



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“ESTUDIO HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E
INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA MUCOSA LINGUAL
HUMANA”**

TESISTA:

OD. NELSON J.L. RUGANI

DIRECTOR:

PROF. DRA. MARÍA ELENA SAMAR

CÓRDOBA, 2009



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS



**ESTUDIO HISTOLÓGICO,
HISTOQUÍMICO E
INMUNOHISTOQUÍMICO
DE LA MUCOSA
LINGUAL HUMANA**

Córdoba, Marzo de 2009



*Trabajo de Tesis
para optar al Título de
DOCTOR EN ODONTOLOGÍA*

Doctorando:
Od. Nelson L.J. RUGANI

Directora de Tesis:
Prof. Dra. María Elena SAMAR



Asesor de Tesis:

Dr. Eduardo GASPARRINI

Comisión de Tesis:

Prof. Dra. Sofía P. de FABRO

Prof. Dra. Silvia LÓPEZ de BLANC

Prof. Dra. Rosita LUCERO



DEDICATORIAS

- ✦ *A mi amada madre, Rosa, fuente de luz divina y manantial de amor infinito.*
- ✦ *A mi padre, Livio, ejemplo de perseverancia y rectitud, tesorero incansable.*
- ✦ *A mis hijos, Christian, Fernanda y Federico, inspiración y motivo de mi vida.*
- ✦ *A mi hermana Marta Leonor, rectora y tutora permanente.*
- ✦ *A mi hermana María Luisa, maestra aplicada de mi infancia.*
- ✦ *A mi novia Andy, por brindarme su amor, su constante dedicación y colaboración.*
- ✦ *A mis amigos de la vida, Carlos, Aldo y Claudio, por compartir ilusiones y proyectos.*
- ✦ *A mis amigos de la Universidad, Mariano, Cristian y Miguel, por su incondicional y sincera amistad.*



AGRADECIMIENTO ESPECIAL

- ✦ *Al Prof. Consulto Dr. Nazario Kuyumlián, maestro, amigo, forjador y fogonero incansable de esta instancia.*
- ✦ *A mi directora, Prof. Dra. María Elena Samar, por su tiempo, dedicación e inquebrantable entrega.*

*Educar a los hombres no es como llenar un vaso,
es como encender un fuego.
Aristóteles*



AGRADECIMIENTOS

- ✦ *Al Sagrado Corazón de Jesús, fuente de inspiración, que nos guía en el camino de la perfección de vida.*
- ✦ *A la Comisión de Tesis, por sus constantes e invaluables sugerencias.*
- ✦ *A la señora Decana, Prof. Dra. Carmen Visvisián, a la señora Vicedecana, Prof. Dra. María Elsa G. de Ferraris y demás autoridades, por su permanente apoyo.*

Al Prof. Emérito Dr. Jorge Uribe Echevarría, quien aportó su entusiasmo y experiencia en la obtención de las imágenes con microscopía láser confocal.

- ✦ *Al Prof. Dr. Luis Santos Spitale, quien enriqueció nuestra investigación con su desinteresada colaboración.*
- ✦ *Al Dr. Eduardo Gasparrini, por su experimentado aporte en el área de la Odontología Forense.*
- ✦ *A la Prof. Dra. Mabel Brunotto por su invaluable aporte en el estudio estadístico.*
- ✦ *A la Prof. Dra. María del Carmen Urquía Morales por su voto de confianza y permanente compromiso en el proyecto.*
- ✦ *A la Prof. Dra. Violeta Ceballos y el personal docente de la Cátedra de Prostodoncia V "B", por su apoyo incondicional.*



AGRADECIMIENTOS

- ✦ *Al Méd. Daniel Robles y Od. Gabriel Fonseca, por su colaboración en la obtención de las muestras.*
- ✦ *A la primera persona que conocí al ingresar a la Facultad, Ricardo Reyna, que hoy me brindó sus conocimientos y apoyo humano.*
- ✦ *Al Sr. Mario Basualdo, a la Cdra. Sofía Gendelman, a la Sra. Norma Insaurrealde, a la Sra. Liliana Dajruch y al Sr. Miguel Arach, por su inquebrantable compañerismo.*
- ✦ *A todo el Personal No Docente de la Facultad, por su aporte al engrandecimiento de la Facultad.*
- ✦ *A todos aquellos que me ayudaron para que pudiera materializar éste trabajo.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	18
➤ Objetivos Generales	18
➤ Objetivos Específicos	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
RESULTADOS	26
➤ Estudio estructural e histoquímico convencional	26
➤ Inmunomarcación del epitelio lingual con citoqueratinas	63
➤ Estudio morfométrico	75
➤ Creación de una base de datos con las imágenes de preparaciones histológicas de mucosa lingual	77
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIONES	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
RESUMEN	97
SUMMARY	98

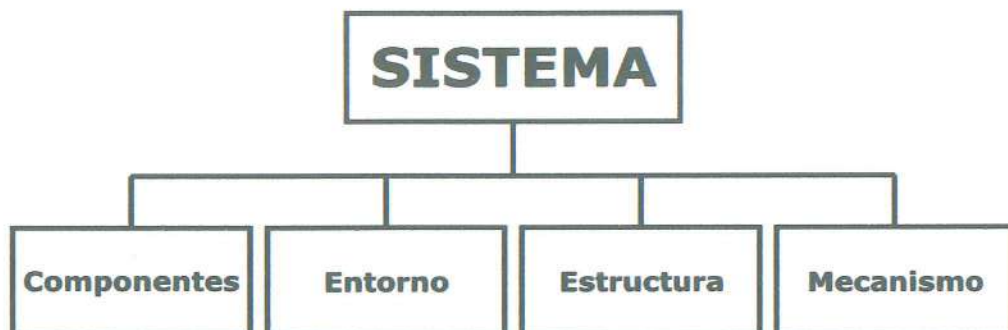
INTRODUCCIÓN

Un sistema se define como un objeto compuesto, cuyas partes o porciones se encuentran integradas entre sí tanto estructural como funcionalmente siendo su principal particularidad presentar propiedades que no poseen las partes que lo componen (Beszkin et al, 2005).

En el terreno odontológico, un ejemplo típico lo constituye el sistema estomatognático, sistema sumamente complejo que funciona por interacción de sus componentes, los que de manera aislada no funcionan por sí mismos.

Como bien lo mencionan Beszkin et al (2005), "un diente no masticaría si no estuviera soportado en la mandíbula, movido por la musculatura que, a su vez, responde a las órdenes del sistema nervioso central".

Según Mario Bunge (2002) un sistema está compuesto de la siguiente manera:



Proyectándonos al sistema estomatognático reconocemos:

- ✚ **Componentes:** dientes, periodoncio de inserción y de protección, articulación témporomandibular, huesos, músculos, ligamentos, glándulas salivales, anillo linfático de Waldeyer, mucosa bucal.
- ✚ **Entorno:** cráneo, cuello, tipo de alimentación, vida emocional, etc.
- ✚ **Estructura:** conjunto de relaciones entre sus componentes y entre éstos y su entorno. Por ejemplo, los huesos dando soporte.
- ✚ **Mecanismo:** Proceso que hace que el sistema funcione: los procesos de deglución, masticación, defensa, etc.

La mucosa bucal, componente del sistema estomatognático, es una membrana húmeda que recubre la cavidad bucal y que cumple funciones masticatorias, protectoras y sensoriales (Presland y Jurevic, 2002; Samar et al, 2008). Constituye una barrera primaria entre el medio bucal y los tejidos subyacentes, protegiéndolos de injurias mecánicas y del ingreso de materiales tóxicos y microorganismos que pueden encontrarse en la orofaringe.

Estructuralmente se reconocen en la mucosa bucal dos componentes principales:

- ✚ **Epitelio:** de origen ectodérmico, de tipo plano o pavimentoso estratificado, altamente especializado, al igual que la epidermis de la piel, que le permite formar y mantener una verdadera barrera crítica gracias a una constante reparación y renovación como parte del recambio fisiológico normal. (Presland y Jurevic, 2002; Anurhada A, y Sivapathasundharam B, 2007).

-
- ✚ **Corion o lámina propia:** originado a partir del ectomesénquima cefálico; laxo, denso o semidenso y de variable espesor de acuerdo a la zona de la mucosa bucal, aporta el soporte mecánico y los nutrientes para el epitelio.

Entre ambos, la **unión epitelio-conectivo** (membrana basal) se presenta como una interfase ondulante o festoneada determinada por las crestas epiteliales por un lado y las papilas coriales por otro. Se la puede identificar con nitidez a nivel de microscopía fotónica con técnicas histoquímicas de rutina como el PAS, ya que en la misma se concentran glicoproteínas, además de otras macromoléculas. Existen diferencias ultraestructurales en la membrana basal según la región de la mucosa bucal de que se trate, en asociación directa con demandas funcionales tisulares.

Por otro lado, es bien conocido que la mucosa bucal humana presenta marcadas diferencias estructurales y clínicas ocasionadas por la influencia mecánica que actúa sobre ella en distintas regiones de la cavidad bucal que hacen que la misma sufra adaptaciones funcionales (Ten Cate, 1986).

Examinada con métodos histológicos de rutina la mucosa que reviste la cavidad bucal se diferencia claramente en (Winning et al, 2000, Samar et al, 2008, Samar y Ávila, 2007):

- ✚ **MUCOSA DE REVESTIMIENTO:** Localizada en la cara ventral de la lengua, mejillas, labios y paladar blando, cumple funciones de protección. Presenta un epitelio plano estratificado no queratinizado grueso. Se caracteriza por los movimientos y distensión de los tejidos, ya que requiere de flexibilidad para acomodarse para hablar, masticar o deglutir
-

el bolo alimenticio. El tejido conectivo subyacente es más elástico y flexible que el de la mucosa masticatoria.

✚ **MUCOSA ESPECIALIZADA:** Es la mucosa que recubre la cara dorsal y superficies laterales del cuerpo de la lengua (Jung et al, 2004), donde se pueden identificar las papilas linguales y los corpúsculos gustativos, receptores de los estímulos gustativos. Su epitelio es una especie de mosaico donde se reconocen zonas de tipo plano estratificado queratinizado, paraqueratinizado y no queratinizado. En la raíz, la mucosa es de naturaleza no queratinizada. El epitelio lingual se encuentra firmemente adherido al músculo esquelético del órgano.

✚ **MUCOSA MASTICATORIA:** Adaptada para soportar el impacto masticatorio, se la encuentra en encía y paladar duro, que son zonas expuestas a roces. Está recubierta por epitelio plano estratificado queratinizado o paraqueratinizado, con numerosas crestas epiteliales y tejido conectivo denso. Fuertemente insertada al hueso por tejido conectivo.

Collins y Daves (1987) realizaron mediciones y calcularon que la mucosa de revestimiento representa aproximadamente un 60% de la superficie total de la mucosa bucal, la masticatoria aproximadamente un 25% y el dorso de la lengua un 15%.

El epitelio de la mucosa bucal humana está formado por una población celular intrínseca (90%), las células epiteliales (queratinocitos) y una población celular extrínseca (10%), las células claras o dendríticas (células de

Langerhans, melanocitos y células de Merkel) además de algunos glóbulos blancos que migraron intraepitelialmente.

Los queratinocitos presentan un manifiesto desarrollo de su citoesqueleto y en ellos ocurre un programa de diferenciación celular terminal muy peculiar, la queratinización, que se expresa por la aparición de un conjunto de proteínas estructurales, las citoqueratinas. Estas se ensamblan en filamentos lo que permite mantener la integridad celular y tisular y al epitelio actuar como una verdadera barrera protectora. Dos tipos de adhesiones celulares, los desmosomas y hemi-desmosomas funcionan aglutinando a los queratinocitos unos con otros y con la membrana basal, y conectan el citoesqueleto con la superficie celular. (Presland y Jurevic, 2002; Alberts et al, 2006).

Los queratinocitos del epitelio de la mucosa bucal sufren un proceso continuo de renovación celular a partir de stem cells (células madre), que pasan por sucesivas divisiones celulares (mitosis) permaneciendo en el estrato basal, o migrando superficialmente a la vez que ocurren en las mismas modificaciones estructurales y funcionales al mismo tiempo que se encargan de reemplazar a las células que se perdieron por descamación fisiológica.

En consecuencia, diferenciamos desde lo funcional en la población queratinocítica dos poblaciones celulares: progenitora (stem cells) proliferante y en maduración, postmitótica o no proliferante (Izumi et al, 2007; Köse et al, 2007).

Epitelio plano estratificado queratinizado: Los queratinocitos se disponen en cuatro estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo o queratinizado. Este último con células conocidas como corneocitos, aplanadas, anucleadas, eosinófilas, carentes de orgánoides, repletas de filamentos de citoqueratina (Figura 1).

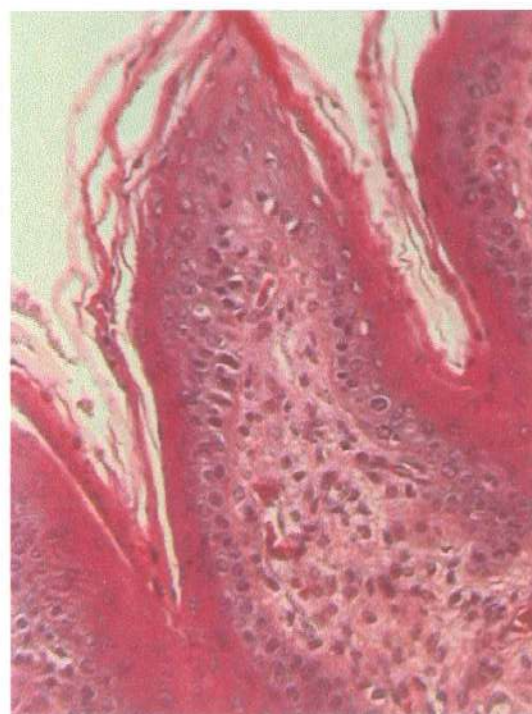


Figura 1: Lengua humana. Epitelio plano estratificado queratinizado correspondiente a una papila filiforme. H/E 200X.

Epitelio plano estratificado no queratinizado: El cambio morfológico que sufren las células es mucho menos evidente que en el epitelio queratinizado. Se reconocen los estratos basal, espinoso o intermedio, el estrato granuloso prácticamente no existe y luego se continúa el estrato

superficial. En la zona superficial las células son más grandes y escamosas, conservando tanto el núcleo como los organoides (Figura 2).

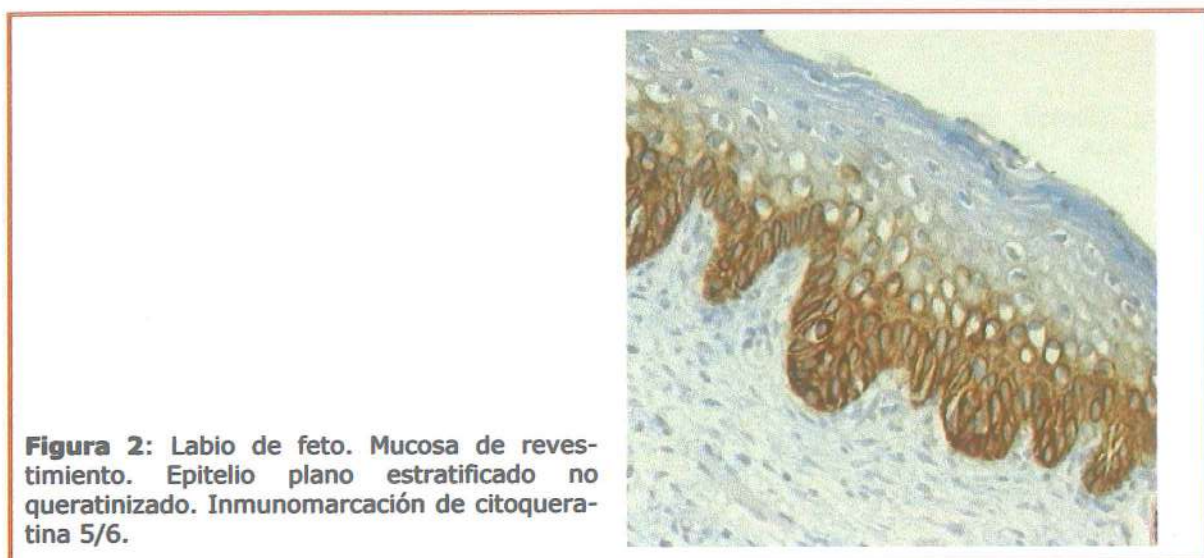


Figura 2: Labio de feto. Mucosa de revestimiento. Epitelio plano estratificado no queratinizado. Inmunomarcación de citoqueratina 5/6.

Epitelio plano estratificado paraqueratinizado: Es semejante al epitelio queratinizado excepto en el estrato córneo, donde los corneocitos presentan núcleos picnóticos (pequeños y con cromatina sumamente densa), algunos gránulos citoplasmáticos de queratohialina, abundancia de citoesqueleto (citoqueratina) y una manifiesta acidofilia citoplasmática (Figuras 3 y 4).

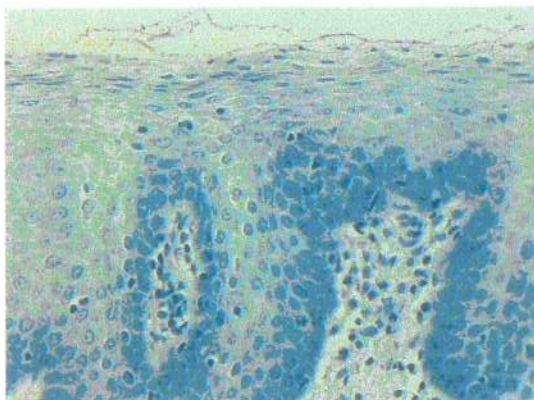


Figura 3: Paladar humano. Epitelio plano estratificado paraqueratinizado. Azul de toluidina pH 3.8 200X.

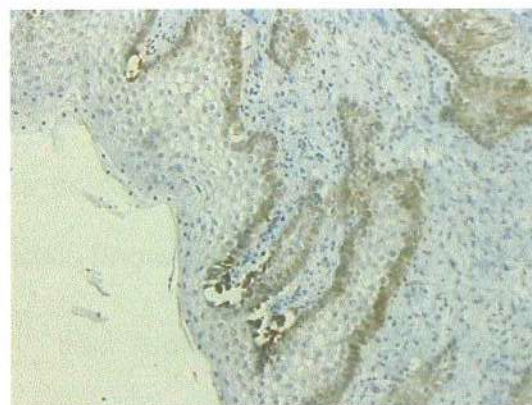


Figura 4: Paladar humano. Epitelio plano estratificado paraqueratinizado. Inmunomarcación de citoqueratina 19. 100X.

En relación a los epitelios planos estratificados queratinizados, la epidermis es la mejor investigada debido a la importante y numerosa patología que afecta a la piel, además de su fácil estudio y de la accesibilidad con que se pueden obtener queratinocitos epidérmicos para estudios *in vitro* (Presland y Dole, 2000). No sucede lo mismo con el epitelio de la mucosa lingual humana.

La lengua (L. *lingua*; G. *glossa*) actúa facilitando el movimiento de los alimentos durante la masticación y contribuyendo en la deglución. Participa también en otras importantes funciones como el habla y el gusto (du Toit,

2003). Es un órgano principalmente muscular (músculos linguales esqueléticos intrínsecos y extrínsecos) componente del sistema estomatognático que ocupa el piso de la boca. De forma ovalada irregular, cuya punta aparece inclinada hacia delante y su extremidad engrosada hacia posterior (Figún y Garino, 2006). Está revestida por una membrana mucosa, que presenta variaciones estructurales según se trate de su cara dorsal (mucosa especializada, de tonalidad rojo grisácea) o ventral (mucosa de revestimiento, delgada, lisa y brillante, de color rosa pálido), en directa relación con su función.

Se ha propuesto que, durante la adaptación de una hábitat, húmedo a seco en la evolución de los vertebrados, la estratificación y la queratinización son los cambios más importantes en el epitelio lingual (Iwasaki, 2002).

La cara dorsal está formada por dos regiones de distinto origen embriológico: el cuerpo o porción bucal de la lengua, comprende los 2/3 anteriores, y tiene una apariencia rugosa cubierta por múltiples excrecencias, las papilas linguales. En el 1/3 posterior, porción faríngea o raíz de la lengua no se observan papilas. Ambas regiones se encuentran delimitadas por una estructura en forma de V, la V lingual, cuyo vértice se orienta hacia la raíz. A lo largo de la V lingual se sitúan las papilas caliciformes o circunvaladas, grandes y planas, en número de 8 a 12, que presentan corpúsculos o botones gustativos, revestidas por epitelio plano estratificado no queratinizado (Geneser, 2000). En la región de la raíz de la lengua se localizan las amígdalas linguales, que son parte constituyente de un importante sistema de defensa, el anillo linfático de Waldeyer, perteneciente al tejido linfático asociado a mucosas (MALT). Como se mencionó anteriormente, la mucosa que reviste el

cuerpo de la lengua se encuentra recubierta de múltiples proyecciones denominadas papilas filiformes y fungiformes. Las papilas filiformes, muy finas, son las más abundantes y se disponen en hileras paralelas a la V lingual.

Bhaskar (1983) describe a las papilas filiformes como formaciones cónicas agudas, que le otorgan a la superficie dorsal del órgano lingual una apariencia aterciopelada; estando su estructura histológica constituida por un epitelio con un centro de tejido conectivo del cual sobresalen hacia el epitelio papilas secundarias. El epitelio es de tipo queratinizado y forma penachos en la zona apical de las papilas, y no presenta botones gustativos.

Según Burkitt et al (1993) las papilas filiformes se observan macroscópicamente como "púas", son las más frecuentes y están revestidas por un epitelio intensamente queratinizado. La queratina le da a la superficie dorsal su color grisáceo. Estas descripciones coinciden con las de otros autores (Junqueira y Carneiro, 1996; Stevens y Lowe, 1998; Gartner y Hiatt, 2002).

Según Gartner y Hiatt (2002) estas papilas contribuyen a raspar el alimento de una superficie.

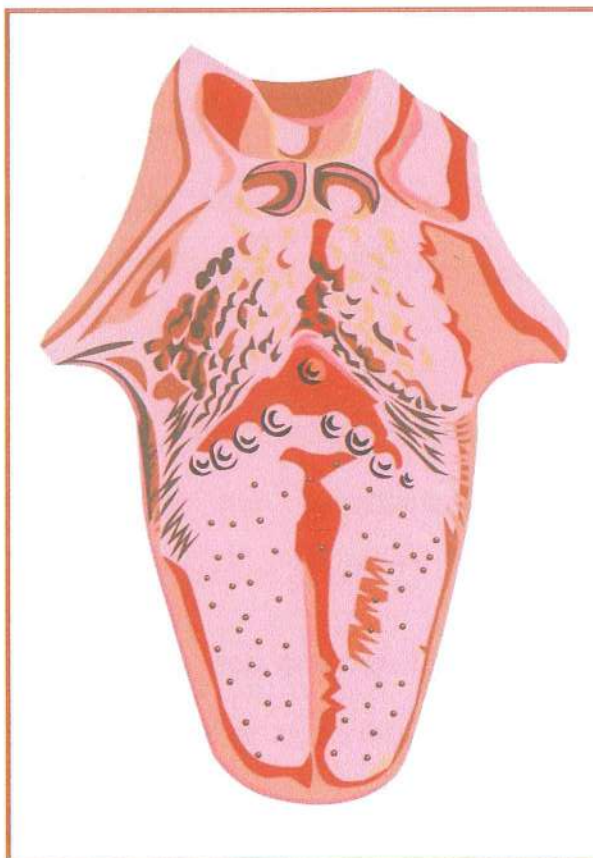
Las papilas fungiformes son menos numerosas, de mayor tamaño, más cortas y más distanciadas entre sí, y se ubican entre las filiformes, muy cerca de la punta de la lengua.

Estas papilas tienen el aspecto de un champiñón u hongo (Stevens y Lowe, 1998; Gartner y Hiatt, 2002), determinado por su estructura que

presenta un tallo más delgado, que se encuentra unido a la superficie del órgano por un ancho casquete.

Su epitelio es relativamente delgado, no queratinizado, que se relaciona con tejido conectivo con abundante vascularización (Burkitt, 1993).

Contienen corpúsculos gustativos a diferencia de las papilas filiformes. Otro tipo de papilas, las foliadas, son sumamente escasas y se las puede observar en las caras laterales del sector posterior de la lengua (Testut y Latarjet, 1958).



Por otro lado, la apariencia histológica de los epitelios estratificados difiere con su localización anatómica y se refleja en la composición bioquímica de los filamentos de queratina (CK), presentes en todos los epitelios estratificados, considerados durante mucho tiempo componentes mecánicos de las células que confieren resistencia a la deformación y la tensión mecánica ejercida localmente por diferentes fuerzas, evitando la ruptura celular y de su membrana (Rojas et al, 1998; Alberts et al, 2006; Oriolo et al, 2007).

Con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales, los filamentos intermedios del citoesqueleto, y entre ellos las CK, se han convertido en moléculas de interés en los últimos años (Berkovitz y Barret, 1998). Debido a que son altamente antigénicas, estas moléculas pueden ser fácilmente identificadas usando métodos inmunohistoquímicos y su especificidad para un tipo celular ofrece posibilidades en el campo de la patología diagnóstica. Mutaciones en 19 diferentes tipos de genes de citoqueratinas han sido identificados como la causa de al menos 15 enfermedades genéticas diferentes (Arin y Mueller, 2007).

Las CK comprenden una compleja familia multigénica de proteínas relacionadas, de las que se han caracterizado hasta el momento 20 polipéptidos diferentes (Fukumashi et al, 2002).

Las CK se clasifican en dos grandes tipos: I y II, de acuerdo a sus características bioquímicas (Rojas et al, 1998).

CITOQUERATINAS

- **TIPO I: CK 9-20**, de bajo peso molecular, punto isoelectrico ácido.
- **TIPO II: CK 1-8**, de peso molecular alto, punto isoelectrico relativamente básico.

Se pueden expresar tanto en epitelios simples (CK 7, 8, 18, 19 y 20) como estratificados (CK 1, 2, 5, 9, 11, 16).

Sus diferentes patrones de expresión se correlacionan con el grado de diferenciación de las células epiteliales inmaduras y de los tumores malignos.

Por consiguiente, las CK son marcadores histológicos útiles para identificar tipos celulares normales durante el desarrollo embrionario y la diferenciación estructural, células displásicas y neoplásicas o cambios intrínsecos por influencias ambientales como puede ser la exposición a drogas u hormonas (Morgan et al, 1986; Ramaeckers, 1994; Vaidya et al, 1998).

Se ha demostrado que durante el desarrollo embrionario se expresan progresivamente diferentes CK. El par CK 8 y 18 es el primero en expresarse durante el comienzo de la diferenciación embrionaria de las células epiteliales.

En embriones y fetos humanos, la CK 5 está presente en la epidermis. CK 1 también se expresa en las células de la capa intermedia de la epidermis en embriones de 13 semanas, período en el cual aún no se inició el proceso de queratinización. Las CK 1, 2 y 10 empiezan a marcarse cuando se produce la

estratificación de la epidermis y su positividad continúa incrementándose durante el desarrollo (Rojas et al, 1998).

No sucede lo mismo con CK 8 y 19, que se encuentran en los estadios tempranos del desarrollo de la epidermis y desaparecen al inicio de la queratinización.

La expresión de CK 5 y 15 (típicas del epitelio estratificado) precede a la estratificación del epitelio plano, y la expresión de CK 1, 2 y 10 (típicas del proceso de queratinización) precede al proceso de queratinización ortoqueratósica.

Estos hechos son indicativos de que la expresión de CK marca el comienzo de ambos procesos (estratificación y queratinización).

Para proteger contra daños físicos, químicos y microbianos, los queratinocitos de la mucosa bucal sufren una diferenciación programada bien definida, esencial para la supervivencia, que resulta en la expresión de CK, que mantienen la integridad de los epitelios y funcionan como una barrera protectora (Presland et al, 2000 a y b).

Estudios preliminares realizados por diferentes autores han demostrado por medio de técnicas electroforéticas diferencias en el patrón de expresión de CK en el epitelio bucal, relacionadas con el patrón de queratinización evaluado histológicamente (Clausen et al, 1986 a y b).

Estos investigadores describieron la similitud de las CK entre paladar duro y epidermis y las diferencias con las CK del epitelio bucal no queratinizado.

En los epitelios escamosos, el par CK 5/14 se expresa en la capa basal de las células indiferenciadas. CK 4 se puede encontrar también en células cilíndricas polarizadas de diferentes epitelios simples y de tipo pseudo-estratificado. El patrón de CK de exocervix y vagina (CK 1, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 16 y 19) es semejante a otros epitelios escamosos estratificados no queratinizados como los de esófago y lengua. La expresión de CK de peso elevado (CK 1 /2, CK 10; 3/12 y 4/13) parecen ser específicas de la diferenciación escamosa puesto que se encuentran en la epidermis, la lengua, el esófago, la córnea y el exocérnix uterino. En la cavidad oral la marcación con CK 19 está presente en las células basales de la mucosa normal, la CK 14 en las células suprabasales (Rojas et al, 1998).

Por medio de técnicas de inmunofluorescencia indirecta, Pelissier et al (1992) investigaron los cambios en la expresión de CK durante el desarrollo de la mucosa bucal humana. Para ello realizaron un estudio en fetos de 10 a 23 semanas donde demostraron que la diferencia principal es la presencia de CK 8, 18 y 19 en los tejidos embrionarios.

En esta investigación se comprobó que la mucosa de revestimiento y masticatoria estaba incompletamente diferenciada en fetos de 10 semanas de desarrollo con expresión de patrones idénticos de CK (CK 4, 5, 8, 13, 18 y 19 y, probablemente, 14, 16 y 17). CK 1, 2, 10 y 11 comienzan a evidenciarse en epitelio gingival y de paladar duro desde la semana 11 pronosticando su diferenciación (mucosa masticatoria) hacia la semana 16. Los patrones de expresión de CK en fetos de 23 semanas tanto en mucosa de revestimiento como masticatoria es algo diferente. La única diferencia en mucosa de

revestimiento desde la semana 10ª fue la disminución de las CK 8, 18 y 19 mientras que la expresión de CK en la mucosa masticatoria (CK 1, 2, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 18, 19 y posiblemente 14, 16 y 17) es ahora muy semejante a la expresión de las CK de la encía del individuo adulto.

Basándonos en: **a-** lo anteriormente relatado; **b-** la contribución de la inmunohistoquímica en el diagnóstico histológico e histopatológico y; **c-** en la búsqueda realizada en las bases de datos MedLine/PubMed, BIREME y PERIODICA (UNAM) vía Internet, que arrojó resultados prácticamente nulos en relación al estudio integral de las modificaciones estructurales, histoquímicas, inmunohistoquímicas y morfométricas de la mucosa lingual humana, y en especial en nuestro país, nos propusimos contribuir al conocimiento de los componentes estructurales del epitelio lingual dorsal y ventral desde la etapa embrionaria hasta el envejecimiento y del comportamiento biológico de las citoqueratinas presentes en el citoplasma de los queratinocitos, lo que nos permitirá obtener nuevos conocimientos sobre sus aspectos histofisiológicos y los potenciales cambios patológicos de la mucosa lingual madura y contribuir al diagnóstico histopatológico y forense.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL



- Realizar el estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de la mucosa lingual humana, en sus caras ventral y dorsal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir los cambios histológicos de la mucosa lingual humana durante su desarrollo embrionario, maduración y envejecimiento celular.
- Evaluar histológicamente por inmunomarcación de CK el epitelio lingual de individuos sanos para determinar diferencias etarias y topográficas y relacionarlas con su función.
- Realizar una comparación de los hallazgos histofisiológicos en las edades prenatales, adultos jóvenes y viejos para su aplicación en el campo de la medicina y odontología forense.
- Crear una base de datos con las imágenes obtenidas para su uso en la docencia de pre y posgrado.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL. Mucosa lingual de:

- **Embriones y fetos humanos** provenientes de abortos espontáneos y muerte fetal (partos prematuros). **N= 12**. La edad de los embriones y fetos osciló entre 10 y 32 semanas del desarrollo según longitud vértex-cóccix (Moore y Persaud, 2000).

10-13 semanas (n = 3)

14-15 semanas (n = 3)

16-19 semanas (n = 3)

20-32 semanas (n = 3)

- **Adultos jóvenes (30 a 45 años). N= 10** (2 mujeres y 8 varones).
- **Viejos. N= 10** (3 mujeres y 7 varones). Se siguió para este grupo la clasificación de Vera (1994), quien diferencia 3 subgrupos:
 1. **Viejos jóvenes, de 60 a 69 años. N= 1 hombre**
 2. **Vejez media, de 70 a 79 años. N= 1 mujer y tres hombres**
 3. **Viejos viejos (mayores de 79 años). N= 2 mujeres y tres hombres.**

El rango de edad (60-mayores de 79 años) indica características homogéneas en relación a los fenómenos biológicos de envejecimiento.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Mucosa lingual en buen estado de conservación y exenta de anomalías macroscópicas tanto en embriones y fetos como adultos jóvenes y viejos.

Embriones y fetos provenientes de abortos espontáneos y muerte fetal (partos prematuros).

Adultos jóvenes y viejos donde la muerte por accidentes fue inmediata con período agónico rápido, sin patologías previas.

Muestras que presentan desde el punto de vista histopatológico, cambios reaccionales leves, como: acantosis irregular y papilomatosis leves y alargamiento de las redes de crestas.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

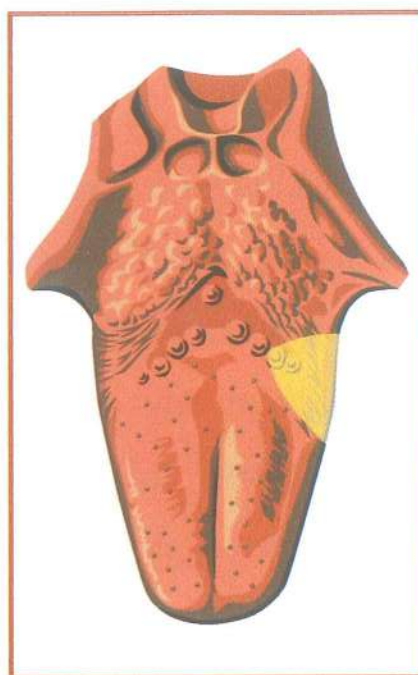
Ausencia de lesiones elementales visibles macroscópicamente en las lenguas de cadáveres y los casos de muerte por ahorcamiento.

OBTENCIÓN DEL MATERIAL

El material de estudio se obtuvo de autopsias realizadas en la justicia federal, entre las 2 y 3 horas posteriores a la muerte, y estudiados en una anatomía patológica típica.

Delimitación topográfica de la obtención de las muestras:

La mucosa lingual fue examinada en un sitio bien definido, como se indica en el siguiente esquema, tomando tanto la superficie dorsal como la ventral.



Para la obtención del material se respetaron los principios éticos de las normas internacionales para investigaciones con seres humanos (Lolas et al, 2006).

METODOLOGÍA

Las muestras de mucosa lingual se procesaron para las siguientes metodologías (Samar et al, 2004):

- **Estudio estructural e histoquímico:** Las muestras se fijaron en formol bufferado de Lillie. Posteriormente se procesaron según la técnica histológica de rutina y se realizaron cortes seriados (de 5 μ m) de cada muestra, donde se aplicaron las siguientes coloraciones:

- Hematoxilina y eosina.

-
- Tricrómico de Masson, para diferenciar tejido conectivo y muscular y para colorear queratina.
 - Tricrómico de Dane, una coloración que permite identificar queratina, prequeratina y mucinas (Dane y Herman, 1963). Sus principales componentes son solución acuosa de Floxina al 1%, Solución de Alcian blue al 0,5% en ácido acético glacial, solución de Naranja G y Hematoxilina de Mayer. Las mucinas se tiñen de azul turquesa, los núcleos de naranja a marrón y queratina y prequeratina de naranja a rojizo.
 - PAS para glicoproteínas.
 - Alcian blue a pH 2.5 y 1.0, para carboximucinas y sulfomucinas.
 - Azul de toluidina a pH 3.8 para sustancias basófilas y metacromáticas alcohol-resistentes.
 - Lectina WGA (wheat germ agglutinin) para poner de manifiesto el azúcar N-acetilglucosamina de la cubierta hidrocarbonada de la membrana celular.
- **Estudio con microscopía láser confocal:** Los cortes histológicos, coloreados con H/E, fueron observados en forma directa con Confocal Laser Scanning Microscope (LSM 5 Pascal, Zeiss, Alemania), utilizando un láser verde de 543 nm de longitud de onda por transmisión, epifluorescencia, mapa de gradientes y stacks. Las visualizaciones obtenidas fueron procesadas con analizador de imágenes Zeiss LSM Image Browser, Alemania.
-

➤ **Estudio inmunohistoquímico (IHQ) de citoqueratinas:** Se realizaron cortes de 4 μ m de los tacos fijados en formol e incluidos en parafina en micrótopo LEICA 8 de rotación.

1. Desparafinización en xilol.
2. Rehidratación en etanol con gradientes decrecientes de concentración.
3. Bloqueo de la peroxidasa endógena en peróxido de hidrógeno.
4. Pretratamiento del tejido con enzimas o calor de microondas con el fin de desenmascarar el antígeno y dejarlo expuesto a la reacción.
5. Aplicación de la tinción IHQ en Autostainer DAKO.

La tinción IHQ se realizó con el Kit LSBA+ de DAKO y consta de los siguientes pasos:

1. Incubación del tejido con anticuerpo primario marca DAKO.
2. Incubación del tejido con anticuerpo secundario biotinilado.
3. Incubación del tejido con el reactivo terciario: streptavidina-peroxidasa.
4. Agregado del cromógeno: diaminobencidina (DAB) sustrato de la enzima peroxidasa, para la reacción de color.

Luego de una contra-tinción con Hematoxilina se deshidrató nuevamente el tejido pasándolo por gradientes crecientes de etanol.

-
- **Análisis morfométrico:** Se analizó el número de núcleos / $10^{-1} \mu\text{m}^2$ en el epitelio dorsal y ventral de muestras de lengua humana provenientes de tres grupos diferentes: embriones, adultos jóvenes y viejos. El sector de obtención del material se indicó más arriba en el esquema correspondiente.
 - **Criterio de selección de las muestras:** de $N=10$ para cada edad se seleccionaron 5 muestras de región ventral y dorsal en las que se observaban los estratos a analizar de manera bien definida de acuerdo a la dirección del corte.

En cada grupo se analizaron $n=5$ muestras correspondientes a sujetos diferentes teñidas con H/E y capturadas utilizando un analizador de imágenes con el programa Image ProPlus, versión 4.5 1.22 para Windows, conectado a un fotomicroscopio Olympus Bx50 y a una cámara de video Sony, perteneciente al Área de Biología Oral, Facultad de Odontología (Universidad Nacional de Córdoba), con una magnificación de 200X. Las imágenes fueron guardadas en formato TIF, de tamaño 760 x 570 píxeles y 1.24 MB.

En cada muestra ($n=5$ para cada grupo) se contaron núcleos en 25 cuadrículas de $10^{-2} \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$. La selección del área en donde se contaron los núcleos fue realizada mediante un muestreo estratificado, de acuerdo a las características histológicas de este tejido. El epitelio fue dividido en $H=3$ estratos, de los cuales se escogió una muestra simple independiente de tamaño $n_h=0.1 \mu\text{m}^2$ en cada estrato.

Todos los valores observados de la lengua de los tres grupos estudiados, tanto en la región dorsal como ventral, fueron expresados como número de núcleos / $10^{-1} \mu\text{m}^2$.

- **Análisis estadístico:** Los datos fueron expresados por la media más/menos su desvío estándar. Se consideraron como variables independientes clasificatorias a las diferentes edades estudiadas (embrión, adulto joven, viejo) y a los diferentes sectores (dorsal y ventral), en tanto, la variable dependiente fue el número de núcleos / $10^{-1} \mu\text{m}^2$.

La comparación del número de núcleos / $10^{-1} \mu\text{m}^2$ en cada sector de la lengua de los embriones, adultos jóvenes y viejos estudiados fue evaluada estadísticamente con el test no paramétrico Mann-Whitney U para muestras independientes con un nivel de confianza estimado por bootstrap de 0.05% (para muestras de tamaño menores a 10) con software SPSS 12 versión para Windows, 2003 (Quinn y Keouch, 2000).

- **Queratinización:** Se sacó contando el número de cortes con queratina sobre el total de los cortes, analizándose 5 campos por preparado.

RESULTADOS

❖ ESTUDIO ESTRUCTURAL E HISTOQUÍMICO CONVENCIONAL

Desarrollo prenatal

Se analizó la mucosa lingual en sus caras ventral y dorsal desde las 10 a las 32 semanas del desarrollo prenatal observándose los cambios descritos en el total de preparados analizados. Entre las 10 y 13 semanas el epitelio ventral (plano estratificado no queratinizado) era delgado y estaba constituido por tres capas: profunda o basal, intermedia y superficial asentando sobre una membrana basal PAS positiva.

Las células de la zona profunda, vecina al mesénquima subyacente, eran pequeñas y formaban una capa más intensamente coloreada que el resto, de aptencia tintorial basófila con H/E y Azul de toluidina a pH 3,8, mientras que las superficiales eran de aspecto escamoso. Las células intermedias y superficiales presentaban un citoplasma vacuolado debido a la presencia de glucógeno PAS positivo.

El epitelio dorsal era semejante, a excepción de la presencia de algunas proyecciones papilares primitivas o incipientes que se proyectaban hacia la superficie y que se hacían más manifiestas hacia las 14 semanas.

Entre las 14 y 15 semanas la estratificación epitelial era notable, con proyecciones papilares manifiestas en la mucosa dorsal, la mayoría de apariencia fungiforme. (Figura 5).

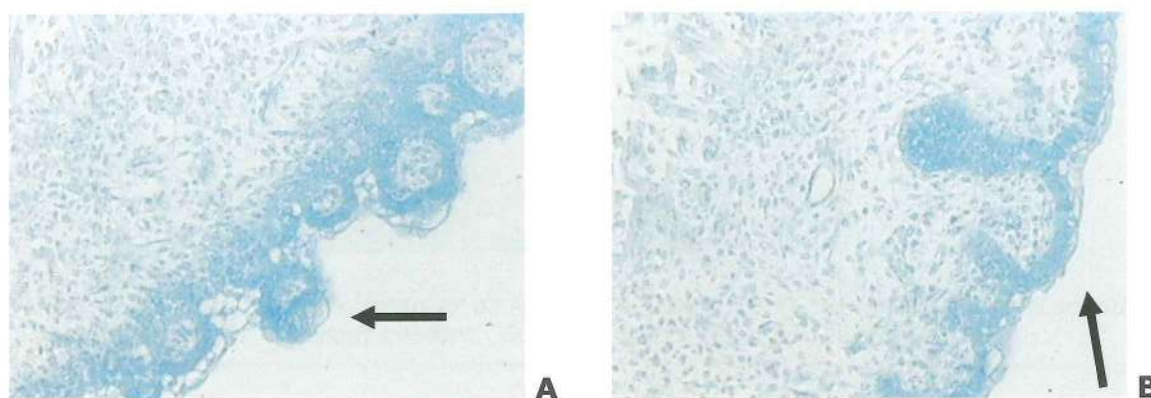


Figura 5: Mucosa dorsal de lengua de feto de 14-15 semanas. **A,** Se observa el epitelio con diferenciación papilar (flecha). Coloración Azul de toluidina. pH 3.8. 100X; **B,** Papila en formación (Flecha). Coloración Azul de toluidina. pH 3.8. 100X.

El epitelio ventral continuaba siendo delgado, sin papilas y PAS positivo. (Figura 6).

Luego de las 16-19 semanas se iniciaba la diferenciación de las papilas caliciformes y a las 20 semanas se encontraban botones gustativos en las papilas fungiformes y caliciformes, con células fusiformes escasamente coloreadas. Posteriormente se diferenciaron las papilas filiformes. Hasta las 32 semanas no fue posible observar con microscopía óptica convencional formación de papilas coriales secundarias en el tejido conectivo vecino al epitelio que revestía las papilas fungiformes. El epitelio presentaba inclusiones de glucógeno PAS positivas. (Figuras 7 y 8).

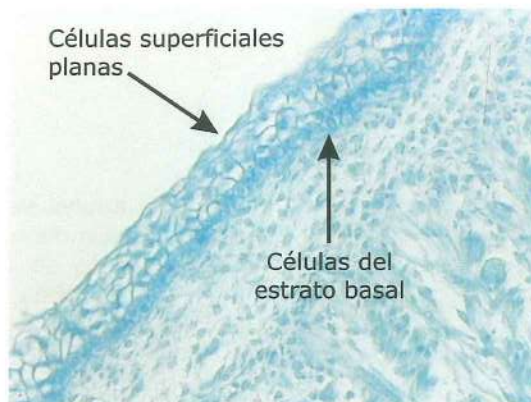


Figura 6: Mucosa ventral apapilar de lengua de feto de 14-15 semanas. No se observan crestas epiteliales ni papilas coriales. Coloración Azul de toluidina. pH 3.8. 100X.

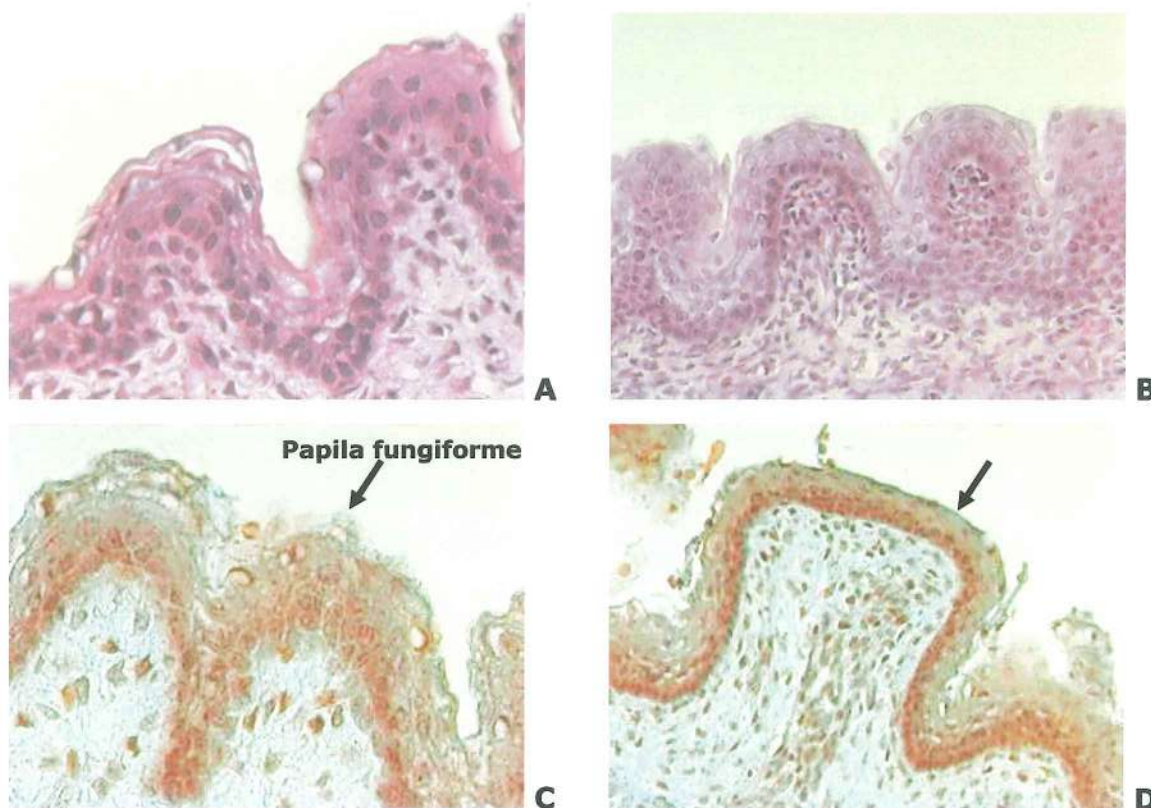
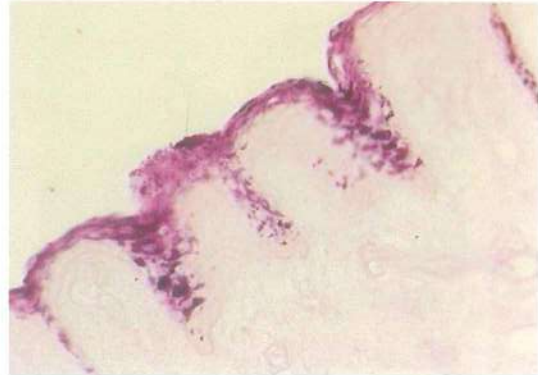


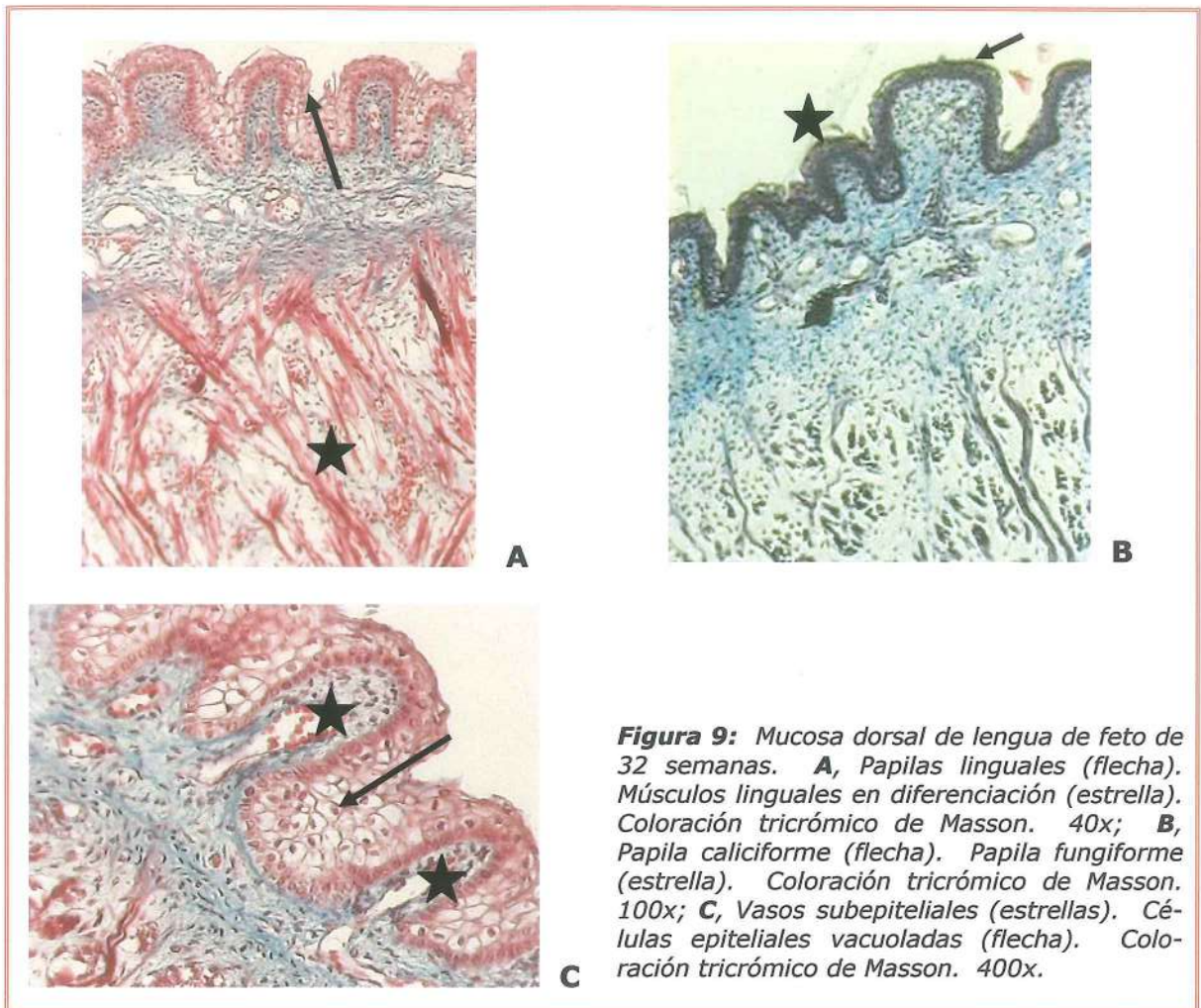
Figura 7: Mucosa dorsal de lengua de feto de 24 semanas. **A,** Papilas fungiformes. No se observan papilas coriales secundarias. Coloración HE. 400x; **B,** Diferenciación de papilas fungiformes. Coloración HE. 200x; **C,** Coloración tricrómico de Dane. 400x; **D,** Papila caliciforme. Coloración tricrómico de Dane. 200x

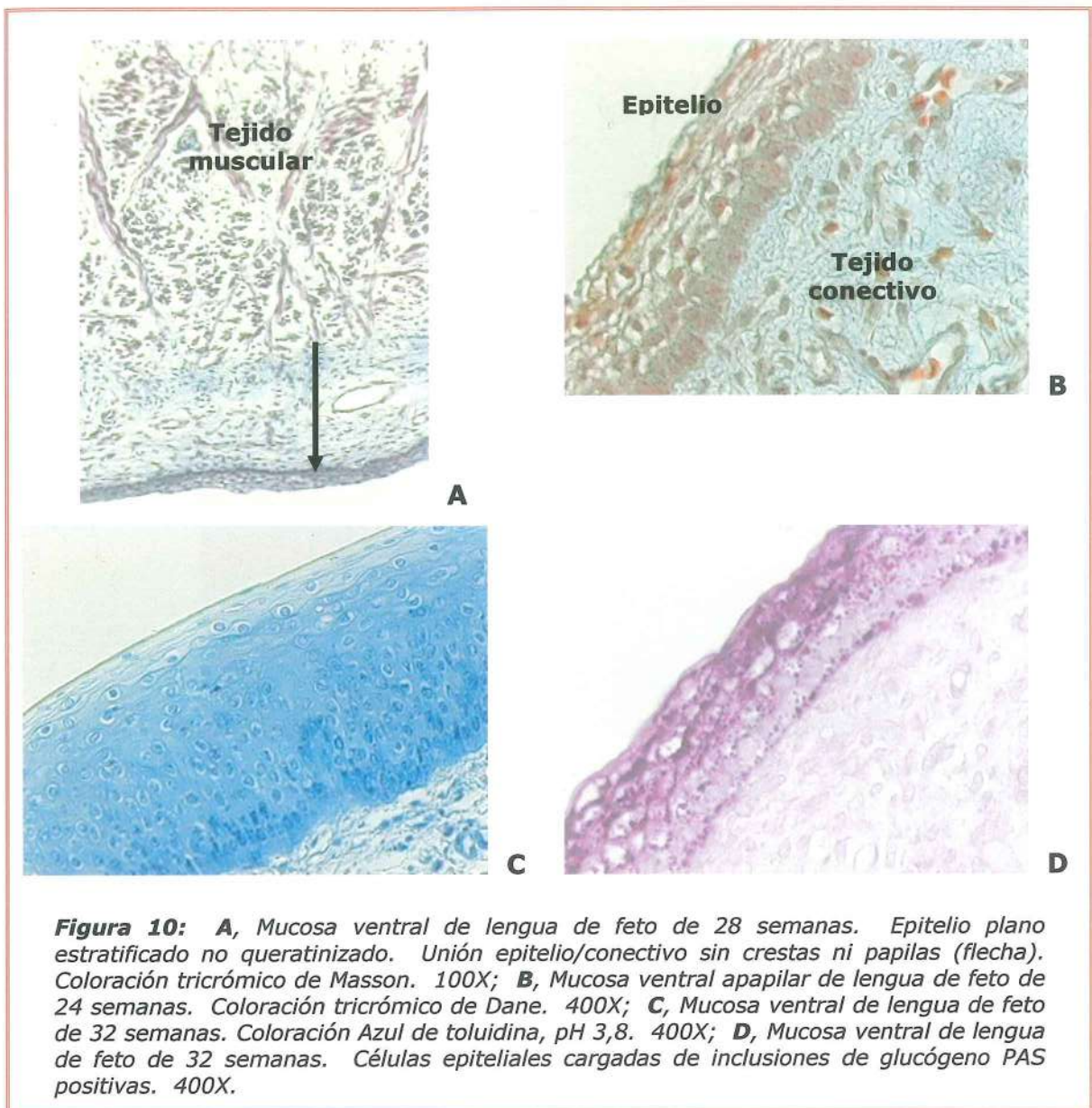
Figura 8: Mucosa dorsal de lengua de feto de 32 semanas. Papilas fungiformes. Células epiteliales con inclusiones de glucógeno PAS positivas. Coloración PAS. 200x.



Tanto el epitelio dorsal como el ventral aumentaban gradualmente su espesor desde las 10 a las 32 semanas. Durante todo el desarrollo prenatal no se observaron crestas epiteliales ni papilas coriales en la mucosa lingual de la región ventral. (Figuras 9 y 10).

Cuando las muestras se analizaron con microscopía láser confocal se detectó a las 32 semanas el inicio de la formación de las papilas coriales secundarias en el tejido conectivo de las papilas fungiformes. (Figuras 11 a 15).





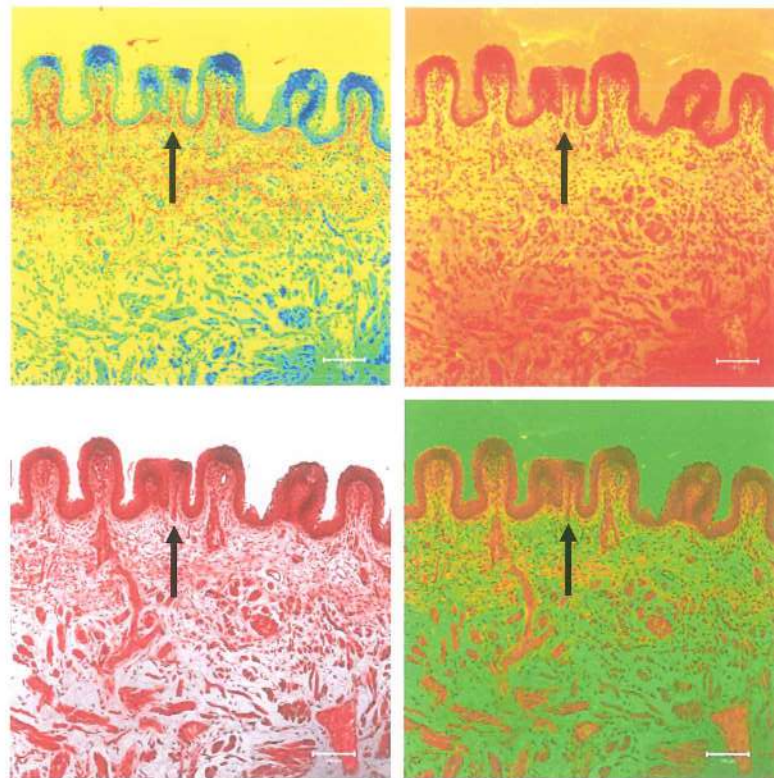


Figura 11: Mucosa dorsal de lengua de feto de 32 semanas. Se observa manifiesto desarrollo papilar y la aparición de las papilas coriales secundarias (flecha). Microscopía láser confocal.

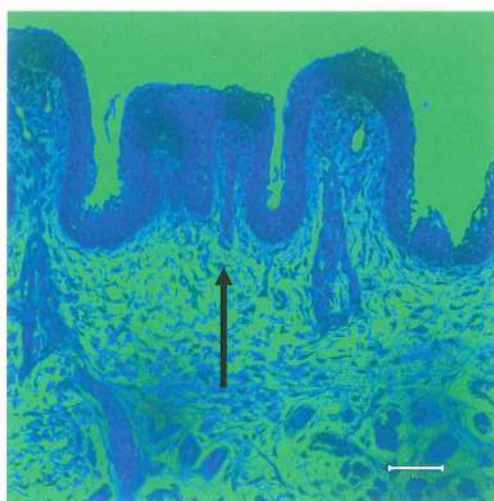


Figura 12: Detalle a mayor magnificación de la figura 11. Microscopía láser confocal.

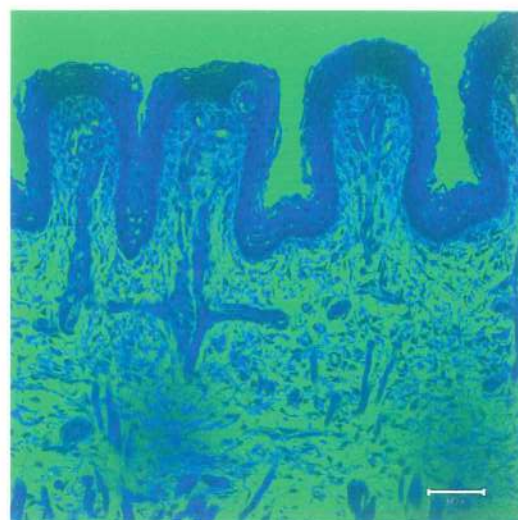
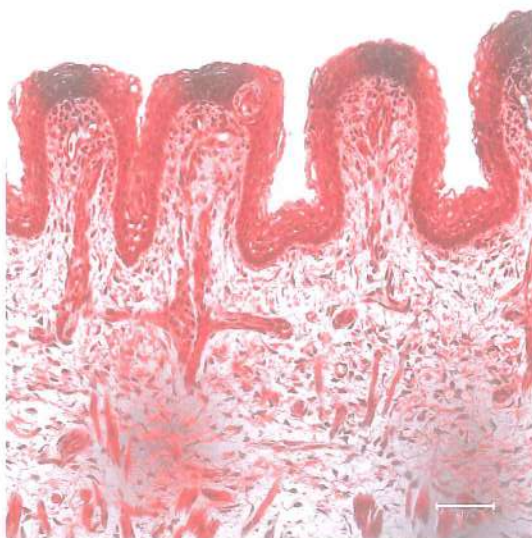


Figura 13: Mucosa dorsal de feto de 32 semanas. Papilas fungiformes. Microscopía láser confocal.

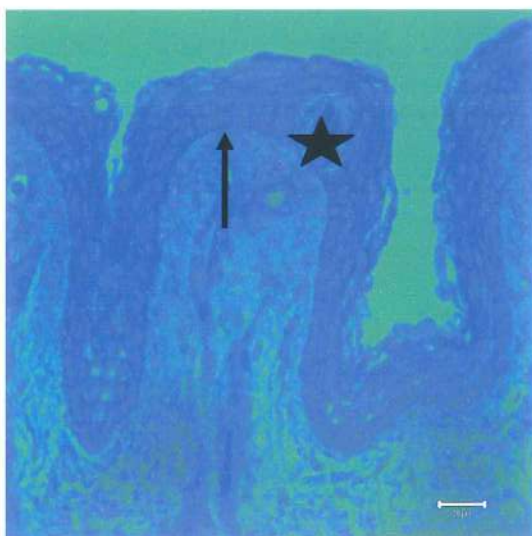


Figura 14: Detalle a mayor magnificación de la figura 13. Papila fungiforme (flecha). Núcleo de tejido conectivo (estrella). Microscopía láser confocal.

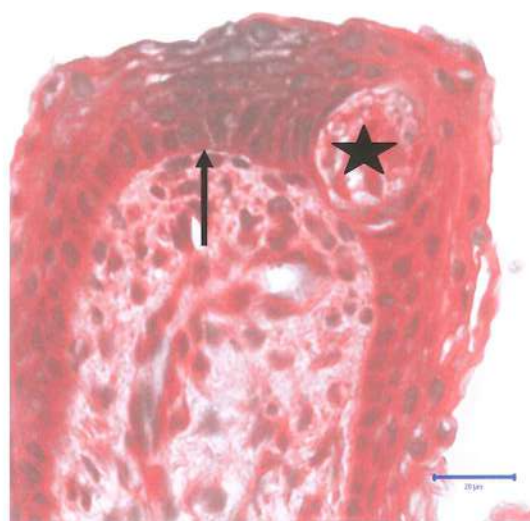


Figura 15: Mucosa dorsal de lengua de feto de 32 semanas. Detalle a mayor magnificación de la figura 14. Estrato basal (flecha). Núcleo de tejido conectivo (estrella). Microscopía láser confocal.

Adultos jóvenes

La mucosa dorsal del sector investigado (ver Materiales y Métodos) estaba revestida por epitelio plano estratificado con variaciones estructurales según el tipo de papila.

Se observó la clásica distribución papilar del dorso y bordes laterales de la lengua, en lo que correspondía a la zona comprendida dentro de los 2/3 anteriores o cuerpo, no así en la del 1/3 posterior o raíz, de naturaleza apapilar. Las papilas eran de tipo filiforme, fungiforme, calciforme y foliada.

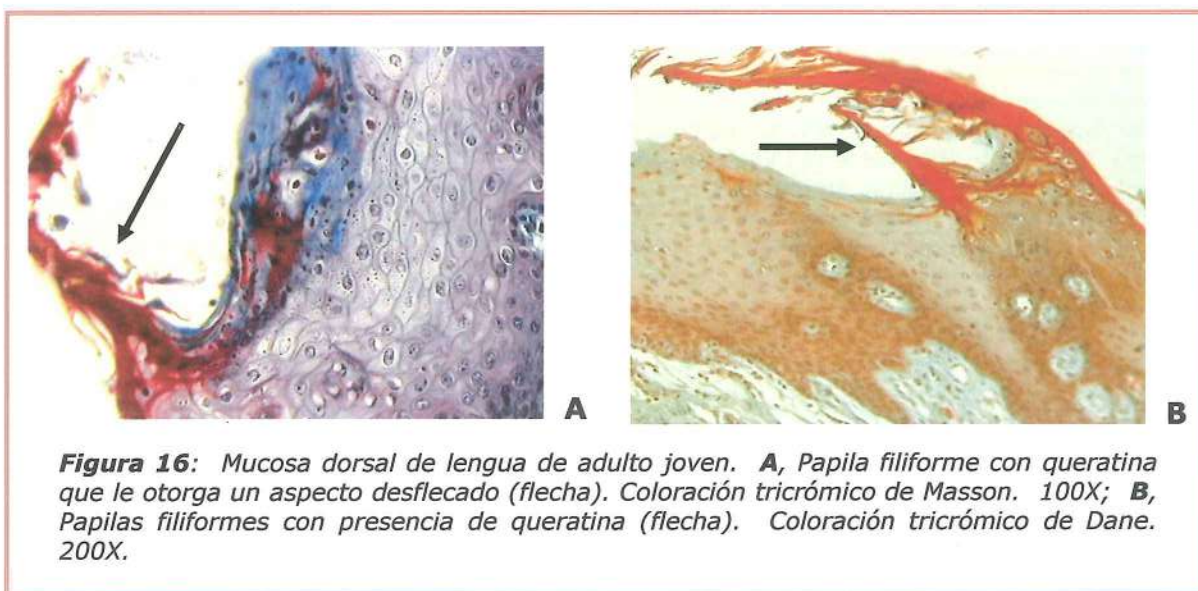
El epitelio del cuerpo era de tipo queratinizado en las áreas de revestimiento de las papilas filiformes, observándose claramente cuatro estratos celulares: basal, espinoso, granuloso y queratinizado o cornificado.

El estrato basal estaba formado por células columnares basófilas, que apoyaban sobre la membrana basal, y cuyos núcleos se disponían en empalizada con eucromatina abundante y nucleolos evidentes. El estrato espinoso mostraba varias capas de células suprabasales, esféricas o poligonales, con núcleos más pequeños. Los contornos celulares presentaban "prolongaciones espinosas", de allí el nombre que se le da a este estrato. El estrato granuloso estaba constituido por varias hileras de células más aplanadas, con abundantes gránulos intracitoplasmáticos basófilos y núcleos más pequeños cuya cromatina era más densa.

Las papilas filiformes, abundantes y de pequeño tamaño, presentaban el aspecto de finas prolongaciones cónicas, largas y puntiagudas, con su extremo superior orientado hacia la región posterior del órgano lingual.

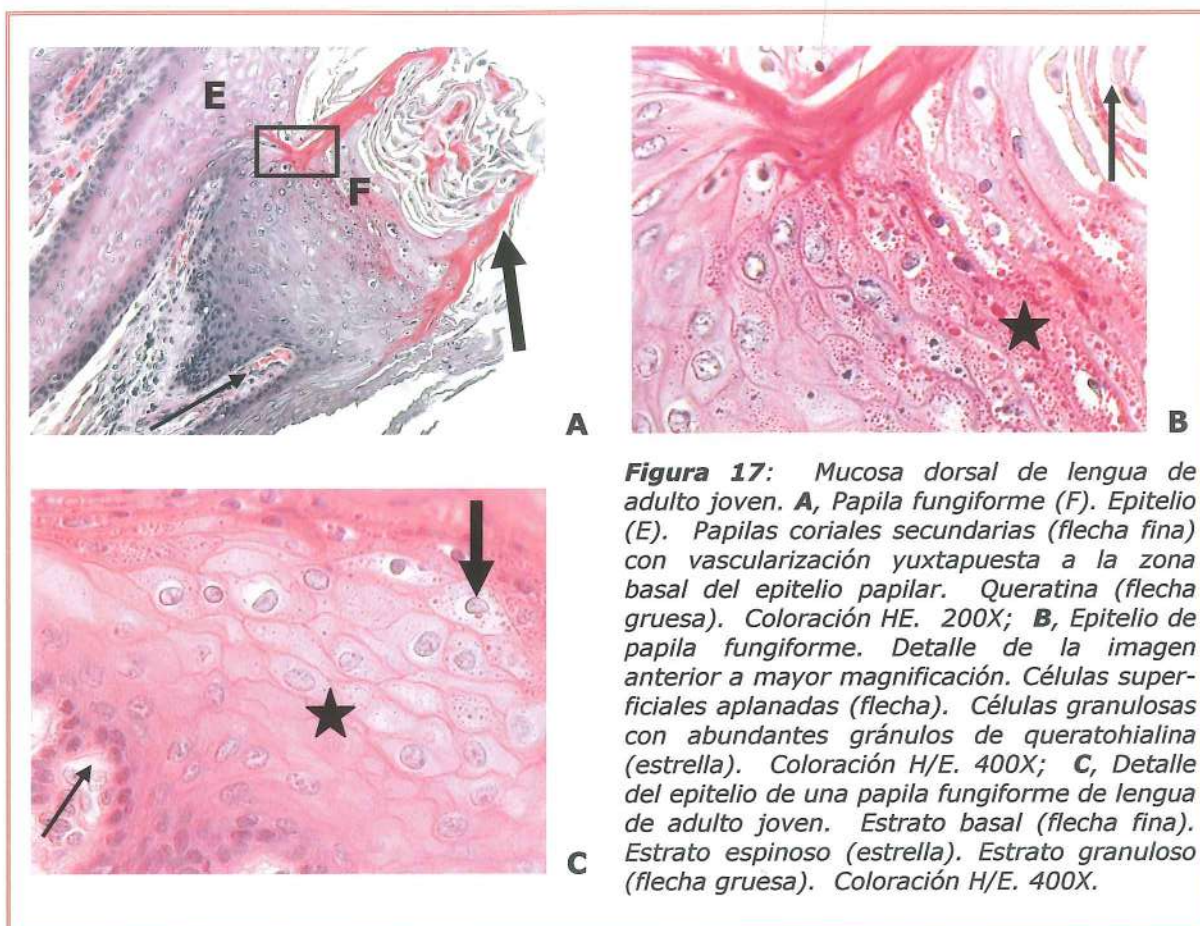
Estructuralmente estaban constituidas por un eje central de tejido conectivo, revestido por epitelio plano estratificado queratinizado (mucosa masticatoria) que en su porción libre aparecía desflecado. No se identificaron en las mismas botones gustativos. (Figura 16.A.).

Cuando los cortes histológicos se colorearon con el método tricrómico de Dane, la queratina superficial se tiñó de una fuerte tonalidad naranja a naranja rojizo, no ocurriendo lo mismo en las áreas no queratinizadas de la mucosa dorsal ni en la mucosa de la superficie lingual ventral de revestimiento. (Figura 16.B.).



Algunas papilas fungiformes que presentaban epitelio paraqueratinizado, con corneocitos superficiales con núcleos muy pequeños, de cromatina densa y citoplasmas acidófilos, pero en menor intensidad que en el epitelio cornificado, se observaron en una mujer y cuatro varones. En las

caras laterales de algunas papilas se observó una capa de queratina. (Figuras 17 y 18).



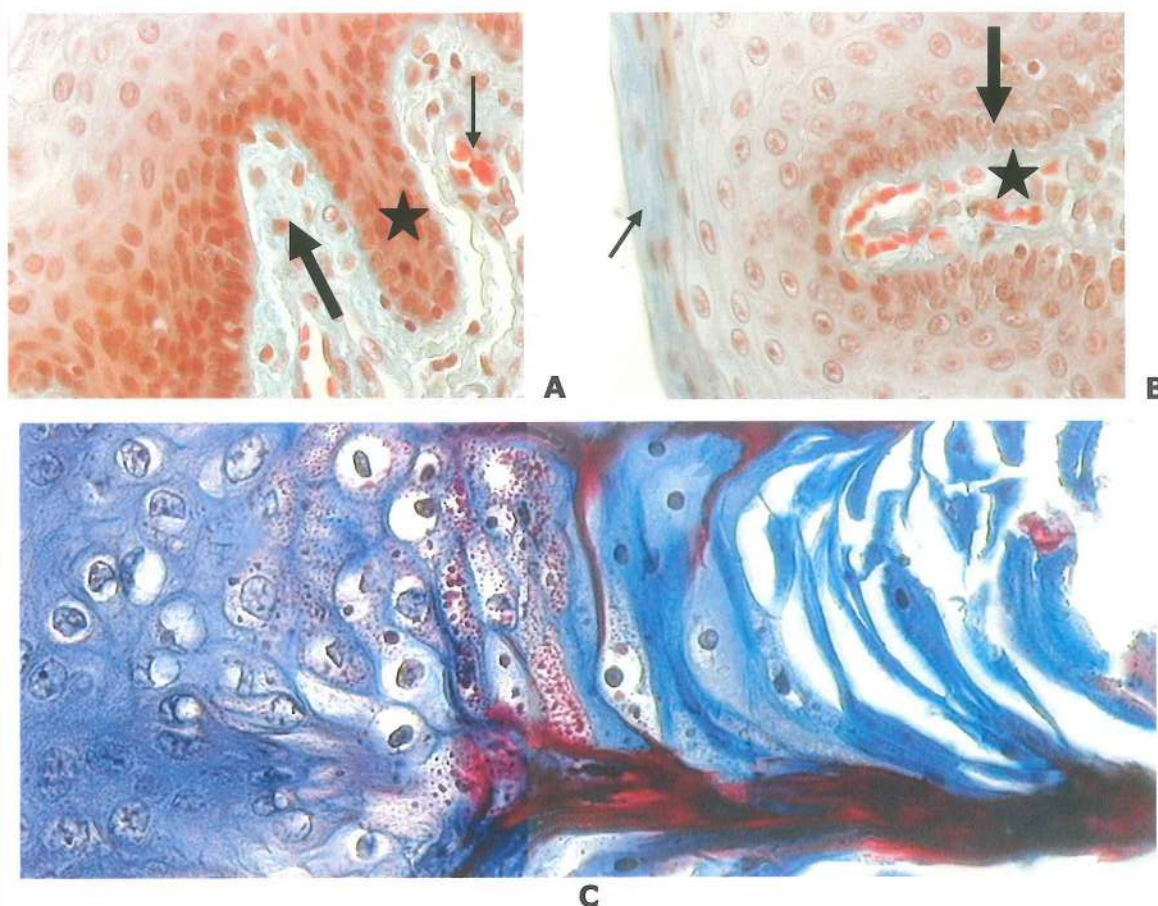


Figura 18: Lengua de adulto joven. **A**, Detalle de la zona basal de una papila fungiforme. Vaso sanguíneo (flecha fina). Cresta epitelial (estrella). Papila corial secundaria (flecha gruesa). Coloración tricrómico de Dane. 400X; **B**, Detalle de una papila fungiforme. Células epiteliales superficiales planas (flecha fina). Células basales (flecha gruesa). Papila corial secundaria (estrella). Coloración tricrómico de Dane. 400X; **C**, Papila fungiforme. Fotocomposición. Coloración tricrómico de Masson. 200X.

Las papilas caliciformes estaban revestidas por epitelio no queratinizado. (Figuras 19; 20 y 21).

En general, el epitelio interpapilar era de tipo no queratinizado.

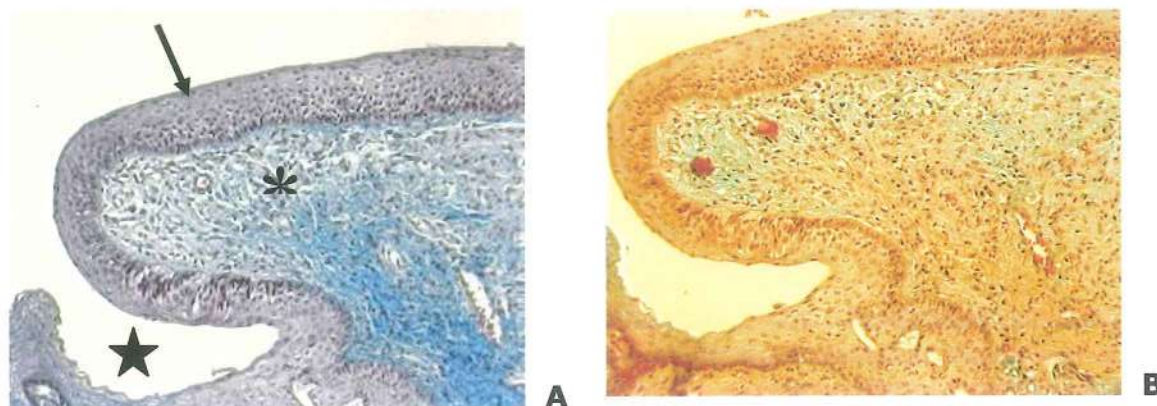


Figura 19: Mucosa dorsal de lengua de adulto joven. **A**, Detalle de una papila caliciforme. Nótese la ausencia de queratina. Surco circunvalador (estrella). Epitelio (flecha). Tejido conectivo (asterisco). Coloración tricrómico de Masson. 40X; **B**, Imagen similar a la observada en A. La coloración empleada (tricrómico de Dane) corrobora la ausencia de queratina. 40X.

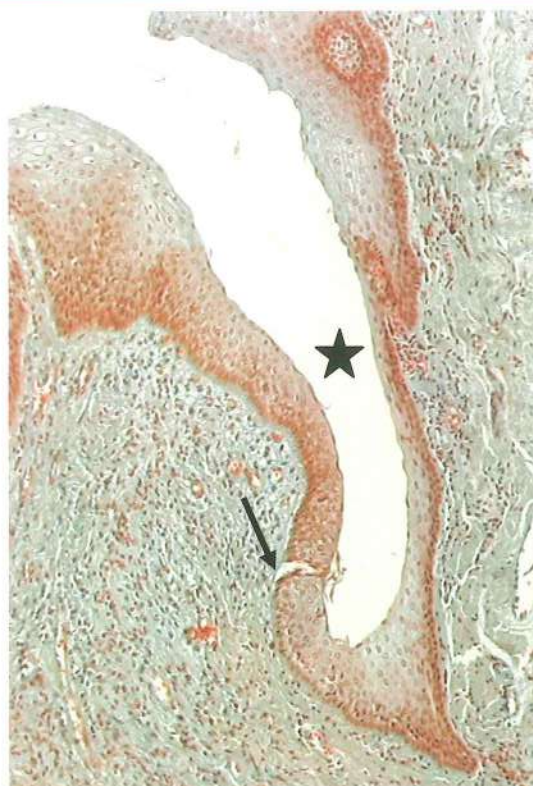
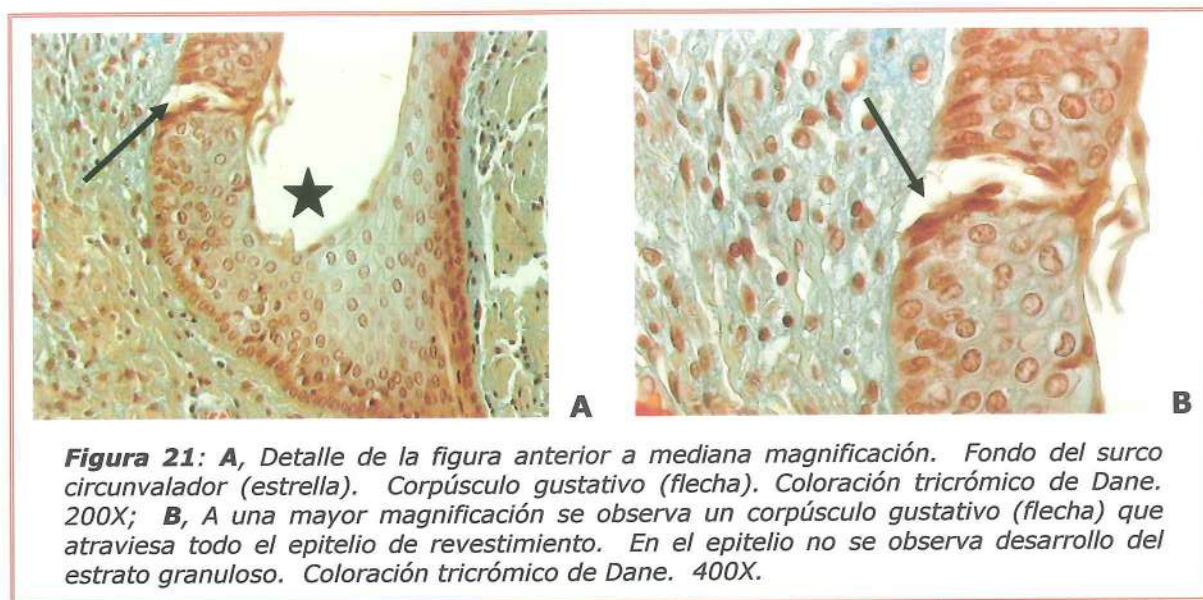


Figura 20: Fotocomposición de una papila caliciforme en lengua de adulto joven. Corpúsculo gustativo (flecha). Surco circunvalador (estrella). Coloración tricrómico de Dane. 100X.



Con microscopía láser confocal se observaba en las papilas filiformes con gran nitidez la capa de queratina al igual que los contornos celulares bien delimitados que contrastaban con un citoplasma más pálido. (Figura 22).

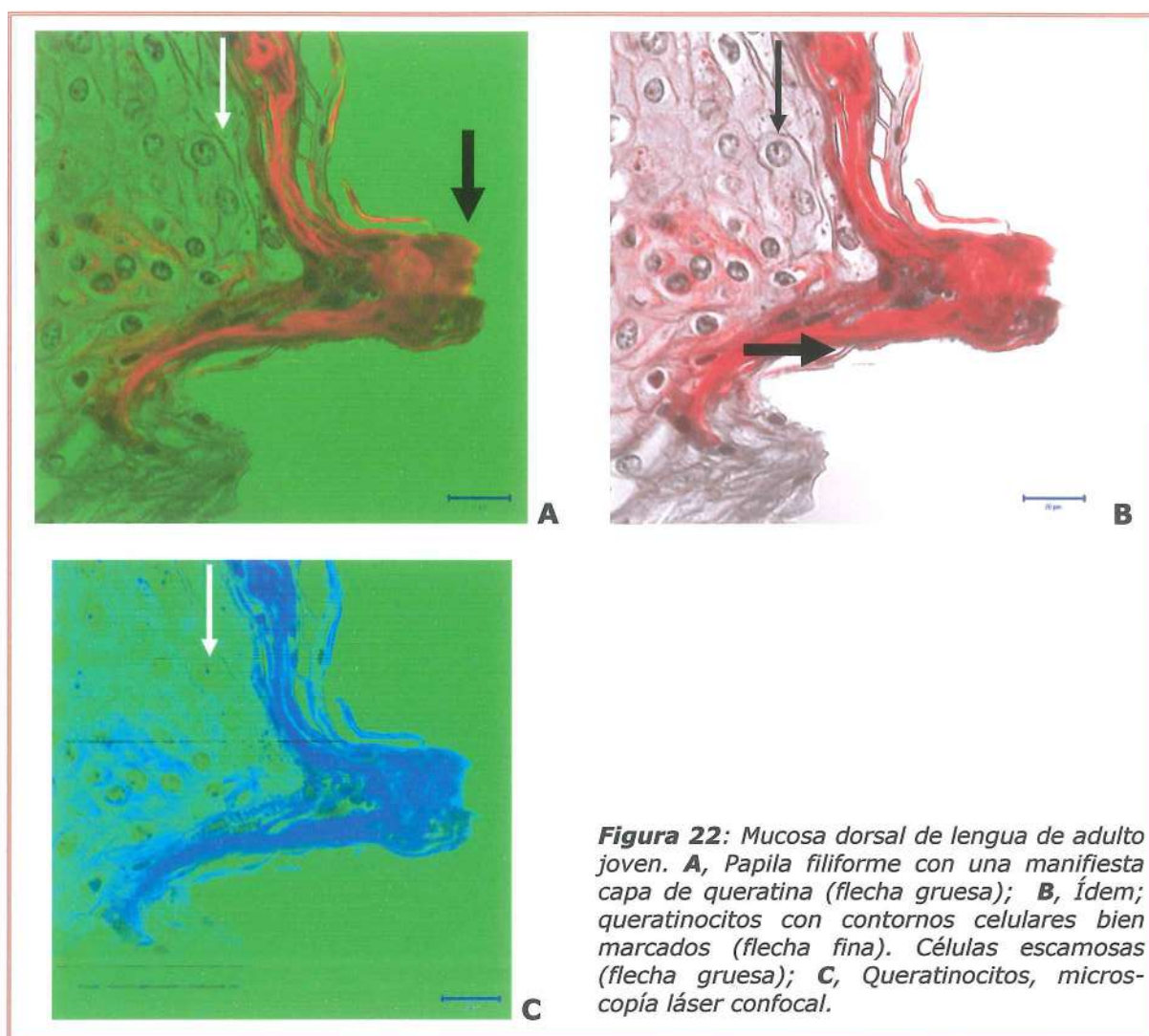


Figura 22: Mucosa dorsal de lengua de adulto joven. **A,** Papila filiforme con una manifiesta capa de queratina (flecha gruesa); **B,** Ídem; queratinocitos con contornos celulares bien marcados (flecha fina). Células escamosas (flecha gruesa); **C,** Queratinocitos, microscopía láser confocal.

Las papilas fungiformes, dispersas y más escasas que las filiformes, mostraban su típica forma de hongo, lo que determina su denominación, con una zona superior abultada y una inferior más angosta. La mucosa que las revestía se caracterizaba por poseer epitelio paraqueratinizado con parches de queratina en su región superior. El tejido conectivo intrapapilar era de variedad laxa, dividido en varias papilas coriales secundarias y con importante vascularización capilar que llegaba muy próxima al epitelio papilar. (Figuras 23 y 24).

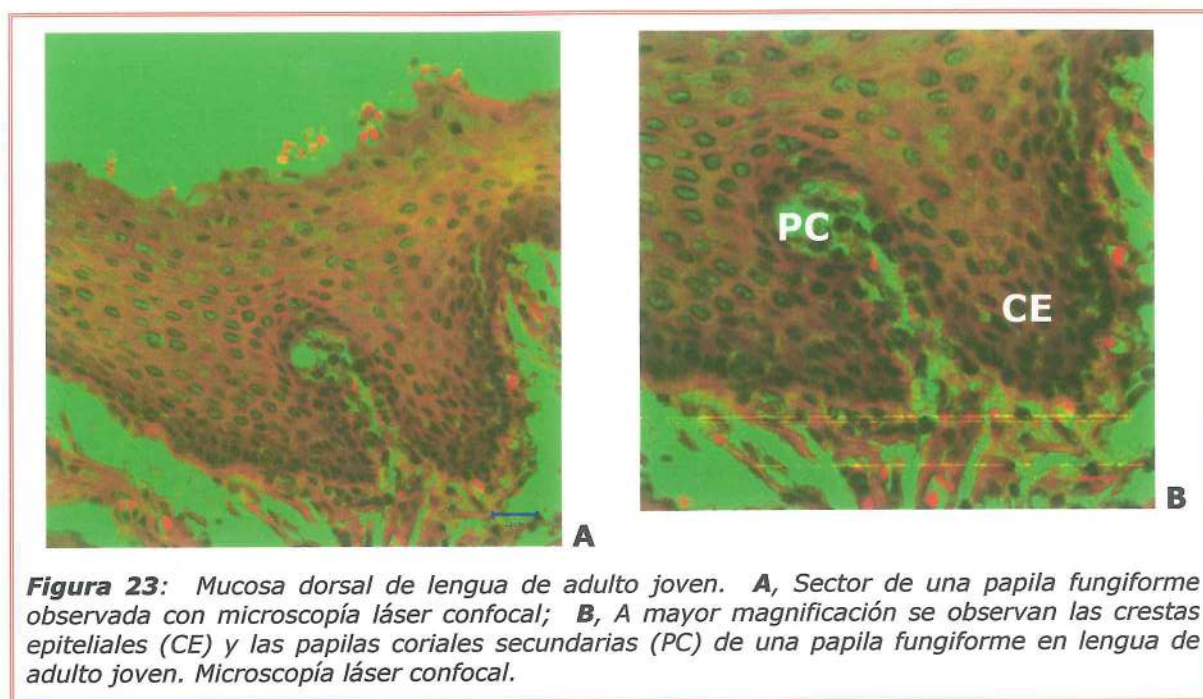
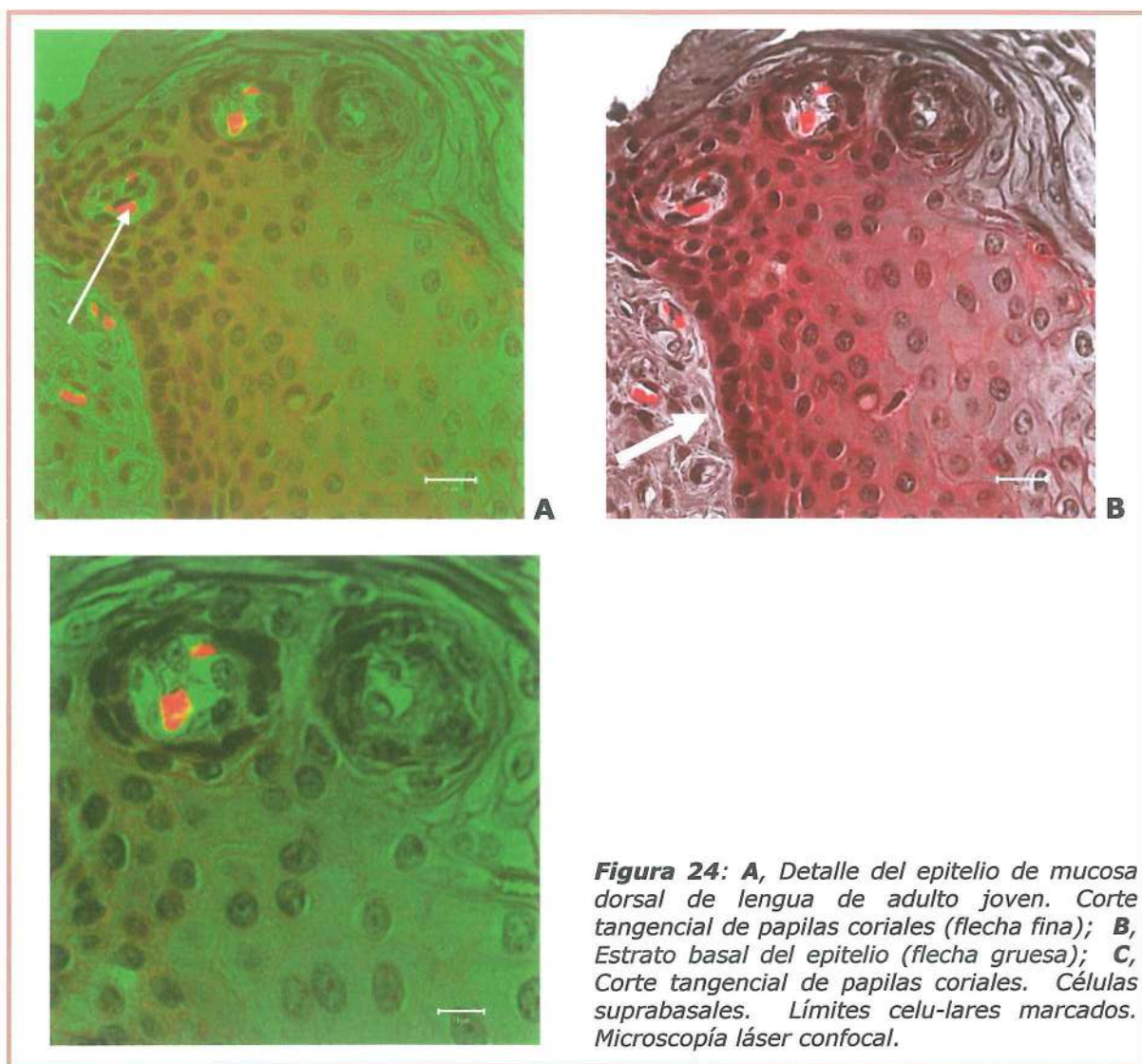


Figura 23: Mucosa dorsal de lengua de adulto joven. **A**, Sector de una papila fungiforme observada con microscopía láser confocal; **B**, A mayor magnificación se observan las crestas epiteliales (CE) y las papilas coriales secundarias (PC) de una papila fungiforme en lengua de adulto joven. Microscopía láser confocal.



En la extremidad libre o superior de las papilas se localizaban botones gustativos con sus características células fusadas, más pálidas que el resto del epitelio superficial que las circundaba. Estos botones o corpúsculos gustativos ocupaban todo el espesor del epitelio en las papilas fungiformes y caliciformes.

Las papilas caliciformes, localizadas en la V lingual, zona de transición entre el cuerpo y la raíz de la lengua, no sobresalían de la superficie de la mucosa. Estaban recubiertas por epitelio no queratinizado y rodeadas por un

profundo surco, el surco circunvalador, en cuyo fondo desembocan las glándulas serosas de von Ebner, de ahí también la denominación de circunvaladas que se da a estas papilas. En las caras laterales de las papilas se disponían los botones gustativos. Las papilas foliadas, en muy escasa cantidad, estaban formadas por pliegues mucosos con aspecto de hojas, en los bordes laterales de la base de la lengua, separados por pequeños surcos. El epitelio que las revestía era de variedad no queratinizada. (Figura 25).

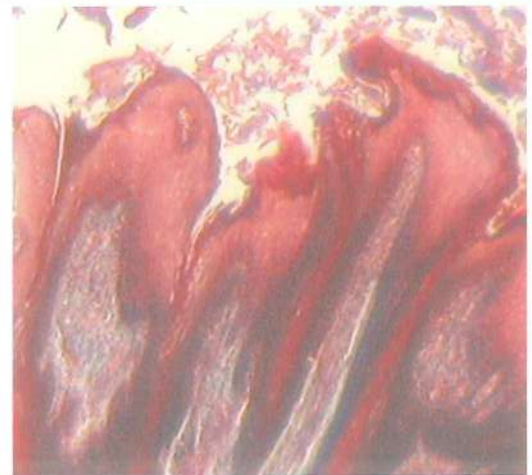
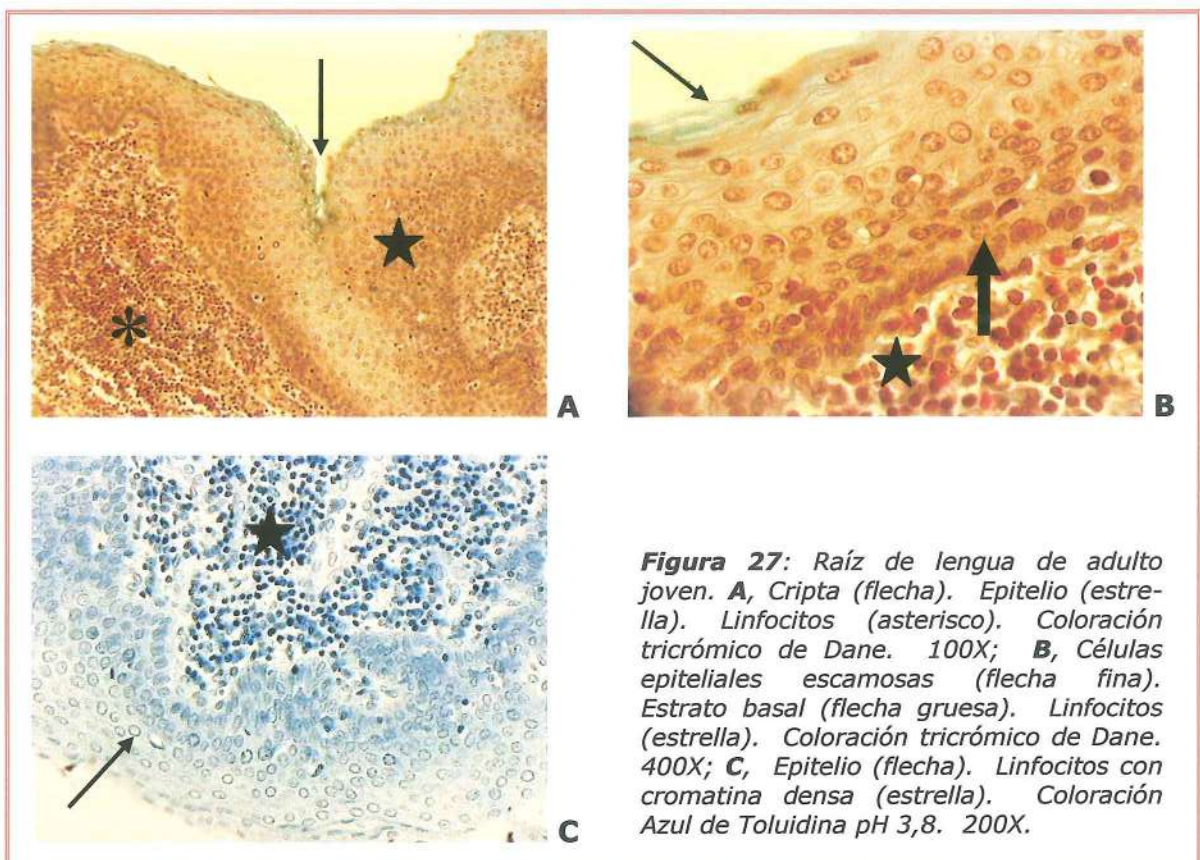
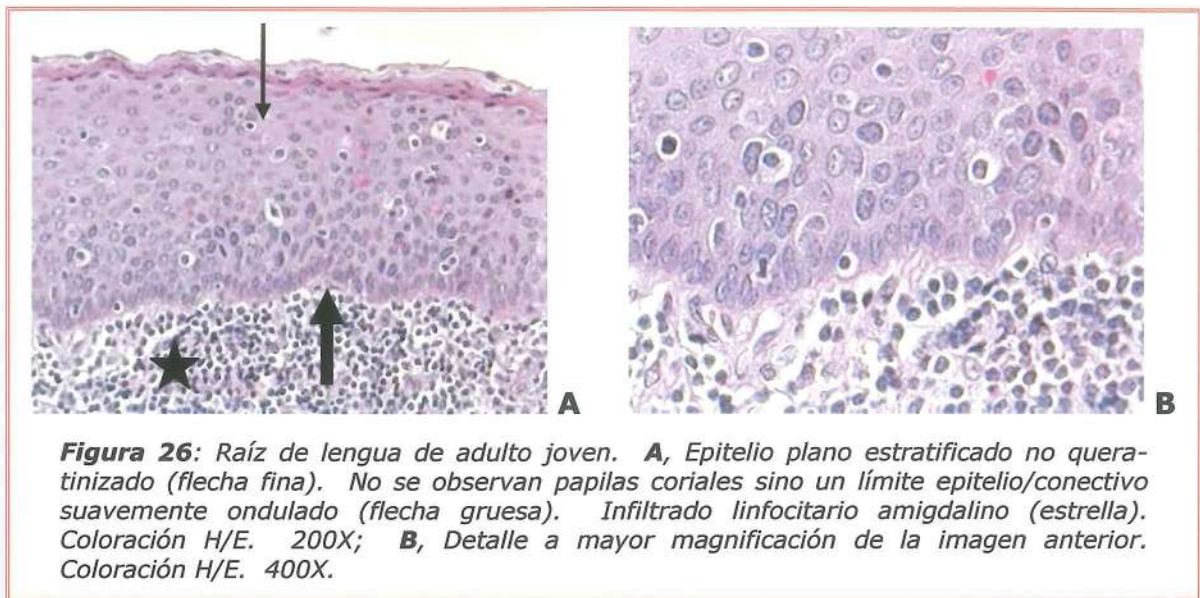


Figura 25: Borde lateral de lengua de adulto joven. Papilas foliadas. Coloración tricrómico de Masson. 100X.

La raíz de la lengua estaba recubierta por una mucosa de tipo revestimiento con epitelio no queratinizado y de mayor espesor que en la zona ventral del órgano.

Este epitelio estaba infiltrado por linfocitos provenientes de la amígdala lingual. No se observó desarrollo papilar y en la unión epitelio-corial las crestas epiteliales eran poco manifiestas. (Figuras 26 y 27).



Los corpúsculos gustativos y el epitelio de revestimiento lingual presentaban con microscopía láser confocal características estructurales no observadas o difíciles de observar con microscopía óptica.

Con microscopía láser confocal se identificaban con nitidez tanto en los corpúsculos gustativos de las papilas fungiformes como caliciformes: células intracorpúsculares fusiformes con núcleos pálidos alargados y otras con núcleos más oscuros y redondeados, ambas con sus prolongaciones que se adelgazaban paulatinamente al dirigirse hacia el poro gustativo. A gran magnificación, las células fusiformes localizadas en el área central de los corpúsculos contenían importante cantidad de gránulos intracitoplasmáticos de diferentes tamaños. También se observaron células basales proliferantes. (Figura 28A, B y C.; y Figura 29). En el estrato espinoso del epitelio donde se encontraban inmersos los corpúsculos gustativos el epitelio desarrollaba los típicos contactos intercelulares que dan el nombre a dicho estrato. (Figura 28D).

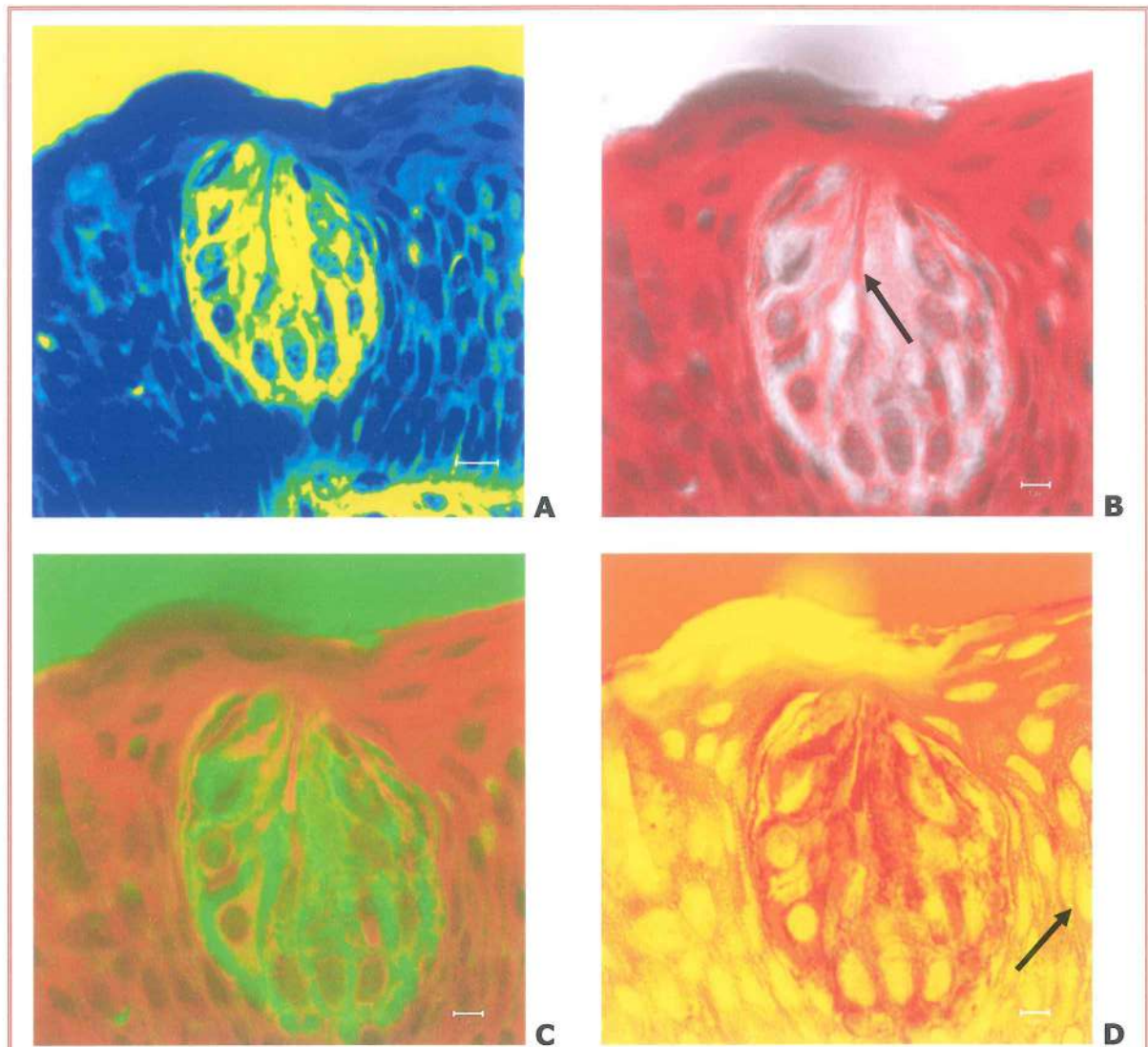
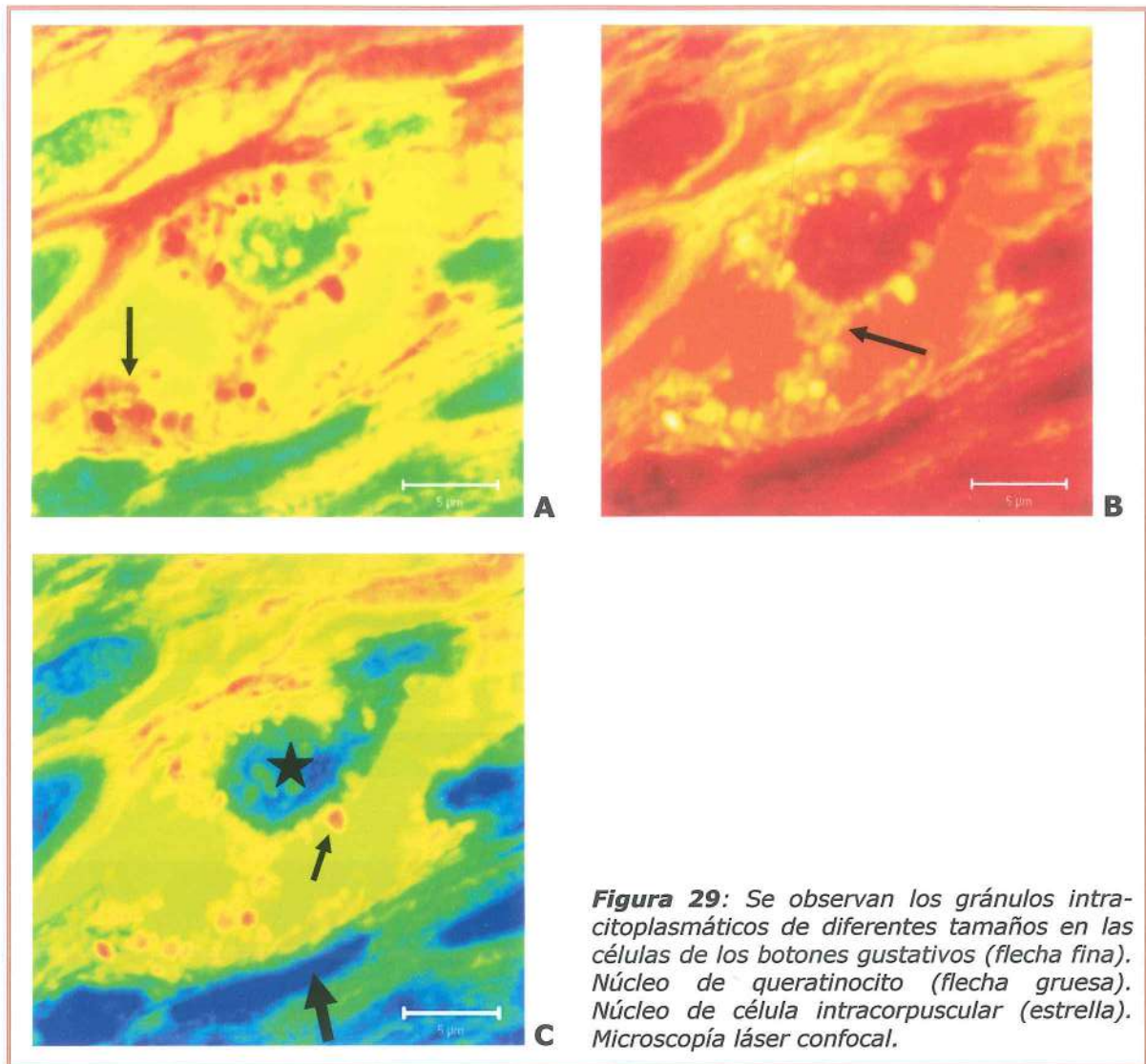
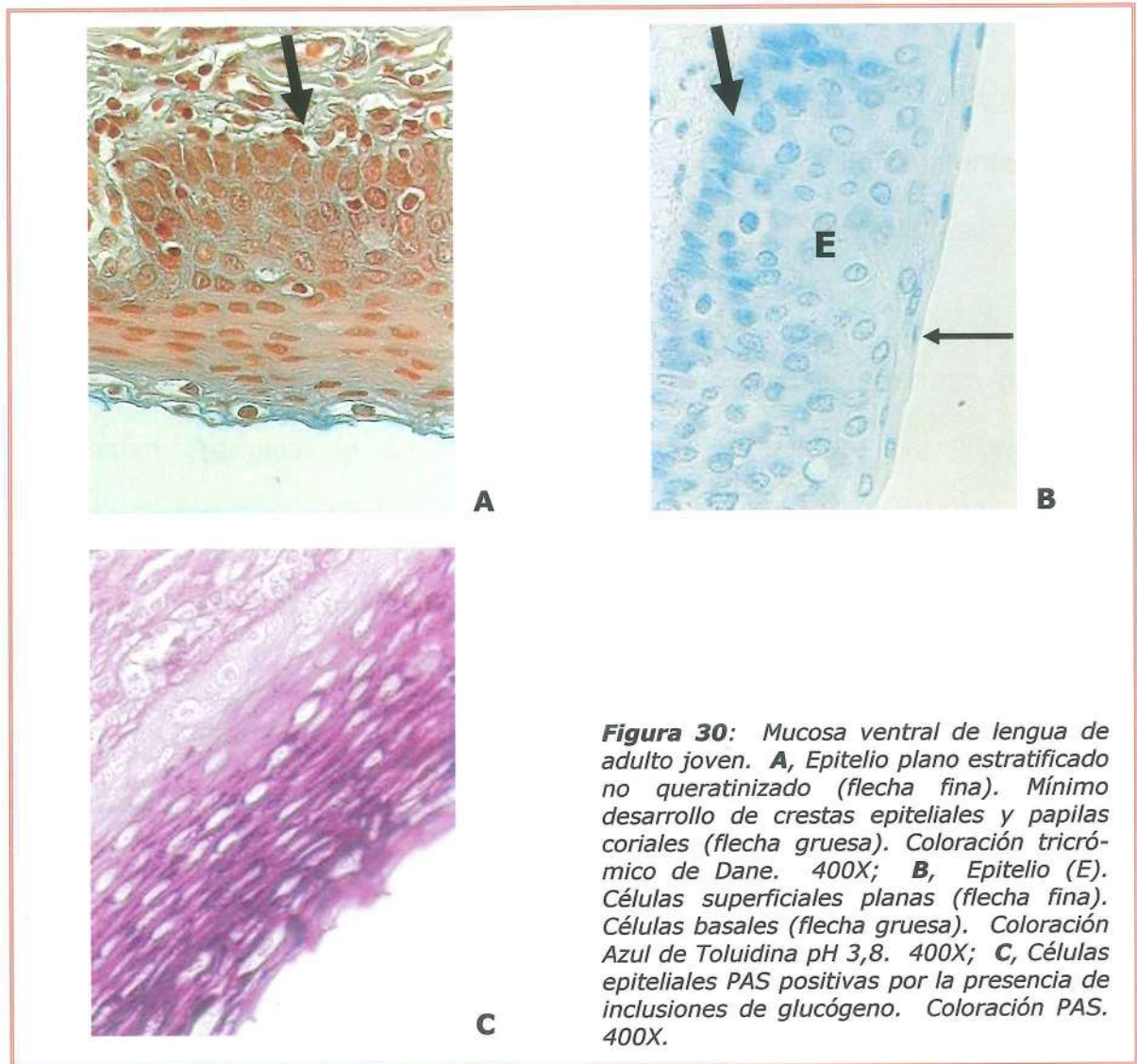


Figura 28: **A**, Corpúsculo gustativo intraepitelial ocupando todo el espesor del epitelio en cara lateral de una papila caliciforme. Microscopía láser confocal; **B**, Se observan núcleos de células con prolongaciones adelgazadas (flecha). Núcleos oscuros y más pálidos; **C**, **D**, Se destacan los contactos intercelulares con el aspecto de delicadas espinas en los queratinocitos (flecha).



La mucosa ventral presentaba en todas las muestras analizadas, un epitelio de revestimiento no queratinizado, con zonas de espesor importante, desarrollando crestas epiteliales muy poco marcadas. Las células se disponían en un estrato basal, uno intermedio y otro superficial. (Figura 30A). El estrato basal estaba formado por células altas con apetencia basófila y núcleos ocupados por cromatina laxa y nucleolos manifiestos. El estrato intermedio o suprabasal, contenía células cuboideas menos basófilas, que se iban aplanando hacia la superficie epitelial, y el estrato superficial células aplanadas

que conservaban sus núcleos. No se observaron gránulos de queratohialina. (Figura 30B). Los queratinocitos eran PAS positivos debido a la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas de glucógeno. (Figura 30C).





Viejos

En el área de estudio de la mucosa dorsal, el cuerpo de la lengua presentaba papilas filiformes, fungiformes y caliciformes, no encontrándose en las muestras analizadas papilas foliadas. Las papilas filiformes estaban delimitadas por epitelio plano estratificado recubierto por una capa de queratina de importante espesor, la que se teñía de naranja intenso con tricrómico de Dane y se observaba nítidamente con microscopía láser confocal. (Figura 31A, C y D).

En el epitelio de estas papilas las células del estrato granuloso contenían gránulos de queratohialina y sus núcleos de cromatina densa estaban retraídos mostrando un halo perinuclear vacío. (Figura 31B).

En una mujer y cinco hombres cuyas edades estaban comprendidas en el 2º y 3º grupo de viejos, algunas papilas fungiformes mostraban un epitelio paraqueratinizado con parches de queratina con estrato granuloso bien manifiesto, PAS negativo y áreas interpapilares PAS positivas. (Figuras 32 y 33). Con microscopía láser confocal se observó que la superficie de las papilas fungiformes era irregular, de aspecto festoneado y a nivel del tejido conectivo subyacente se localizaban acúmulos de adipocitos. (Figuras 34 y 35).

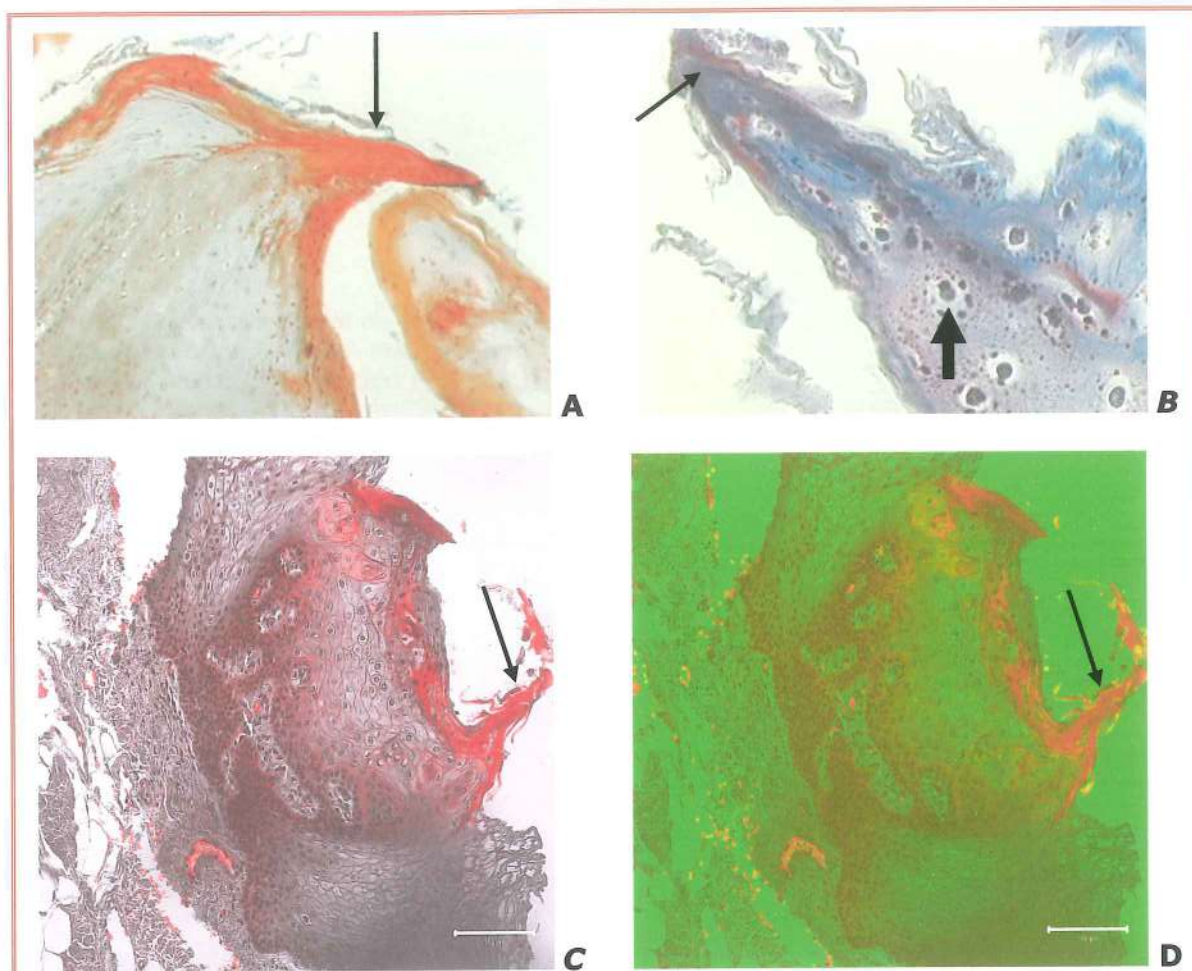


Figura 31: Mucosa dorsal de lengua de viejo. **A**, Papila filiforme con epitelio queratinizado. Capa de queratina coloreada por Naranja G (flecha). Coloración tricrómico de Dane. 10X; **B**, Mucosa dorsal de lengua de viejo. Papila filiforme. Queratina (flecha fina). Gránulos de queratohialina (flecha gruesa). Coloración tricrómico de Masson. 400X; **C** y **D**, Vista panorámica de una papila filiforme. Queratina (flecha).

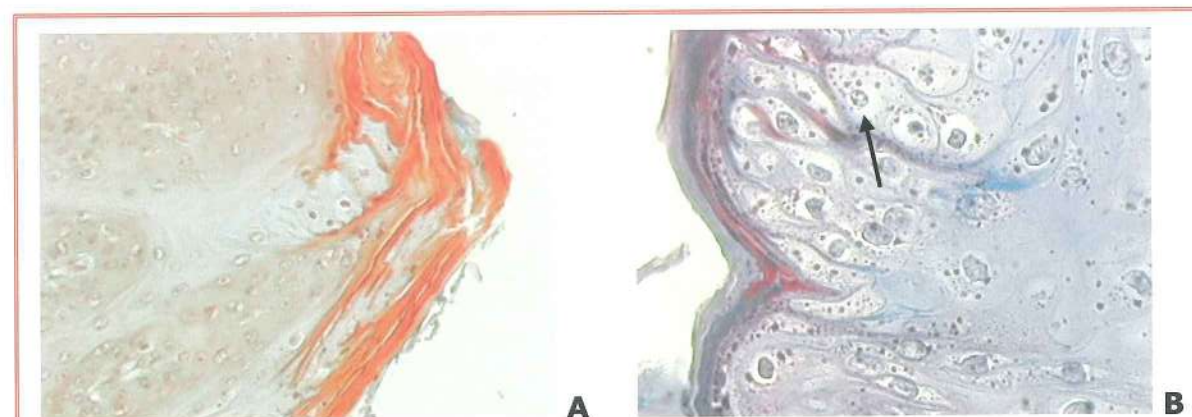


Figura 32: Mucosa dorsal de lengua de viejo. **A**, Parche de queratina. Coloración tricrómico de Dane. 200X; **B**, Detalle del estrato granuloso de una zona correspondiente a una papila fungiforme (flecha). Coloración tricrómico de Masson. 400X.

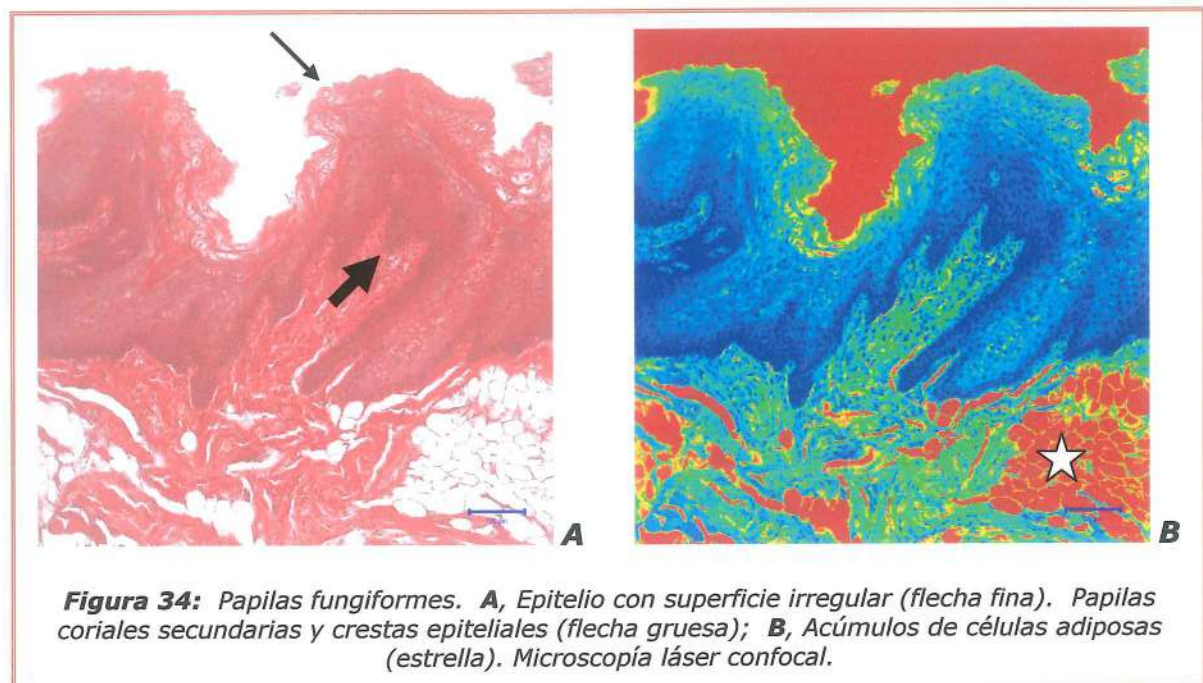
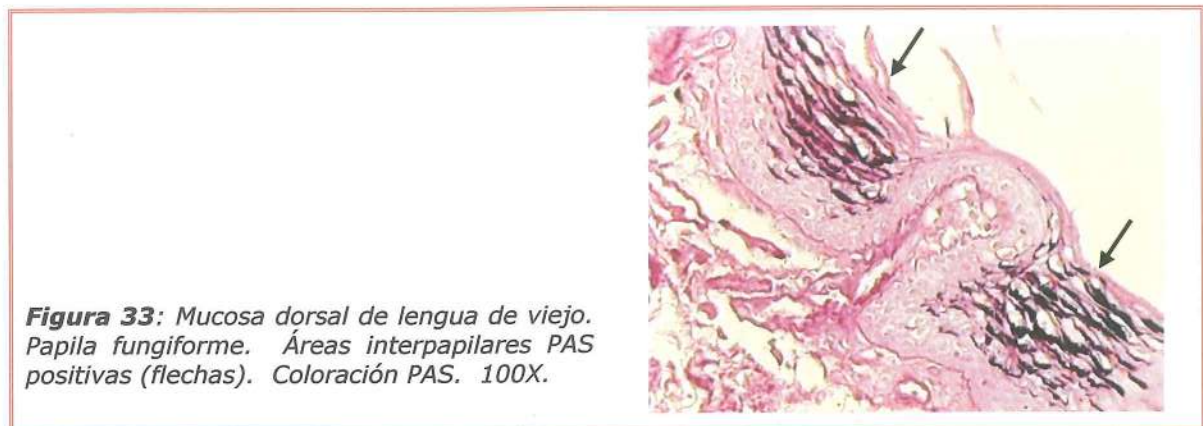
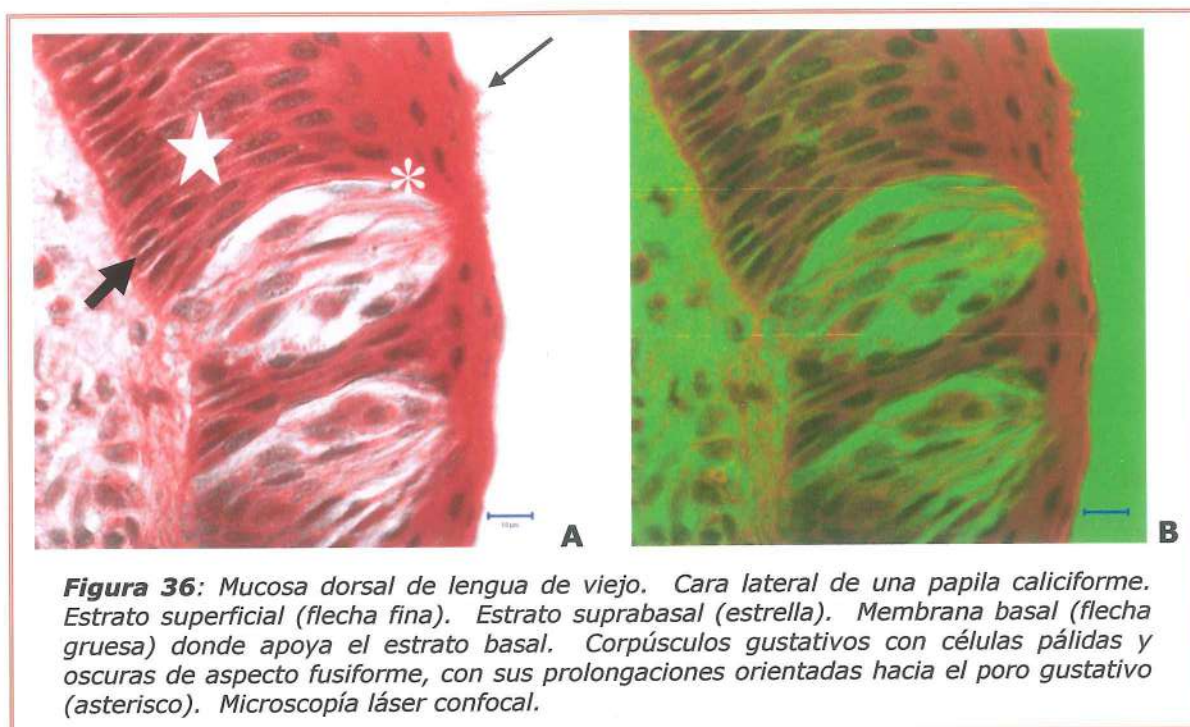




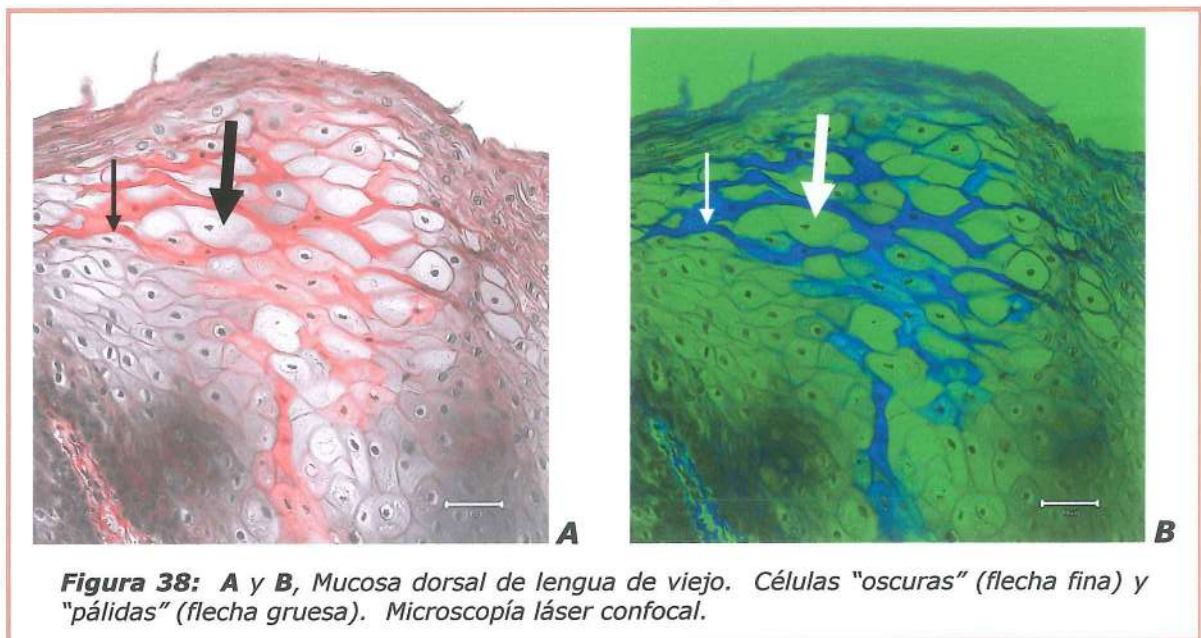
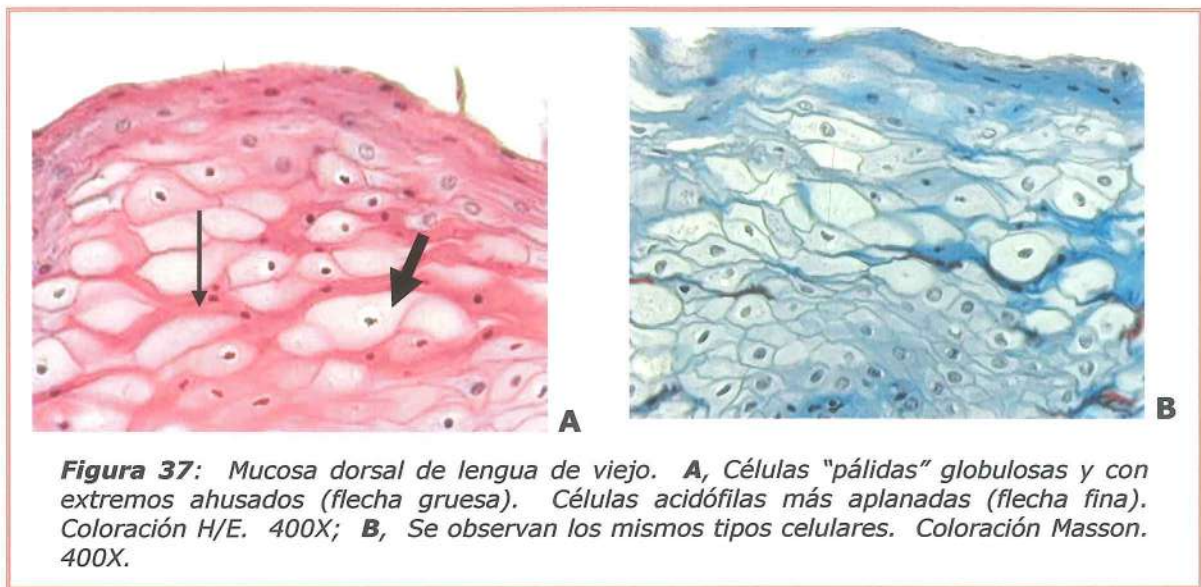
Figura 35: Se observa a mayor magnificación la superficie irregular de una papila fungiforme. Microscopía láser confocal.

Estas características estructurales se observaron en todas las muestras investigadas, sin embargo eran más manifiestas en los individuos de más edad en los que había pequeñas áreas apilares en la zona estudiada, cuya delimitación se especifica en Materiales y Métodos. Las papilas caliciformes eran semejantes a la edad anteriormente descrita, con corpúsculos gustativos localizados en las caras laterales que delimitan el surco circunvalador.

Con microscopia láser confocal se observaron en los corpúsculos gustativos los mismos tipos celulares que en las muestras de individuos adultos jóvenes, presentando algunos gránulos en los citoplasmas. (Figura 36).



En el epitelio dorsal por delante de la V lingual se destacaban nidos celulares formados por células acidófilas fusiformes con finas prolongaciones intercaladas con células pálidas con límites celulares marcados, globulosas, cuyos extremos afinados terminaban en pequeñas prolongaciones, ambas con núcleos de aspecto picnótico. En algunas células planas se observaba un marcado halo vacío perinuclear en tanto que en otras no se identificaron los núcleos. (Figura 37). Cuando estos nidos celulares se estudiaron con microscopía láser confocal las células eosinófilas tomaban un tinte oscuro y se observaba nítidamente que presentaban núcleos pequeños y densos, eran muy delgadas, con forma sumamente alargada con extensas y delicadas prolongaciones que abrazaban a manera de tentáculos a las células pálidas identificadas con H/E. (Figuras 38 y 39).



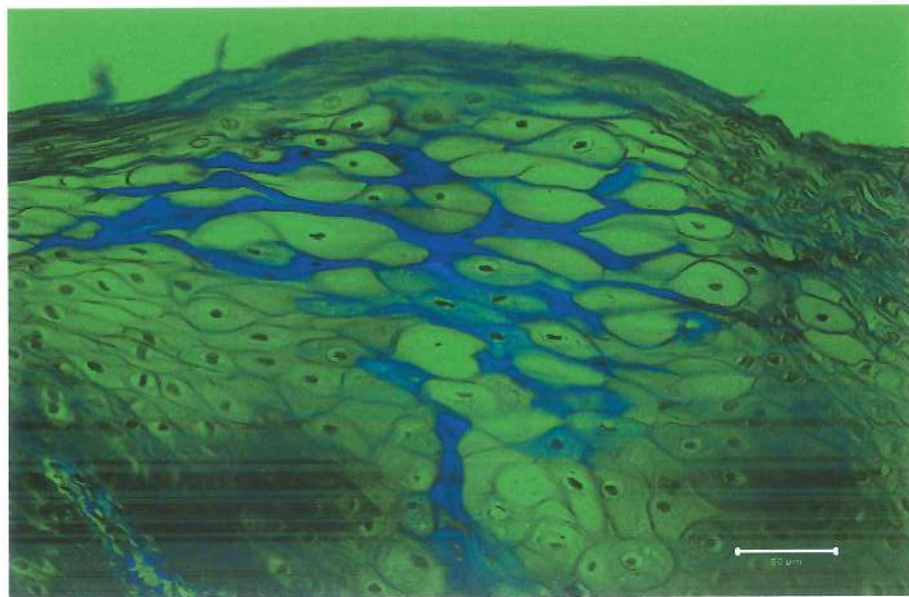
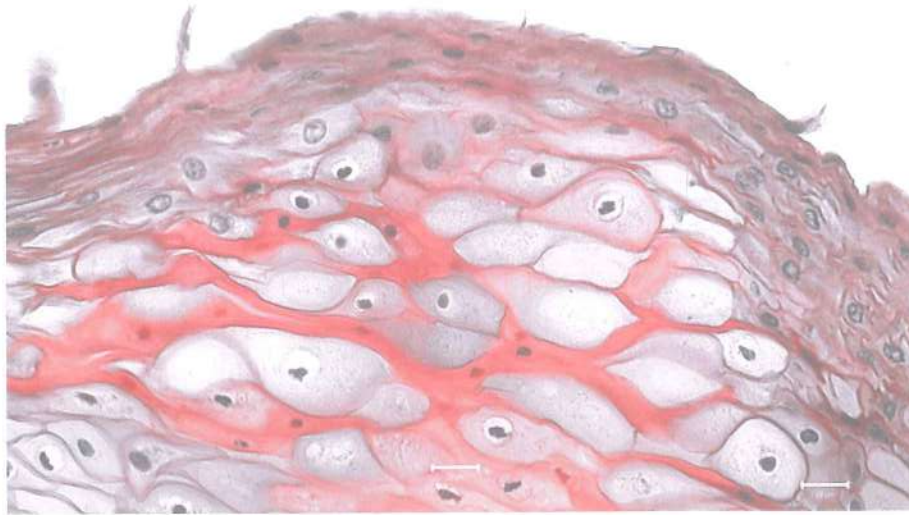
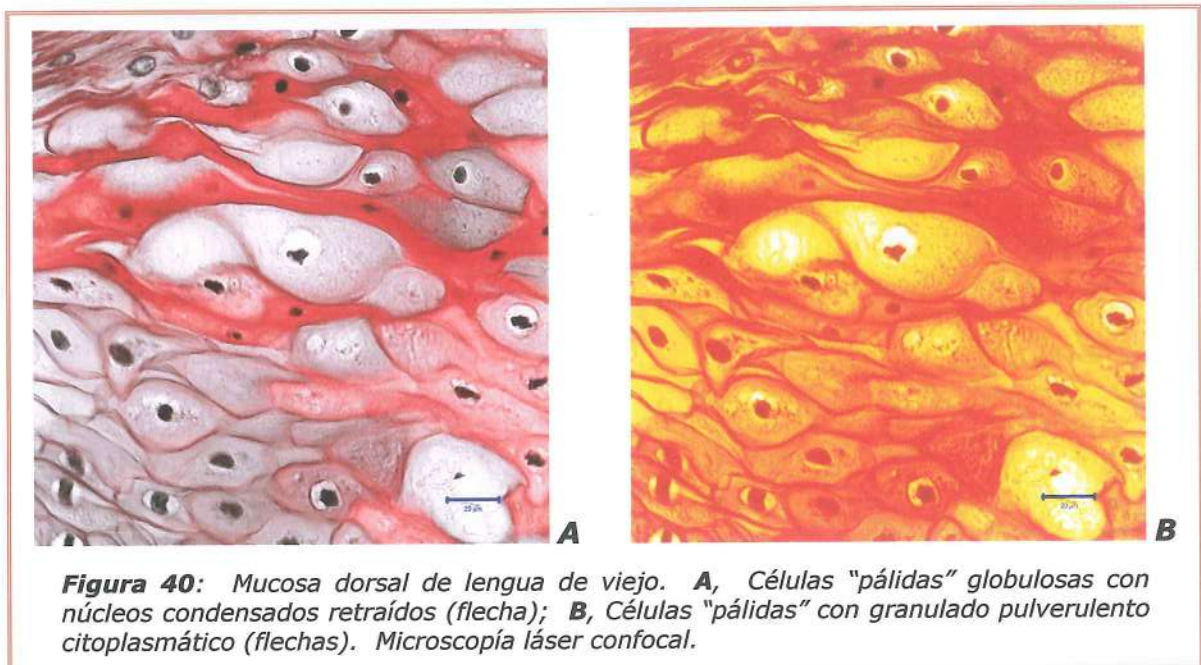


Figura 39: Detalle a mayor aumento de la figura 38. Microscopía láser confocal.

Estas células "oscuras" presentaban delicadas granulaciones intracitoplasmáticas.

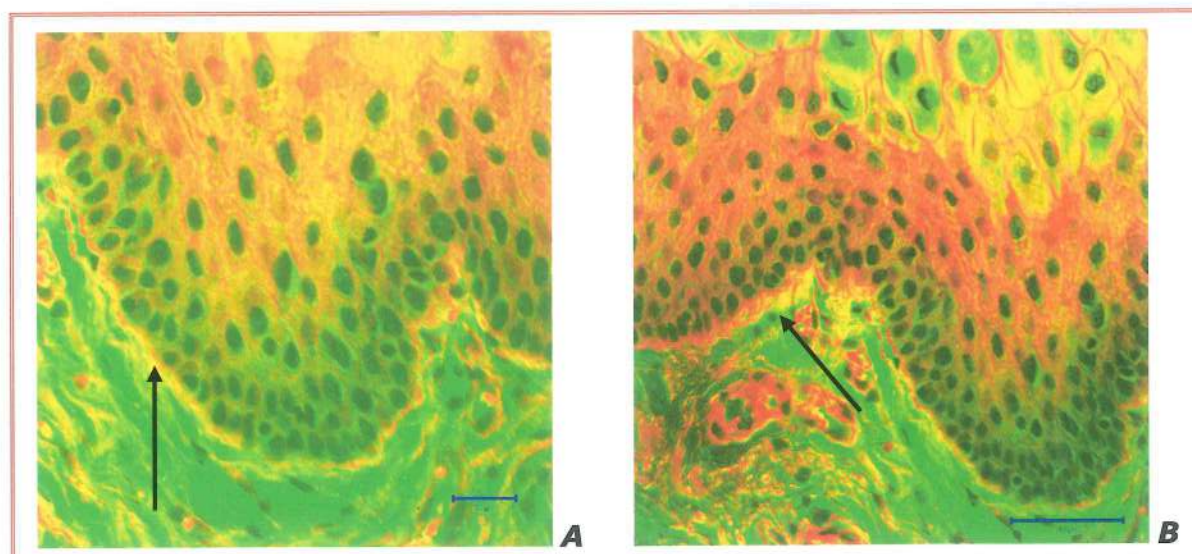
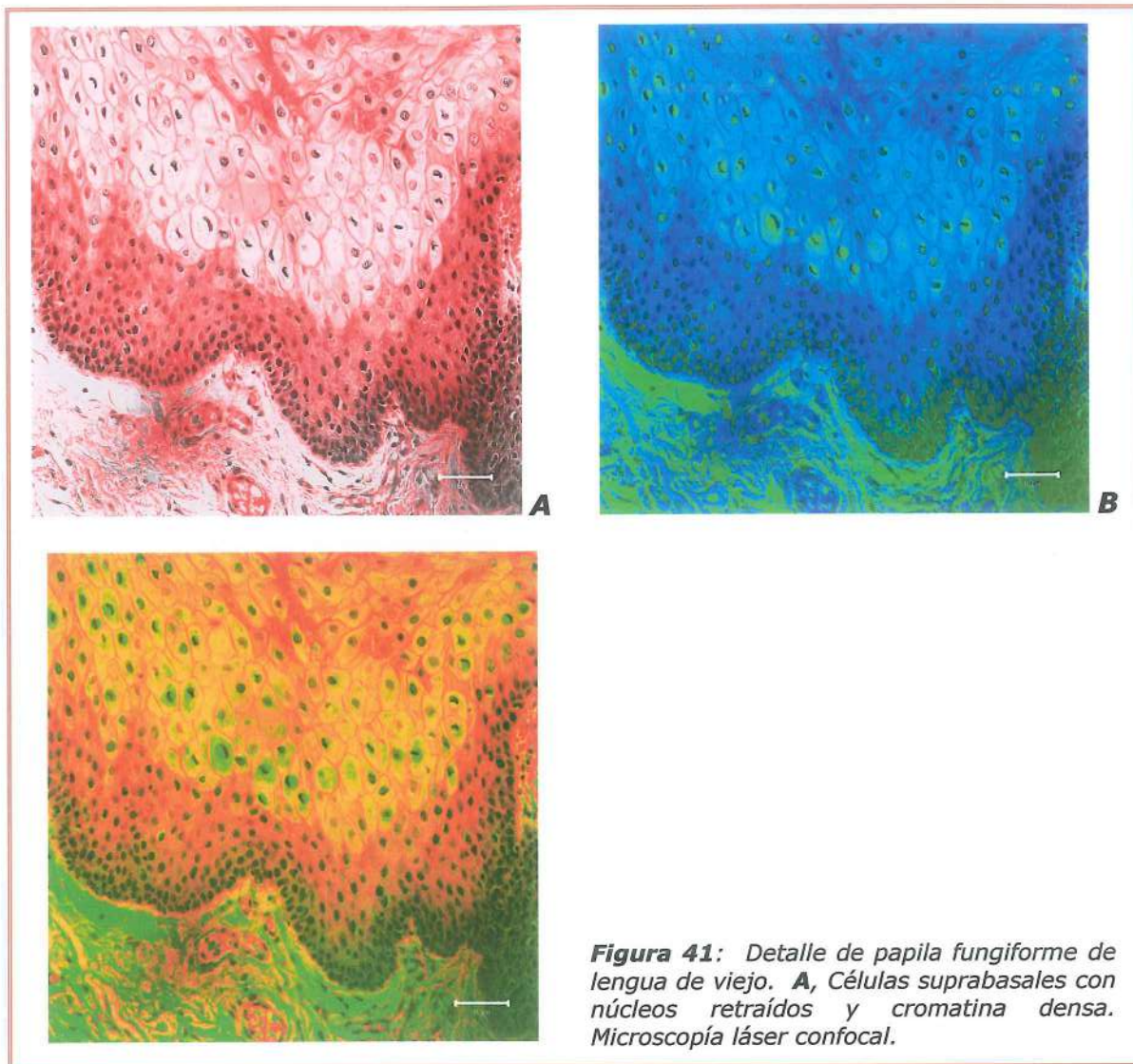
Las células "pálidas" eran globulosas y más grandes que las anteriores, con extremos ahusados pero de escasa longitud si se las comparaba con las

células oscuras. El citoplasma de estas células pálidas se encontraba ocupado por un importante granulado de aspecto pulverulento. Sus núcleos retraídos y de cromatina sumamente condensada estaban circunscriptos por un halo perinuclear con material de apariencia filamentososa y finamente granular. (Figura 40).



Estas características eran más evidentes en el 3º grupo de viejos (mayores de 79 años).

En la zona suprabasal de las papilas fungiformes las células presentaban núcleos retraídos y de cromatina densa, con un pequeño halo perinuclear. (Figura 41). El componente fibroso de la membrana basal era bien manifiesto. (Figura 42).



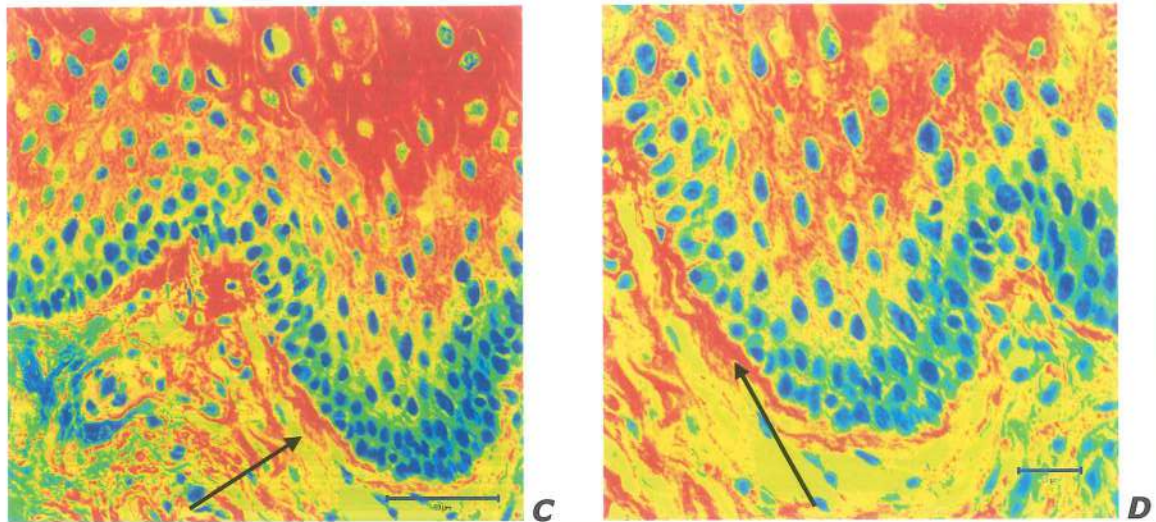


Figura 42: Mucosa dorsal de lengua de viejo. Se señala el componente fibroso de la membrana basal de una papila fungiforme. Microscopía láser confocal.

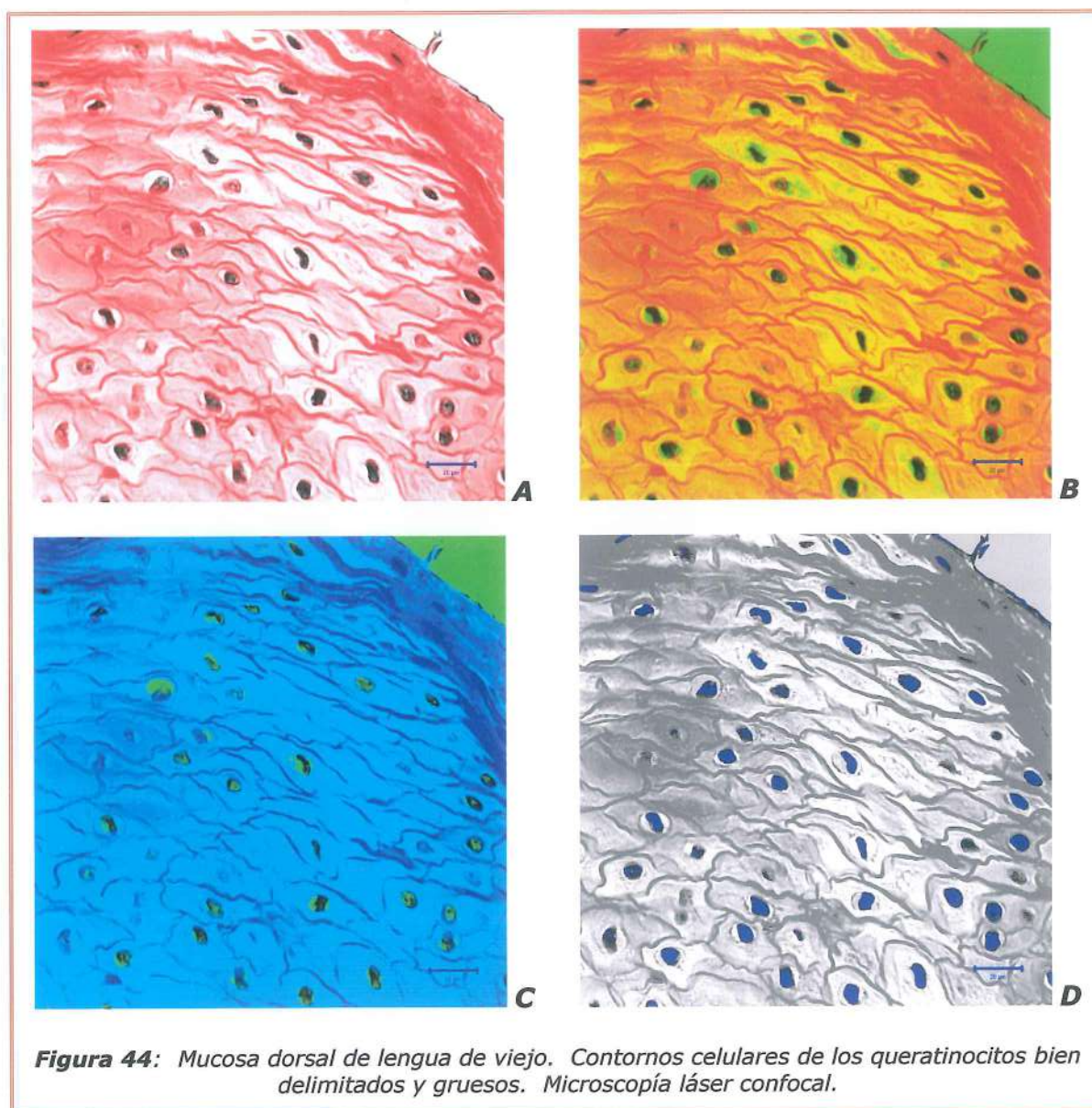
La coloración con la lectina WGA (wheat germ agglutinin), que marca el azúcar N-acetilglucosamina de la cubierta glicoproteica externa de la membrana celular nos permitió determinar las características de los contornos celulares, los que en algunas áreas eran sumamente irregulares y con abundantes interdigitaciones o pliegues entrantes y salientes de la superficie celular que se acoplaban con otras entrantes y salientes en las células adyacentes, contribuyendo a mantener la cohesión entre las células, a nivel de los estratos suprabasal y granuloso, aspecto estructural muy disímil a lo que sucedía en embriones y adultos jóvenes, ya que en estos últimos las interdigitaciones no eran tan marcadas. (Figura 43).



Con H/E se diferenciaban tres tipos celulares con interdigitaciones, debido al aspecto de sus núcleos, algunos con cromatina laxa, otros con cromatina densa y otros anucleados.

Con microscopía láser confocal se destacaban los contornos celulares que parecían dibujados, bien marcados y gruesos, con pronunciadas interdigitaciones y los núcleos retraídos, pequeños y densos. (Figura 44).

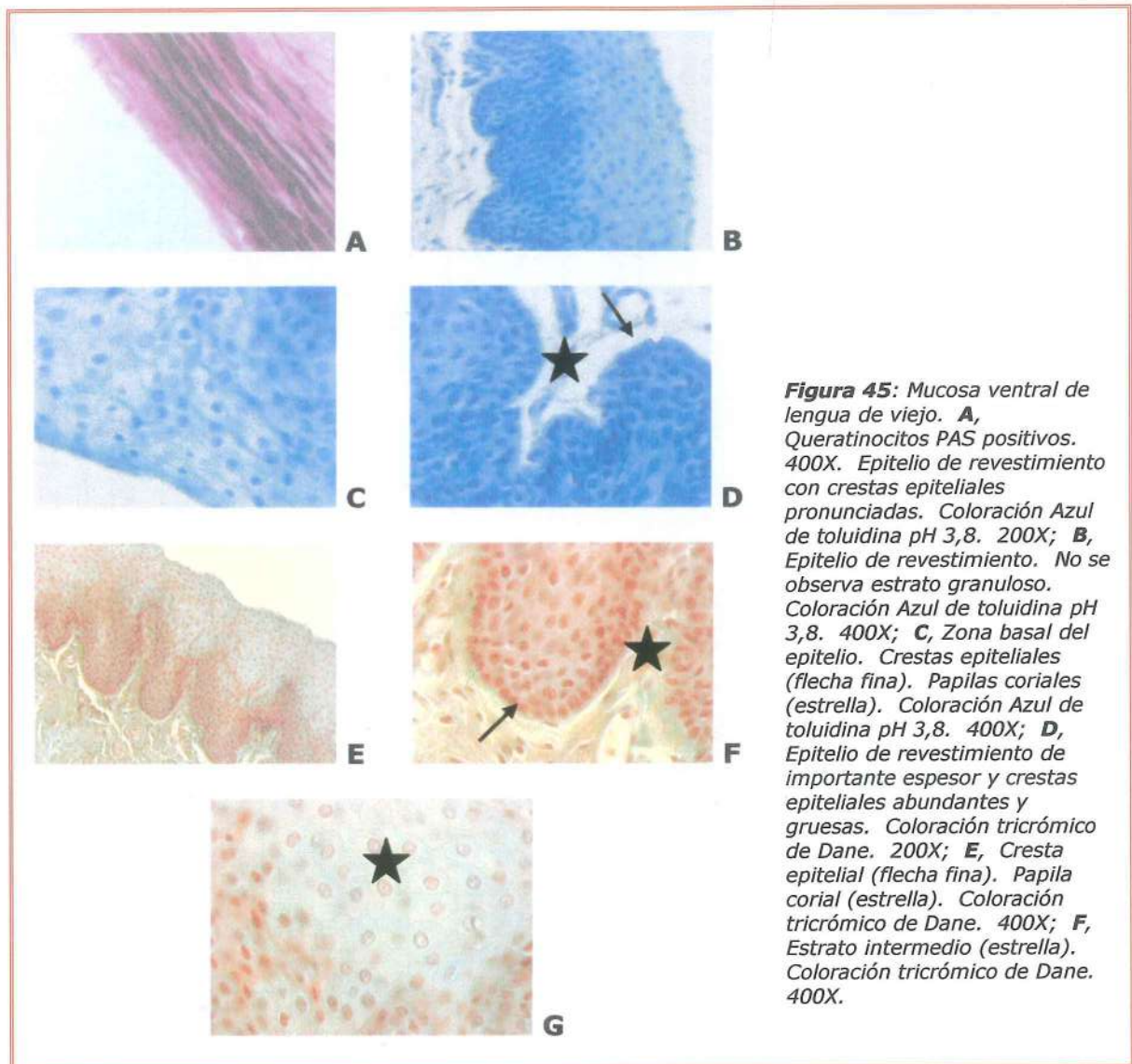
En el estrato superficial los contornos celulares eran lisos y las células escamosas estaban delimitadas por gruesas cubiertas celulares fuertemente coloreadas con lectina WGA. (Figura 43A).



En la raíz de la lengua no se observaron diferencias con la edad anteriormente presentada.

En la mucosa ventral se observó un epitelio de revestimiento plano estratificado no queratinizado con importante espesor, semejante al de los adultos jóvenes. Se identificaron los estratos basal con células basófilas, intermedio y superficial, formados por células de citoplasma claro con H/E, Azul de

toluidina y Dane, las que se colorearon intensamente con PAS. El estrato intermedio estaba formado por células de citoplasma pálido. (Figura 45).



La característica diferencial en relación al grupo de adultos jóvenes la constituyó la presencia de crestas epiteliales abundantes y gruesas y una capa o estrato suprabasal con células que desarrollaban interdigitaciones poco manifiestas.

SÍNTESIS: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA LENGUA

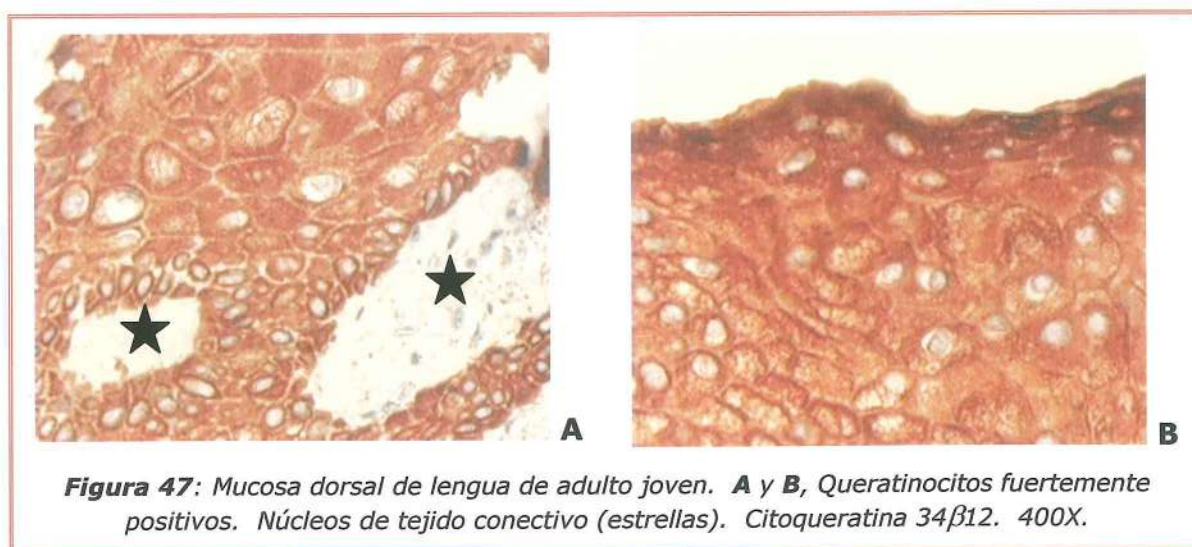
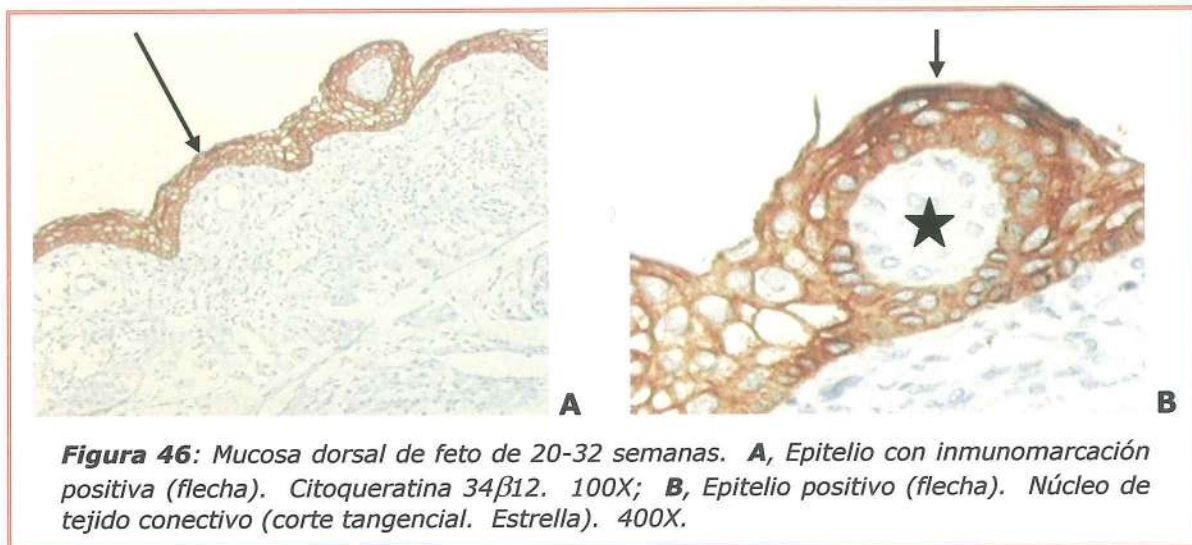
	SUPERFICIE DORSAL	SUPERFICIE VENTRAL
EDAD Desarrollo prenatal	<p>10-12 semanas: Epitelio plano estratificado no queratinizado con algunas proyecciones papilares incipientes.</p> <p>14 semanas: Proyecciones papilares más manifiestas.</p> <p>14-16 semanas: Estratificación epitelial notable. Papilas de apariencia fungiforme.</p> <p>16 semanas: Papilas caliciformes.</p> <p>20 semanas: Corpúsculos gustativos. Papilas filiformes: diferenciación más tardía.</p> <p>32 semanas: Epitelio PAS+ intenso.</p>	<p>10-12 semanas: Epitelio plano estratificado no queratinizado.</p> <p>14-16 semanas: Epitelio delgado apapilar PAS+. No hay crestas epiteliales ni papilas coriales.</p> <p>Ídem.</p> <p>Ídem.</p>
Adultos Jóvenes	<p>CUERPO</p> <p>Epitelio plano estratificado papilar: Epitelio interpapilar no queratinizado. Papilas filiformes: epitelio queratinizado sin corpúsculos gustativos. Papilas fungiformes: epitelio paraqueratinizado con parches de queratina en algunas papilas. Papilas coriales secundarias. Tejido conectivo no queratinizadas con botones gustativos en caras laterales. Papilas caliciformes no queratinizadas con botones gustativos en caras laterales. Papilas foliadas muy escasas. Epitelio no queratinizado.</p> <p>Corpúsculos gustativos (Microscopía confocal láser): Células intracorporales fusiformes con gránulos, prolongaciones cito-plasmáticas adelgazadas hacia el poro gustativo. Algunas con núcleos pálidos y alargados y otras con núcleos más oscuros y redondeados. Células basales proliferantes.</p>	<p>RAÍZ</p> <p>Mucosa tipo revestimiento (epitelio no queratinizado apapilar). Mayor espesor epitelial que en zona ventral. Infiltración linfocitaria intraepitelial. Crestas epiteliales poco marcadas.</p>
Viejos	<p>Epitelio papilar: no se observan papilas foliadas. Papilas filiformes: epitelio plano estratificado con importante espesor de queratina. Gránulos de queratohialina en capa granulosa con núcleos de cromatina densa, retraídos y halo perinuclear vacío. Papilas fungiformes: algunas paraqueratinizadas con parches de queratina. Superficie papilar irregular de aspecto festoneado. Estratos suprabasal y granuloso con abundantes interdigitaciones. Estrato granuloso manifiesto. Tejido conectivo subyacente con adipocitos. Pequeñas áreas apapilares. Papilas caliciformes semejantes a las de adultos jóvenes.</p> <p>Corpúsculos gustativos (Microscopía láser confocal): Tipos celulares semejantes a los de jóvenes con algunos gránulos citoplasmáticos. Nidos celulares con células acidófilas fusiformes, de finas prolongaciones y células pálidas globosas, con extremos afinados y pequeñas prolongaciones, ambas con núcleos picnóticos. Con microscopía láser confocal células oscuras muy delgadas, sumamente alargadas y extensas y delicadas prolongaciones que abrazan a las células pálidas con núcleos pequeños y densos y delicadas prolongaciones citoplasmáticas. Células pálidas globosas con extremos ahusados y citoplasma con gránulos de aspecto pulverulento. Núcleos retraídos de cromatina densa y halo perinuclear.</p>	<p>Epitelio de revestimiento no queratinizado PAS+. Crestas epiteliales poco marcadas.</p> <p>Epitelio de revestimiento plano estratificado no queratinizado de importante espesor. Abundantes y gruesas crestas epiteliales. Estrato epitelial suprabasal con interdigitaciones poco manifiestas.</p>

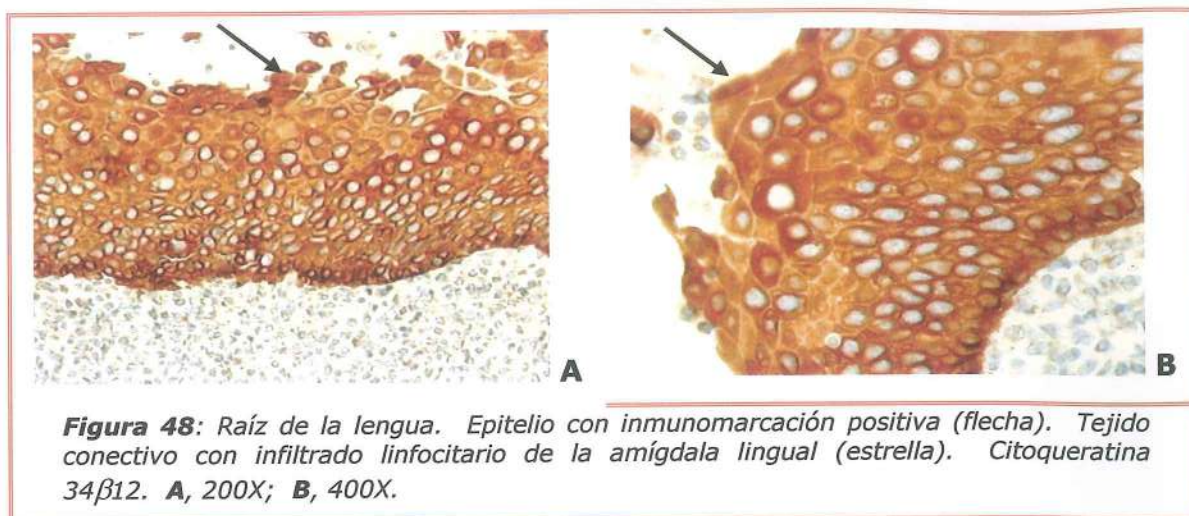


❖ INMUNOMARCACIÓN DEL EPITELIO LINGUAL CON CITOQUERATINAS

➤ Citoqueratina 34 β 12

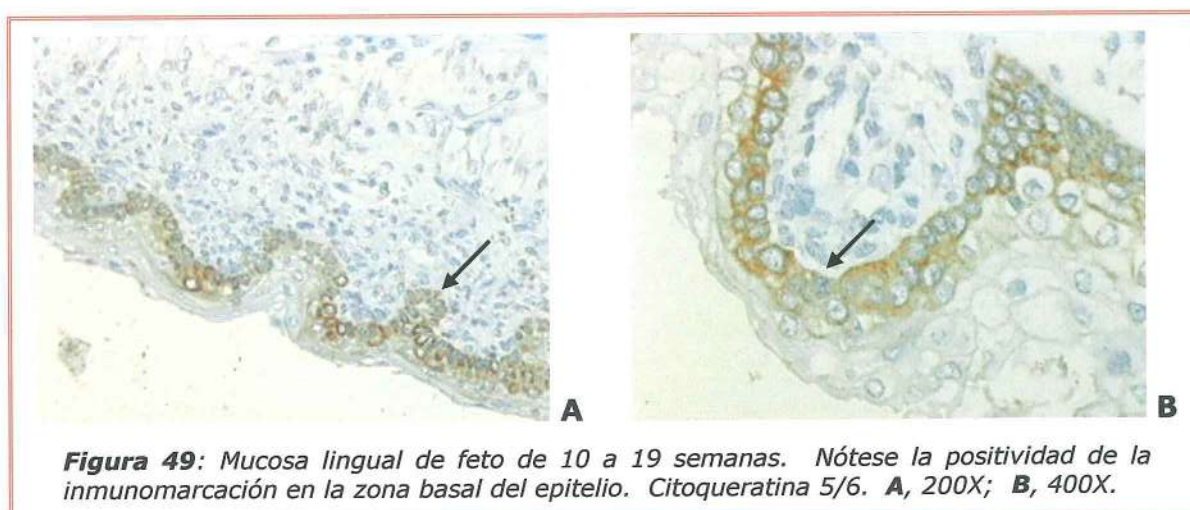
Se observó una intensa inmunomarcación homogénea en todas las edades pre y postnatales en todos los estratos celulares tanto del epitelio de la mucosa dorsal del dorso de la lengua como de la raíz y mucosa ventral. (Figuras 46, 47 y 48).





➤ Citoqueratinas 5/6

Desarrollo prenatal: En fetos de 10 a 19 semanas la mucosa lingual de la superficie dorsal presentó una fuerte positividad en el área basal resultando más débil hacia superficial (Figura 49).

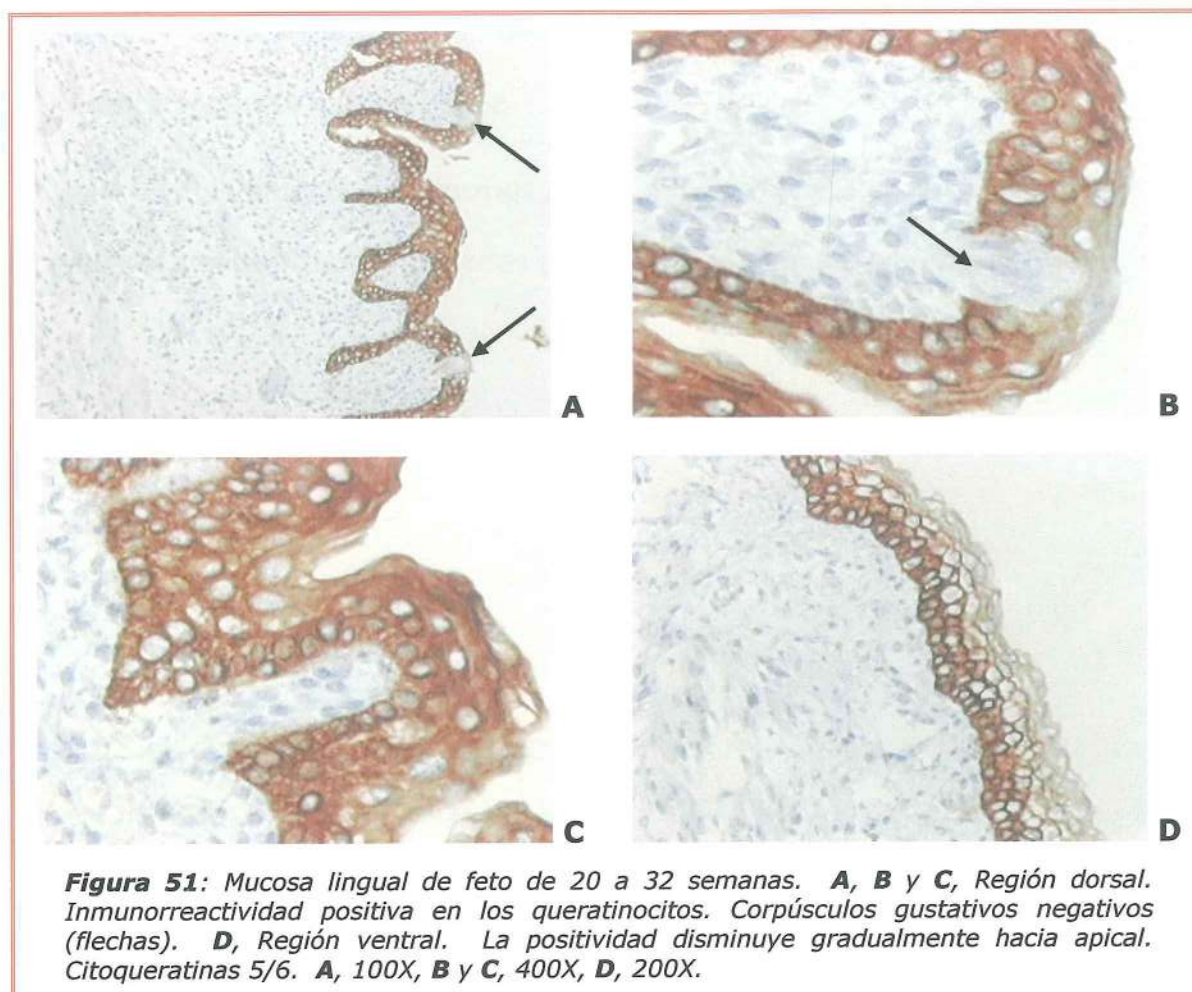


Por el contrario, en la región ventral de la lengua la marcación hacia basal era moderada siendo semejante a la dorsal en los estratos más superficiales (Figura 50).



Entre las 20 y 32 semanas la mucosa dorsal era positiva fuerte en todo el epitelio, con células que presentaban un intenso halo perinuclear inmunoreactivo. Los corpúsculos gustativos eran negativos. (Figura 51A, B y C).

La mucosa ventral mostró una marcación intensa en basal y supra-basal siendo menos marcada hacia superficial. (Figura 51D).

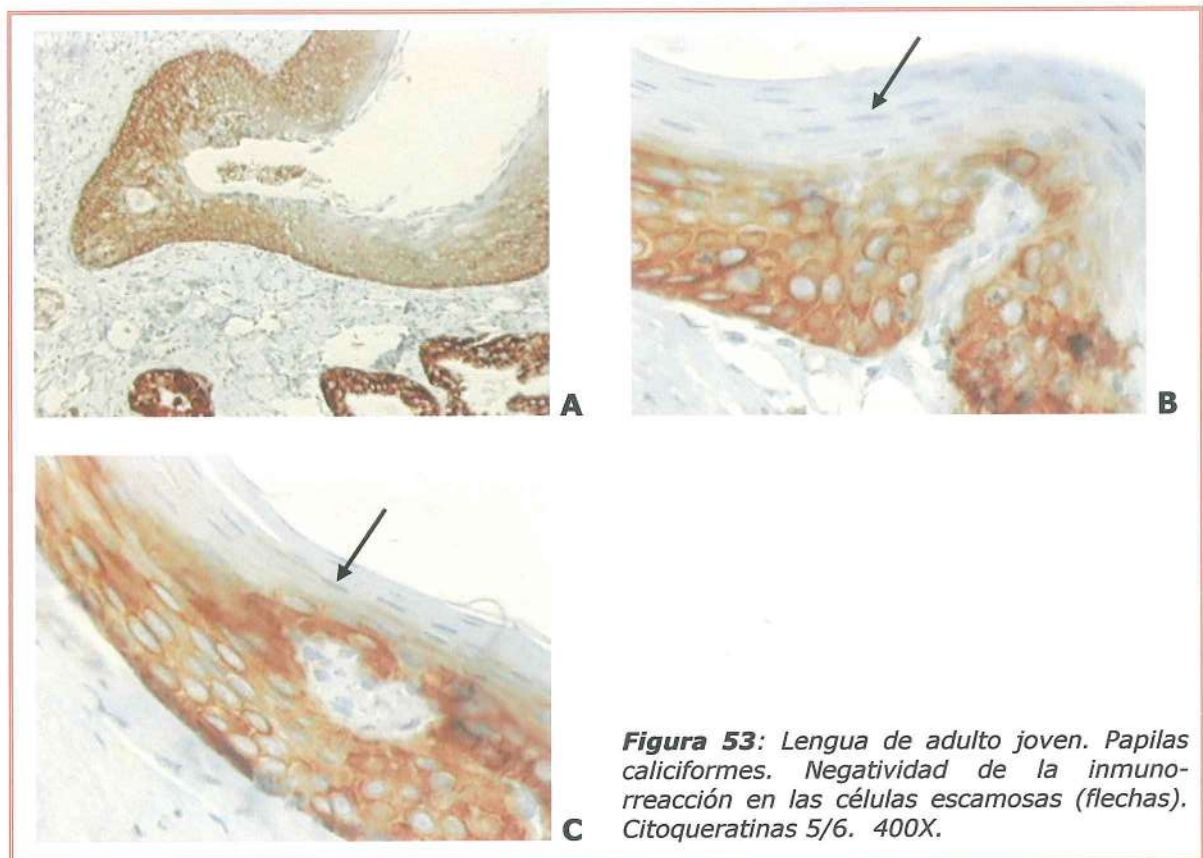


Adultos jóvenes: En la mucosa ventral la reacción positiva era más manifiesta en la zona basal, siendo débil a negativa en el resto de los estratos celulares (Figura 52).

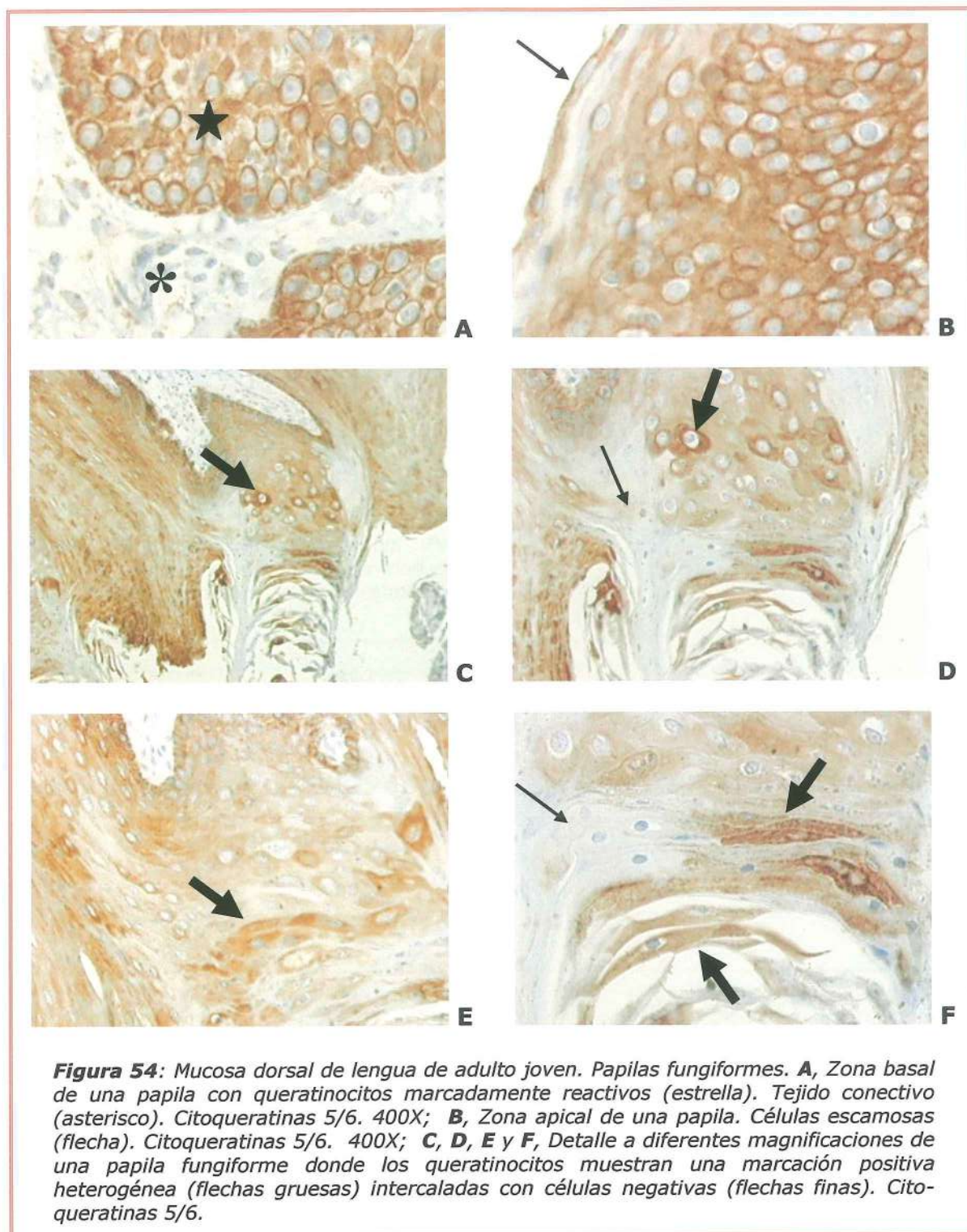


En la mucosa dorsal del cuerpo de la lengua la reacción resultó diferente según el tipo de papila.

En las papilas caliciformes era manifiestamente positiva excepto en las capas más superficiales formadas por células planas o escamosas. (Figura 53).



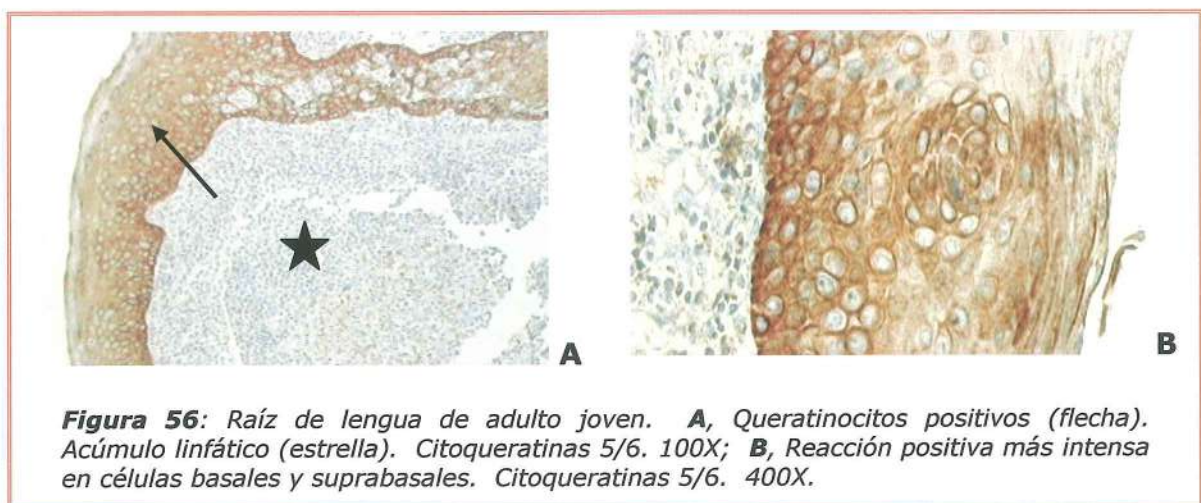
Por el contrario, las papilas fungiformes mostraron una marcación positiva heterogénea en todos los estratos celulares, los que presentaron una marcación más fuerte en las zonas basal y superficial en algunas papilas, mientras que en otras aparecía la reacción en todos los estratos celulares con células fuertemente marcadas intercaladas con otras negativas. (Figura 54).



Las papilas filiformes resultaron positivas en todos los estratos coloreándose a la manera de tres franjas donde la superior e inferior daban una reacción positiva que variaba de moderada a intensa y la media más débil. (Figura 55).



La raíz de la lengua presentó un epitelio con marcación positiva, la que era más intensa en las células del estrato basal y células suprabasales vecinas a las anteriores. (Figura 56).



Viejos: La reacción del epitelio en las papilas fungiformes fue semejante a lo observado en los adultos jóvenes. (Figura 57).

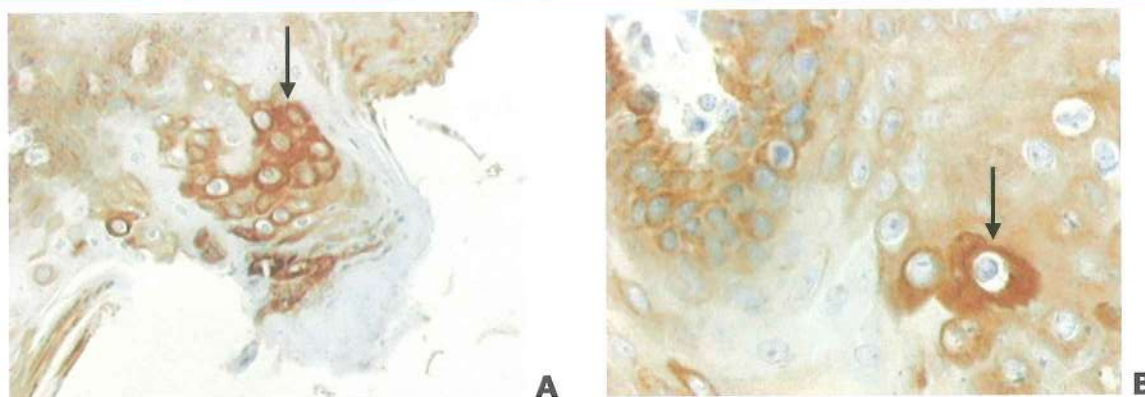


Figura 57: Mucosa dorsal de lengua de viejo. Papila fungiforme con marcación heterogénea de los queratinocitos (flechas). Citoqueratinas 5/6. **A**, 200X; **B**, 400X.

En las papilas caliciformes los queratinocitos se coloreaban débilmente aunque en sectores aparecían acúmulos celulares más intensamente coloreados siguiendo un patrón de distribución heterogéneo. (Figura 58).

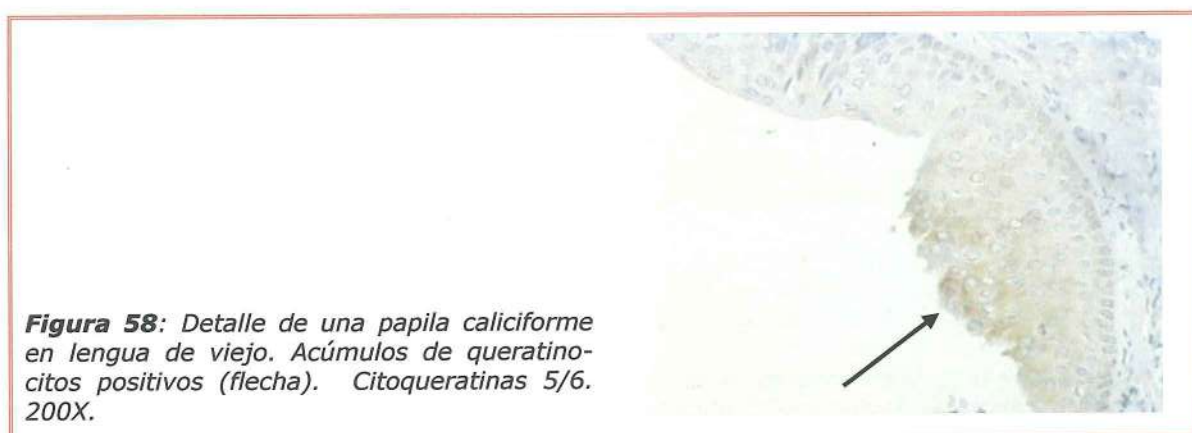


Figura 58: Detalle de una papila caliciforme en lengua de viejo. Acúmulos de queratinocitos positivos (flecha). Citoqueratinas 5/6. 200X.

➤ **Citoqueratina 19**

Desarrollo prenatal: Entre las 10 y 32 semanas de vida intrauterina no se observaron diferencias con la edad, contrariamente a lo que se sucedió con citoqueratinas 5/6, siendo positivas fundamentalmente las células que conformaban el estrato basal antes de la diferenciación papilar y posteriormente en los diferentes tipos de papilas de la mucosa dorsal y en la mucosa ventral. (Figura 59).

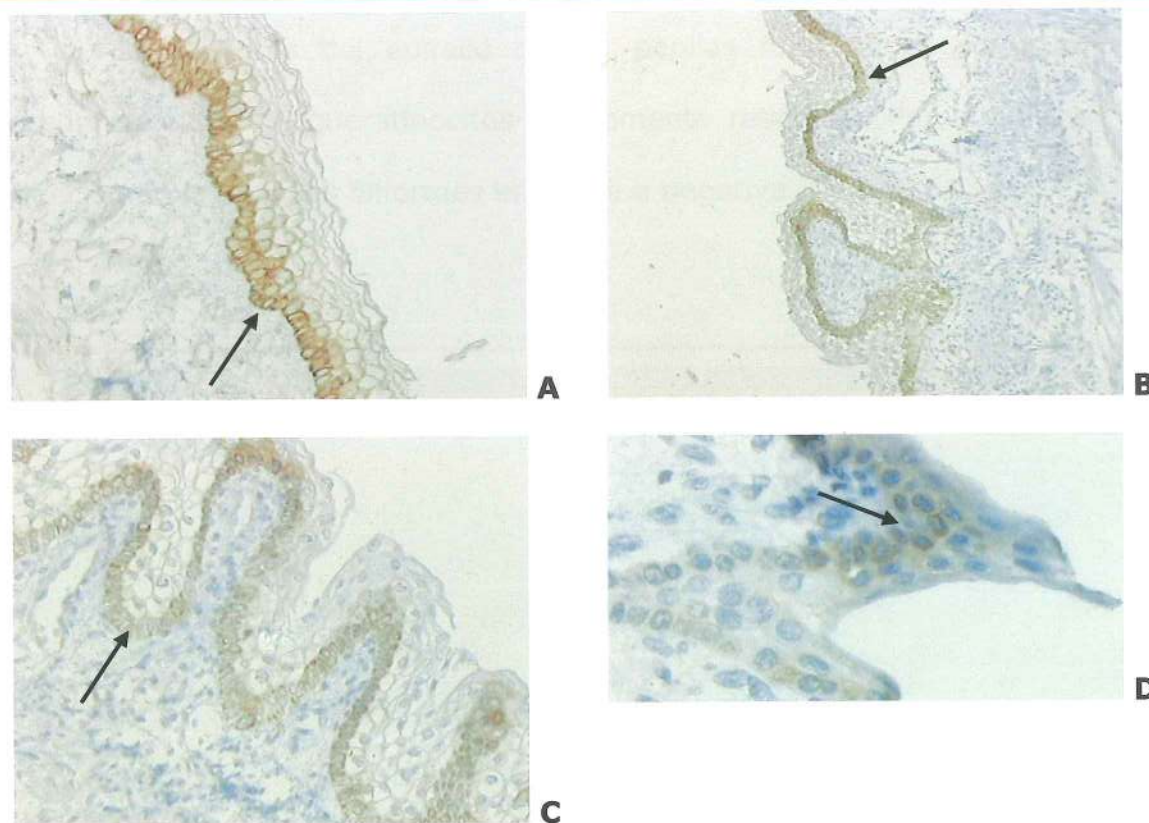
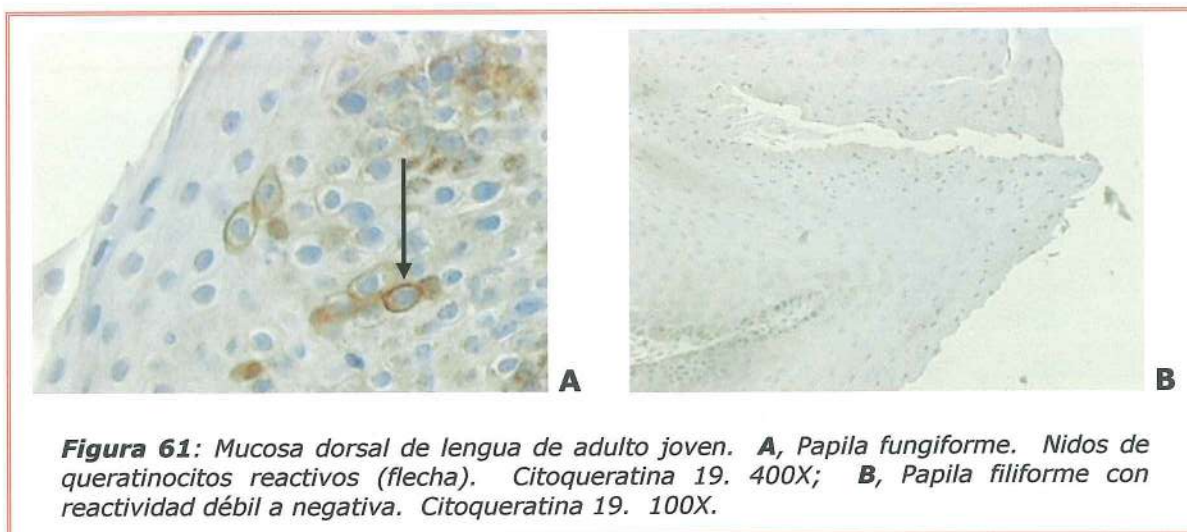


Figura 59: Lengua de feto de 10 a 32 semanas. **A**, Mucosa ventral; **B**, **C** y **D**, Mucosa dorsal. La reacción positiva se observa principalmente en las células de localización más basal (flechas). Citoqueratina 19. **A**, 200X; **B**, 100X; **C**, 200X; **D**, 400X.

Adultos jóvenes: La mucosa ventral resultó positiva moderada a débil en el estrato de células basales. (Figura 60).

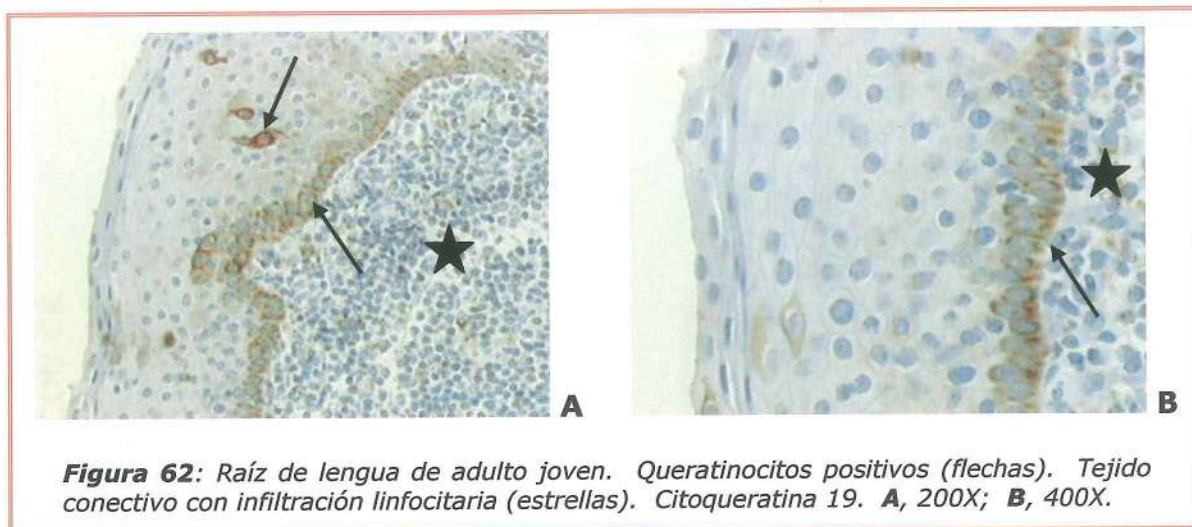


En sectores del epitelio de las papilas fungiformes se observaron pequeños nidos de queratinocitos fuertemente reactivos. Por el contrario, la reacción en las papilas filiformes era débil a negativa. (Figura 61).



En las papilas caliciformes la reacción copiaba el patrón de reacción observado con citoqueratinas 5/6.

En la raíz las células basales eran positivas al igual que algunas células del estrato superficial, estas últimas de manera aislada. (Figura 62).



Viejos: Reacciones similares se observaron en los individuos viejos. (Figura 63).





➤ SÍNTESIS: INMUNOMARCACIÓN DEL EPITELIO LINGUAL CON CK

CK 34 β 12	Intensa marcación homogénea en todas las edades prenatales y postnatales en todos los estratos celulares del epitelio de la mucosa dorsal (raíz y cuerpo) y ventral.
CK 5 / 6	<p>Desarrollo prenatal:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fetos de 10-19 semanas</i> <u>Mucosa dorsal</u>: positividad fuerte en el área basal. Positividad débil hacia superficial. <u>Mucosa ventral</u>: positividad moderada hacia basal. Positividad débil hacia superficial. • <i>Fetos de 20-32 semanas</i> <u>Mucosa dorsal</u>: positividad fuerte en el área basal. Positividad débil hacia superficial. <u>Mucosa ventral</u>: positividad moderada hacia basal. Positividad débil hacia superficial. <p>Adultos jóvenes</p> <p><u>Mucosa dorsal</u>: reactividad diferente según el tipo de papila. <u>Papilas calciformes</u>: Positividad manifiesta excepto en las células superficiales escamosas. <u>Papilas fungiformes</u>: Positividad heterogénea en todos los estratos celulares. <u>Papilas filiformes</u>: Positividad en todos los estratos, moderada a fuerte en las áreas basal y superficial y más débil en el área media. <u>Raíz</u>: Epitelio positivo con fuerte reactividad hacia basal y suprabasal. <u>Mucosa ventral</u>: Positividad más manifiesta en basal y negativa en el resto de los estratos celulares.</p> <p>Viejos</p> <p><u>Mucosa dorsal</u>: Papilas fungiformes con reactividad semejante a las de adultos jóvenes. <u>Papilas calciformes</u> con positividad débil y parches de queratinocitos con positividad fuerte. Reactividad semejante a adultos jóvenes en raíz y mucosa ventral.</p>
CK 19	<p>Desarrollo prenatal</p> <p><u>10 a 32 semanas</u>: no se observaron diferencias. Positividad fundamentalmente en las células basales antes de la diferenciación papilar y en las células basales papilares de la mucosa dorsal. Ídem en raíz y mucosa ventral.</p> <p>Adultos jóvenes</p> <p><u>Mucosa dorsal</u>: Papilas fungiformes con epitelio que presenta nidos de queratinocitos fuertemente reactivos <u>Papilas filiformes</u>: Positividad débil o negativas. <u>Papilas calciformes</u>: Reactividad semejante a CK 5/6. <u>Raíz</u>: Células basales positivas y superficiales positivas aisladas. <u>Mucosa ventral</u>: Positividad moderada a débil en el estrato basal.</p> <p>Viejos</p> <p>Reacciones semejantes a las de adultos jóvenes.</p>

❖ ESTUDIO MORFOMÉTRICO

Cuando se comparó el número de núcleos/ $10^{-1} \mu\text{m}^2$, en el sector dorsal del epitelio de las muestras de lengua de los embriones humanos, se observó un número de núcleos/ $10^{-1} \mu\text{m}^2$ 1.8 veces mayor que en el epitelio de las muestras de lengua del mismo sector de los adultos jóvenes ($p=0.0367$) (Tabla, Figura 64A).

Mientras que los sectores dorsal y ventral en cada grupo estudiado no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el número de núcleos/ $10^{-1} \mu\text{m}^2$ ($p>0.05$) (Tabla, Figura 64B)

Tabla 1: Promedio y desvío estándar del número de núcleos por $10^{-1} \mu\text{m}^2$ en muestras de mucosa lingual según edad y sectores

Edad	Sector	Número de Núcleos/$10^{-1} \mu^2$ (media \pm DE)
Embrión	Dorsal	9,82 \pm 3,51
	Ventral	7,07 \pm 1,6
Adulto Joven	Dorsal	5,36 \pm 1,28
	Ventral	5,46 \pm 3,49
Viejo	Dorsal	7,47 \pm 2,42
	Ventral	6,02 \pm 2,09

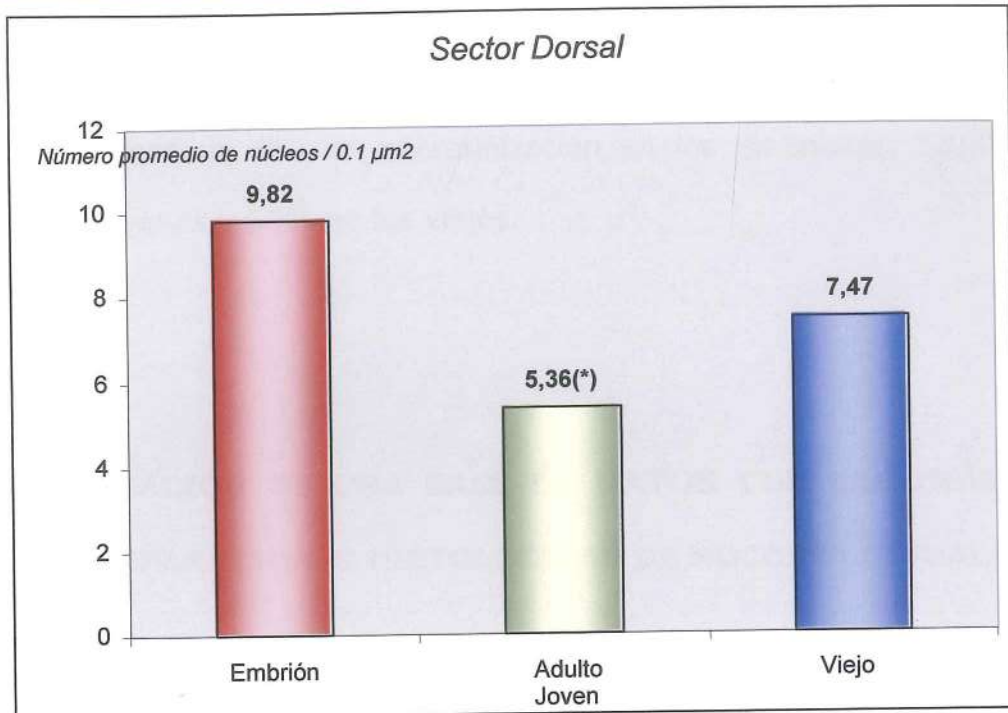
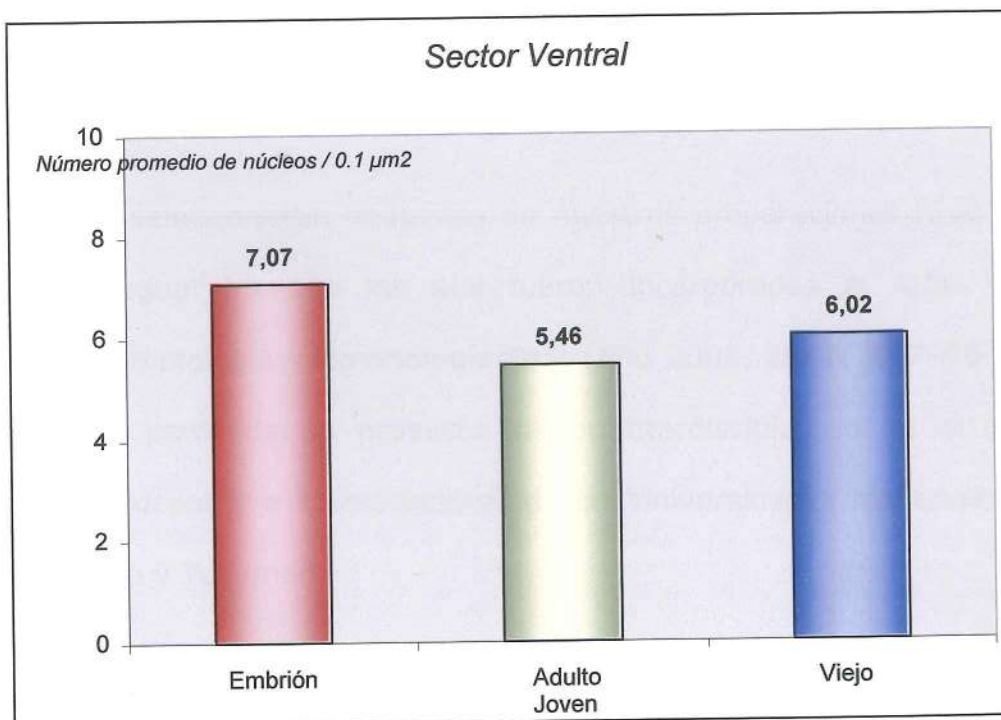
**A****B**

Figura 64: Número promedio de núcleos / $10^{-1} \mu\text{m}^2$ en el sector dorsal (A) y ventral (B) de la mucosa lingual de embriones, adultos jóvenes y viejos. (*)Indica diferencias estadísticamente significativas entre los estadios embrionario, adulto joven, viejo.

En relación a la queratinización de la mucosa, ésta se evaluó como presencia/ausencia de queratina en cualquiera de los dos sectores estudiados, observándose un 0% de queratinización en los embriones, 53.33% en los adultos jóvenes y 60% en los viejos.

❖ **CREACIÓN DE UNA BASE DE DATOS CON LAS IMÁGENES DE PREPARACIONES HISTOLÓGICAS DE MUCOSA LINGUAL**

Dentro de los objetivos específicos de nuestro trabajo, nos fijamos crear una base de datos con las imágenes histológicas obtenidas, para su uso en la docencia de grado y post-grado relacionada con la temática del órgano lingual.

Se seleccionaron imágenes de nuestras preparaciones histológicas de mucosa lingual humana las que fueron incorporadas al Atlas digital de Anatomía, Histología y Embriología Oral (Año 2005, **ISBN 987-05-0141-9**), que forma parte de un proyecto mayor interdisciplinario en el que participamos docentes e investigadores de las Universidades Nacionales de Córdoba, Cuyo y Tucumán.

Ya que como es sabido que las imágenes histológicas refuerzan la comprensión de la información escrita y facilitan la observación de las prácticas y, teniendo presente que no contamos con material iconográfico a nivel masivo sobre el desarrollo y estructura de los tejidos dentarios, peridentarios y sistema estomatognático, realizamos el Atlas en soporte CD-

ROM, con el objetivo de reforzar su estudio con imágenes microscópicas, radiológicas y clínicas, normales y patológicas, que permiten transferir e integrar los conocimientos aportados por las Ciencias Morfológicas en la investigación, la enseñanza y la práctica clínica. Esto es, la enseñanza de las Ciencias Morfológicas clínicamente orientada como recomienda la Organización Panamericana de la Salud.

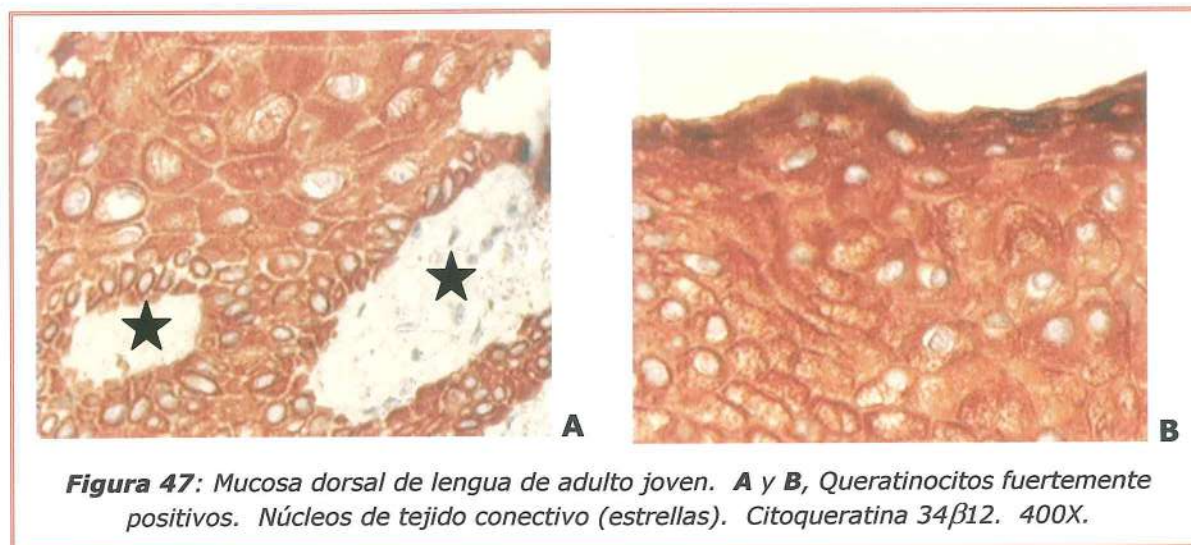
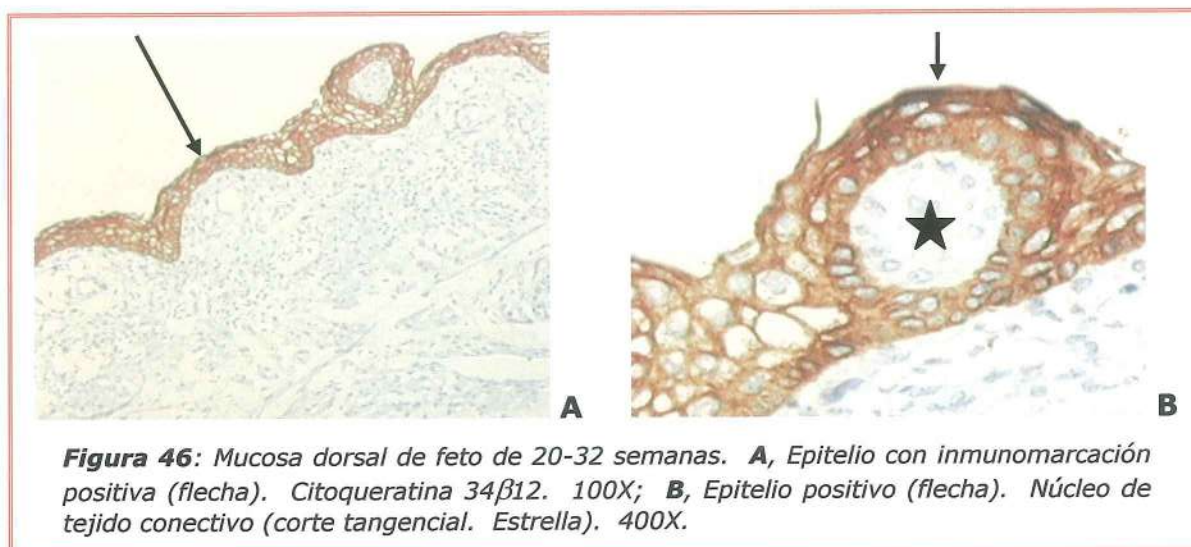
Las imágenes se digitalizaron con un analizador de imágenes con el programa Image Pro-Plus.

Este Atlas compitió en **VIDEOMED 2005. 5º Festival Internacional de Cine Médico y Científico. Consejo de Médicos de la Provincia de Córdoba. World Association of Medical and Health Films, siendo distinguido con la **Mención a la calidad docente.** Categoría multimedia. Octubre 2005.**

❖ INMUNOMARCACIÓN DEL EPITELIO LINGUAL CON CITOQUERATINAS

➤ Citoqueratina 34β12

Se observó una intensa inmunomarcación homogénea en todas las edades pre y postnatales en todos los estratos celulares tanto del epitelio de la mucosa dorsal del dorso de la lengua como de la raíz y mucosa ventral. (Figuras 46, 47 y 48).



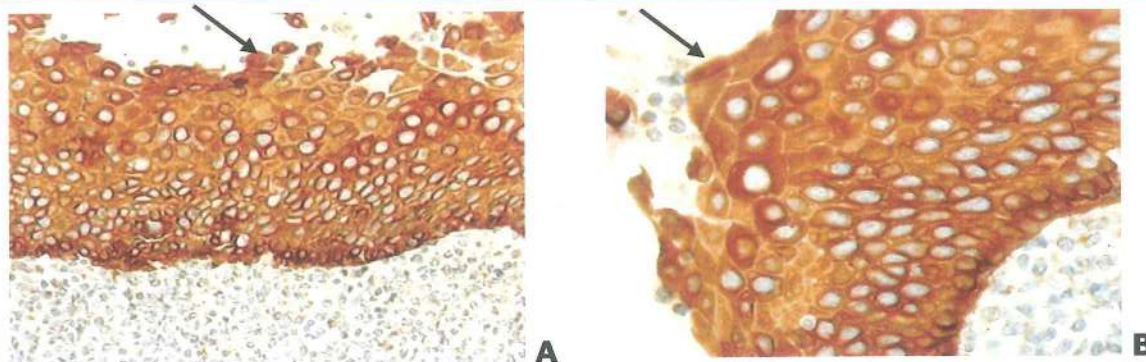


Figura 48: Raíz de la lengua. Epitelio con inmunomarcación positiva (flecha). Tejido conectivo con infiltrado linfocitario de la amígdala lingual (estrella). Citoqueratina 34 β 12. **A**, 200X; **B**, 400X.

➤ Citoqueratinas 5/6

Desarrollo prenatal: En fetos de 10 a 19 semanas la mucosa lingual de la superficie dorsal presentó una fuerte positividad en el área basal resultando más débil hacia superficial (Figura 49).

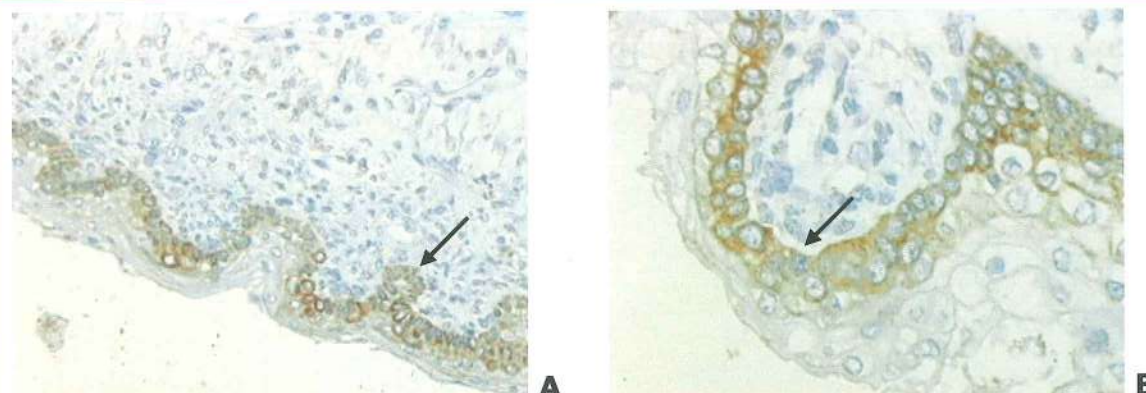
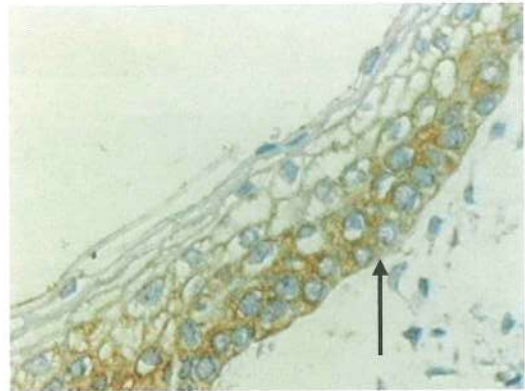


Figura 49: Mucosa lingual de feto de 10 a 19 semanas. Nótese la positividad de la inmunomarcación en la zona basal del epitelio. Citoqueratina 5/6. **A**, 200X; **B**, 400X.

Por el contrario, en la región ventral de la lengua la marcación hacia basal era moderada siendo semejante a la dorsal en los estratos más superficiales (Figura 50).

Figura 50: Región ventral de lengua de feto de 10 a 19 semanas. Marcación positiva moderada en la zona basal. Citoqueratina 5/6. 200X.



Entre las 20 y 32 semanas la mucosa dorsal era positiva fuerte en todo el epitelio, con células que presentaban un intenso halo perinuclear inmunoreactivo. Los corpúsculos gustativos eran negativos. (Figura 51A, B y C).

La mucosa ventral mostró una marcación intensa en basal y supra-basal siendo menos marcada hacia superficial. (Figura 51D).

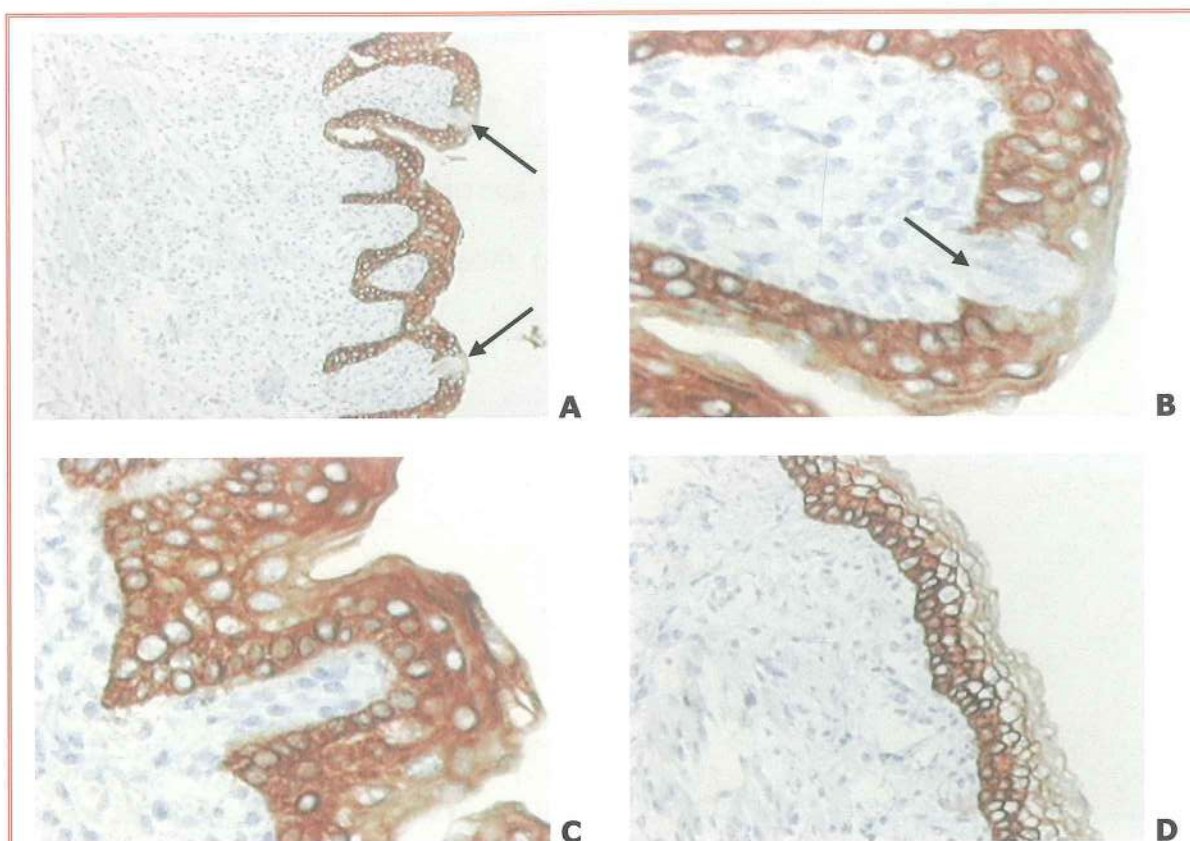


Figura 51: Mucosa lingual de feto de 20 a 32 semanas. **A, B** y **C**, Región dorsal. Inmunorreactividad positiva en los queratinocitos. Corpúsculos gustativos negativos (flechas). **D**, Región ventral. La positividad disminuye gradualmente hacia apical. Citoqueratinas 5/6. **A**, 100X, **B** y **C**, 400X, **D**, 200X.

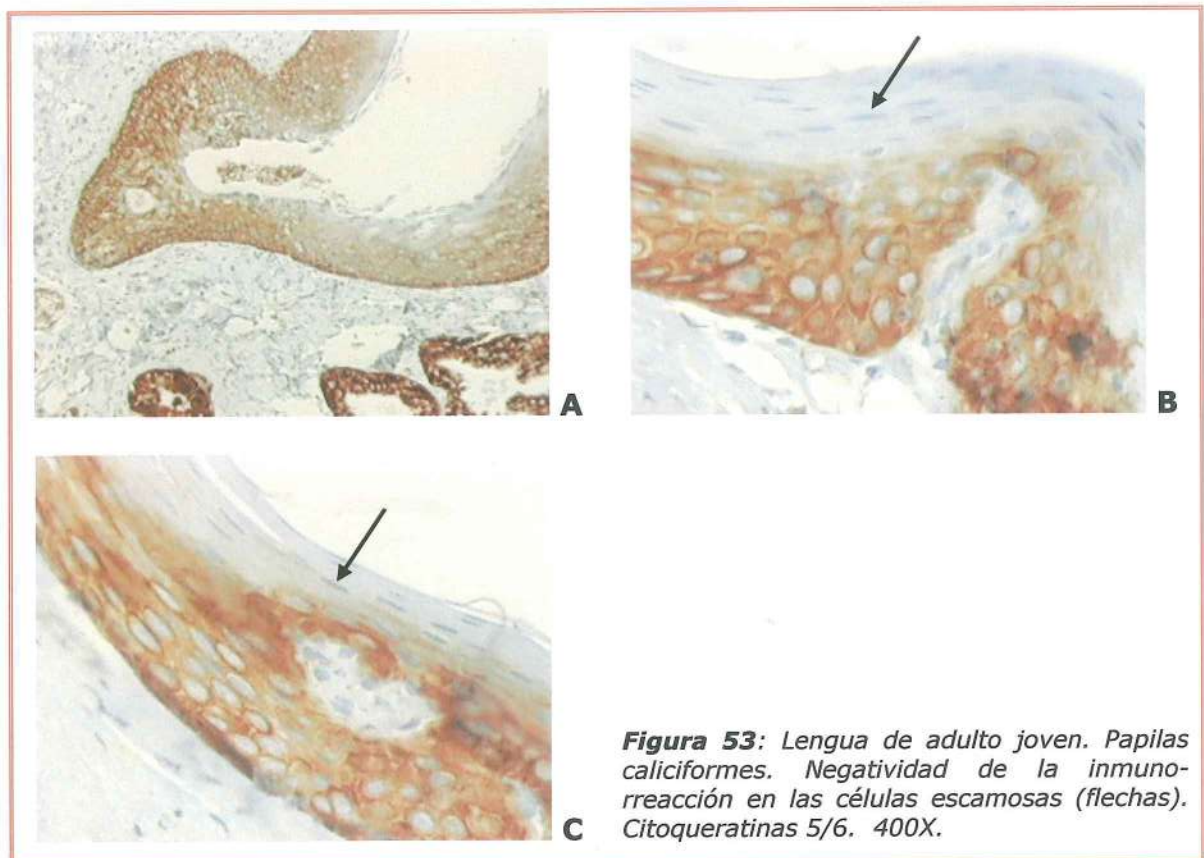
Adultos jóvenes: En la mucosa ventral la reacción positiva era más manifiesta en la zona basal, siendo débil a negativa en el resto de los estratos celulares (Figura 52).



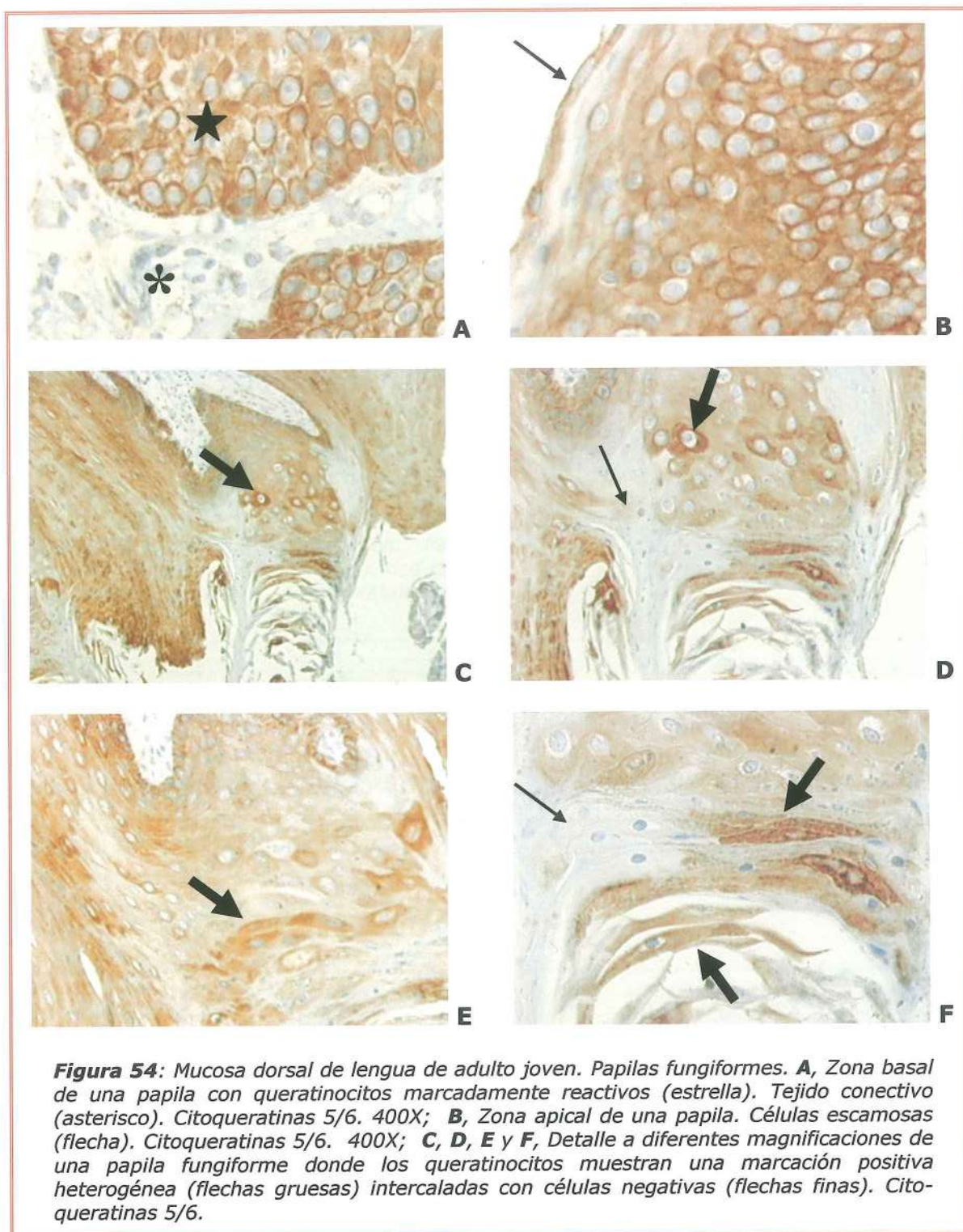
Figura 52: Mucosa lingual ventral de adulto joven. Reacción positiva más intensa en la zona basal (flecha). Citoqueratinas 5/6. 200X.

En la mucosa dorsal del cuerpo de la lengua la reacción resultó diferente según el tipo de papila.

En las papilas caliciformes era manifiestamente positiva excepto en las capas más superficiales formadas por células planas o escamosas. (Figura 53).



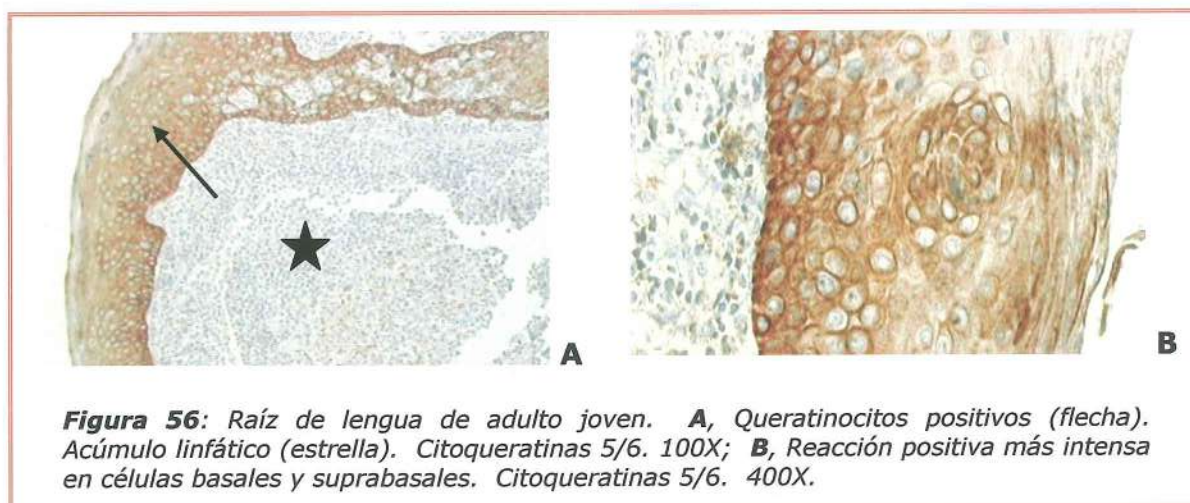
Por el contrario, las papilas fungiformes mostraron una marcación positiva heterogénea en todos los estratos celulares, los que presentaron una marcación más fuerte en las zonas basal y superficial en algunas papilas, mientras que en otras aparecía la reacción en todos los estratos celulares con células fuertemente marcadas intercaladas con otras negativas. (Figura 54).



Las papilas filiformes resultaron positivas en todos los estratos coloreándose a la manera de tres franjas donde la superior e inferior daban una reacción positiva que variaba de moderada a intensa y la media más débil. (Figura 55).



La raíz de la lengua presentó un epitelio con marcación positiva, la que era más intensa en las células del estrato basal y células suprabasales vecinas a las anteriores. (Figura 56).



Viejos: La reacción del epitelio en las papilas fungiformes fue semejante a lo observado en los adultos jóvenes. (Figura 57).

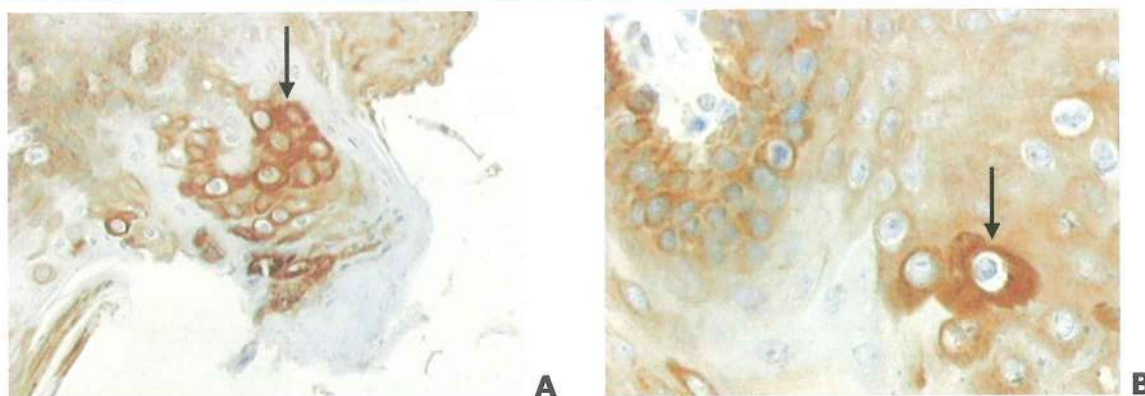


Figura 57: Mucosa dorsal de lengua de viejo. Papila fungiforme con marcación heterogénea de los queratinocitos (flechas). Citoqueratinas 5/6. **A**, 200X; **B**, 400X.

En las papilas caliciformes los queratinocitos se coloreaban débilmente aunque en sectores aparecían acúmulos celulares más intensamente coloreados siguiendo un patrón de distribución heterogéneo. (Figura 58).

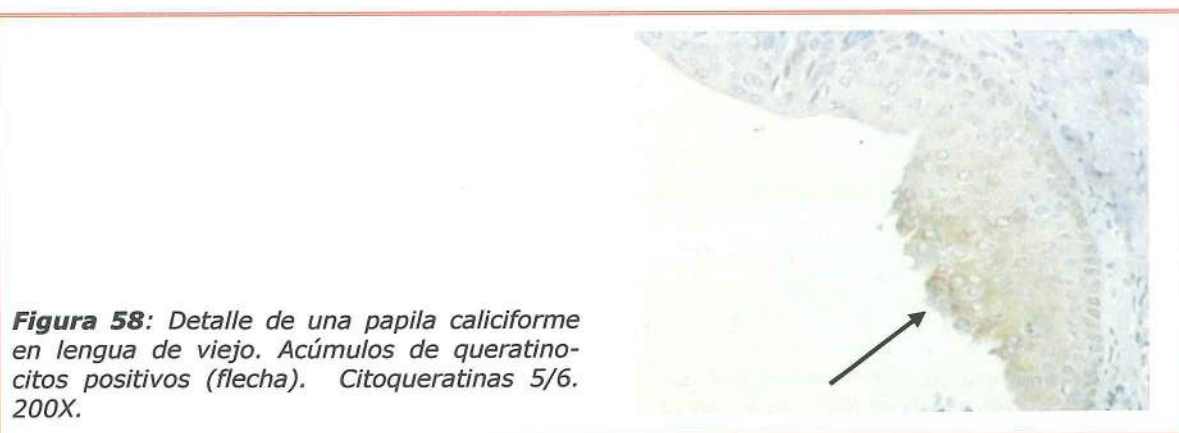


Figura 58: Detalle de una papila caliciforme en lengua de viejo. Acúmulos de queratinocitos positivos (flecha). Citoqueratinas 5/6. 200X.

➤ Citoqueratina 19

Desarrollo prenatal: Entre las 10 y 32 semanas de vida intrauterina no se observaron diferencias con la edad, contrariamente a lo que se sucedió con citoqueratinas 5/6, siendo positivas fundamentalmente las células que conformaban el estrato basal antes de la diferenciación papilar y posteriormente en los diferentes tipos de papilas de la mucosa dorsal y en la mucosa ventral. (Figura 59).

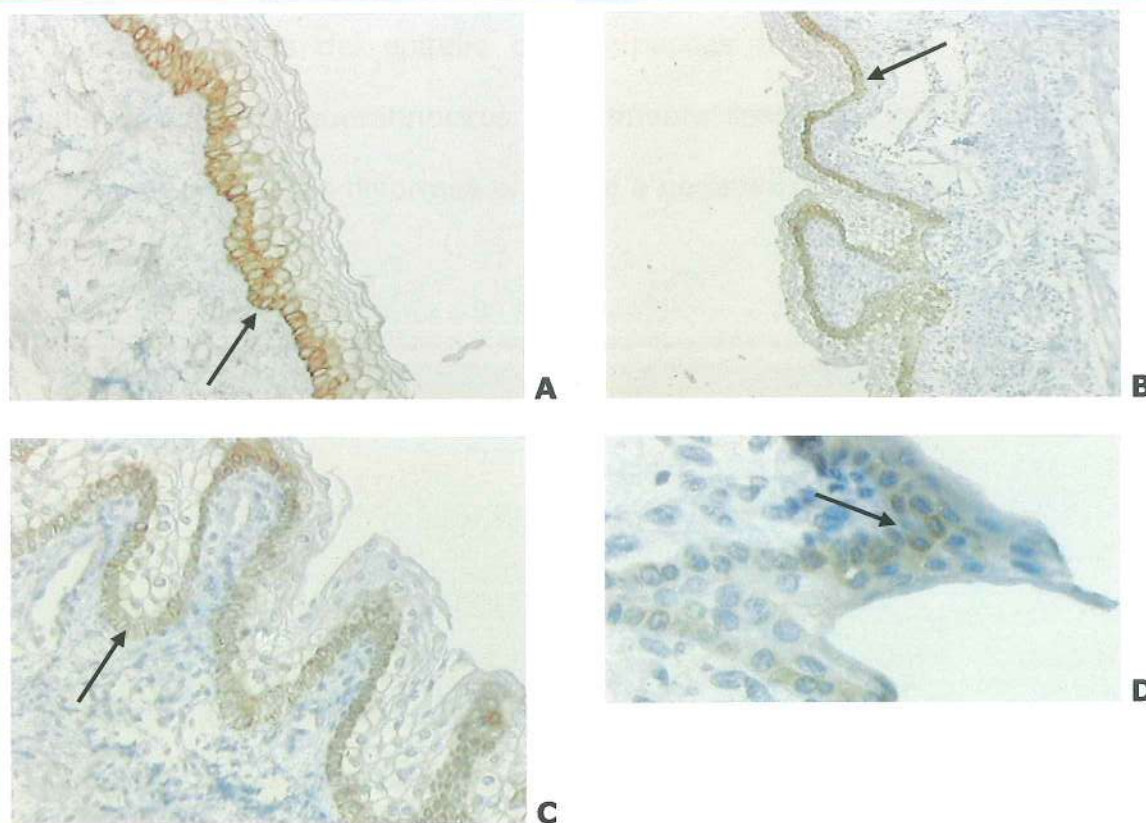
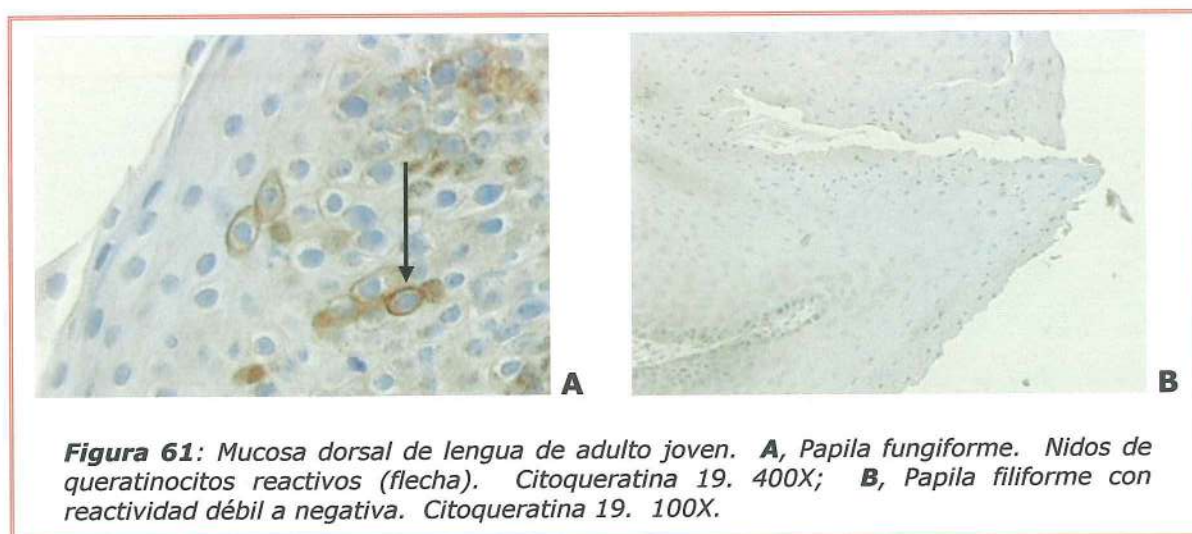


Figura 59: Lengua de feto de 10 a 32 semanas. **A**, Mucosa ventral; **B**, **C** y **D**, Mucosa dorsal. La reacción positiva se observa principalmente en las células de localización más basal (flechas). Citoqueratina 19. **A**, 200X; **B**, 100X; **C**, 200X; **D**, 400X.

Adultos jóvenes: La mucosa ventral resultó positiva moderada a débil en el estrato de células basales. (Figura 60).

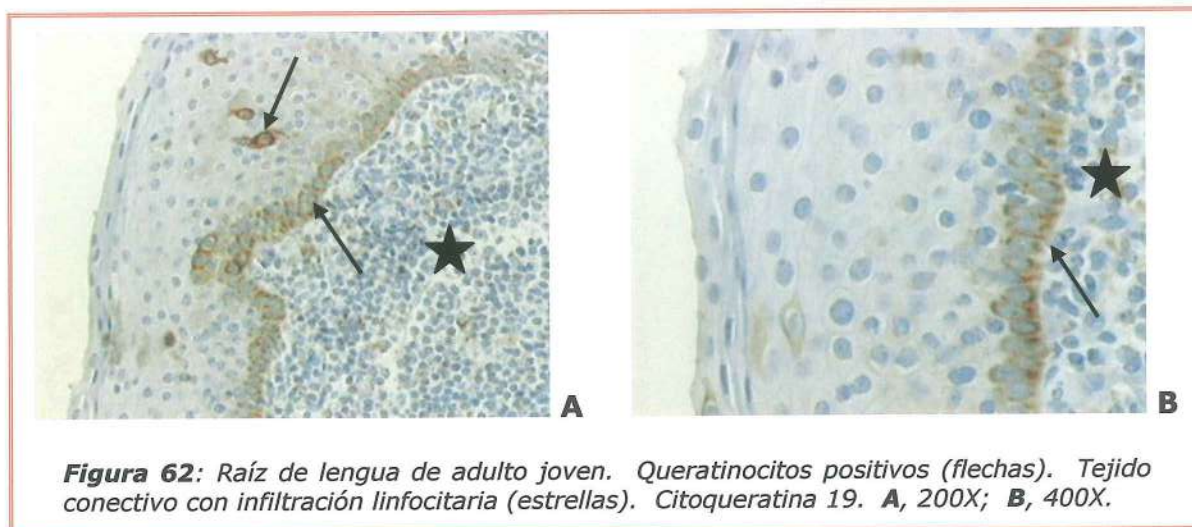


En sectores del epitelio de las papilas fungiformes se observaron pequeños nidos de queratinocitos fuertemente reactivos. Por el contrario, la reacción en las papilas filiformes era débil a negativa. (Figura 61).



En las papilas caliciformes la reacción copiaba el patrón de reacción observado con citoqueratinas 5/6.

En la raíz las células basales eran positivas al igual que algunas células del estrato superficial, estas últimas de manera aislada. (Figura 62).



Viejos: Reacciones similares se observaron en los individuos viejos. (Figura 63).



➤ **SÍNTESIS: INMUNOMARCACIÓN DEL EPITELIO LINGUAL CON CK**



<p>CK 34 β 12</p>	<p>Intensa marcación homogénea en todas las edades prenatales y postnatales en todos los estratos celulares del epitelio de la mucosa dorsal (raíz y cuerpo) y ventral.</p>
<p>CK 5 / 6</p>	<p>Desarrollo prenatal:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fetos de 10-19 semanas</i> <p>Mucosa dorsal: positividad fuerte en el área basal. Positividad débil hacia superficial. Mucosa ventral: positividad moderada hacia basal. Positividad débil hacia superficial.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fetos de 20-32 semanas</i> <p><u>Mucosa dorsal</u>: positividad fuerte en el área basal. Positividad débil hacia superficial. <u>Mucosa ventral</u>: positividad moderada hacia basal. Positividad débil hacia superficial.</p> <p>Adultos jóvenes</p> <p>Mucosa dorsal: reactividad diferente según el tipo de papila. Papilas caliciformes: Positividad manifiesta excepto en las células superficiales escamosas. Papilas fungiformes: Positividad heterogénea en todos los estratos celulares. Papilas filiformes: Positividad en todos los estratos, moderada a fuerte en las áreas basal y superficial y más débil en el área media. <u>Raíz</u>: Epitelio positivo con fuerte reactividad hacia basal y suprabasal. <u>Mucosa ventral</u>: Positividad más manifiesta en basal y negativa en el resto de los estratos celulares.</p> <p>Viejos</p> <p><u>Mucosa dorsal</u>: Papilas fungiformes con reactividad semejante a las de adultos jóvenes. Papilas caliciformes con positividad débil y parches de queratinocitos con positividad fuerte. Reactividad semejante a adultos jóvenes en raíz y mucosa ventral.</p>
<p>CK 19</p>	<p>Desarrollo prenatal</p> <p><u>10 a 32 semanas</u>: no se observaron diferencias. Positividad fundamentalmente en las células basales antes de la diferenciación papilar y en las células basales papilares de la mucosa dorsal. Ídem en raíz y mucosa ventral.</p> <p>Adultos jóvenes</p> <p><u>Mucosa dorsal</u>: Papilas fungiformes con epitelio que presenta nidos de queratinocitos fuertemente reactivos Papilas filiformes: Positividad débil o negativas. Papilas caliciformes: Reactividad semejante a CK 5/6. <u>Raíz</u>: Células basales positivas y superficiales positivas aisladas. <u>Mucosa ventral</u>: Positividad moderada a débil en el estrato basal.</p> <p>Viejos</p> <p>Reacciones semejantes a las de adultos jóvenes.</p>

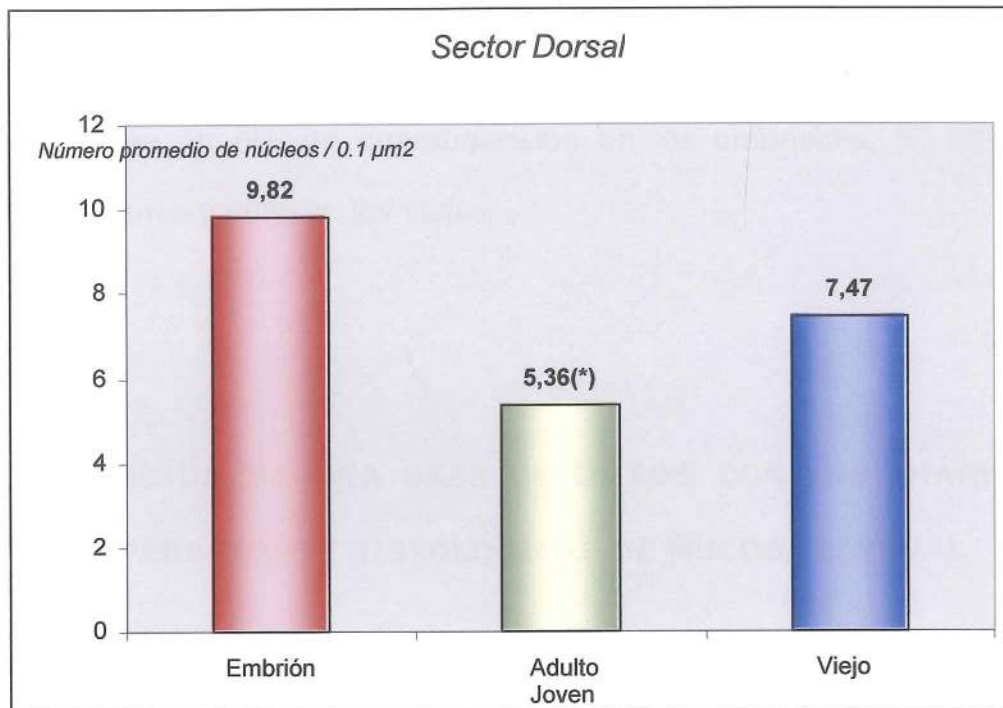
❖ ESTUDIO MORFOMÉTRICO

Cuando se comparó el número de núcleos/ $10^{-1} \mu\text{m}^2$, en el sector dorsal del epitelio de las muestras de lengua de los embriones humanos, se observó un número de núcleos/ $10^{-1} \mu\text{m}^2$ 1.8 veces mayor que en el epitelio de las muestras de lengua del mismo sector de los adultos jóvenes ($p=0.0367$) (Tabla, Figura 64A).

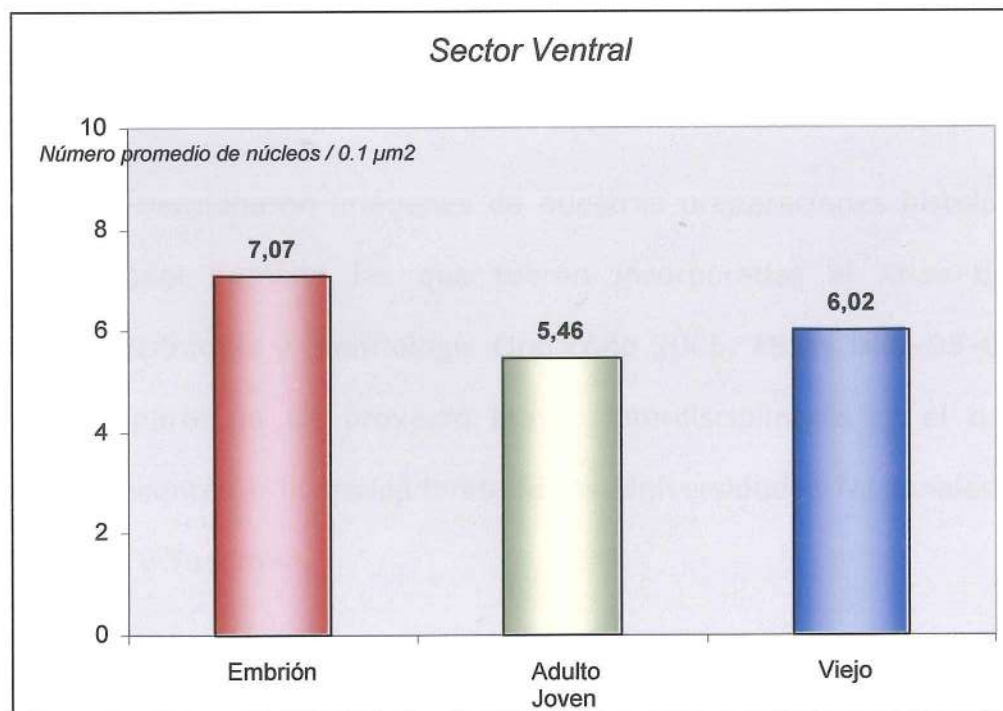
Mientras que los sectores dorsal y ventral en cada grupo estudiado no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el número de núcleos/ $10^{-1} \mu\text{m}^2$ ($p>0.05$) (Tabla, Figura 64B)

Tabla 1: Promedio y desvío estándar del número de núcleos por $10^{-1} \mu\text{m}^2$ en muestras de mucosa lingual según edad y sectores

Edad	Sector	Número de Núcleos/$10^{-1} \mu^2$ (media \pm DE)
Embrión	Dorsal	9,82 \pm 3,51
	Ventral	7,07 \pm 1,6
Adulto Joven	Dorsal	5,36 \pm 1,28
	Ventral	5,46 \pm 3,49
Viejo	Dorsal	7,47 \pm 2,42
	Ventral	6,02 \pm 2,09



A



B

Figura 64: Número promedio de núcleos / $10^{-1} \mu\text{m}^2$ en el sector dorsal (A) y ventral (B) de la mucosa lingual de embriones, adultos jóvenes y viejos. (*)Indica diferencias estadísticamente significativas entre los estadios embrionario, adulto joven, viejo.

En relación a la queratinización de la mucosa, ésta se evaluó como presencia/ausencia de queratina en cualquiera de los dos sectores estudiados, observándose un 0% de queratinización en los embriones, 53.33% en los adultos jóvenes y 60% en los viejos.

❖ **CREACIÓN DE UNA BASE DE DATOS CON LAS IMÁGENES DE PREPARACIONES HISTOLÓGICAS DE MUCOSA LINGUAL**

Dentro de los objetivos específicos de nuestro trabajo, nos fijamos crear una base de datos con las imágenes histológicas obtenidas, para su uso en la docencia de grado y post-grado relacionada con la temática del órgano lingual.

Se seleccionaron imágenes de nuestras preparaciones histológicas de mucosa lingual humana las que fueron incorporadas al Atlas digital de Anatomía, Histología y Embriología Oral (Año 2005, **ISBN 987-05-0141-9**), que forma parte de un proyecto mayor interdisciplinario en el que participamos docentes e investigadores de las Universidades Nacionales de Córdoba, Cuyo y Tucumán.

Ya que como es sabido que las imágenes histológicas refuerzan la comprensión de la información escrita y facilitan la observación de las prácticas y, teniendo presente que no contamos con material iconográfico a nivel masivo sobre el desarrollo y estructura de los tejidos dentarios, peridentarios y sistema estomatognático, realizamos el Atlas en soporte CD-

ROM, con el objetivo de reforzar su estudio con imágenes microscópicas, radiológicas y clínicas, normales y patológicas, que permiten transferir e integrar los conocimientos aportados por las Ciencias Morfológicas en la investigación, la enseñanza y la práctica clínica. Esto es, la enseñanza de las Ciencias Morfológicas clínicamente orientada como recomienda la Organización Panamericana de la Salud.

Las imágenes se digitalizaron con un analizador de imágenes con el programa Image Pro-Plus.

Este Atlas compitió en **VIDEOMED 2005. 5º Festival Internacional de Cine Médico y Científico. Consejo de Médicos de la Provincia de Córdoba. World Association of Medical and Health Films, siendo distinguido con la **Mención a la calidad docente**. Categoría multimedia. Octubre 2005.**

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos analizado las características histológicas, histoquímicas y morfométricas de la mucosa lingual humana en sus caras dorsal y ventral, en la etapa prenatal, en adultos jóvenes y viejos.

Destacamos que en la bibliografía consultada no se encontraron descripciones sistematizadas sobre las variaciones cronológicas de la mucosa lingual humana.

En la etapa prenatal se observaron una serie de eventos entre los que se destacó la aparición de proyecciones papilares incipientes en fetos de 10 semanas, las que a las 14 semanas se podían identificar como fungiformes. Las papilas caliciformes aparecían luego de las 16 semanas, en tanto que las papilas filiformes se observaron a partir de las 20 semanas.

Cuando se contrastaron estos hallazgos con los de la literatura comprobamos que existe discrepancia entre algunos autores de viejos trabajos, en cuanto al momento de aparición y al tipo de papila que se diferencia en primer término y coincidencias en lo descrito por otros.

Según Yamasaki y Takahashi (1982) y Provenza y Seibel (1986) las primeras papilas en aparecer en la mucosa lingual dorsal son las caliciformes, entre las 9 y 10 semanas del desarrollo intrauterino. Las papilas fungiformes se identifican desde las 11 semanas según lo descrito por Milaire (1980). En cuanto a las papilas filiformes, serían las últimas en aparecer, al final del desarrollo (Provenza y Seibel, 1986).

En publicaciones más recientes, Moore y Persaud (2000), describen el inicio del desarrollo de las papilas linguales al final de la 8^o semana, con la aparición de los esbozos de las papilas caliciformes y foliadas. A posteriori aparecen, según estos autores, las papilas fungiformes y finalmente las papilas filiformes entre las 10 y 11 semanas.

A diferencia de estos autores, Sawaf et al (1991) consideran al igual que lo hallado en nuestra investigación que las primeras papilas que se diferencian son las fungiformes, a partir de las 10 semanas, etapa más temprana a lo observado por nosotros. Estos autores describen la presencia de numerosas papilas, la mayoría de apariencia fungiforme, en la superficie dorsal de la lengua fetal. Además indican que existe queratina en la superficie de algunas papilas, detalle estructural y funcional no observado en el presente trabajo.

También Abramovich (1984) considera que las papilas linguales se diferencian según la siguiente cronología: primero las fungiformes, luego las caliciformes y en tercer lugar las filiformes.

Según Witt y Reutter (1997), en estudios realizados en lengua humana embrionaria con microscopía electrónica de barrido, las papilas fungiformes aparecen desde las 7 semanas y se desarrollan antes de las filiformes, las que no se diferencian antes de las primeras 15 semanas de gestación.

La microscopía laser confocal, no empleada anteriormente para el estudio de la lengua post/mortem, nos permitió la observación de detalles estructurales no detectados con microscopía óptica de rutina, puesto que permite la observación a diferentes profundidades en el interior del tejido.

Así, las papilas coriales secundarias no identificadas con este último tipo de microscopio, se observaron en fetos a partir de las 32 semanas de gestación, lo que posibilita enriquecer los resultados hallados al obtener información sobre estructuras "enmascaradas" con la tecnología convencional.

En relación a la mucosa lingual de adultos jóvenes, nuestros hallazgos son en general, coincidentes con las descripciones bibliográficas (Geneser, 2000; Gartner y Hiatt, 2002; Jung et al, 2004).

En algunas muestras de jóvenes y viejos observamos papilas fungiformes con epitelio paraqueratinizado, lo que coincide con las descripciones de Winning et al (2000) y Sapp et al (2004).

Con microscopía láser confocal diferenciamos distintos tipos de células intracorporales, que se describen en el "Capítulo Resultados", no analizadas en los botones gustativos humanos con esta metodología.

En individuos viejos hemos encontrado algunas características estructurales y citológicas no informadas por otros autores.

Uno de esas observaciones correspondió a las papilas fungiformes, las cuáles observadas con microscopía láser confocal mostraban contornos irregulares, de aspecto festoneado, no percibidos en el material estudiado con microscopía convencional.

La aparición en la mucosa dorsal del cuerpo de la lengua de nidos o grupos celulares conformados por células acidófilas fusiformes con prolongaciones citoplasmáticas y células claras, globulosas, con extremos afinados y

núcleos picnóticos es un hallazgo, probablemente relacionado con el envejecimiento o senescencia celular.

Peinado et al (2001) describen al envejecimiento como "un proceso irreversible que afecta de manera heterogénea a las células que conforman los seres vivos, las cuáles, con el paso del tiempo, se ven sometidas a un deterioro morfofuncional que puede conducir las a la muerte".

El microscopio láser confocal nos permitió obtener información más acabada sobre estos "dos tipos celulares". Observamos así que las células eosinófilas de las técnicas de rutina aparecían ahora como células "oscuras" con núcleos densos y pequeños y citoplasmas algo aplanados con prolongaciones delicadas, muy extensas dispuestas en forma de red entre las células pálidas de la H/E.

La presencia de delicadas granulaciones citoplasmáticas en las células oscuras y las manifiestas granulaciones de apariencia pulverulenta de las células pálidas y las características morfológicas de estos dos tipos celulares posiblemente se relacionan con el envejecimiento celular, como ya mencionamos anteriormente, ya que no se observaron en adultos jóvenes.

Se puede especular que las células "oscuras" podrían corresponder a queratinocitos en involución, que, por su morfología, recuerdan a las células senescentes de la literatura (Campisi y D'Adda di Fagagna, 2007; Funayama y Ishikawa, 2007) mientras que ocurriría simultáneamente una hipertrofia compensatoria por parte de las células "pálidas" que las rodean.

Como relatan Campisi y D'Adda di Fagagna (2007) senescencia deriva de senex (latín), que significa hombre viejo o vejez. En la biología del organismo, senescencia describe un proceso de deterioro que sigue al desarrollo y la maduración. En relación a las células, esta palabra se aplicó a aquéllas que dejan de dividirse en cultivo. Un acortamiento de los telómeros es la primera explicación molecular que se le dio a esta situación. Los telómeros disfuncionales serían el disparador de la senescencia vía p53 (Campisi y D'Adda di Fagagna, 2007; Funayama y Ishikawa, 2007).

La senescencia celular fue propuesta como: a- un mecanismo supresivo anticáncer, y b- una recapitulación del envejecimiento, o disminución de la capacidad regenerativa de células in vivo. En este contexto, la senescencia celular se considera deletérea porque contribuye a la disminución de la renovación y función tisular (Campisi y D'Adda di Fagagna, 2007; Funayama y Ishikawa, 2007).

Esto abre una puerta hacia futuras investigaciones donde realizaremos estudios de estas células halladas por nosotros, con microscopía electrónica de transmisión y marcaciones inmunohistoquímicas (p53 –proteína supresora de tumores-, β - galactosidasa ácida) para dilucidar el verdadero significado funcional de estos dos tipos de queratinocitos.

Ribeiro de Castro y Ramos e Silva (2005) relatan que en la edad avanzada la mucosa oral es clínicamente normal y el envejecimiento no es más que una progresiva degeneración celular que resulta en el retardo de las divisiones celulares, con una disminución en la capacidad de crecimiento celular lo que ocasiona una reparación tisular disminuida. En consecuencia, la

mucosa se encuentra más expuesta y además del envejecimiento se adicionan otros factores predisponentes tales como una inadecuada alimentación, el alcohol, el café y el tabaco, medicamentos, sustancias tóxicas, prótesis dentales, etc, que agravan las alteraciones de la cavidad oral. Estos autores también mencionan la disminución de las papilas linguales, en número y tamaño, y disminución en el número de los botones gustativos.

En cuanto a la relación glucógeno/grado de queratinización, se conoce bien que la cantidad de esta inclusión varía en los epitelios normales según la forma de queratinización, donde los epitelios no queratinizados son ricos en glucógeno mientras que en los epitelios ortoqueratinizados la reacción PAS es negativa (Isacsson y Shear, 1981). Estos datos son coincidentes con nuestras marcaciones en relación a las diferencias regionales del epitelio lingual en lo que corresponde a su grado de queratinización. Esto además tiene su significación en histopatología puesto que se ha observado una abrupta disminución del glucógeno en la zona de unión entre epitelio no displásico y epitelio displásico, y en el epitelio hiperplásico pseudoepiteliomatoso, carcinoma a células escamosas y carcinoma verrugoso.

Cuando estudiamos las citoqueratinas, filamentos intermedios marcadores de células epiteliales, encontramos algunos hallazgos interesantes que pueden contribuir a la identificación de la edad en muestras de lengua humana.

En las marcaciones para citoqueratina 34 β 12, de alto peso molecular, observamos que todo el epitelio lingual se marcaba intensamente, independiente de la edad y región topográfica de las muestras. Asimismo, no

encontramos referencias bibliográficas en lengua en relación a esta citoqueratina, por lo que aportamos un resultado original, que puede tener valor en el contexto de marcación con una batería de citoqueratinas como elemento diagnóstico de edad, región de la lengua y patología. En paladar humano de fetos y adultos jóvenes al igual que en mucosa labial de fetos la marcación para citoqueratina 34 β 12 fue semejante a lo descrito para el órgano lingual (Rugani, comunicación personal).

La marcación para citoqueratinas 5/6, de tipo básico y de alto peso molecular, mostró algunas características interesantes según la edad y región de la lengua de que se trate. Los resultados obtenidos durante el periodo prenatal demuestran con claridad modificaciones de su patrón de distribución a medida que avanza el desarrollo, coincidente probablemente con una diferenciación funcional de los queratinocitos, ya que citoqueratina 6 marca las células (queratinocitos) suprabasales con alto recambio, como son las del epitelio bucal y citoqueratina 5 es específica de estratificación al igual que la citoqueratina 14 (Montenegro et al, 1998; Sanz, 2006). Y esto es así ya que en etapas más tempranas (10-18 semanas) tanto en mucosa dorsal como ventral la marcación es predominante en la capa basal, recordando que a posteriori (20-32 semanas) la marcación se hace más intensa en todo el epitelio dorsal y en las capas basal y suprabasal del epitelio ventral, mostrando ambas zonas diferencias bien manifiestas en la marcación con los queratinocitos de las capas superficiales, los que prácticamente no muestran reactividad. En labios y paladar duro de fetos se observó una fuerte positividad de los estratos basal y suprabasal, siendo este último órgano

fuertemente positivo en todos los estratos del epitelio en la edad adulta (Rugani, comunicación personal).

Sin embargo, Sawaf et al (1991) sostienen que citoqueratina 6 no es detectada a las 10 semanas del desarrollo pero su reactividad sí es importante en el epitelio lingual ventral a las 14 semanas comenzando a debilitarse a las 19 semanas. Por el contrario permanece con fuerte positividad en el epitelio dorsal, según relatan estos autores, siendo la proteína más prominente a las 23 semanas.

A diferencia de lo relatado para la etapa prenatal se observaron diferencias en muestras de adultos jóvenes y viejos, especialmente en la cara dorsal del cuerpo de la lengua, cuya reactividad resultó heterogénea dependiendo del tipo de papila. Se puede inferir a partir de estos resultados que los patrones de expresión de citoqueratinas 19 y 5/6 se modifican con el grado de diferenciación que alcanzaron los queratinocitos en este grupo etario, situación que persiste con leves modificaciones en los viejos.

Citoqueratina 19 mostró una fuerte positividad en las células del estrato basal previamente y a posteriori de la diferenciación papilar. Por el contrario en labio de feto la positividad era moderada en los queratinocitos basales (Rugani, comunicación personal).

En las muestras de adultos jóvenes comprobamos que en el epitelio ventral la reactividad de las células basales era de moderada a débil, a diferencia de la raíz, donde también aparecían algunas células superficiales aisladas positivas.

En cuanto al cuerpo de la lengua la reacción resultó heterogénea como ocurrió con citoqueratinas 5/6, en relación al tipo de papila.

La marcación positiva con citoqueratina 19 en distintos grupos etarios a nivel de los queratinocitos basales está identificando la presencia de células madre como relatan Squier y Kremer (2001).

Sawaf et al (1991) observaron reactividad positiva para citoqueratina 19 en todas las capas del epitelio lingual dorsal y ventral en fetos de 14 y 19 semanas, siendo positiva también en la semana 23, aunque con menos intensidad.

Montenegro et al observaron una tinción negativa en la inmunopresión de citoqueratina 19 en epitelio gingival humano paraqueratinizado. Por el contrario, Sanz (2006) sostiene que las áreas paraqueratinizadas expresan citoqueratina 19, ausente en los epitelios ortoqueratinizados.

Otro hallazgo a destacar es la apariencia de las crestas epiteliales en el epitelio ventral en adultos jóvenes y viejos, ya que se encuentran manifiestamente marcadas en estos últimos a diferencia de los primeros, lo que constituye otro parámetro dentro de las diferencias etarias encontradas por nosotros.

CONCLUSIONES

En síntesis, los resultados más sobresalientes descritos por nosotros consistieron en:

- a) Identificación de las papilas linguales durante la etapa prenatal y descripción de detalles estructurales apoyados en las observaciones con microscopía láser confocal.
- b) Características estructurales y citológicas particulares en muestras de individuos viejos, entre las que destacamos con microscopía óptica de rutina, nidos celulares con células acidófilas fusiformes con prolongaciones citoplasmáticas y células claras globulosas con extremos ahusados y núcleos picnóticos.

Con microscopía láser confocal se comprueba que estas células aparecen como células "oscuras" con núcleos densos y cuerpos celulares aplanados con delgadas prolongaciones que envuelven a modo de red a las células "pálidas" con granulaciones intracitoplasmáticas.

- c) Modificaciones topográficas y de la intensidad de la inmunomarcación de los queratinocitos en mucosa dorsal y ventral de lengua de fetos, adultos jóvenes y viejos, con citoqueratinas 34 β 12, 5/6 y 19.
- d) Diferencias estructurales marcadas de las crestas epiteliales en el epitelio de la mucosa ventral de lenguas de adultos jóvenes, donde son poco marcadas y en viejos, donde son de mayor espesor.

- e) Diferencias estadísticamente significativas en la densidad celular (número de núcleos⁻¹ por μm^2) de la mucosa dorsal de lenguas de fetos y adultos jóvenes.

La estimación de la edad de cuerpos y esqueletos no identificados, con propósitos de investigación en ciencias forenses tiene una larga tradición. Existen grupos internacionales de estudio que han elaborado recomendaciones para orientar en la estimación de la edad de los individuos con el propósito de dilucidar situaciones médico/legales (Schmeling et al, 2007).

Por todo lo relatado anteriormente, las características histológicas, histoquímicas y morfométricas descritas por nosotros en mucosa lingual humana en distintos grupos etarios, especialmente durante la vejez, pueden aportar nuevos elementos hacia la orientación de la edad cronológica de los individuos dentro de la Odontología Forense, importante campo actualmente en expansión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOVICH A (1984): Embriología de la región maxilo-facial. Editorial Mundi. Buenos Aires.
- ALBERTS B, BRAY D, HOPKIN K, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2006): Introducción a la Biología Celular. 2º edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- ANURHADA A, SIVAPATHASUNDHARAM B (2007): Image analysis of normal exfoliated gingival cells. Indian J Dent Res 18: 63-66.
- ARIN MJ, MUELLER FB (2007): Keratins and their associated skin disorders. Eur J Dermatol 17: 123-129.
- BERKOVITZ BK, BARRET AW (1998).Cytokeratin intermediate filaments in oral and odontogenic epithelia. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol 40: 4-23.
- BESZKIN M, LOSOVIZ E, ZIELINSKY L (2005): El sistema estomatognático: un sistema complejo. RAAO XLIV: 27-32.
- BHASKAR SN (1983): Histología y Embriología bucal de Orban. 9ª edición. El Ateneo. Buenos Aires.
- BUNGE M (2002). Ser, saber, hacer. Ed Paidos. México.
- BURKITT HG, YOUNG B, HEATH JW (1993): Wheater. Histología funcional. Texto y atlas en color. 3ª edición. Churchill Livingstone. Hong Kong.

- CAMPISI J, d'ADDA di FAGAGNA F (2007): Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nature reviews 8: www.nature.com/reviews/molcellbio.
- CASTELLANOS JL (2002). Mucosa bucal. Rev Asoc Dent Mex 59: 73.
- CLAUSEN H., MOE D., BUSCHARD K., DOBELSTEEN E. (1986). Keratin proteins in human oral mucosa. J Oral Pathol 15: 36-42.
- CLAUSEN H, VEDTOFTE P, MOE D, DOBELSTEEN E, AUN TT, DALE B (1986b): Differentiation-dependent expression of keratins in human oral epithelia. J Invest Dermatol 86: 249-254.
- COLLINS LM, DAWES C (1987). The surface area of the adult human mouth and the thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. J Dent Res 66: 1300-1302.
- DANE ET, HERMAN DL (1963): Dane's method for prekeratin, keratin and mucins. Stain Technol 38: 97-101.
- DU TOIT DF (2003): The tongue: structure and function relevant to disease and oral health. SADJ 58: 380-383.
- FERRANDO M, SPIESS W (2000): Microscopia laser confocal de barrido. URL: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=745054>. Fecha de consulta: 13 de setiembre de 2007.
- FIGUN ME, GARINO RR (2006): Anatomía odontológica. Funcional y aplicada. Editorial El Ateneo. 2º edición. 10º reimpresión. Buenos Aires.

- FUNAYAMA R, ISHIKAWA F (2007): Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* 116: 431-440.
- FUKUMASHI K, ENORIYA Y, INOVE T (2002): Cytokeratins expression of constituting cells in ameloblastoma. *Bull Tokyo Dent Coll* 43: 13-21.
- GARTNER LP, HIATT JL (2002): *Histología. Texto y atlas. 2º edición.* Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. DF.
- GENESER F (2000): *Histología. 3º edición.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2000.
- ISACSSON G, SHEAR M (1981): Content and distributios of glucogen in oral epithelial dysplasia. *Scand J Dent Res* 89: 79-88.
- IWASAKI S (2002): Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. *J Anat* 201: 1-13.
- IZUMI K, TOBITA T, FEINBERG SE (2007): Isolation of human oral keratinocyte progenitor stem cells. *J Dent Res* 86: 341-346.
- JUNG HS, AKITA K, KIM JY (2004): Spacing patterns on tongue surface-gustatory papilla. *Int J Dev Biol* 48: 157-161.
- JUNQUEIRA L, CARNEIRO J (1996): *Histología básica. Texto y atlas. 4a edición.* Masson SA. Barcelona.
- KÖSE O, LALLI A, KUTULOLA A, ODELL EW, WASSEN A (2007): Changes in the expression of stem cell markers in oral lichen planus and hyperkeratotic lesions. *J Oral Sc* 49: 133-139.

-
- LOLAS F, QUEZADA A, RODRÍGUEZ E et al (2006): Investigación en salud. Dimensiones éticas. CIEB. Universidad de Chile. Santiago de Chile.
 - MARSHAK G., LEITNER O. (1987). Cytokeratin polypeptides in normal and metaplastic human salivary gland epithelia. *J Oral Pathol* 16: 442-449.
 - MILAIRE J (1980): La portion mobile de la langue. Origine, developpement, structure et anomalies. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 34, suppl 2: 15-53.
 - MONTENEGRO MA, IBARRA G, ROJAS M (1998): Expresión de citoqueratinas en el epitelio oral de la mucosa gingival humana y de ratón. *Rev Chil Anat* 16: 211-217.
 - MOORE K., PERSAUD T. (2000). Embriología básica. 6º edición. Ed. McGraw Hill-Interamericana. México DF.
 - MORGAN P.R., SHIRLAW P.J., JOHNSON N.W., LEIGH I.M., LANE E.B. (1987). Potential applications of anti-keratin antibodies in oral diagnosis. *J Oral Pathol* 16: 212-222.
 - NEVILLE B.W., DAY T.A. (2002). Oral cancer and precancerous lesions. *CA. Cancer J Clin* 52: 195-215.
 - ORIOLO AS, WALD FA, RAMSAUER VP, SALAS PJ (2007): Intermediate filaments. A role in epithelial polarity. *Exp Cell Res* 313: 2255-2264.
 - OSBORN M. (1983). Intermediate filaments as histologic markers: an overview. *J Invest Dermatol* 81/Suppl: 104s-108s.
 - PEINADO MA, MARTINEZ M, PEDROSA JA (2001): Envejecimiento cerebral y enfermedades neurodegenerativas asociadas. UNED. Gráfica Minerva SL. Jaén.

- PELISSIER A., ONHAYOUN J.P., SAWAF M.H., FOREST N. (1992). Changes in cytokeratins expression during the development of the human oral mucosa. *J Periodontol Res* 27: 588-598.
- PRESLAND R.B., DALE B.A. (2000). Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 11: 383-408.
- PRESLAND RB, JUREVIC RJ (2002): Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues:. *J Dent Res* 66: 564-574.
- PROVENZA DV, SEIBEL W (1986): *Oral Histology*. 2º ed. Lea and Febiger. Filadelfia. Pp 148-161.
- QUINN GP, KEOUCH MJ (2000): *Experimental design and data analysis for biologists*. Eds. Cambridge University Press. London.
- RIBEIRO de CASTRO MC, RAMOS E SILVA M (2005): Physiologic alterations of oral mucosa due to aging: a review., *Acta Dermatovenerol Croat* 13: 184-188.
- ROJAS M., MARTINEZ-GARCIA F., COBO P., PALACIOS J., NISTAL M., REGADERA J. (1998). Keratinas: Biología celular y significado funcional normal y patológico. *Rev Chil Anat* 16: 15-31.
- SAMAR M.E., AVILA R.E., ESTEBAN RUIZ F. (2004). *Técnicas histológicas: Fundamentos y aplicaciones*. Ed. SeisC. Córdoba.
- SAMAR ME et al (2008): *Histología y Embriología oral clínicamente orientadas*. 2ª edición. Ed SeisC. Córdoba.

- SAMAR ME et al (2007): Histología humana clínicamente orientada: Tejidos y sistemas. 2º edición. Ed SeisC. Córdoba.
- SANZ JM (2006): Características estructurales y metabólicas de la mucosa gingival. *Odont Moder* 2: 10-11.
- SAWAF MH, SHABANA AHM, PELISSIER A, FOREST N, OUHAYOUN JP (1991): Characterization of cytokeratin patterns in the developing human tongue. *Int J dev Biol* 35: 91-100.
- SCHMELING A, GESERICK G, REISENGER W, OLZE A (2007): Age stimation. *Forensic Sci Int* 165: 178-181.
- SOTO EGUIBAR E (1993): La microscopia confocal. *Elementos* 17: 35-39.
- SQUIER C, KREMER M (2001): Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr* 29: 7-15.
- STEVENS A, LOWE J (1998): Histología humana. 2a edición. Harcourt Brace. Madrid.
- SUN T.T., EICHNER R., NELSON W.G., SCHEFFER C., TSENG G., WEISS R., JARVIDEN M., WOODCOCK-MITCHELL J. (1983). Keratin classes: Molecular marker for different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol* 81/Suppl: 109s-115s.
- TEN CATE A.R. (1986). Histología oral. Estructura y función. 2º edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- TESTUT L, LATARJET A (1958). Tratado de Anatomía humana. Tomo 3. 9º edición. Salvat editores. Barcelona. Pp 519-538.

- VAIDYA M.M., SAWANT S.S., BORGES A.M., OGALE S.B., BHISEY A.N. (1998). Cytokeration expression in precancerous lesions of the human oral cavity. *Oral Oncol* 34: 261-264.
- VERA R (1994): Diseño de investigaciones epidemiológica. En : *La atención de los viejos: un desafío para los años 90*. Publicación científica 546. OPS. Washington DC. pp 431-446.
- WINNING T.A., TOCONSEND G.C. (2000). Oral mucosal embryology and histology. *Clin Dermatol* 18: 499-511.
- WITT M, REUTTER K (1997): Scanning electron microscopy studies of developing gustatory papillae in humans. *Chem Senses* 22: 601-612.

RESUMEN

Se realizó el estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de la mucosa lingual humana, en sus caras ventral y dorsal, durante su desarrollo embrionario, maduración y envejecimiento celular, para determinar modificaciones etarias y topográficas y relacionarlas con su función.

Los resultados más sobresalientes consistieron en: a) Identificación del desarrollo cronológico de las papilas linguales durante la etapa prenatal y descripción de detalles estructurales apoyados en las observaciones con microscopía láser confocal; b) Características estructurales y citológicas particulares en muestras de individuos viejos, entre las que destacamos con microscopía óptica de rutina, nidos celulares con células acidófilas fusiformes con prolongaciones citoplasmáticas y células claras globulosas con extremos ahusados y núcleos picnóticos; c) Con microscopía láser confocal se comprueba que estas células aparecen como células "oscuras" con núcleos densos y cuerpos celulares aplanados con delgadas prolongaciones que envuelven a modo de red a las células "pálidas" con granulaciones intracitoplasmáticas; d) Modificaciones topográficas y de la intensidad de la inmunomarcación de los queratinocitos en mucosa dorsal y ventral de lengua de fetos adultos jóvenes y viejos, con citoqueratinas 34 β 12, 5/6 y 19; y e) Diferencias estructurales marcadas de las crestas epiteliales en el epitelio de la mucosa ventral de lenguas de adultos jóvenes y viejos.

Por todo lo relatado anteriormente, las características histológicas, histoquímicas y morfométricas descritas por nosotros en mucosa lingual humana en distintos grupos etarios, especialmente durante la vejez, pueden aportar nuevos elementos hacia la orientación de la edad cronológica de los individuos dentro de la Odontología Forense, importante campo actualmente en expansión.

SUMMARY

A structural, histologic, histochemical and immunohistochemical study was made of the human lingual mucosa, in its ventral and dorsal zones, during the embryonic development, maturation and aging development to determinate topographic and age-related changes.

The most distinctive results were a) Chronological development identification and histological characteristics of the lingual papillae during prenatal stage, specifically with confocal laser microscopy; b) Structural and cytological characteristics in old group samples, among the most distinctive with routine optical microscopy, cellular nests with acidophilic fused cell with cytoplasmic processes and pale globular cells with spindle-shaped ends and pyknotic nuclei; c) With confocal laser microscopy we checked that these cells show as dark cells with dense nuclei and flattened body cells with thin processes surrounding as a net the pale cells with intracytoplasmic granules; d) Topographic changes and the immunomarked intensity of the keratinocytes of the dorsal mucosa and ventral tongue in different group ages with cytokeratins 34 β 12, 5/6 and 19; and e) Marked structural differences in the epithelial crests in the epithelium of the ventral mucosa tongue of young and old groups age.

Because of all above narrated, structural, histochemical and morphometric characteristics described by us in human lingual mucosa in different groups ages, specially during elderly can add new elements to the orientation of the chronological age of individual in forensic dentistry, and important field in expansion.