

# Presencia de citosinas en estomatitis aftosa recurrente

## *Recurrent Aphthous Stomatitis and Cytokines Presentation*

Magda Alexandra Miret, Marco Tulio Mérida, José Corado, Sandra Vivas, Rubén Toro, Concetta D'Alessandro, Carlos Escalona

Universidad de Carabobo. Servicio de Dermatología. Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera". Valencia. Venezuela.

### Correspondencia:

Marco Tulio Mérida  
Apartado de Correo n° 1766  
Valencia. Carabobo. Venezuela  
Tel.: (+58) 24 1842 3634  
e-mail: mmerida@postgrado.uc.edu.ve

### Resumen

La Estomatitis Aftosa Recurrente (EAR) es una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por la presencia de ulceraciones recurrentes y dolorosas de la mucosa bucal.

**Objetivo:** Determinar el posible rol del TGF- $\beta$ , IL-1, ICAM-1 y las poblaciones linfocitarias (CD4, CD8, CD45RO) e histiocitarias CD68 en la inmunopatogénesis de la EAR.

**Materiales y Métodos:** Se estudiaron 12 pacientes con EAR y 15 controles, procedentes de la consulta externa del Servicio de Dermatología de la Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera", Valencia, Venezuela y de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo. El promedio de edad fue 52,5 años y una relación sexo masculino/femenino de 1:1. Como criterio de exclusión se descartó la infección por Herpes Simple, glositis migratoria, liquen ruber plano y colagenopatías. Se realizó citología de las lesiones, se tomaron muestra de saliva para medir ICAM-1 por ELISA y de suero donde se establecieron los niveles de IL-1. La determinación en especímenes de mucosa oral de pacientes con EAR y grupo control de la expresión de TGF- $\beta$ , CD4, CD8, CD45RO, CD68 a través de técnicas de Inmunohistoquímica.

**Resultados:** Los niveles de ICAM-1 estuvieron significativamente elevados en saliva de pacientes con EAR; la expresión de TGF- $\beta$  en mucosa de EAR fue mayor (2 a 3 cruces) que en el grupo control (1 cruz), el conteo de linfocitos T CD4/CD8 mostró un predominio de linfocitos T CD8 (1670+/-136) en comparación con CD4 (1568+/-190) en pacientes con EAR, las poblaciones de histiocitos CD68 se expresaron elevadas (2 a 3 cruces) en pacientes con EAR, los niveles séricos de IL-1 $\alpha$  presentaron una media de 149,63 pg/ml en comparación con el grupo control de 58,15 pg/ml.

**Conclusiones:** Los mecanismos en la patogénesis de la EAR implica diferentes caminos que probablemente incluyen al ICAM-1, IL-1, TGF $\alpha$  y linfocitos T, se deberán realizar futuras investigaciones para ayudar a dilucidar dicha patogénesis.

(Miret MA, Mérida MT, Corado J, Vivas S, Toro R, D'Alessandro C, Escalona C. Presencia de citosinas en estomatitis aftosa recurrente. Med Cutan Iber Lat Am 2004; 32(4): 151-156)

**Palabras clave:** estomatitis aftosa recurrente, citoquinas.

### Summary

*Recurrent Aphthous Stomatitis (SRA) is an inflammatory chronic disease, characterized by the presence of recurrent and painful ulcerations in the oral mucous.*

**Objective:** To determine the possible role of the TGF- $\beta$ , IL-1, ICAM-1 and T cells population (CD4, CD8, CD45RO) and histiocitic CD68 in the immunopathogenesis of the SRA.

**Material and Methods:** Twelve patients with the SRA diagnosis and 15 patients without SRA as controls material, were enrolled into the study, all patients were from the Dermatological out patients service at the Hospital Central de Valencia and Facultad de Odontología from Universidad de Carabobo, Valencia-Venezuela. Age rate was 52.5 years, and the relation gender was 1:1. It was excluded all patients with the diagnosis as Herpes type1 or 2, migratory glossitis, lichen rubber planus and any type of collagen disease. Cytological study from salivary smears, ICAM-1 in saliva (ELISA) and IL-1 by seric levels was showed. Immunohistochemical study was made for TGF- $\beta$ , CD4, CD3, CD45RO, CD68 expression.

**Results:** ICAM-1 levels were high in SRA patient, TGF- $\beta$  was more in SRA (++/+++) patients than no SRA patients (+). T cells CD8 population were more common than T cells CD4 (1568/-190) in SRA patients, histiocitic poblation CD68 was high (++/+++) and IL-1 $\alpha$  medium was 149.63 pg/ml.

**Conclusion:** The immunological amplication in the SRA showed as ICAM-1, IL-1, TGF- $\beta$  and T cells population is the way to get more information about the pathogenesis and systemic implications of SRA, we suggest to all investigators this way in order to understand the pathogenesis of this disease.

**Key words:** recurrent aphthous stomatitis, cytokines.

La Estomatitis Aftosa Recurrente (EAR) es un cuadro inflamatorio de la mucosa bucal, caracterizado por la presencia de un infiltrado inflamatorio de células T, el cual refleja la importancia de la producción local y efecto sistémico de citosinas (IL-1, IL-4, IL-6 y TGF- $\beta$ )[1]. Las citosinas poseen propiedades biológicas principalmente en los procesos inflamatorios, infecciosos y en la enfermedad autoinmune. Los efectos locales de algunas citosinas involucran la proliferación de las células fagocíticas esenciales para la eliminación de microorganismos[2]. Hay evidencia que varios factores se implican en la patogénesis de EAR. Muchos estudios han descrito la expresión de citosinas en EAR pero hay menos investigaciones en relación al papel de TGF- $\beta$ [3]. El TGF- $\beta$  es una citosina multifuncional que induce la actividad celular en los tejidos, la regulación de desarrollo temprano, diferenciación, formación de la matriz extracelular, hematopoyesis, angiogénesis, quimiotaxis, función inmune e inducción de apoptosis. Además induce la configuración del tejido y la morfogénesis[4]. En una herida se localizan células apoptóticas curativas, principalmente en el tejido de granulación del borde epitelial. Los queratinocitos secretan las citoquinas y las proteínas de la matriz extracelular, que modulan la proliferación, migración y diferenciación durante la curación de una herida de piel. Las citosinas y el TGF- $\beta$  están involucradas en la renovación del tejido lesionado[5]. En estudio previo, se demostró asociación entre ICAM-1 y EAR encontrándose los niveles de ICAM-1 elevados en fases agudas y de remisión[6]. En el presente estudio se investigó la probable relación entre poblaciones linfocíticas T, citosinas (IL-1, TGF- $\beta$ ) y moléculas de adhesión (ICAM-1) en pacientes con enfermedad aftosa recurrente.

## Objetivo

El objetivo de esta investigación fue determinar el posible rol del TGF- $\beta$ , IL-1, ICAM-1 y las poblaciones linfocitarias (CD4, CD8 y CD45RO) e histiocitaria CD68 en la inmunopatogénesis de la EAR.

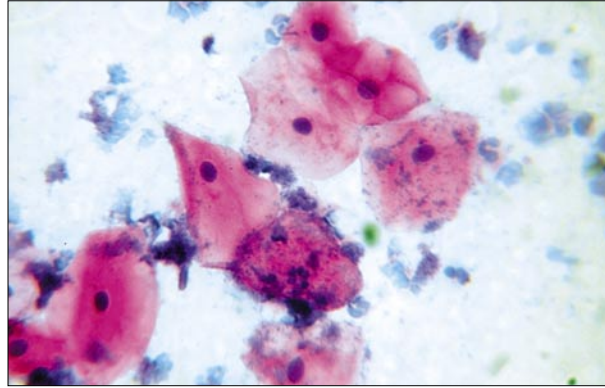
## Material y métodos

Previo consentimiento y siguiendo las normas éticas, se estudiaron 12 pacientes y sus respectivos controles. Los pacientes se seleccionaron de la consulta Externa de Dermatología de la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera y de la consulta de Patología Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. El promedio de edad fue de 52,5 años, con una relación 1,1 sexo masculino: femenino. El grupo control estuvo conformado por 15 personas, con promedio de edad de 54,8 y una relación por sexo similar al grupo con EAR; sin lesiones bucales erosivas o ulcerativas, a los cuales se les había extirpado

lesiones tumorales benignas (fibromas duros de la mucosa yugal) tomándose los bordes libres de lesión. Como criterio de exclusión se descarto enfermedad por Virus Herpes Simple, glositis migratoria, liquen ruber plano y colagenopatías. Para descartar infección por Virus Herpes (VHS) I y II se realizó raspado de lesiones bucales y citología por técnica de Papanicolau, así como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) específica para VHS I y II. Se obtuvo muestras de saliva por estimulación mecánica en ayunas durante la fase activa de la enfermedad, para la determinación por método inmunoenzimático (ELISA), en el cual se usaron enzimas que se acoplan a anticuerpos específicos u otras proteínas, para generar una reacción colorimétrica cuantificable por espectrofotometría. Se empleó kits para ICAM-1 R&D System's. Se obtuvo muestra de suero por punción venosa para determinar IL-1 mediante ELISA, empleando el Kits para IL-1 $\alpha$  R&D. A cada paciente se le tomó biopsia de las lesiones de EAR con punch de 3 mm y los especímenes fueron fijados en formol a pH neutro al 10%, se realizaron cortes de 3 micras de espesor y coloreadas con hematoxilina-eosina para diagnóstico histopatológico de EAR. Cortes de espesor similar se destinaron para inmunohistoquímica. Los especímenes control se obtuvieron de material provenientes de bordes quirúrgicos de lesiones benignas de patología bucal. Se aplicó la técnica de inmunoperoxidasa Avidina-Biotina. Los anticuerpos monoclonales de origen murino Laboratorios DACKO a dilución 1:100, para la identificación linfocitaria, fueron CD4, CD8, CD45RO y para histiocitos y macrófagos CD68. El anticuerpo policlonal de origen bovino para determinación de TGF- $\beta$  fue obtenido del R & D System's en dilución 1:100. Los especímenes de mucosa bucal, de 4 micras, fueron desparafinados y rehidratados con Tapon Salino-Fosfato modificado (PBS), e incubados por 30 minutos en 0,3% de peróxido de hidrógeno y en metanol por 120 minutos, a temperatura ambiente, para contrarrestar la peroxidasa endógena. Posteriormente, fueron incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos. La incubación se realizó con cámara húmeda y lavado con P. B. S. La peroxidasa fue revelada con 90  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 3-aminoetil-carbazol disuelto en 50mm de N-N dimetilformamida en 0,1 M de Acetato pH 5,2, por 5 minutos en sustrato Vector® NovaRed™. Los especímenes fueron nuevamente lavados y teñidos con tinción de hematoxilina de Harris. Se procedió a la cuantificación linfocitaria separada, con un microscopio óptico Olympus CH-2 para la determinación del número de células/mm<sup>2</sup>, tanto en epitelio como en corion papilar y profundo. Todos los campos histológicos fueron cuantificados con una amplificación de 400X. Se contaron 10 campos por especímenes y se aplicó la fórmula: C/X=X/D, siendo X el número de célula/mm<sup>2</sup> y D un factor constante para 400X=0,0096. La medición de la inmunotinción estuvo basada en



**Figura 1.** Estomatitis aftosa recurrente. Lesión ulcerada en cara dorsal de lengua.



**Figura 2.** Citologías de EAR. Papanicolau, determinación de células superficiales epiteliales (X 400).

una evaluación semicuantitativa, la cual no incluyó intensidad. Se aplicó una escala del 0 al 3 y las muestras fueron divididas en 4 grupos, de acuerdo a los valores de inmunopositividad: 0:<10%, 1: 10-25%, 2: 26-50% y 3:>50%. La expresión de inmunopositividad se consideró contributorio, cuando hubo inmunoreacción en 10% de las células. Se aplicó el análisis de varianza. El objeto de dicha prueba fue el de establecer la variabilidad de valores característicos diferenciales entre los dos grupos de estudios, que permitiese la aceptación o rechazo de las hipótesis planteada.

## Resultados

Se estudiaron un total de 27 muestras, de los cuales 12 presentaban EAR y sus respectivos controles, en la Figura 1 se evidencia una lesión ulcerada en cara dorsal de lengua. En la Tabla 1 se muestra la determinación de TGF- $\beta$ , CD4, CD8, CD45RO y CD68 por inmunohistoquímica en EAR y grupo control, el promedio de edad en EAR fue de 52,5 años. La intensidad promedio del patrón de expresión tisular (mucosa bucal) de TGF- $\beta$  se demostró tanto en los pacientes con EAR como en los individuos sanos en 100%. Se evidencia que los pacientes con EAR expresan la citosina (TGF- $\beta$ ) en una intensidad moderada (2 a 3 cruces) en comparación a los individuos sanos quienes expresan el TGF- $\beta$  de manera débil (1 cruz). Ausencia de marcador linfocitario CD45RO tanto en pacientes con EAR como en el grupo control. En relación a la población de linfocitos T CD4/CD8 hay un predominio de CD4 en pacientes con EAR (2 a 3 cruces promedio) y en el grupo control la relación CD4/CD8 presenta poca variación. En cuanto a la población de histiocitos CD68 se observó que predomina en los pacientes con EAR (2 cruces) en comparación con el grupo control prácticamente ausente.

**Tabla 1.** Determinación de TGF- $\beta$  CD4, CD8, CD45RO Y CD68 por inmunohistoquímica en EAR y grupo control.

Paciente	Edad	Sexo	TGF- $\beta$	CD4	CD8	CD45RO	CD68
1	72	M	+++	+++	++	-	+++
2	56	F	++	+++	++	-	+++
3	31	M	+++	+++	++	-	++
4	42	M	+++	++	+++	-	++
5	60	F	++	+++	-	-	++
6	55	M	+++	+++	+	-	++
7	67	F	++	++	++	-	++
8	63	F	++	++	+	-	++
9	61	M	++	+++	-	-	+
10	48	F	+++	++	++	-	++
11	39	M	++	++	-	-	+++
12	36	F	+++	+	-	-	+

Control	Edad	Sexo	TGF- $\beta$	CD4	CD8	CD45RO	CD68
1	66	F	+	+++	+++	-	+
2	57	M	+	+++	+++	-	+
3	40	M	+	+++	+++	-	-
4	61	F	++	+	++	-	+
5	57	F	+	+	+	-	-
6	52	F	++	+++	++	-	+
7	58	M	++	+++	++	-	+
8	42	M	++	+++	++	-	-
9	63	F	+	+	+	-	-
10	58	F	++	++	++	-	-
11	59	F	++	++	+	-	-
12	62	F	+	+	++	-	-
13	33	M	+	+	++	-	-
14	48	M	+	+	++	-	-
15	66	F	+	+	++	-	-

En la Tabla 2 se evidencia el contejo de CD4, CD8, CD45RO y CD68 en EAR y grupo control, apreciando en los pacientes con EAR una población predominante de CD8 calculada en 1670+/-136 y CD4 de 1568+/-190, mientras que en el grupo control se reportó poca variación entre las poblaciones con un contejo de CD8 de 1495+/-176 y CD4 de 1475+/-184. El análisis del CD45RO reportó un contejo de 75+/-4 en EAR y 60+/-5 en grupo control y para CD68 de 475+/-60 en EAR y 380+/-25 en grupo control, lo cual muestra un predominio de ambos (CD45RO y CD68) en los pacientes con EAR.

**Tabla 2.** Contaje de CD4, CD8, CD45RO y CD68 en EAR y grupo control

Paciente con EAR		Grupo control	
Anticuerpo	Contaje	Anticuerpo	Contaje
CD4	1568+/-190	CD4	1475+/- 184
CD8	1670+/-136	CD8	1495+/-176
CD45RO	75+/-4	CD45RO	60+/-5
CD68	475+/-60	CD68	380+/-25

En la Tabla 3 se presentan los valores promedios (medias aritméticas y desviaciones estandar) de ICAM-1 de los pacientes con EAR en fase aguda y de remisión así como los valores del grupo control. Se encontraron niveles promedio de ICAM-1 durante la fase aguda de 3,63 ng/ml, durante la fase de remisión de 2,33 ng/ml, con medidas de dispersión de 4,05 y 1,34 ng/ml respectivamente y de 1,20 ng/ml para el grupo control.

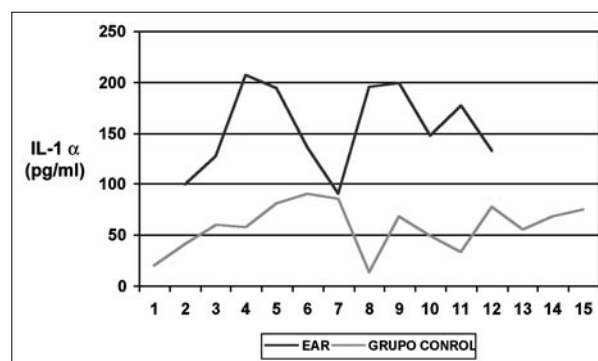
**Tabla 3.** Determinación ICAM-1 en saliva de pacientes con estomatitis aftosa recurrente y grupo control

Muestra	Niveles de ICAM -1 (ng/ml)		
	X	DS	P
<b>Fase aguda</b>	3. 63	4. 05	< 0. 05
<b>Fase de remisión</b>	2. 33	1. 34	< 0. 05
<b>Ambos</b>	2. 98	3. 04	< 0. 01
<b>Control</b>	1. 28	1. 20	

En la Tabla 4 se muestran los niveles de IL-1 $\alpha$  séricos en EAR y grupo control, presentándose una media de 149,63 pg/ml para los pacientes con EAR en comparación con el grupo control con una media de 58,15 pg/ml. En el Gráfico 1 se evidencian los valores de IL-1 $\alpha$  para cada caso estudiado, observándose niveles elevados en EAR.

**Tabla 4.** Determinación de IL-1 $\alpha$  sérica en pacientes con EAR y en un grupo control.

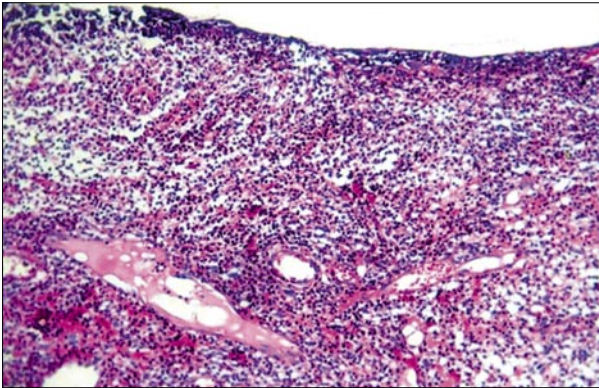
Caso	IL-1 $\alpha$ (pg/ml) pacientes con EAR	IL-1 $\alpha$ (pg/ml) en grupo control
1	76,08	20,15
2	99,36	40,74
3	127,86	60,12
4	206,38	57,13
5	193,77	80,41
6	136,04	90,18
7	89,43	85,14
8	194,99	12,36
9	198,03	67,48
10	147,63	49,58
11	176,36	33,12
12	132,58	77,00
13		55,36
14		68,21
15		75,14



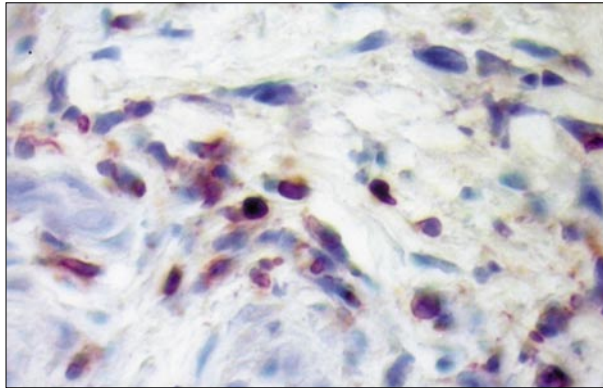
**Gráfico 1.** Determinación de IL- $\alpha$  sérica en pacientes con EAR y grupo control.

## Comentario

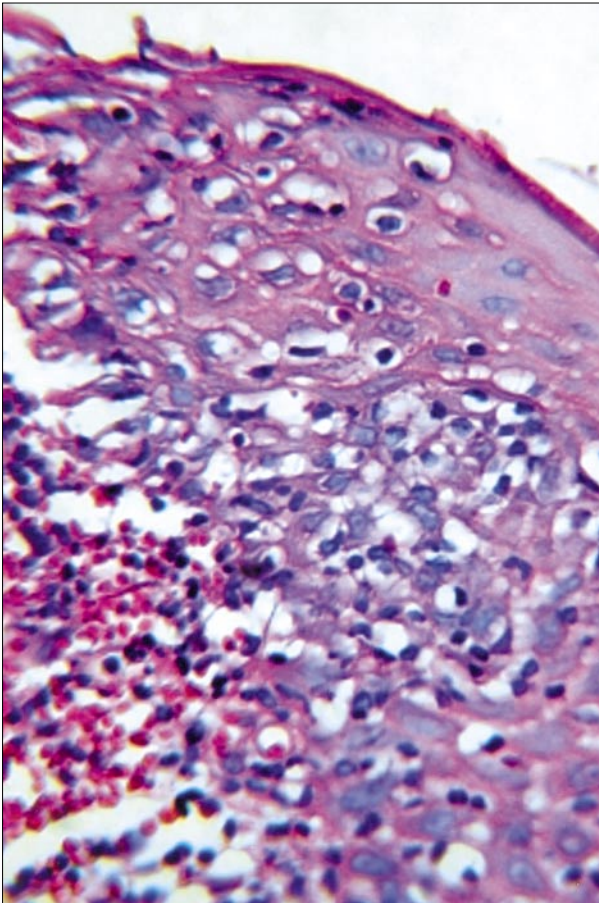
La Estomatitis Aftosa Recurrente (EAR) es una enfermedad inflamatoria de la mucosa bucal de etiología desconocida. Múltiples trabajos han intentado esclarecer él o los agentes causales así como los mecanismos involucrados en su patogénesis. Trabajos recientes sugieren que la EAR es probablemente una enfermedad de naturaleza inmunitaria, donde se encuentra un predominio de células de respuesta tipo TH1, las cuales producen citosinas como IL-1, IL-2, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )[7].



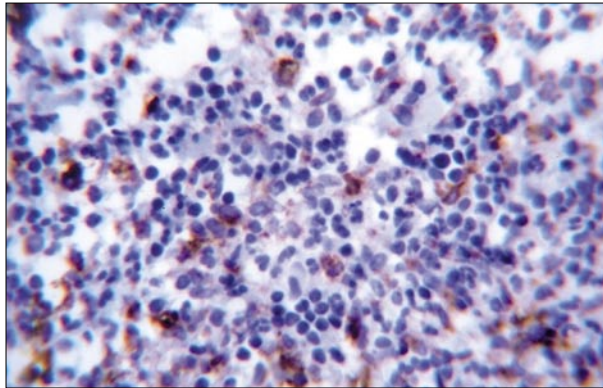
**Figura 3.** Biopsia de mucosa bucal con ausencia de epitelio, infiltrado inflamatorio difuso. Coloración de hematoxilina de Harris (X 100).



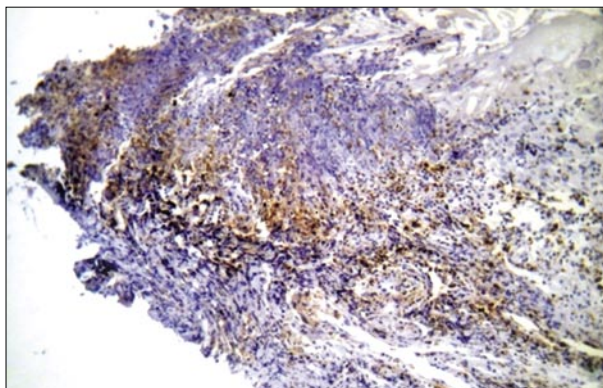
**Figura 5.** Microfotografía, demostración de CD8 en sección impregnada en parafina. Coloración de contraste hematoxilina de Harris (X 400).



**Figura 4.** Microfotografía, borde de ulcera que muestra infiltrado perivascular y exocitosis. Coloración de hematoxilina de Harris (X 400).



**Figura 6.** Microfotografía, demostración de CD68 en sección de mucosa yugal impregnada en parafina. Tejido con contraste hematoxilina de Harris (X 400).



**Figura 7.** Microfotografía, demostración de citosina TGF- $\beta$  en sección de mucosa bucal. Inmunohistoquímica que demuestra reacción en las capas superficiales de queratinocitos epiteliales e infiltrado inflamatorio en corion papilar. Coloración con contraste hematoxilina de Harris (X 100).

En este sentido se plantea que la EAR es el resultado de la alteración en la red de citosinas en la mucosa bucal, mediada por una respuesta inmunitaria celular que actúa directamente sobre áreas localizadas en la misma[8].

La presencia del TGF- $\beta$  en las lesiones aftosas de mucosa bucal de pacientes con EAR nos permite sugerir que dicha expresión permitiría el desarrollo de un estado de inmunosupresión en el microambiente de la mucosa bucal que favorecerá el desarrollo de lesiones aftosas en estos pacientes (Ochoa, Pedrañez, Corado, 2002)[9].

Existen receptores celulares para TGF- $\beta$ -1 y una dependencia en la inhibición o en el aumento de la diferenciación celular, estímulo de la síntesis de proteínas de la matriz intercelular como colágeno y fibronectina, glucosaminoglicano, integrina y osteonectina. En condiciones de daño tisular las plaquetas y los leucocitos, liberan TGF- $\beta$  y se ha comprobado que cesa la producción de la matriz extracelular[10-12]. En el presente estudio hemos demostrado la expresión de TGF- $\beta$ , CD4, CD8, CD45RO y CD68 utilizando el método inmunohistoquímico y los niveles de ICAM-1 en saliva por método inmunoenzimático (ELISA) en EAR.

Se puede presumir que el aumento de ICAM-1 en saliva, refleja una expresión aumentada de estas moléculas sobre la superficie de las células endoteliales, a nivel de la mucosa bucal. No se pueden afirmar las probables causas de ésta expresión aumentada, pero esto traería como consecuencia un reclutamiento de células inmunológicamente competentes, fundamentalmente linfocitos que expresen integrinas como la molécula asociada con la función linfocítica-1 (LFA-1) lo cual plantea su adhesión en número mayor, así como la unión de los neutrófilos a la superficie del endotelio, su

diapedesis a través de las células endoteliales, su activación, así como la activación de la cascada de adhesión[13], culminando con fenómenos de hipersensibilidad que se expresan a través de las úlceras recurrentes. Para tratar de comprobar esta hiperactividad inmune local se han cuantificado otras citosinas tales como IL-1, IL-2, IL-3 y FNT- $\alpha$ . La IL-1 $\alpha$  y  $\beta$  coestimulan la activación de linfocitos T al aumentar la producción de citocinas, entre las que se incluyen IL-2 y su receptor, aumenta la proliferación y maduración de células B, citotoxicidad por natural killer (NK), efecto proinflamatorio al inducir quimiocinas e ICAM-1 y VCAM-1 en el endotelio[14]. En nuestro estudio los pacientes con EAR reflejaron concentraciones de IL-1 $\alpha$  francamente elevadas, lo cual apoya el planteamiento de inmunidad celular que media inflamación local, activación linfocitaria y efectos hematopoyéticos.

Se reporta una disminución de la relación CD4/CD8 en estos pacientes, que persisten durante el período de remisión. Esto sugiere un aumento de la actividad de los linfocitos CD8 (célula T citotóxica), protagonista de la respuesta celular citotóxica. Se puede plantear que estos linfocitos con niveles elevados han sido reclutados por una expresión aumentada de ICAM-1[15].

En nuestra investigación se demostró que el infiltrado de células T es ligeramente superior en EAR en comparación con el grupo control y a su vez la presencia de un número elevado de CD68+ macrófago en EAR.

En conclusión en el mecanismo de la patogénesis de la EAR probablemente se implican varios caminos que integran al ICAM-1, IL-1, TGF- $\beta$  y linfocitos T. Futuras investigaciones deberán realizarse para ayudar a dilucidar las interrogantes.

## Bibliografía

1. Yamamoto M, Maehara Y, Sakaguchi Y, Kusumoto T, et al. Serum citokines, receptor interleukin-2 and soluble intercellular adhesion molecular-1 in oral disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 78: 727-35.
2. Dinarello C. Anti-cytokines strategies. *Eur Cytokine Netw* 1992; 3: 7-17.
3. Olaso R, Pairault C, Saez JM, Habert R. Transforming growth factor b 3 in the fetal and neonatal rat testis: immunolocalization and effect on fetal Leydig cell function. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 247-54.
4. Schuster and Kriegelstein K. Mechanisms of TGF b mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2001; 307: 1-14.
5. Tamariz DE, Castro MF, Kuri HW. Growth factors and extra cellular matrix proteins during wound healing promoted with frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes. *Cell Tissue Res* 2002; 307:79-89.
6. Miret A, Chacon de Petrola P, Flores ME, Mérida MT, et al. Determinación de los niveles de ICAM-1 e IgE secretora en saliva de pacientes con diagnóstico de estomatitis aftosa recurrente. *Salus* 1998; 2: 10-8.
7. Jiménez SY, Bagán SJ, Milián M. Minor recurrent aphthous stomatitis. Clinic characteristics hematologic deficiencies in 60 patients. *J Oral Med* 1996; 1: 11-4.
8. Buno IJ. 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: 827-31.
9. Gold I. The role for transforming growth factor beta (TGF b) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 1999; 10: 303-60.
10. Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor  $\beta$ . *Handbk Exp Pharm* 1990; 95: 419-58.
11. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK. Transforming growth factor type  $\beta$  rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 4167-71.
12. Ijnotz RA, Endo T, Massagué L. Regulation of fibronectin and type 1 collagen mRNA levels by transforming growth factor  $\beta$ . *J Biol Chem* 1987; 262: 6443-6.
13. Hogg N, et al. Structure and function of adhesion receptors in leukocytes transsicking. *Immunology Today* 1995: 327-9.
14. Roitt. *Inmunología fundamentos*. 10ª edición. Madrid-España. Editorial Médica Panamericana S.A. 2003.
15. Eversole L. Immunopatología of oral mucosal ulcerative, desquamative and bullous disease. *Oral Surgery . Oral Medicine and Oral Patology* 1994; 77: 565-71.