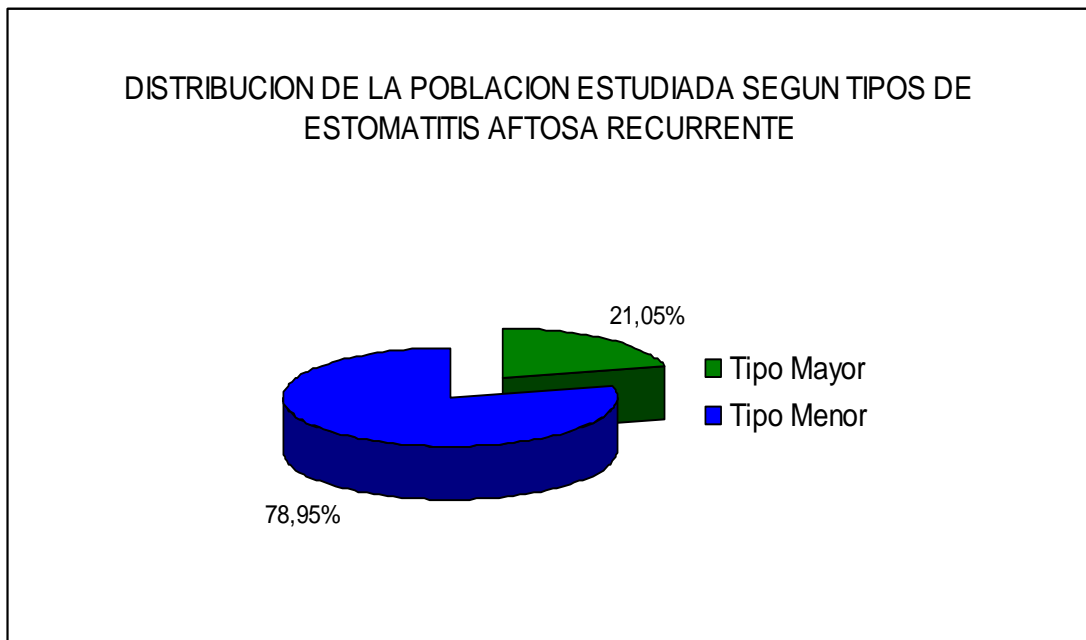


Gráfico N°5

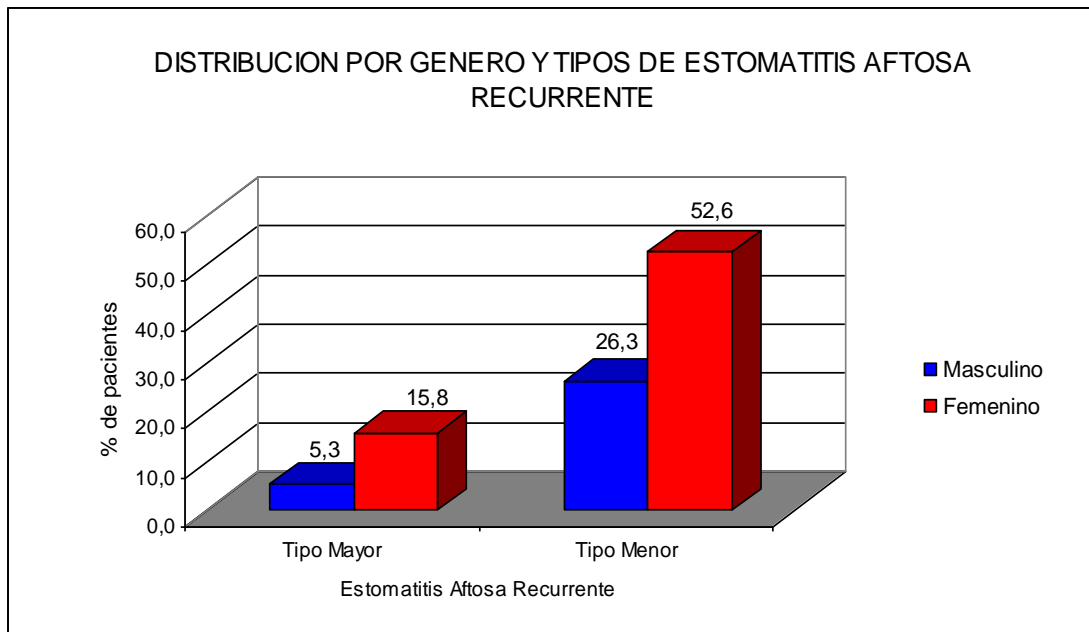


Gráfico N°6

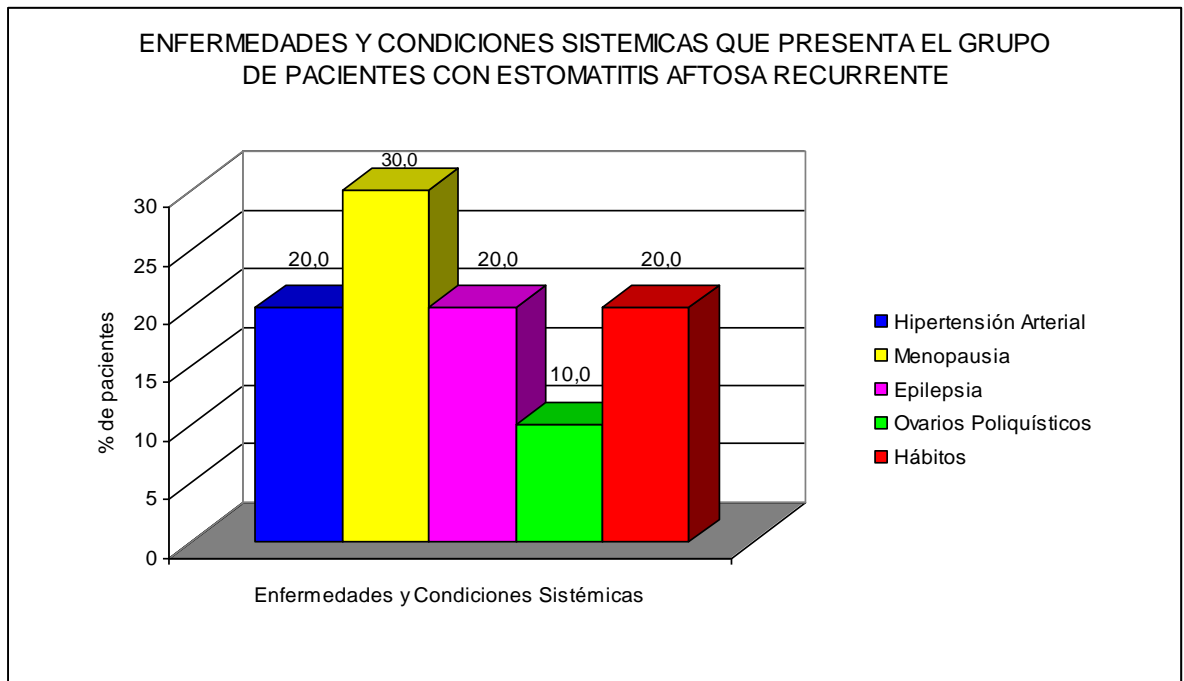


Foto Nº 3- Infiltrado crónico

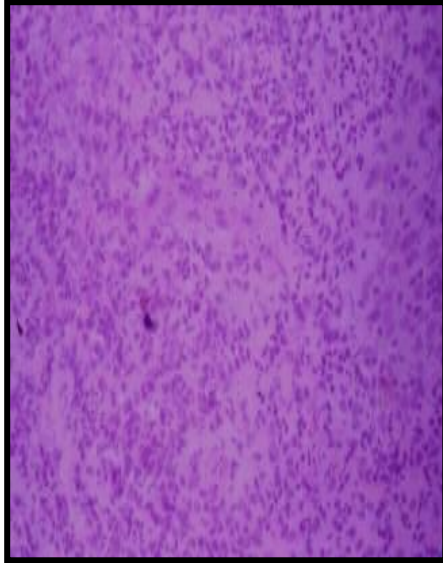


Foto Nº 4 - Infiltrado Mixto

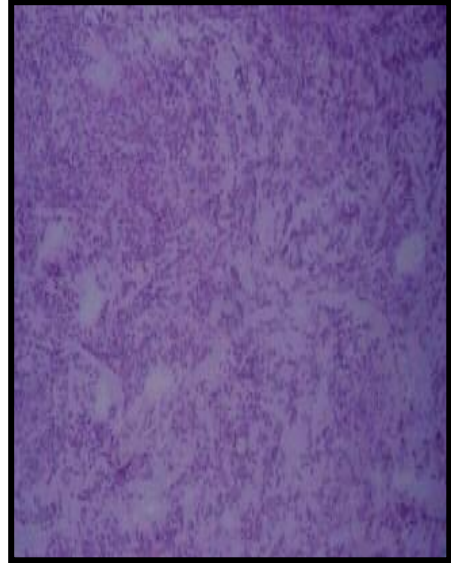


Foto Nº 5
Necrosis, Fibrina e Infiltrado

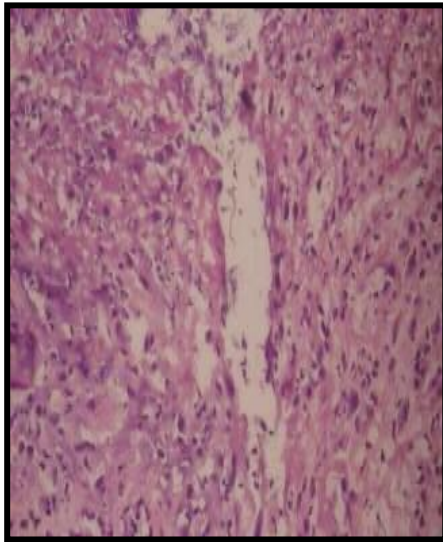


Foto Nº 6
Base Ulcera e Infiltrado

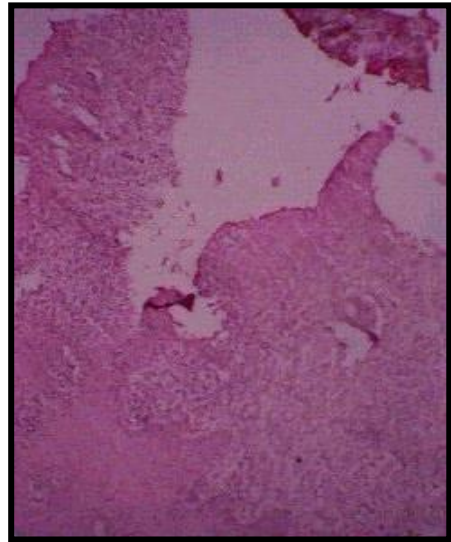


Foto N° 7
Linfocitos T citotóxicos CD8+ en tejido de
Estomatitis Aftosa Recurrente 10X

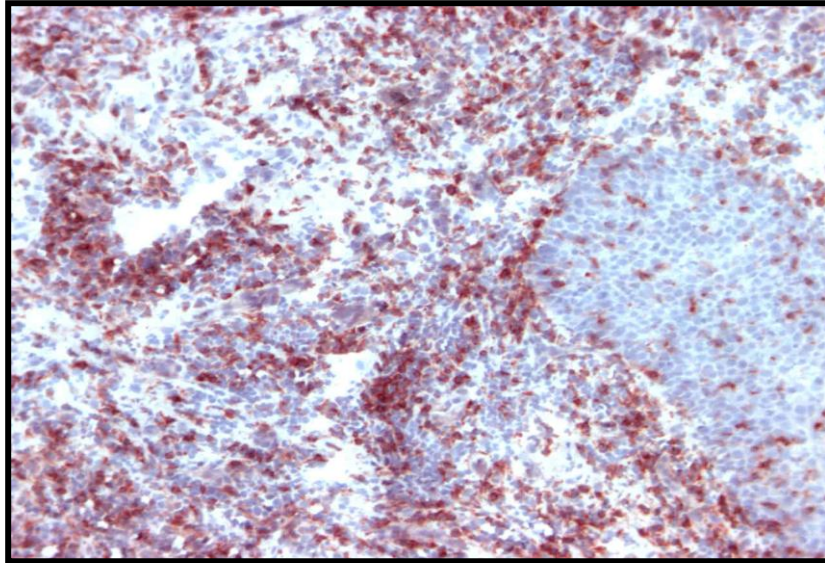


Foto N° 8
Linfocitos T citotóxicos CD8+ en tejido de
Estomatitis Aftosa Recurrente 40X

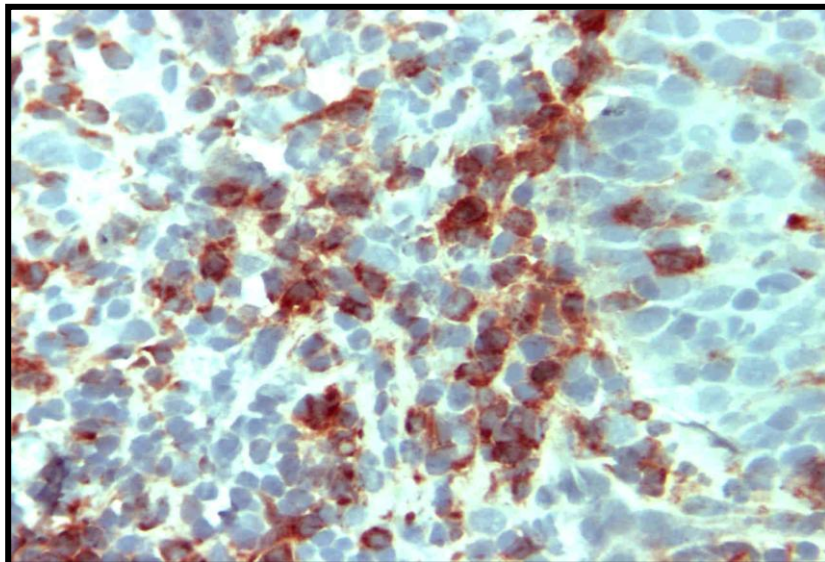


Gráfico N°7

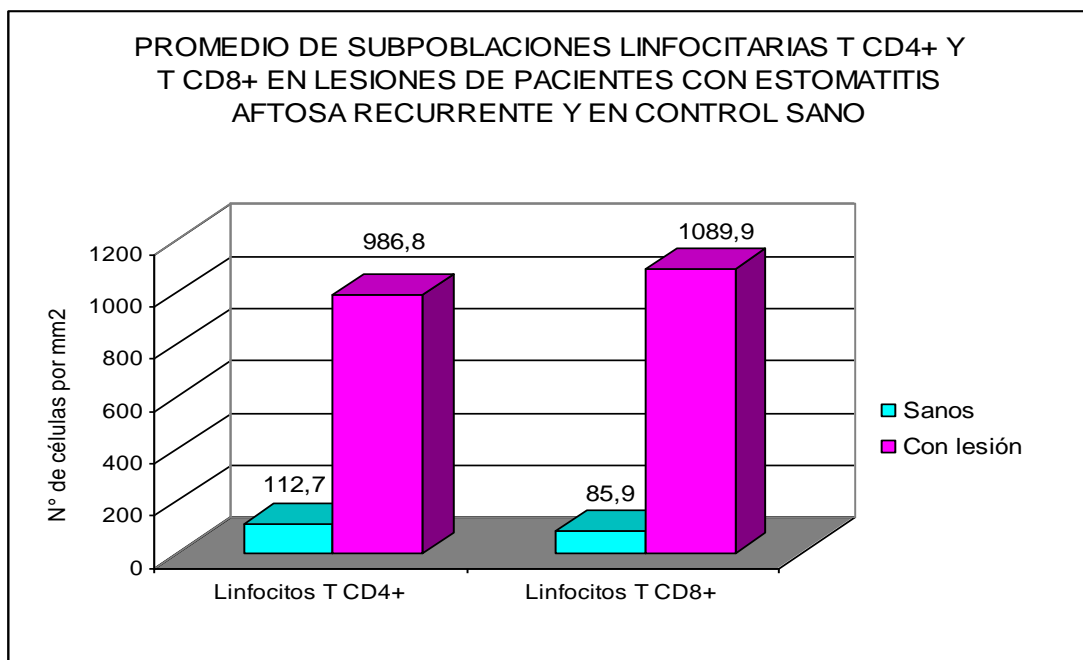


Foto N° 9
Linfocitos T ayudadores-inductores CD4+ en tejido
de Estomatitis Aftosa Recurrente 10X

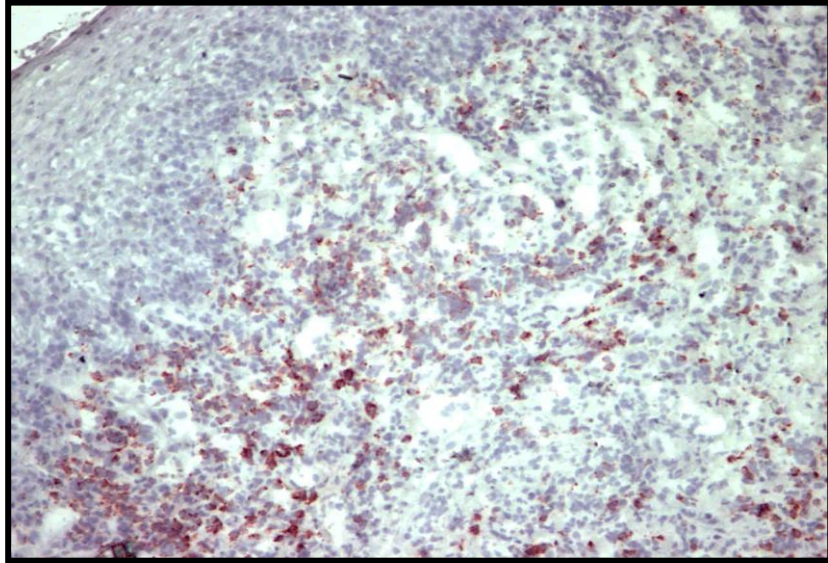


Foto N° 10
Linfocitos T ayudadores-inductores CD4+ en tejido
de Estomatitis Aftosa Recurrente 40X

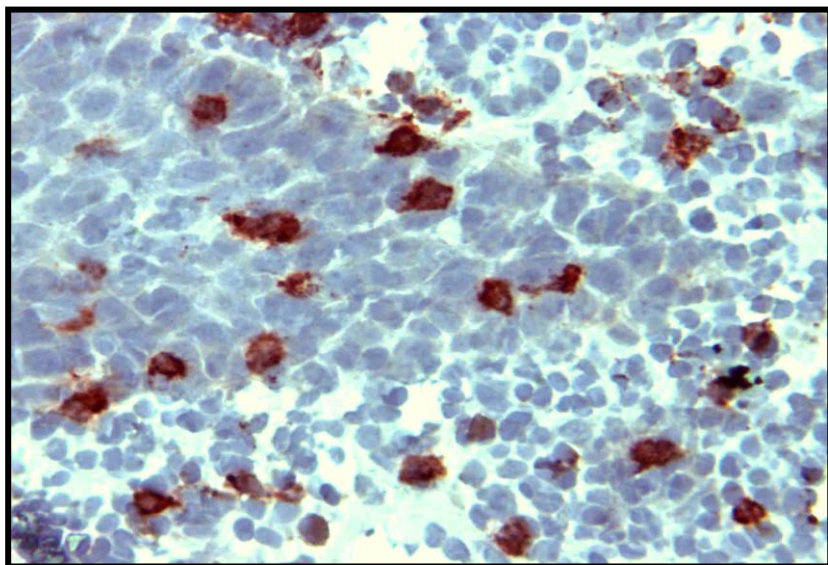
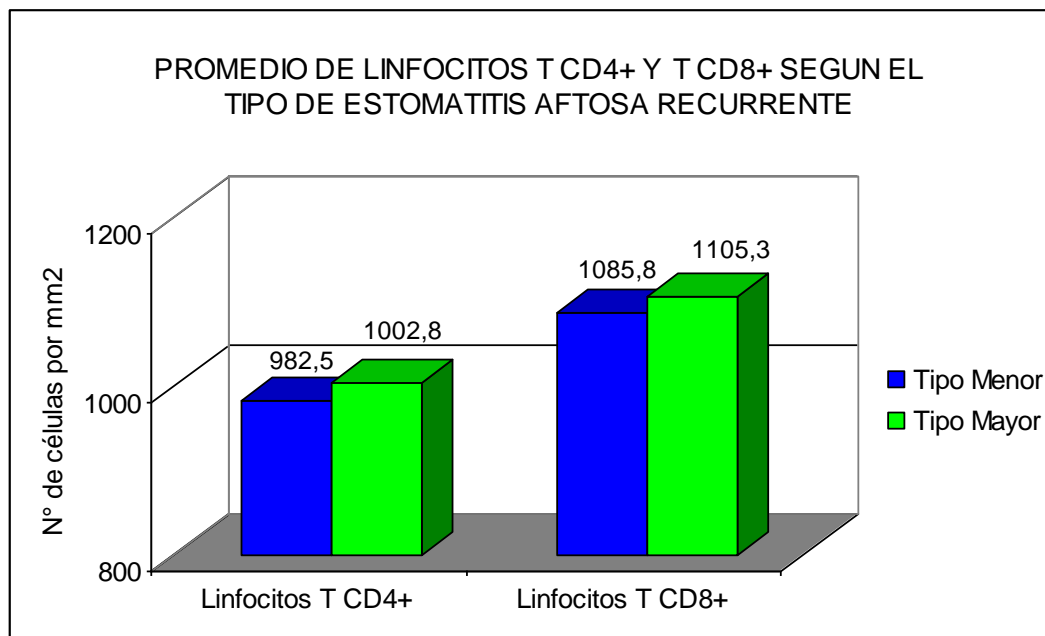


Gráfico N°8



Fotos N° 11 y 12
Expresión de la Molécula de Adhesión ICAM-1 en
tejido de Estomatitis Aftosa Recurrente 10X

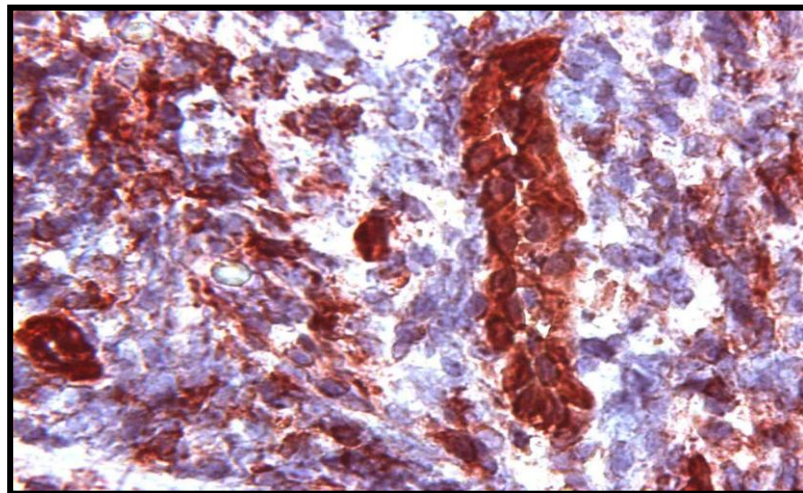
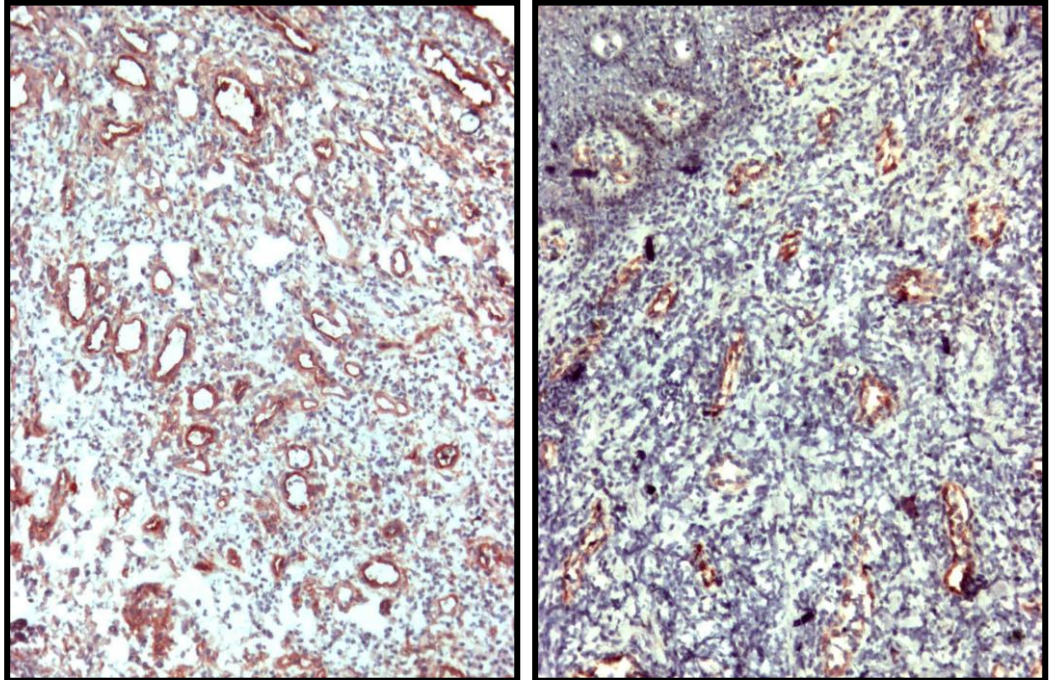


Foto N° 13
Expresión de la Molécula de Adhesión ICAM-1 en
tejido de Estomatitis Aftosa Recurrente 40X

Gráfico N°9

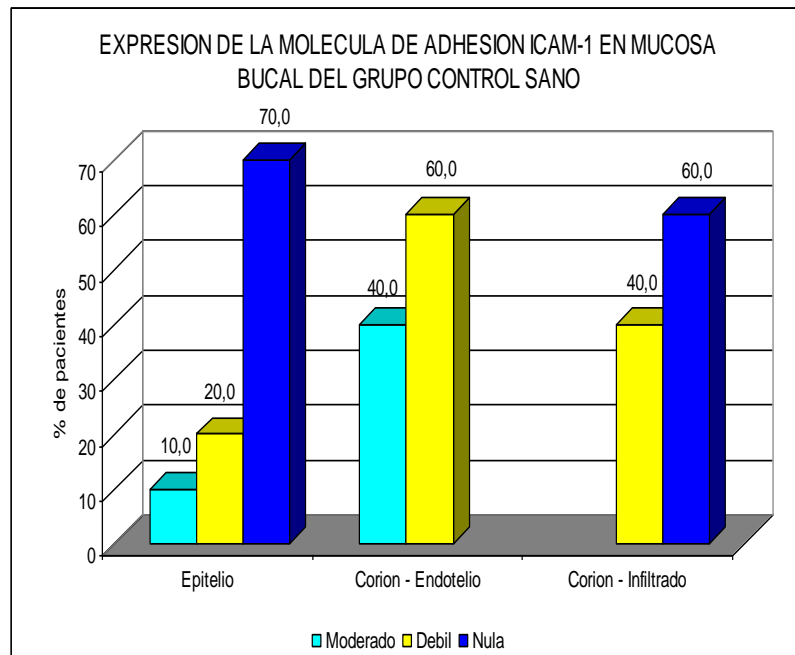
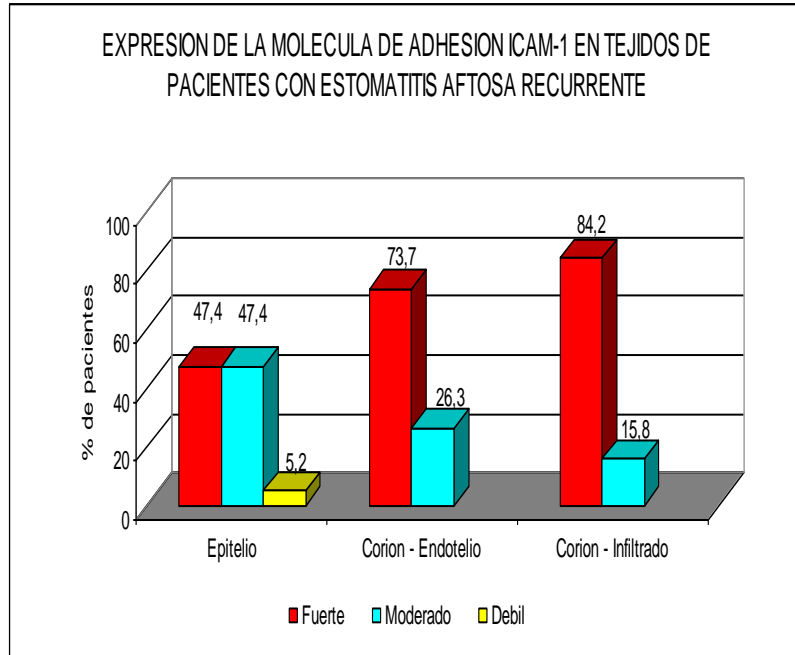


Foto N° 14
Expresión de la Molécula de Adhesión ICAM-1 en
tejido de Estomatitis Aftosa Recurrente 40X

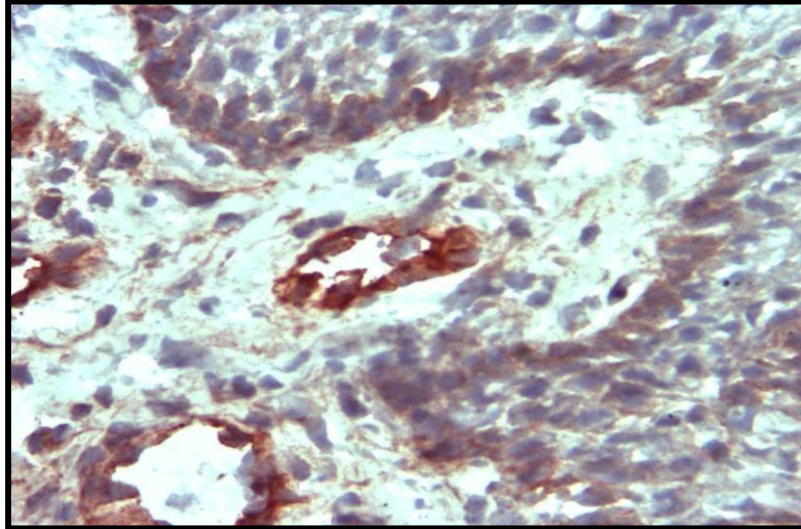


Foto N° 15
Expresión de la Molécula de Adhesión ICAM-1 en
tejido de Estomatitis Aftosa Recurrente 40X

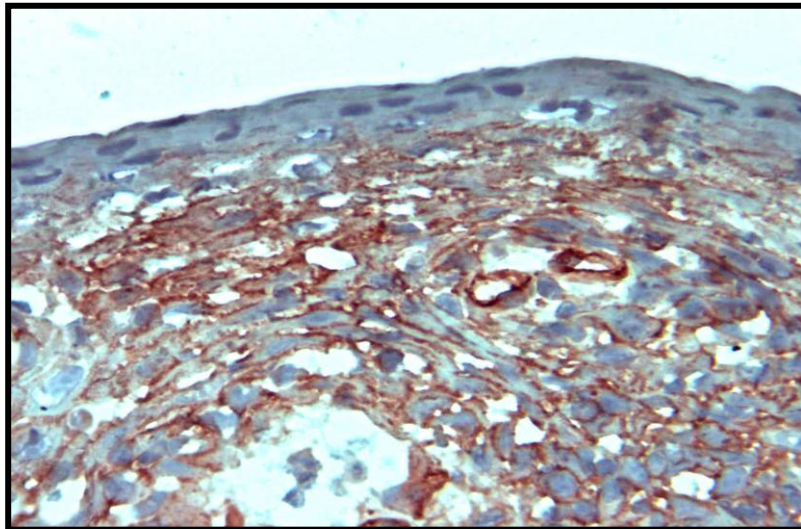
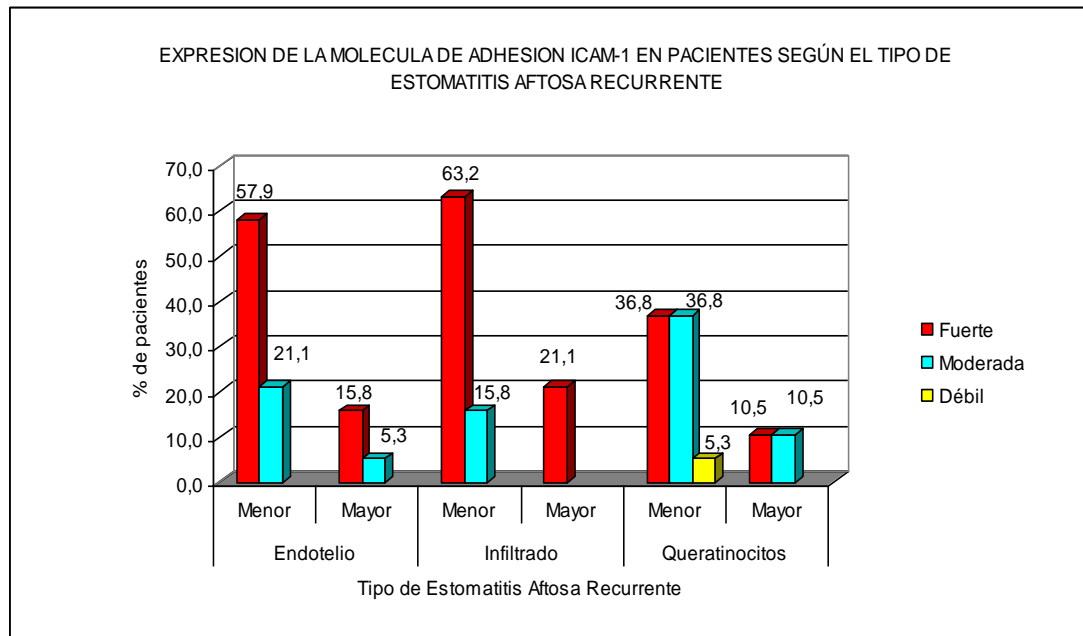


Gráfico N°10



Fotos N° 16 y 17
Expresión de la Molécula de Adhesión VCAM-1
en tejido de Estomatitis Aftosa Recurrente 40X y 10X

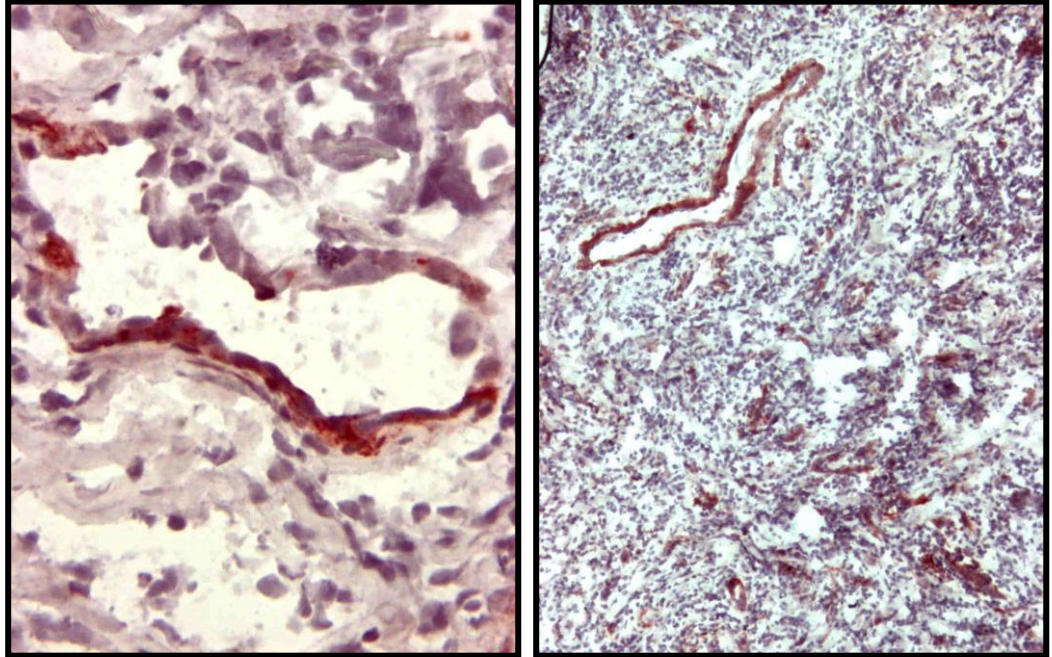


Foto N° 18
Expresión de la Molécula de Adhesión VCAM-1
en tejido de Estomatitis Aftosa Recurrente 40X

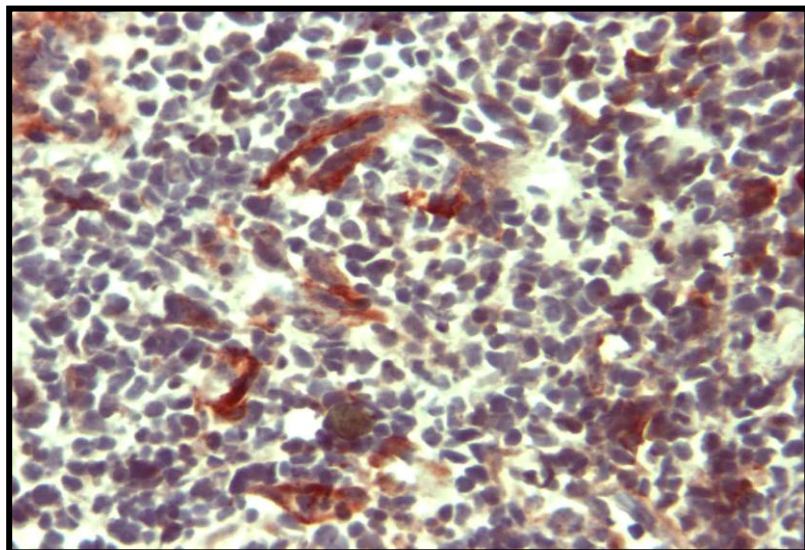


Gráfico N°11

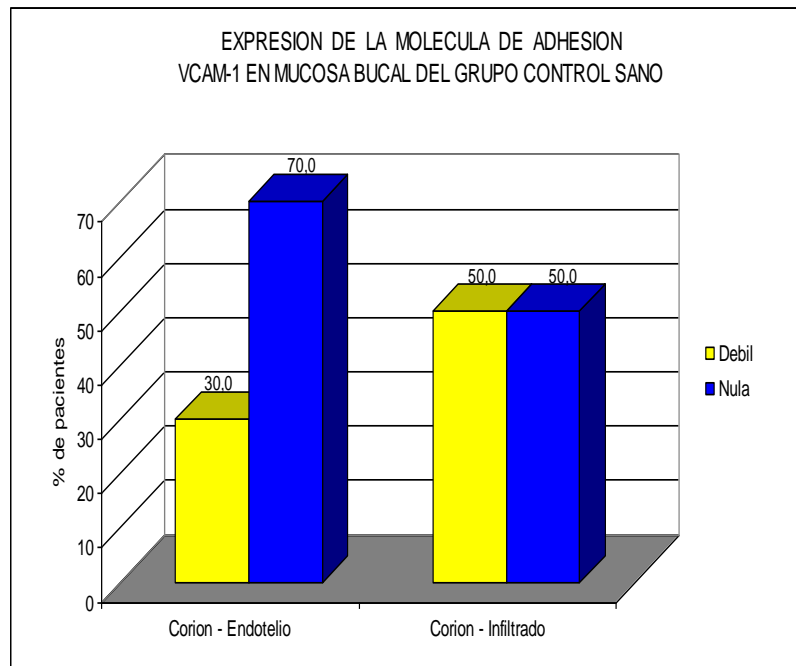
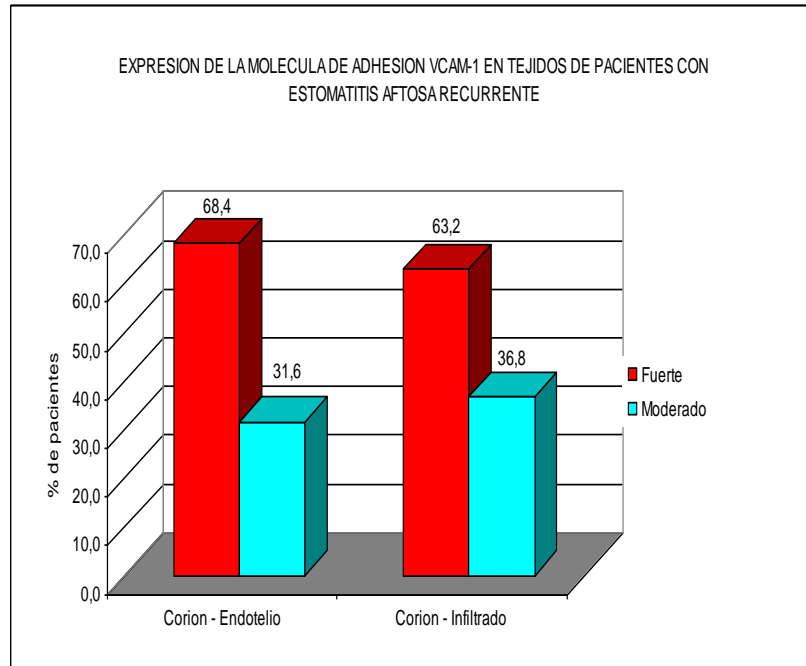
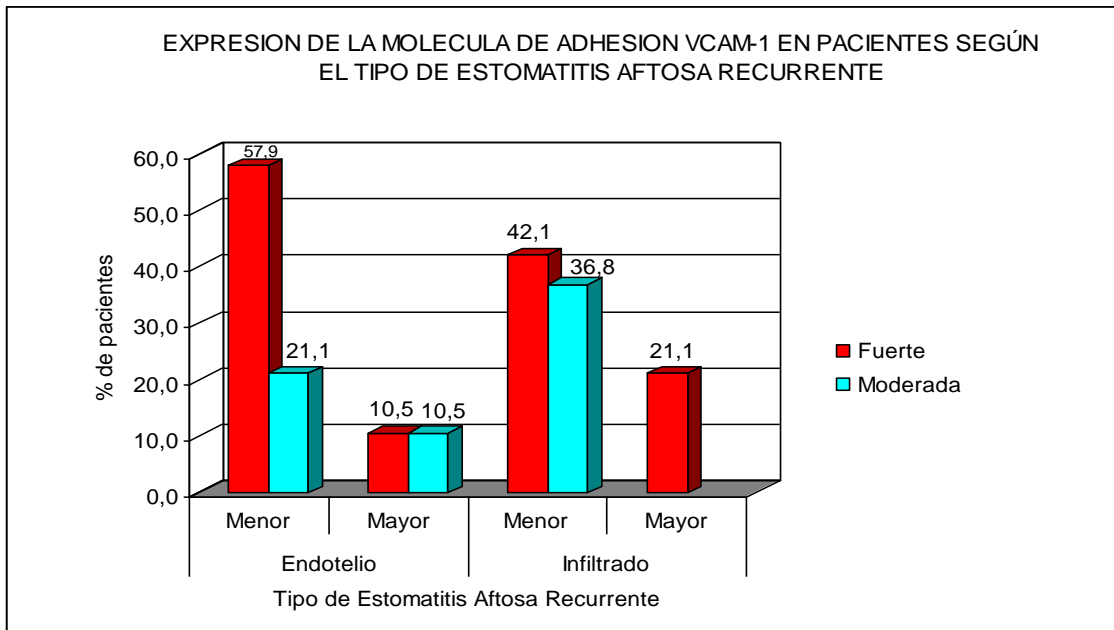


Gráfico N°12



TABLAS

Tabla I. Moléculas de adhesión epitelial bucal

FAMILIA	EXPRESIÓN EN EL EPITELIO BUCAL	LIGANDO	FUNCIONES
INTEGRINAS	$\alpha 2\beta 1$ $\alpha 3\beta 1$ $\alpha 5\beta 1$ $\alpha 9\beta 1$ $\alpha 6\beta 4$ (componente de hemidesmosomas) $\alpha \nu \beta 5$ $\alpha \nu \beta 6$	Colágeno, laminina laminina fibronectina tenascina laminina vitronectina fibronectina	Principales receptores célula-MEC. Muestran estar involucrados en muchas funciones de los queratinocitos, incluyendo la migración, diferenciación, producción de proteasa, unión de la membrana basal. La expresión $\alpha \nu \beta 6$ esta asociada con la sanación.
CADERINAS	Caderina-E Caderina-P (solamente células basales) Desmogleinas 1-3 Desmocollinas 1-3	Homotípico, además $\alpha E\beta 7$ integrina sobre linfocitos Homotípico Homotípico Homotípico	Principalmente involucrados en reacciones homotípicas manteniendo el contacto célula-célula y la arquitectura tisular. La caderina-E forman uniones adherentes entre las células; las caderinas desmosomales forman desmosomas
SELECTINAS	Selectina-E reportada en la encía inflamada Selectina ligando sLex en los queratinocitos basales	Carbohidratos sialilados y fucosilados tales como sLex, sLea.	Papel incierto en los queratinocitos. Posiblemente involucrado en la respuesta inmune.
SFIg	ICAM-1 sobre el epitelio de unión ICAM-1 expresión en la inflamación	Integrinas $\beta 2$ en los neutrófilos, monocitos, linfocitos	Respuesta inmune. Aumenta la migración de células inflamatorias y la unión en condiciones tales como el liquen plano
CD44	CD44s múltiples variantes de unión, incluyendo v2-10, v3-10, v4-10, v6-10 y v8-10	Principalmente hialuronidasa, también puede unir factores de crecimiento y otras moléculas de la matriz.	Papel incierto en los queratinocitos. Variantes de empalmes posiblemente involucrados en la migración y la proliferación.

La tabla muestra las clases de moléculas de adhesión expresadas por los queratinocitos en el epitelio bucal normal junto con sus ligandos y funciones.

TABLA II. Etapas clínicas de la EAR según Stanley

ETAPA	DURACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Premonitoria	24 horas	Hormigueo subjetivo, quemazón o entumecimiento en el área donde la úlcera se desarrollará. Cambios clínicos no visuales pueden ser evidentes.
Preulcerativa	18-72 horas	Círculo pequeño localizado de eritema, mácula o leve elevación. La lesión gradualmente desarrolla una membrana superficial o capa.
Ulcerativa	1-16 días	Porción central de membrana que se desprende, dejando después una úlcera bien definida. Esto usualmente está acompañado por un halo eritematoso. Se forma una pseudomembrana sobre la úlcera, la cual puede continuar aumentando por 4-6 días.
Sanación	4-35 días	La úlcera sana sin formación de cicatriz, excepto en el caso de la EAR Mayor. Las úlceras traumáticas sanarán en menor tiempo que las aftas recurrentes (mayor, menor o herpetiforme).

Tabla III: Frecuencia de pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente según localización de la lesión.

LOCALIZACION	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Cara interna de carrillo y Cara interna de labio	5	26.3%
Cara interna de labio y lengua	5	26.3%
Cara interna de carrillo	3	15.8%
Cara interna de carrillo y lengua	2	10.5%
Cara interna de carrillo y Fondo del vestíbulo	1	5.3%
Cara interna de labio	1	5.3%
Cara interna de labio y Fondo del vestíbulo	1	5.3%
Cara interna de carrillo, Cara interna de labio y Cara ventral de lengua	1	5.3%
TOTAL	19	100%

V. DISCUSIÓN

La Estomatitis Aftosa Recurrente es una enfermedad muy común que afecta la mucosa bucal no queratinizada. Está caracterizada por úlceras dolorosas periódicas, simples o múltiples que sanan espontáneamente. Varios factores predisponentes han sido implicados, pero a pesar de las extensivas investigaciones, el agente etiológico no ha sido identificado.

Aunque se desconoce la causa de la Estomatitis Aftosa Recurrente, las investigaciones recientes han sugerido que las personas afectadas por esa condición pueden tener desequilibrios inherentes en la inmunoregulación, también se han asociado factores locales y sistémicos. Las aftas están presentes en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, con úlceras pépticas, en pacientes con inmunodeficiencias primarias y secundarias, así como también en pacientes con estrés severo. Un gran número de estudios indican que la EAR es una enfermedad inmunopatológica y numerosos autores han investigado el estado y la respuesta inmunológica en dichos

pacientes, reportando que los linfocitos son el tipo de célula predominante en esas lesiones.

También ha sido documentado que los pacientes con EAR muestran un aumento en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo en la etapa inicial de la enfermedad (Mills y col. 1980 y Greenspan y col. 1981). Otros autores como Degalis y col. (1987) han demostrado que los neutrófilos sanguíneos periféricos juegan un papel importante en la fagocitosis y en la eliminación del material antigénico o productos del tejido dañado en la EAR. Estos datos apoyan la hipótesis de un desequilibrio en la fracción de las células T en sangre periférica como también en los subtipos de linfocitos T.

En los últimos años ha surgido un gran interés en determinar el papel que juega la respuesta celular y la importancia de las moléculas de adhesión en el reclutamiento del infiltrado inflamatorio en las lesiones de Estomatitis Aftosa Recurrente. Las moléculas de adhesión están expresadas sobre las células endoteliales donde ellas median la unión y la migración de las células transendoteliales de los leucocitos a los sitios de la inflamación.

Con el enfoque de un relevante aporte de la respuesta inmunológica en el proceso inflamatorio de estas lesiones, el propósito de este estudio fue analizar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 y caracterizar las subpoblaciones linfocitarias en los tejidos de los pacientes que presentan esa enfermedad, mediante el uso de la técnica de inmunocitoquímica, aportando datos del comportamiento de nuestra población que contribuyan a comparar y a esclarecer la etiopatogenia de la EAR.

En la presente investigación se seleccionaron 19 pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente, el 68.4% pertenecían al género femenino y el 31.6% al masculino, con una proporción de 2.2:1. Los estudios de población realizados por Axéll y col. (1976) en un grupo de pacientes adultos suecos, Fahmy (1976) en una comunidad mixta árabe, Pongissawaranun y Laohapand (1991) en una población de pacientes tailandeses; Field y col. (1992) en un grupo de niños, encontraron que estas lesiones predominaban en el género femenino. Aunque, otros reportes de prevalencia como los de Bagán y col. (1991) en España; Vincent y Lilly (1992) en los Estados Unidos, Kleinman y col. (1994) en una población de niños y adolescentes norteamericanos y Reichart (2000) en un estudio representativo de pacientes

alemanes, los cuales varían dependiendo de la demografía del sujeto y exponen que los hombres y las mujeres están igualmente afectados.

Con respecto a la predisposición de la enfermedad en referencia al género, se ha relacionado con frecuencia el ciclo menstrual y los desequilibrios hormonales con la EAR desconociéndose su mecanismo etiopatogénico, pero en la actualidad no se ha encontrado ninguna asociación entre la EAR y un antecedente hormonal, por lo que ambos géneros pueden estar afectados por igual.

El rango de edad de los pacientes con EAR comprendió edades desde los 9 años hasta 82 años, siendo el promedio de 39.58 ± 9.33 años. Es importante notar que la enfermedad se presentó en un rango amplio, entre ellos un niño, un adolescente, tres adultos jóvenes hasta un paciente de edad avanzada. Coincidiendo estos resultados, con los datos reportados por Miller y col. (1977) y Reichart (2000), donde la EAR tenía una prevalencia más alta en adultos jóvenes, disminuyendo tanto en incidencia como en severidad con la edad. Además, Field y col. (1992) y Kleinman y col. (1994) refieren que la edad pico de aparición de la EAR está entre los

10 y 19 años. También, Porter y col. (1998) informaron que la ulceración puede comenzar antes de los 5 años de edad.

Aunque, en esta investigación no se determinó con exactitud la edad de inicio de la patología, los resultados obtenidos sugieren que la EAR es una enfermedad sin predisposición en cuanto a la edad, afectando desde niños hasta individuos de edad avanzada. La discrepancia en los reportes epidemiológicos probablemente se deba a una variedad de metodologías empleadas, a las poblaciones y edades incluidas en los estudios, lo cual puede explicar alguna de las diferencias existentes en las prevalencias entre ellos.

De acuerdo a los tipos de Estomatitis Aftosa Recurrente en el grupo estudiado, el 78.95% de los casos fueron del tipo Menor y solamente se presentaron 4 casos del tipo Mayor (21.05%). Los resultados obtenidos son similares a diversos reportes como los de Wray y col. (1982); Bagán y col. (1991); Rogers (1997); Porter y col. (1998, 2000); Ce (2001); Kim y Greenberg (2001); Barrons (2001) en los cuales la EAR Menor era el subtipo más común. En esta investigación no se presentó ningún caso del tipo Herpetiforme, posiblemente por ser el menos frecuente y de difícil diagnóstico.

Cuando se relacionó el tipo de Estomatitis Aftosa Recurrente con el género, se reportó una mayor incidencia en el género femenino tanto para la EAR del tipo Menor (10/15) como para el tipo Mayor (3/4). En cuanto al género masculino, 5/15 pacientes presentaron el tipo Menor y solo un paciente presentó la EAR tipo Mayor. En base a estos resultados podemos sugerir que estas lesiones se presentan con mayor frecuencia en el género femenino, pero también se pudiera inferir que las mujeres acuden con mayor frecuencia a los servicios odontológicos y además muestran más preocupación por su salud bucal.

En cuanto a los sitios de localización de las lesiones según el tipo de EAR, los estudios realizados por diversos investigadores, como Eversole (1994), Porter y col. (1998), Barrons (2001), Neville y col. (2002); reportan que las lesiones ocurren casi exclusivamente en las superficies no queratinizadas móviles tales como la mucosa labial y bucal, superficie ventral o lateral de la lengua y piso de la boca en la EAR de tipo Menor. La EAR de tipo Mayor tiende a presentarse en la mucosa labial, paladar blando, fauces y úvula, pero puede afectar cualquier sitio. La EAR de tipo Herpetiforme no tiene predilección en cuanto a la localización y pueden presentarse en cualquier parte de la

mucosa. Las regiones de la mucosa bucal queratinizada, tales como el paladar duro, la encía y la superficie dorsal de la lengua, son sitios raros de presentación.

Estos datos están en concordancia con nuestros resultados donde la Estomatitis Aftosa Recurrente se presentó con mayor frecuencia en las áreas de mucosa no queratinizada como la cara interna de carrillo, cara interna de labio y cara ventral/bordes de la lengua. Relacionando la localización con los tipos de Estomatitis Aftosa Recurrente, tanto para el tipo Menor como para el tipo Mayor, las lesiones se localizaron en las mismas regiones antes mencionadas sin predilección en cuanto a la localización con los tipos presentados.

El diagnóstico de la EAR fue realizado principalmente por la historia, presentación clínica y la exclusión de otros trastornos ulcerativos que pueden asemejarse a las aftas. Por lo que se realizó una completa anamnesis donde se registró toda la sintomatología referida por los pacientes. La totalidad de ellos manifestaron dolor, recurrencia, molestia para hablar y a veces para comer. Además su presencia es fuente de mucha preocupación y ansiedad.

Para establecer alguna asociación entre las enfermedades y las condiciones sistémicas presentes en el grupo con la EAR, se encontró que en el grupo femenino evaluado, la menopausia fue la condición más relevante. Entre las enfermedades se destacó la epilepsia y la hipertensión arterial. Del mismo grupo otra paciente refirió ovarios poliquísticos en terapia con anticonceptivos orales. Aunque se desconoce su mecanismo etiopatogénico se han relacionado alteraciones endocrinas que provocan desequilibrios hormonales con la aparición de la enfermedad, pero en la actualidad y con la base de datos aportados por algunos investigadores como Ferguson y col. (1984) y posteriormente por McCartan y Sullivan en 1992, los cuales han fallado en encontrar alguna asociación entre la EAR y un desencadenante de tipo hormonal, al parecer tanto mujeres como hombres pueden estar igualmente afectados.

Cabe destacar que los pacientes refirieron haber sufrido altos niveles de estrés concomitantemente con los periodos de aparición de la EAR. Estas altas proporciones fueron manifestadas por los pacientes de ambos géneros ya sea que presentaban la EAR de tipo Menor así como la del tipo Mayor. El papel del estrés psicológico y fisiológico como factor etiológico en la EAR es controversial. Los pacientes frecuentemente

asocian situaciones de estrés con el comienzo de las lesiones y varios estudios como el de Rees y Binnie (1996) han reportado una incidencia de 31-66% de la EAR entre estudiantes de odontología y medicina comparado con 10-20% en la población general, sugiriendo la condición de estrés como un factor etiológico contribuyente.

Además el estudio de Pedersen (1989) mostró que la terapia antidepressiva reducía la incidencia de las úlceras, aunque los esfuerzos para demostrar una asociación directa entre el estrés de la vida y la EAR han sido hasta la actualidad infructuosos. Es importante tomar en cuenta que este estudio no fue diseñado para cuantificar la asociación entre el estrés y la EAR, dado que nuestros datos resultaron de la anamnesis. Sin embargo, las observaciones sugieren que puede haber una posible relación del impacto del estrés emocional y la aparición de las lesiones.

Entre las enfermedades sistémicas presentes en el grupo femenino se encontró la hipertensión arterial y la epilepsia, una paciente con hipertensión arterial y dos pacientes manifestaron epilepsia y una de ellas en tratamiento con anticonceptivos orales. Con relación a la epilepsia y a la hipertensión arterial no

existen datos que demuestren una asociación directa entre éstas y la Estomatitis Aftosa Recurrente.

Al analizar los hábitos psicosociales en nuestra población, una minoría de pacientes manifestaron hábitos, entre ellos solo un paciente del género masculino manifestó ingerir aproximadamente dos cervezas diariamente y otro paciente del mismo género refirió el uso frecuente de gomas de mascar (chicle) con sabor a menta y canela. El papel del consumo de bebidas alcohólicas en la etiología de la Estomatitis Aftosa Recurrente es difícil de establecer y en este caso los resultados no permiten dar conclusiones a este respecto.

Referente al hábito de masticar chicle, algunos investigadores han postulado que ciertos aditivos de los alimentos pueden actuar como alérgenos y precipitar la aparición de la EAR. Entre ellos, Nolan y col. (1991) en un estudio de 21 pacientes con EAR quienes estaban dentro de los límites normales desde el punto de vista hematológico y no respondían a la terapia de vitamina B₁ y B₆, hallaron que los dos alérgenos más comunes fueron el cinamaldehído y el ácido benzoico, y que los pacientes mostraron mejoría después de la subsiguiente eliminación del alérgeno. Ogura y col. (2001) apoyan este

argumento concluyendo que individuos japoneses con EAR tenían ingesta más altas de cinamaldehído y ácido benzoico que aquellos del grupo control. Sin embargo, otro estudio como el de Eversole y col. (1982) en el cual los pacientes tuvieron contacto con alimentos específicos como fresas, nueces y tomates, que subsecuentemente establecían que le causaban úlceras, fallaron para documentar cualquier asociación entre la EAR y esos alimentos.

El cinamaldehído es un agente saboreante y el ácido benzoico es un preservativo, ninguno de ellos están presentes en la cerveza, pero las gomas de mascar (chicle) si contienen cinamaldehído. Por lo que el paciente que tiene ese hábito puede estar más expuesto a esa sustancia que los pacientes del grupo control; pero estos hallazgos no evidencian una asociación significativa, por lo que estudios adicionales con un número mayor de pacientes, objetivos precisos y pruebas cutáneas alérgicas para identificar al alérgeno antes de su eliminación de la dieta son necesarios para clarificar este punto.

Varios investigadores han propuesto que a pesar de su etiología desconocida, la EAR tiene un fuerte componente hereditario y diversos estudios implican una disfunción inmune

local en el área de la lesión, que desencadena los eventos moleculares responsables de la injuria a la mucosa, ocasionando las úlceras.

Los linfocitos son el tipo de célula predominante en las lesiones de la EAR. Cuando se evalúa la función del linfocito, Greenspan y col. (1985) hallaron que ni la hipersensibilidad mediada por células para los estreptococos o antígenos virales, ni la reactividad cruzada entre la mucosa bucal y los antígenos de los estreptococos son probablemente los que jueguen un papel en la patogénesis de la EAR. Estos datos apoyan la hipótesis de un desequilibrio o defecto en la inmunidad de las sub-poblaciones celulares. Muchos estudios han mostrado un desequilibrio en la fracción de las células T en sangre periférica así como también en los subtipos de los linfocitos T. Los porcentajes reducidos en las células T CD4 y CD8 en sangre periférica ha sido descrita por Pedersen y col. (1991) y Qi y col. (1995), pero los resultados son todavía controversiales.

El propósito del presente estudio fue caracterizar las subpoblaciones linfocitarias en los tejidos de los pacientes con

EAR, para analizar el estado inmunitario y su respuesta en comparación con los pacientes sin antecedentes de EAR.

En la presente investigación se determinó la densidad de los subtipos linfocitarios: linfocitos T CD4+ y CD8+ en muestras de tejido con EAR en etapa ulcerativa (15 del tipo Menor y 4 del tipo Mayor) y en el grupo control sano. Los resultados de la investigación arrojaron un aumento estadísticamente significativo de los linfocitos T ayudadores-inductores CD4+ y de los linfocitos T citotóxicos CD8+ en las lesiones de Estomatitis Aftosa Recurrente en relación con los controles saludables.

Los resultados presentados en este trabajo están en concordancia con los reportados por Savage y col. en 1985 en muestras de tejidos provenientes de pacientes con EAR (7 lesiones EAR ulcerativa y 6 lesiones EAR en etapa de cicatrización) donde describieron las proporciones de linfocitos T CD4/CD8 de aproximadamente 1:10 en la fase ulcerativa, mientras que los linfocitos T CD4 se encontraron que predominaban sobre los linfocitos T CD8 en las fases pre-ulcerativa y de cicatrización.

También los presentes hallazgos son compatibles con los reportados por Pedersen y col. en 1992, en el cual determinaron los porcentajes y la cuantificación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en la mucosa bucal tanto en las áreas con lesión activa de 24 pacientes, como en las áreas clínicamente no afectada de 19 pacientes con EAR del tipo Menor, comparándola con controles sin antecedentes de EAR. Los porcentajes de los linfocitos T CD8+ de los pacientes estaban aumentados significativamente durante la EAR en la fase activa, pero no durante la EAR inactiva cuando se comparó con los controles; mientras que los porcentajes de la CD4+ no fueron significativamente diferentes entre los controles y los pacientes.

En el mismo estudio, las cifras de la CD8+ de la EAR, tanto en la etapa activa como en la inactiva, estaban aumentadas significativamente cuando se comparó con los controles, y las cifras de la CD4+ en las muestras de la EAR activa, fueron significativamente diferentes de la mucosa no afectada, pero no significativamente diferente de las cifras de los controles. De este modo la EAR muestra características que parecen más pronunciadas durante la enfermedad activa que durante el reposo, y esto podría explicar la observación clínica común que

una vez que una úlcera ha aparecido, muchos pacientes son propensos para tener más úlceras en otras localizaciones.

Otro estudio para determinar la diferencia entre la mucosa clínicamente no afectada y la mucosa con lesión, investigadores como Häyrynen-Immonen y col. en 1991, seleccionaron 8 muestras con EAR tipo Menor en etapa ulcerativa y 5 muestras de un área clínicamente no afectada del lado opuesto de los mismos pacientes con EAR. Los análisis cuantitativos mostraron que el infiltrado inflamatorio *in situ* en la lesión EAR activa consistió de un 30-60% de linfocitos T CD4+, 10-30% de linfocitos T CD8+, 5-12% de linfocitos B, 5-35% de macrófagos, 2-5% de mastocitos y un bajo número de monocitos. En cambio en las muestras de las áreas clínicamente no afectadas, las células inflamatorias son raras. Estas diferencias pudieran deberse al tiempo de evolución de la enfermedad, reflejando la importancia para elegir el momento de la toma de las biopsias. Estos investigadores consideraron que la clasificación de la EAR de acuerdo al tiempo de la lesión es difícil y están a favor del compromiso tanto del sistema inmunitario como de células inflamatorias menos específicas pero más destructivas en los eventos tisulares locales en la EAR.

Los reportes previos sustentan que las células predominantes en el infiltrado celular de las lesiones de EAR en la etapa ulcerativa son los linfocitos T CD8+ y que éstos superan en número a los linfocitos T CD4+. Estas alteraciones en los subtipos de linfocitos también han sido mostradas en la sangre periférica de los pacientes con EAR en etapa ulcerativa (Kayavis y col. 1987; Sun y col. 1987; Savage y col. 1988; Pedersen y col. 1989; Pedersen y col.1991; Bachtiar y col.1998). No obstante, existen investigaciones que muestran una proporción mayor de linfocitos T CD4+ que CD8+ (Häyrynen-Immonen, 1991).

La inmunidad de la mucosa involucra muchos otros tipos de células que las investigadas en el presente estudio, como los linfocitos B, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, células de Langerhans, etc. Sin embargo, los estudios tanto en mucosa bucal como en sangre periférica, indican rasgos de inmunosupresión en los pacientes con EAR y parece que los cambios de los subtipos de los linfocitos T en la mucosa bucal, de alguna manera reflejan a los cambios periféricos (Pedersen y col. 1992).

Muchos estudios realizados en sangre periférica de pacientes con EAR realizados por Kayavis y col. (1987); Sun y col. (1987);

Savage y col. (1988); Landesberg y col. (1990); Pedersen y col. (1991); Bachtiar y col. (1998) y Sistig y col. (2001) han reportado los porcentajes de los linfocitos T CD4+ periféricos consistentemente reducidos en los pacientes con EAR activa. Pareciera que esta disminución de las cifras de la CD4+ periférica también está reflejada en la mucosa no afectada de los pacientes con EAR.

En referencia a los niveles de los linfocitos T CD8+ periféricos, algunos autores como Kayavis y col. (1987); Savage y col. (1988); Pedersen y col. (1989) y Landesberg y col. (1990), han reportado como aumentados los porcentajes de la CD8+ en los pacientes con EAR, con una tendencia a un mayor incremento durante la EAR en la etapa ulcerativa inicial, por lo que parece que los cambios cuantitativos de la subpoblación CD8+ periférica en los pacientes con EAR están mostrados no solamente en las áreas de ulceración sino en la mucosa bucal en general. En contraste Sistig y col. (2001) reportaron que los porcentajes de los linfocitos T CD8 en los pacientes con EAR activa, se mostraron sin cambios en comparación con la etapa de remisión de la enfermedad, así como con el control saludable.

En cuanto a la proporción de los linfocitos T CD4+/CD8+ en sangre periférica, ha sido reportada por los mismos autores estar reducida en los pacientes con EAR comparada con los grupos controles, lo cual coincide con los hallazgos del presente estudio. Al evaluar el grupo con lesión, la relación CD4+/CD8+ fue de 0.9, la cual fue menor y con diferencia estadísticamente significativa al valor de la proporción de los pacientes del grupo control, la cual fue de 1.3. De esta manera, los cambios de la proporción de los linfocitos T CD4+/CD8+ periféricos posiblemente también están presentes en la mucosa bucal.

Al analizar la distribución de las subpoblaciones linfocitarias de acuerdo al tipo de Estomatitis Aftosa Recurrente, la del tipo Mayor presentó los mayores valores de densidad promedio de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ por mm². Aun cuando en ambos casos el promedio fue mayor en la EAR Mayor, no se encontró entre ambos tipos diferencias estadísticamente significativas. Aunque no existen reportes previos para conocer la asociación entre los tipos de EAR (Mayor y Menor) y las subclases de linfocitos en muestras de tejido. El estudio más reciente, pero en sangre periférica, fue realizado por Bachtiar y col. en 1998, su investigación incluyó 12 EAR tipo Menor y 7 del tipo Mayor, durante la fase de úlcera activa y sus resultados

mostraron que la proporción de los linfocitos T CD4+ en la EAR tipo Mayor no difirió de la EAR del tipo Menor. Sin embargo, la proporción de linfocitos T CD8+ en la EAR del tipo Mayor fue más alta que en la EAR del tipo Menor. Los autores concluyeron que los linfocitos T CD8+ en los pacientes con EAR, representa el subtipo citotóxico y que éste actúa como célula efectora en el daño de la mucosa bucal, y que depende de la severidad de las lesiones.

Aunque el linfocito es la célula relevante en el infiltrado de la Estomatitis Aftosa Recurrente, no es necesariamente el único tipo de célula que esta involucrada en la destrucción local del tejido. Las células polimorfonucleares pueden ocasionar daño al tejido, particularmente en las enfermedades autoinmunes. Luderschmidt y col. (1981) reportaron que la vasculitis inmunocompleja juega un papel importante en la patogénesis de la EAR, destacándose la importancia de la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio vascular, el cual es crítico para la iniciación del reclutamiento celular inflamatorio.

Existe un incrementado interés en destacar la importancia de las moléculas de adhesión en el reclutamiento del infiltrado inflamatorio en las lesiones de la EAR. Las moléculas de adhesión son expresadas sobre las células endoteliales

activadas, donde ellas median la unión y la migración celular transendotelial de los leucocitos hacia los sitios de la inflamación. Entre las moléculas involucradas en este proceso están la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) ó (CD54) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) ó (CD106), ambas miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Osborn 1990; Hakkert y col. 1991). Estos autores sugieren que la VCAM-1 puede mediar la adhesión inicial de los linfocitos T y los monocitos a las células endoteliales activadas, y que la ICAM-1 puede ser importante en reforzar su adhesión y facilitar la subsiguiente transmigración de esas células.

Es importante destacar que la ICAM-1 es una glucoproteína simple de la superficie celular constitutivamente expresada sobre las células endoteliales vasculares, pero no en los queratinocitos de la piel normal. Su expresión puede ser inducida por mediadores inflamatorios tales como la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y el interferón gamma (IFN- γ). Sirve como un ligando para el antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1), el cual pertenece a la sub-familia de la integrina β 2 y es expresado en los linfocitos T, y para la Mac-1 la cual también es miembro de la sub-familia de la

integrina β_2 y es expresada en los macrófagos, neutrófilos y células natural killer (Li y col. 1996).

En este estudio la expresión de las moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1, estaban significativamente elevadas en las lesiones de la Estomatitis Aftosa Recurrente en comparación con los controles saludables sin antecedentes de EAR.

La expresión de la ICAM-1 en los queratinocitos de las lesiones con EAR fue un rasgo prominente y mostró la característica “malla de gallinero” apariencia de inmunotinción positiva de la membrana del queratinocito de la capa basal. La ICAM-1 no se expresa normalmente en esta área, por lo que debe existir un proceso inflamatorio para que sea expresada (Li y col. 1996). Los hallazgos de esta investigación están en concordancia con aquellos reportados por Healy y Thornhill (1999) donde los queratinocitos expresaron fuertemente la molécula ICAM-1 en las lesiones de la EAR. Pero están en desacuerdo con los obtenidos por Verdickt y col. (1992), quienes observaron ocasionalmente su presencia en la EAR y estaba confinado solamente a las células de la capa basal, esto pudo ser debido a que se utilizaron diferentes anticuerpos. Sin embargo, ellos sugieren que la expresión ICAM-1 en los

queratinocitos puede ser un fenómeno secundario a la infiltración linfocítica y que puede ayudar a retener o acumular a los linfocitos en el epitelio de la mucosa bucal.

Por lo tanto, la expresión de la molécula ICAM-1 por los queratinocitos puede ser importante en la patogénesis de la EAR, ya que al persistir la adhesión de los linfocitos T puede mediar su migración intra-epitelial y la retención de los mismos contribuyendo a exacerbar el proceso inflamatorio (Dustin y col. 1988; Barker y col. 1989). Esto queda reforzado por los resultados obtenidos en el grupo control en donde los queratinocitos expresaron la ICAM-1 en muy pocas muestras de mucosa normal, las cuales estaban cercanamente asociadas con vasos sanguíneos y solamente de manera moderada y débil en algunos queratinocitos.

Esto confirma la ausencia de la expresión de dicha molécula en los queratinocitos, lo que ha sido ampliamente demostrado en la mucosa bucal y en la piel normal. En contraste, la expresión ICAM-1 es observada en los queratinocitos de enfermedades cutáneas inmunoinflamatorias tales como el liquen plano, la psoriasis y la dermatitis alérgica por contacto, y su expresión ha

sido correlacionada con la infiltración de los linfocitos T en la epidermis (Li y col. 1996).

La expresión ICAM-1 en los queratinocitos también puede jugar un papel más directo en la ruptura epitelial y en la formación de la úlcera. Las células natural killer (NK) y los linfocitos T citotóxicos CD8 positivos son capaces de atacarlos como blanco y matar a los queratinocitos directamente debido a su habilidad para unirse a la ICAM-1 expresada en los queratinocitos (Makgoba y col. 1988; Symington y col. 1991). En este respecto es interesante observar que los linfocitos T intraepiteliales son predominantemente CD8-positivos en la EAR ulcerativa, como ha sido demostrado en la mayoría de las lesiones de la EAR en este estudio. Por lo que el desarrollo de la úlcera podría ser una consecuencia directa de la lisis de los queratinocitos, particularmente si la expresión ICAM-1 se extiende a través de todo el grosor del epitelio.

Al evaluar la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en otras localizaciones, se observó un fuerte inmunomarcaje en el endotelio de los vasos sanguíneos y en las células del infiltrado celular del corion de las lesiones con EAR. Estos resultados están en concordancia con los reportados por Healy y col. (1999)

y Häyrynen-Immonen y col. (1992). Todos los individuos del grupo control también expresaron la molécula de adhesión ICAM-1 en las células endoteliales, pero a diferencia de los tejidos de los pacientes con EAR, la expresión fue débil y moderada. Además en este mismo grupo se encontró un escaso infiltrado celular y las pocas células solo estaban débilmente expresadas y en cercanía a vasos sanguíneos. La expresión sobre las células endoteliales que revisten a los vasos parece ser esencial para la migración de los leucocitos dentro de los tejidos, tanto en la vigilancia inmunológica de la mucosa normal como en los infiltrados inflamatorios de los pacientes con EAR.

Los resultados obtenidos en relación a la molécula de adhesión VCAM-1 también mostraron aumentada su expresión en las lesiones de la Estomatitis Aftosa Recurrente en comparación con el grupo control sano. La característica más notable fue la frecuencia e intensidad de la expresión de la VCAM-1 en las células endoteliales observadas en las lesiones con EAR. Mientras que la VCAM-1 solo estaba expresada débilmente en las células endoteliales de algunas biopsias de las muestras de la mucosa normal. Estos datos coinciden con los de Healy y col. (1997, 1999).

La VCAM-1 es una proteína que no está normalmente expresada sobre el endotelio vascular, pero su expresión está inducida por la interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α). Se encuentra en las células endoteliales activadas, fibroblastos de la médula ósea, macrófagos tisulares, células dendríticas, mioblastos y miotúbulos, para de esta manera mediar la adhesión de los linfocitos, monocitos y eosinófilos al endotelio. Su ligando sobre los linfocitos corresponde a un miembro de la integrina β_1 , la VLA-4 (activación tardía o *very late activation*) presente en las células T de memoria (Healy y col. 1997).

Los estudios previos han demostrado que la VCAM-1 esta solo minimamente expresada, en las células endoteliales de la piel normal. La expresión de la VCAM-1 en las células endoteliales demuestra su importancia en mediar la adhesión de los linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos a la célula endotelial y sus subsecuentes migraciones dentro de los tejidos (Elices y col. 1990; Bochner y col. 1991; Weller y col. 1991).

También en los individuos con lesión se observó la mayor expresión de la VCAM-1 en la zona del infiltrado celular. Es por lo tanto probable, que la fuerte expresión de la VCAM-1 sobre las

células endoteliales que revisten a los vasos sanguíneos en la EAR, juegan un papel importante en el reclutamiento del infiltrado en esas lesiones que consisten predominantemente de linfocitos. Esta sugerencia es sustentada por nuestros resultados comparándolos con las muestras de la mucosa normal, donde solamente la mitad de ellos expresó débilmente la molécula VCAM-1 en el corion.

Los hallazgos presentes apoyan que la EAR es una enfermedad con varias causas posibles, las moléculas de adhesión están expresadas en las superficies de muchas y diferentes células, y juegan un papel importante en las interacciones célula-célula y célula-matriz, en la inmunidad y en la inflamación.

También se sugiere que la etiología de la EAR depende de una disfunción inmunológica local en la cual los linfocitos T desempeñan una función significativa. El origen del estímulo que inicia el proceso se desconoce. El agente causal podría ser un antígeno endógeno o exógeno, o podría ser un factor inespecífico como el traumatismo, en el cual pueden estar implicados mediadores químicos.

La importancia de estos trabajos es destacar que nuestro país está a la vanguardia en la investigación, y que cada estudio es un aporte científico, contribuyendo a presentar datos hasta ahora no reportados, así mismo incorporando al odontólogo al campo de la investigación para ejercer un papel integral en el área de la salud.

VI. CONCLUSIONES

La Estomatitis Aftosa Recurrente se presentó predominantemente en pacientes del género femenino, sin predilección en cuanto a la edad.

La Estomatitis Aftosa Recurrente más frecuente fue el tipo Menor y las lesiones se localizaron principalmente en la cara interna del carrillo y labio.

La sintomatología referida en términos generales fue el dolor. La condición sistémica asociada fue la menopausia.

En relación a la densidad de las subpoblaciones celulares linfocitarias, se observó un marcado aumento en el número de

linfocitos T CD4+ y CD8+ en los pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente, en comparación con el grupo control. Implicando a los linfocitos T y por lo tanto una respuesta inmune mediada por células activadas en la patogénesis de la Estomatitis Aftosa Recurrente.

En la Estomatitis Aftosa Recurrente, las subpoblaciones de las células T CD4+ y CD8+ se ubicaron en una alta proporción debajo del epitelio y en el espacio del corion, en contraste al grupo control que fueron escasas, lo cual sugiere que la respuesta celular está implicada en el daño a los queratinocitos, resultando en la destrucción epitelial y en el desarrollo de la úlcera en ese sitio.

La densidad celular de los linfocitos T CD4+ y CD8+ fue similar para los tipos de Estomatitis Aftosa Recurrente Mayor y Menor.

La molécula de adhesión ICAM-1 se encontró fuertemente expresada en las muestras de los pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente, en contraste con el grupo control que fue débil o no se detectó.

La expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 se localizó más frecuentemente a nivel de la membrana basal de los queratinocitos y en las células endoteliales de los vasos del corion en los pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente.

La molécula de adhesión ICAM-1 se expresó marcadamente en la Estomatitis Aftosa Recurrente tipo Menor, a nivel del endotelio y del infiltrado en relación a los resultados más heterogéneos en la Estomatitis Aftosa Recurrente tipo Mayor.

La expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 estuvo significativamente aumentada en los pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente con respecto al grupo sano.

La mayor localización de la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 fue en las células endoteliales y en el infiltrado del corion de los pacientes con Estomatitis Aftosa Recurrente, en relación al grupo control donde no hubo expresión o fue muy débil.

Se detectó una alta expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en las lesiones de pacientes con Estomatitis

Aftosa Recurrente, lo cual sugiere su participación en la etiopatogénesis de la enfermedad.

El estudio de los eventos de adhesión celular y la explicación del papel de las moléculas de adhesión en la patogénesis de la Estomatitis Aftosa Recurrente, podría ayudar a nuestro conocimiento de la enfermedad y apuntar la vía para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

VII. REFERENCIAS

Arbesfeld SJ, Kurban AK. Behçet's disease—new perspectives on an enigmatic syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 767-779.

Atkin P, Xu X, Thornhill M. Minor recurrent aphthous stomatitis and smoking: an epidemiological study measuring plasma cotinine. *Oral Dis* 2002; 8(3):173-176.

Axéll T. A prevalence study of oral mucosal lesions in an adult Swedish population. *Odont Rev* 1976; 27(36): 1-103.

Axéll T, Henricsson V. The occurrence of recurrent aphthous ulcers in an adult Swedish population. *Acta Odontol Scand* 1985; 43: 121-5.

Axéll T, Henricsson V. Association between recurrent aphthous stomatitis and tobacco habits. *Scand J Dent Res* 1985; 93; 239-242.

Bachtiar EW, Cornain S, Sioregar B, Raharjo TW. Decreased CD4+/CD8+ ratio in major type of recurrent aphthous ulcers: comparing major to minor types of ulcers. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1998; 16(2-3):75-79.

Bagán JV, Sanchis JM, Milian MA, Penarrocha M, Silvestre FJ. Recurrent aphthous stomatitis. A study of the clinical characteristics of lesions in 93 cases. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 395-397.

Barnadas M, Remacha A, Condimines J. Estudio de los déficit hematológicos en los enfermos afectados de aftas orales recidivantes. *Med Clin (Barc)* 1997; 109: 85-87.

Barrons R. Treatment strategies for recurrent oral aphthous ulcers. *Am J Health Syst Pharm* 2001; 58(1): 41-53.

Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WER, Thornhill MH. Recurrent aphthous stomatitis and gene polymorphisms for the inflammatory markers TNF- α , TNF- β and the vitamin D receptor: no association detected. *Oral Dis* 2002; 8(6): 303-307.

Berroteran A, Perrone M, Correnti M, Cavazza M, Tombazzi C, Goncalvez R, Lecuna V. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. *J Med Microbiol* 2002; 51: 764-770.

Binnie WH, Curro FA, Khandwala A, Van Inwegan RG. Amlexanox oral paste: A novel treatment that accelerates the healing of aphthous ulcers. *Compend Contin Educ Dent* 1997; 18: 1116-1118.

Birek C, Grandhi R, McNeill K. Detection of *Helicobacter pylori* in oral aphthous ulcers. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 197-203.

Bonnetblanc JM, Royer C, Bedane C. Thalidomide and recurrent aphthous stomatitis: A follow-up study. *Dermatology* 1996; 193: 321-323.

Boulinguez S, Reix S, Bedane C, Debrock C, Bouyssou-Gauthier ML, Sparsa A, Le Brun V, De Vencay P, Bernard P, Bonnetblanc JM. Role of drug exposure in aphthous ulcers: A case-control study. *Br J Dermatol* 2000; 143: 1261-1265.

Brice S, Cook D, Leahy M, Huff JC, Weston WL. Examination of the oral mucosa and peripheral blood cells of patients with recurrent aphthous ulceration for human herpesvirus DNA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89: 193-8.

Brown RS, Bottomley WK. Combination immunosuppressant and topical steroid therapy for treatment of recurrent major aphthae. A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 42-44.

Buno IJ, Huff JC, Weston WL, Cook DT, Brice SL. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol* 1998; 134: 827-831.

Casiglia JM. Recurrent aphthous stomatitis: Etiology, diagnosis, and treatment. *Gen Dent* 2002; Mar-Apr; 50(2):157-166.

CE Jr. Aphthous ulcers revisited. *J Am Dent Assoc* 2001;132: 728

Challacombe SJ, Barkhan P, Lehner T. Haematological features and differentiation of recurrent oral ulceration. *Br J Oral Surg* 1977; 15: 37-48.

Challacombe SJ, Batchelor JR, Kennedy LA, Lehner T. HLA antigens in recurrent oral ulcerations. *Arch Dermatol* 1977; 113: 1717-1719.

Chaun H. Update on the role of *H. pylori* infection in gastrointestinal disorders. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 251-255.

Connell WR, Kamm MA, Dickson M, Balkwill AM, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994; 343(8908): 1249-1252.

Cooke BE. The diagnosis of bullous lesions affecting the oral mucosa. Part I. *Br Dent J* 1960; 109: 83-96.

Criteria for diagnosis of Behçet disease. International Study Group for Behçet Disease. *Lancet* 1990; 335: 1078-1080.

Crevelli MR, Aguas S, Adler I, Quarracino C, Bazerque P. Influence of socioeconomic status on oral mucosa lesion prevalence in schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol* 1988; 16: 58-60.

de Asis ML, Bernstein LJ, Schliozberg J. Treatment of resistant oral aphthous ulcers in children with acquired immunodeficiency syndrome. *J Pediatr* 1995; 127: 663-665.

Degalis P, Bagg J, Walker DM. Spontaneous migration and chemotactic activity of neutrophil polymorphonuclear leukocytes in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 64: 298-301.

Di Alberti L, Ngui SL, Porter SR, Speight PM, Scully C, Zakrzewska JM, et al. Presence of human herpesvirus-8 variants in the oral tissues of human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Infect Dis* 1977; 175: 703-707.

Di Alberti L, Porter SR, Speight PM, Scully C, Zakrzewska JM, Williams I, et al. Detection of human herpesvirus-8 DNA in oral ulcer tissues of HIV-infected individuals. *Oral Dis* 1977; 3(Suppl 1): S133-S134.

Dolby AE, Walker DM, Slade M, Allan C. HLA histocompatibility antigens in recurrent aphthous ulceration. *J Dent Res* 1977; 56: 105-107.

Donatsky O. A leukocyte migration study on the cell-mediated immunity against adult human oral mucosa and streptococcal antigens in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1976; 84(C): 227-234.

Eisen D, Lynch DP. Selecting topical and systemic agents for recurrent aphthous stomatitis. *Cutis* 2001; 68: 201-206.

Ek A, Larsson K, Siljerud S, et al. Fluticasone and budesonide inhibit cytokine release in human lung epithelial cells and alveolar macrophages. *Allergy* 1999; 54: 691-699.

Embil JA, Stephens RG, Mauriel R. Prevalence of recurrent herpes labialis and aphthous ulcers among young adults on six continents. *Can Med Assoc J* 1975; 113: 630-637

Eglin RP, Lehner T, Subak-Sharpe JH. Detection of RNA complimentary to herpes simplex virus in mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. *Lancet* 1982; 2: 1356-1361.

Eversole LR, Shopper TP, Chambers DW. Effects of suspected foodstuff challenging agents in the etiology of recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 54: 33-38.

Eversole LR. Immunopathology of oral mucosal ulcerative, desquamative, and bullous diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77: 555-571.

Fahmy MS. Recurrent aphthous ulcers in a mixed Arab community. *Community Dent Oral Epidemiol* 1976; 4: 160-64.

Fakhry-Smith S, Din C, Nathoo SA, Gaffar A. Clearance of sodium lauryl sulphate from the oral cavity. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 313-317.

Farell RJ, Kelly CP. Diagnosis of celiac sprue. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3237-3246.

Ferguson MM, Wray D, Carmichael HA, Russell RI, Lee FD. Coeliac disease associated with recurrent aphthae. *Gut* 1980; 21: 223-226.

Ferguson MM, Carter J, Boyle P. An epidemiological study of factors associated with recurrent aphthae in women. *J Oral Med* 1984; 39: 212-217.

Field EA, Brookes V, Tyldesley WR. Recurrent aphthous ulceration in children –A review. *Int J Paed Dent* 1992; 2: 1-10.

Forbes A, Reading NG. Review article: The risks of malignancy from either immunosuppression or diagnostic radiation in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharm Therap* 1995; 9: 465-470.

Gadol N, Greenspan JS, Hoover CI, Olsen J. Leucocyte migration inhibition in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol* 1985; 14: 121-132.

Gallina G, Cumbo V, Messina P, Caruso C. HLA-A, B, C, DR, MT and MB antigens in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 59: 364-370.

Gándara P, Somoza JM, Garcia A, Gándara JM. Estomatitis aftosa recidivante. Diagnóstico y actualización terapéutica. *Gaceta Dental*. Septiembre 2002, N° 130.

Ghodratnama F, Riggio MP, Wray D. Search for human herpesvirus-6, human cytomegalovirus and varicella zoster virus DNA in recurrent aphthous stomatitis tissue. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 192-197.

Ghodratnama F, Wray D, Bagg J. Detection of serum antibodies against cytomegalovirus, varicella zoster virus and human herpesvirus-6 in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 12-15.

Grady D, Ernster VL, Stillman L, et al. Smokeless tobacco use prevents aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74: 463-465.

Greenberg MS; Pinto A. Etiology and management of recurrent aphthous stomatitis. *Curr Infect Dis Rep* 2003; 5(3): 194-198.

Greenspan JS, Gadol N, Olson JA, Talal N. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in recurrent aphthous ulceration. *Clin Exp Immunol* 1981; 44:603-610.

Greenspan JS, Gadol N, Olson JA, Hoover CI, Jacobsen PL, Shillitoe EJ, et al. Lymphocyte function in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol* 1985; 14: 492-502.

Greer ROJ, Lindenmuth JE, Juarez T, Khandwala A. A double-blind study of topically applied 5% amlexanox in the treatment of aphthous ulcers. *J Oral Max Surg* 1993; 51: 243-248.

Hasan A, Childerstone A, Pervin K, Shinnick T, Mizushima Y, van der Zee R, et al. Recognition of a unique peptide epitope of the mycobacterial and human heat shock protein 65-60 antigen by T cells of patients with recurrent oral ulcers. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 392-397.

Häyrinen-Immonen R, Malmström M, Nordström D, Hietanen J, Könttinen Y. Immune inflammatory cells in recurrent oral ulcers (ROU). *Scand J Dent Res* 1991; 99: 510-518.

Häyrinen-Immonen R, Malmström M, Nordström D, Sorsa T, Könttinen Y. Distribution of adhesion receptors in recurrent oral ulcers. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 199-202.

Häyrinen-Immonen R, Sorsa T, Pettila J, Könttinen Y, Teronen O, Malmström M. Effect of tetracyclines on collagenase activity in patients with recurrent aphthous ulcers. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 269-272.

Healy CM, Thornhill MH. Induction of adhesion molecule expression on blood vessels and keratinocytes in recurrent oral ulceration. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 5-11.

Healy CM, Paterson M, Joyston-Bechal S. y col. The effect of sodium lauryl sulfate-free dentifrice on patients with recurrent oral ulceration. *Oral Dis* 1999; 5: 39-43.

Healy CM, Enobakhare B, Haskard D, Thornhill M. Raised levels of circulating VCAM-1 and circulating E-selectin in patients with recurrent oral ulceration. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 23-8.

Herlofson BB, Brodin P, Aars H. Increased human gingival blood flow induced by sodium lauryl sulfate. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 1004-1007.

Hizawa K, Iida M, Kohrogi N, Kuroki F, Yao T, Sakamoto K, Fujisjima M. Crohn disease: Early recognition and progress of aphthous lesions. *Radiology* 1994; 190(2): 451-454.

Hoover CI, Greenspan JS. Immunochemical antigens of various viridans streptococci, including strain 2A+₃HOT from recurrent aphthous ulceration. *Arch Oral Biol* 1983; 28: 917-922.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase techniques. *J Histochemistry Cytochemistry* 1981; 29 (4): 577-80.

Hunter IP, Ferguson MM, Scully C, Galloway AR, Main AN, Russell RI. Effects of dietary gluten elimination in patients with recurrent minor aphthous stomatitis and no detectable gluten enteropathy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75: 595-598.

Jaber L, Weinberger A, Klein T, Yaniv I, Mukamel M. Close association on HLA-B52 and HLA-B44 antigens in Israeli Arab adolescents with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 184-187

Jacobson JM, Greenspan JS, Spritzler J, Ketter N, Fahey JL, Jackson JB, et al. Thalidomide for the treatment of oral aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1997; 336: 1487-1493.

Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Kaklamanis PG. Behçet's disease. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 27:197-217.

Katz J, Chaushu G, Peretz B. Recurrent oral ulcerations associated with recurrent herpes labialis –two distinct entities?. *Community Dent Oral Epidemiol* 2001; 29: 260-263.

Kayavis I, Danilidis M, Albanidou-Farmaki E, Vergoulas G, Polymenidis Z, Papanayotou P. T-lymphocyte subsets in recurrent oral ulceration. A preliminary study. *J Oral Med* 1987; 42: 198-200.

Khandwala A, Van Inwegen RG, Alfano MC. 5% amlexanox oral paste: a new treatment for recurrent minor aphthous ulcers. I. Clinical demonstration of acceleration of healing and resolution of pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 83: 222-230.

Kim Y, Greenberg MS. Management of patients with severe oral mucosal disease. *Alpha Omegan* 2001; 94:18-23.

Kleinman DV, Swango PA, Pindborg JJ. Epidemiology of oral mucosa in United States schoolchildren: 1986-87. *Community Dent Oral Epidemiol* 1994; 22: 243-253.

Krause I, Rosen Y, Kaplan I, Milo G, Guedj D, Molad Y, Weinberger A. Recurrent aphthous stomatitis in Behçet disease: Clinical features and correlation with systemic disease expression and severity. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 193-196.

Lahteenoja H, Toivanen A, Viander M, Maki M, Irjala K, Raiha I, et al. Oral mucosal changes in coeliac patients on a gluten-free diet. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 899-906.

Landesberg R, Fallon M, Insel R. Alterations of T helper/inducer and T suppressor/inducer cells in patients with recurrent aphthous ulcers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 205-208.

Lehner T. Autoimmunity in oral diseases, with special reference to recurrent oral ulceration. *Proc R Soc Med* 1968; 61: 515-24.
Lehner T. Progress report: oral ulceration and Behçet's syndrome. *Gut* 1977; 18: 491-511.

Lehner T, Welsh KI, Batchelor JR. The relationship of HLA-B and DR phenotypes to Behçet's syndrome, recurrent oral ulceration and the class of immune complexes. *Immunology* 1982; 47: 581-587.

Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T. Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies Behçet's syndrome. *Infect Immunol* 1991; 59: 1434-1441.

Leimola-Virtanen R, Happonen RP, Syrjanen S. Cytomegalovirus (CMV) and *Helicobacter pylori* (HP) found in oral mucosal ulcers. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 14-17.

Le Thi Huong D, Wechsler B, Piette JC, Papo T, Jaccard A, Jault F, et al. Aortic insufficiency and recurrent valve prosthesis dehiscence in MAGIC syndrome. *J Rheumatol* 1993; 20: 397-398.

Lindemann RA, Riviere GR, Sapp JP. Serum antibody responses to indigenous oral mucosal antigens and selected laboratory-maintained bacteria in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 59: 585-589.

López Jornet P, Bermejo Fenoll A. Lesiones que cursan con úlceras, vesículas y ampollas en la mucosa bucal. En Bacosnes coord. *Manual de Odontología*. Trigo Ediciones, S.L. Smithkline Beecham, S.A. Madrid, 1998; 3005-3024.

Lozada-Nur F, Ficarra G. Malattie vecicolo-erosive del cavo orale. *Diagnosi e trattamento*. Masson S.p.A. Milano, 1990, 1-6.

Luderchmidt C, Wolff HH, Scherer R. Aphthen: Histologische, immunofluoreszenz und immunelektronenmikroskopische Studie zur Pathogenese. *Hautarzt* 1981; 32: 364-369.

MacPhail LA, Greenspan D, Greenspan JS. Recurrent aphthous ulcers in association with HIV infection. *Diagnosis and treatment*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 283-288.

MacPhail LA, Greenspan JS. Oral ulceration in HIV infection: Investigation and pathogenesis. *Oral Dis* 1997; 3 (Suppl 1): S190-S193.

Malmström M, Salo OP, Fyhrquist F. Immunogenetic markers and immune response in patients with recurrent oral ulceration. *Int J Oral Surg* 1983; 12: 23-30.

Marshall GS, Edwards KM, Butler J, Lawton AR. Syndrome of periodic fever, pharyngitis, and aphthous stomatitis. *J Pediatr* 1987; 110: 43-46.

McCartan BE, Sullivan A. The association of menstrual cycle, pregnancy, and menopause with recurrent oral aphthous stomatitis: A review and critique. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 455-458.

McCartan BE, Lamey PJ, Wallace Am. Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 357-359.

Meini A, Pillan MN, Plebani A, Ugazio AG, Majorana A, Sapelli PL. High prevalence of DRW10 y DQW1 antigens in celiac disease associated with recurrent aphthous stomatitis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 972.

Messadi DV, Pober JS, Fiers W, Gimbrone MA, Murphy GF. Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. *J Immunol* 1987; 139: 1557-1562.

Miles DA, Bricker SL, Razmus TF, Potter RH. Triamcinolone acetonide versus chlorhexidine for treatment of recurrent stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75: 397-402.

Miller MF, Ship II, Ram C. A retrospective study of the prevalence and incidence of recurrent aphthous ulcers in a professional population, 1958-1971. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977a; 43: 532-537.

Miller MF, Garfunkel AA, Ram C, Ship II. Inheritance patterns in recurrent aphthous ulcers: Twin and pedigree data. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977b; 43: 886-891.

Miller MF, Garfunkel AA, Ram CA, Ship II. The inheritance of recurrent aphthous stomatitis. Observations on susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 49: 409-12.

Miller RA. The Koebner phenomenon. *Int J Dermatol* 1982; 21: 192-197.

Mills MP, Mackler BF, Nelms DC, Peavy DL. Quantitative distribution of inflammatory cells in recurrent aphthous stomatitis. *J Dent Res* 1980; 59: 562-566.

Mizuki N, Ohno S, Sato T, Ishihara M, Miyata S, Nakamura S, et al. Mieso-satellite polymorphism between the tumor necrosis factor and HLA-B genes in Behçet's disease. *Human Immunol* 1995; 43:129-135.

Moraes M, Russo G. Thalidomide and its dermatologic uses. *Am J Med Sci* 2001; 321: 321-326.

Mravak-Stipetic M, Gall-Troselj K, Lukac J, Kusic Z, Pavelic J. Detection of *Helicobacter pylori* in various oral lesions by nested polymerase chain reaction. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 1-3.

Muzyka BC, Glick M. Major aphthous ulcers in patients with HIV disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77:116-120.

Natah SS, Häyrinen-Immonen R, Hietanen J, Malmström M, Konttinen Y. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha expressing cells in recurrent aphthous ulcer lesions. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 19-25.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquet JE. Oral and maxillofacial pathology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2002. p. 285-290.

Nolan A, McIntosh WB, Allam BF, Lamey PJ. Recurrent aphthous ulceration: Vitamin B₁, B₂, and B₆ status and response to replacement therapy. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 389-391.

Nolan A, Lamey PJ, Milligan KA, Forsyth A. Recurrent aphthous ulceration and food sensitivity. *J Oral Pathol Med* 1991b; 20:473-475.

Norris P, Poston RN, Thomas DS, Thornhill M, Hawk J, Haskard DO. The expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: a comparison of ultraviolet B erythema and delayed hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 763-70

Nsamba C, Kaluskar SK. Inheritance of recurrent aphthous ulceration of the mouth. *J Laryngol Otl* 1986; 100: 361-362.

Ogura M, Yamamoto T, Morita M, Wanatabe T. A case-control study on food intake of patients with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91:45-49.

Olson JA, Feinberg I, Silverman S Jr, Abrams D, Greenspan JS. Serum vitamin B₁₂, folate, and iron levels in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 54: 517-520.

Paterson DL, Georghiou PR, Allworth AM, Kemp RJ. Thalidomide as treatment of refractory aphthous ulceration related to human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 250-254.

Pavelic J, Gall-Troselj K, Jurak I, Mravak-Stipetic M. *Helicobacter pylori* in oral aphthous ulcers. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 523-525.

Pedersen A. Psychologic stress and recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 119-122.

Pedersen A. Recurrent aphthous ulceration: virological and immunological aspects. *APMIS* 1993; 37 (Suppl): 1-37.

Pedersen A, Hornsleth A. Recurrent aphthous ulceration: A possible clinical manifestation of reactivation of varicella zoster or cytomegalovirus infection. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 64-68.

Pedersen A, Madsen HO, Vestergaard B, Ryder LP. Varicella-zoster virus DNA in recurrent aphthous ulcers. *Scand J Dent Res* 1993; 101: 311-313.

Pedersen A. Psychologic stress and recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 119-122.

Pedersen A, Klausen B, Hougen HP, Stenvang JP. T-lymphocyte subsets in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 59-60.

Pedersen A, Klausen B, Hougen HP, Ryder LP. Peripheral lymphocyte subpopulations in recurrent aphthous ulceration. *Acta Odontol Scand* 1991; 49: 203-206.

Pedersen A, Hougen HP, Kenrad B. T-lymphocyte subsets in oral mucosa of patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 176-180.

Perez-Stable EJ, Benowitz NL, Marin G. Is serum cotinine a better measure of cigarette smoking than self-report? *Prev Med* 1995; 24: 171-179.

Phelan JA, Eisig S, Freedman PD, Newsome N, Klein RS. Major aphthous-like ulcers in patients with AIDS. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 68-72.

Platz P, Ryder LP, Donatsky O. No deviations of HLA A and B antigens in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Tissue Antigens* 1976; 8: 279-280.

Pongissawaranun W, Laohapand PP. Epidemiologic study on recurrent aphthous stomatitis in a Thai dental patient population. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991; 19: 52-53.

Porter SR, Hegarty A, Kaliakatsou F, Hodgson T, Scully C. Recurrent aphthous stomatitis. *Clin Dermatol* 2000; 18 (5) 569-578.

Porter SR, Scully C, Pedersen A. Recurrent aphthous stomatitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 306-321.

Porter SR, Scully C, Flint SR. Haematological status in recurrent aphthous stomatitis compared with other oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 66: 41-44.

Porter SR, Scully C, Bowden J. Immunoglobulin G subclasses in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 26-27.

Porter SR, Scully C. Aphthous stomatitis—an overview of aetiopathogenesis and management. *Cin Exp Dermatol* 1991;16: 235-243

Porter SR, Kingsmill V, Scully C. Audit of diagnosis and investigations in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 76: 449-452.

Qi J, Sun Z, Wei S. T-cell subsets and lymphocyte proliferation in recurrent oral ulcers. *Chin J Stomatol* 1995; 30: 292-294.

Ratis G, Poccardi G, Scalabrini DR, Pomatto E, Vercellino V. Il linfocitogramma nelle stomatiti aftose ricorrenti. *Minerva Stomatol* 1991; 40: 45-49.

Rattan J, Schneider M, Arber N, Gorsky M, Dayan D. Sucralfate suspension as a treatment of recurrent aphthous stomatitis. *J Inter Med* 1994; 236: 341-343.

Rees TD, Binnie WH. Recurrent aphthous stomatitis. *Dermatol Clin* 1996; 14: 243-256.

Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000; 28: 390-398.

Reichart PA, Philipsen HP. *Atlas de Patología Oral*. Masson, S.A. Barcelona, 1999.

Reimer G, Luckner L, Hornstein OP. Direct immunofluorescence in recurrent aphthous ulcers and Behçet's disease. *Dermatol* 1983; 167: 293-298.

Regezi JA. y Sciuba J. *Patología Bucal* 1999. Tercera Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México.

Revuz J, Guillaume JC, Janier M, Hans P, Marchand C, Souteyrand P, et al. Crossover study of thalidomide vs. placebo in severe recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol* 1990; 118: 923-927.

Riggio MP, Lennon A, Wray D. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous stomatitis tissue by PCR. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 507-513.

Rogers RS. Recurrent aphthous stomatitis: Clinical characteristics and associated systemic disorders. *Semin Cutan Med Surg* 1997; 16: 278-283.

Sallay K, Kulscar G, Dan P, et al. Aetiologie and prophylaxe der rezidivierenden Aphthen. *Dtsch Zahnartzl* 1975; 30: 570-575.

Sapp JP, Eversole LR, Wysocki G. *Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea*. Edición en español 1998. Harcourt Brace de España.

Savage NW, Seymour GJ. Specific lymphocytotoxic destruction of autologous epithelial cell targets in recurrent aphthous stomatitis. *Aust Dent J* 1994; 39: 98-104.

Savage NW, Mahanonda R, Seymour GJ, Bryson GJ, Collins RJ. The proportion of suppressor-inducer T-lymphocytes is reduced in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol* 1988; 17: 293-297.

Savage NW, Seymour GJ, Kruger BJ. T lymphocyte subset changes in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60: 175-181.

Scheid P, Bohadana A, Martinet Y. Nicotine patches for aphthous ulcers due to Behçets syndrome. *N Engl J Med* 2000; 343: 1816-1817.

Schafler NL. *Medical Malpractice. Handling Dental Cases.* 2nd ed. Colorado Springs, CO: Shepard's/McGraw-Hill Inc, 1991.

Scholl PR. Periodic fever syndromes. *Curr Opin Pediatr* 2000; 12: 563-566.

Schreiner DT, Jorizzo JL. Behçet's disease and complex aphthosis. *Dermatol Clin* 1987; 5: 769-778.

Schroeder HE, Muller-Glauser W, Sallay K. Pathomorphologic features of the ulcerative stage of oral aphthous ulcerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 58: 293-305.

Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F. The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis: A consensus approach. *JADA* 2003; 134(2): 200-207.

Scully C, Porter SR. Recurrent aphthous stomatitis: current concepts of etiology, pathogenesis and management. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 21-27.

Scully C, Yap L, Boyle P. IgE and IgD concentrations in patients with recurrent aphthous stomatitis. Arch Dermatol 1983; 119: 31-34.

Sedghizadeh P, Shuler CF, Allen CM, Beck FM, Kalmar JR. Celiac disease and recurrent aphthous stomatitis: A report and review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 94: 474-478.

Seear J, Walters L. Law and Ethics in Dentistry. 3rd. ed. Boston: Wright/Butterworth-Heinemann Ltd, 1991.

Shapiro S, Olsson DL, Chellemi SJ. The association between smoking and aphthous ulcers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1970; 30: 624-630.

Shashy RG, Ridley MB. Aphthous ulcers: A difficult clinical entity. Am J Otolaryngol 2000; 21: 389-393.

Ship JA, Chavez EM, Doerr PA, Henson BS, Sarmadi M. Recurrent aphthous stomatitis. Quint Int 2000; 31: 95-112.

Sircus W, Church R, Kelleher J. Recurrent aphthous ulceration of the mouth. Q J Med 1957; 26: 235-249.

Sistig S, Cekic-Arambasin A, Rabatic S, Vucicevic-Boras V, Kleinheinz J, Piffko J. Natural immunity in recurrent aphthous ulceration. J Oral Pathol Med 2001; 30: 275-280.

Sistig S, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Kuzic Z. Salivary IgA and IgG subclasses in oral mucosal diseases. Oral Dis 2002; 8(6): 282-286.

Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and

saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol* 2000; 49: 349-353.

Stanley HR. Aphthous lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972; 33: 407-416.

Stoopler ET, Sollectio TP. Recurrent aphthous stomatitis. Update for the general practitioner. *NY State Dent J* 2003 Feb; 69(2): 27-29.

Studd M, McCance DJ, Lehner T. Detection of HSV-1 DNA in patients with Behçet's syndrome and in patients with recurrent oral ulcers by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1991; 34: 39-43.

Sun A, Wu Y-C, Hsieh R-P, Kwan H-W, Lu Y-C. Changes of T-lymphocyte subsets in recurrent aphthous ulcers. *J Formosan Med Assoc* 1987; 86: 718-722.

Sun A, Chang JG, Chu CT, Liu BY, Yuan JH, Chiang CP. Preliminary evidence for an association of Epstein-Barr virus with pre-ulcerative oral lesions in patients with recurrent aphthous ulcers or Behçet's disease. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 168-175.

Sutton RL. Periadenitis mucosa necrotic recurrens. *J Cutan Dis* 1911; 29: 65-71.

Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Fernandez CT, Rondón AJ, Convit J. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. *Exp Dermatol* 1994; 3: 17-22.

Taylor LJ, Bagg J, Walker DM, et al. Increased production of tumor necrosis factor by peripheral blood leucocytes in patients with recurrent oral aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 21-25.

Tuzun B, Wolf R, Tuzun Y, et al. Recurrent aphthous stomatitis and smoking. *Int J Dermatol* 2000; 39: 358-360.

VanHale HM, Rogers RSr. Light and fluorescent microscopic studies of recurrent aphthous ulcers. *Cutis* 1984; 34: 284-288.

Veloso FT, Saleiro JV. Small-bowel changes in recurrent ulceration of the mouth. *Hepatogastroenterology* 1987; 34: 36-37.
Verdickt GM, Savage NW, Dodd NM, Walsh LJ. Expression of the CD54 (ICAM-1) and CD11a (LFA-1) adhesion molecules in oral mucosal inflammation. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 65-69.

Vicente M, Soria A, Mosquera A, Pérez J, Lamas A, Castellano T, Ramos A. Immunoglobulin G subclass measurements in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 538-540.

Victória JMN, Kalapothakis E, Silva J de FC, Gomez RS. *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(4): 219-223.

Vincent SD, Lilly GE. Clinical, historic, and therapeutic features of aphthous stomatitis. Literature review and open clinical trial employing steroids. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74: 79-86.

Widdop FT. On informed consent in dentistry. *Aust Dent Assoc News Bull* 1991; Feb: 35.

Wilson CW. Food sensitivities, taste changes, aphthous ulcers and atopic symptoms in allergic disease. *Ann Allergy* 1980; 44: 302-307.

Woo SB, Sonis ST. Recurrent aphthous ulcers: a review of diagnosis and treatment. *J Am Dent Assoc* 1996; 127: 1202-1213.

Wray D, Charon J. Polymorphonuclear neutrophil function in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 392-394.

Wray D, Vlagopoulos TP, Siraganian RP. Food allergens and basophil histamine release in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 54: 388-395.

Wray D, Graykowski EA, Notkins AL. Role of mucosal injury in initiating recurrent aphthous stomatitis. *Br Med J* 1981; 283: 1569-1570.

Wright A, Ryan FP, Willingham SE, Holt S, Page A, Hindle MO, et al. Food allergy or intolerance in severe recurrent aphthous ulceration of the mouth. *Br Med J* 1986; 292: 1237-1238.

Yel L, Tezcan I, Hasturk H, Ersoy F, Sanal O, Yavuzylimaz E. Oral findings, treatment and follow-up of case with major aphthous stomatitis (Sutton's disease). *J Clin Pediatr Dent* 1994; 19: 49-53.