



**Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Odontología
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en
Odontología “Dr. Keisaburo Miyata”**

“Índice de Proliferación Celular con Ki-67 en la
Hiperplasia Epitelial Multifocal”

TESIS

**Que para obtener el grado de MAESTRA EN
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

Presenta:

C. D. Ashanti Pineda Orozco

Directora:

Dra. en C. S. Edith Lara Carrillo

Codirector:

Dr. en P. M. B. Víctor Hugo Toral Rizo

Asesor:

Dr. en C. S. Elías Nahúm Salmerón Valdés



2017-2021

Toluca, Estado de México. Diciembre 2021

Índice

	Pág.
Resumen.....	3
1. Introducción.....	4
2. Antecedentes.....	5
3. Planteamiento del problema.....	12
4. Justificación.....	14
5. Hipótesis.....	16
6. Objetivos.....	17
7. Material y Métodos.....	18
7.1 Marco metodológico.....	18
7.2 Operacionalización de variables.....	19
7.3 Material.....	20
7.4 Procedimiento.....	20
7.5 Análisis estadístico y aspectos bioéticos.....	25
8. Resultados.....	27
8.1 Acuse de envío del artículo.....	27
8.2 Artículo enviado/Resumen.....	28
8.3 Resultados adicionales.....	29
9. Discusión.....	35
10. Conclusiones.....	40
11. Referencias.....	41
12. Anexos.....	53

RESUMEN

Introducción: La Hiperplasia Epitelial Multifocal (HEMF) se debe al virus de papiloma humano (VPH 13 y 32). Con mayor frecuencia se presenta en niños y mujeres. Caracterizada por lesiones no dolorosas, de coloración blanquecina o semejante a mucosa. El índice de proliferación celular (IPC) se mide por inmunohistoquímica (IHQ) en lesiones por VPH y permite conocer el mecanismo de la enfermedad y su asociación con otras entidades patológicas. **Objetivo:** Determinar el IPC por medio de IHQ con Ki-67 de la HEMF en pacientes de SEDENA y Clínica Orocentro de la Facultad de Odontología de la UAEMex. **Metodología:** Estudio transversal retrospectivo de 57 bloques y laminillas con diagnóstico clínico-patológico de HEMF. El cálculo de IPC se llevó a cabo mediante microscopio óptico considerando positividad leve, moderada o severa. El análisis estadístico se hizo con Chi cuadrado, tomando como valor de $P < 0.05$, mediante el paquete estadístico Stata SE 11.0 para Windows. **Resultados:** La HEMF es más frecuente en menores de 19 años y mujeres. Se confirma que en niños y mujeres las lesiones se localizan con mayor frecuencia en mucosa de revestimiento y en hombres, en mucosa especializada. La positividad a Ki-67 se observa en los estratos basal e intermedio en el 49.12% de los casos. Se apoya el argumento de que Ki-67 es útil en la detección y predicción del nivel proliferativo de las células, sin embargo, la sobreexpresión en HEMF no está clara y requiere mayor estudio para su uso en patología bucal. **Conclusiones:** La incidencia de HEMF es más frecuente en presentación de lesiones múltiples en niños y mujeres, que suelen presentarse en hombres en el dorso lingual y mujeres en el labio inferior. Aunque la HEMF es una patología benigna, existe un alto IPC en la HEMF.

1. INTRODUCCIÓN

La Hiperplasia Epitelial Multifocal, o Enfermedad de Heck, fue descrita por primera vez por Archad y colaboradores en 1965, quienes estudiaron lesiones orales en mucosa de 19 niños indios Navajos. Actualmente se sabe que la HEFM es una patología benigna, proliferativa, caracterizada por presentar lesiones nodulares y sésiles no dolorosas, de coloración blanquecina o similar a la mucosa en que se localizan. Se asocia con los subtipos 13 y 32 del Virus de Papiloma Humano (VPH), predominante en género femenino, adolescentes, niños y grupos étnicos de esquimales e indios del centro y sur de América.¹⁻⁴

Clínicamente las manifestaciones nodulares, sésiles y delimitadas pueden ir de 3 a 10 mm, que en coalescencia alteran la funcionalidad y estética de labios, carrillos, lengua, encías y paladar.⁵

Histológicamente se aprecia acantosis, hiperqueratosis y elongación de las crestas interpapilares, así también, a través de métodos auxiliares de diagnóstico por inmunohistoquímica, se han identificado figuras mitosoides y células coilocíticas, cuya presencia confirma la infección por VPH, vinculado además con el desarrollo de diferentes enfermedades de la mucosa oral tanto benignas como malignas.^{5,6}

En estas últimas, la utilización de inmunomarcadores como Ki-67 cumplen una función importante en el control del ciclo celular y proliferación.⁷⁻⁹

El recuento celular es una herramienta importante en el estudio de población celular, como medio de diagnóstico, ya que permite optimizar la velocidad en el conteo, localización y curso de las células en evaluación. Así, la identificación del índice de proliferación de estas proteínas a través de inmunohistoquímica (IHQ) contribuye a la mejora en el diagnóstico y tratamiento de lesiones causadas por VPH, el conocimiento del mecanismo de la enfermedad, su asociación con otras entidades patológicas y la detección precoz de las mismas.^{10,11}

El objetivo de esta investigación fue determinar el índice de proliferación celular de la HEMF por medio de inmunohistoquímica con Ki-67 en los pacientes de la clínica Orocentro de la Facultad de Odontología y del laboratorio de histopatología SEDENA de 2006 a 2019.

2. ANTECEDENTES

En el año de 1983 Gerdes y Scholzen¹² identificaron una proteína asociada a la proliferación celular, especialmente presente en las fases G1, S y G2, es decir, activas, pero ausente en las de reposo (G0), característica que le ha valido para ser utilizado como biomarcador y auxiliar en áreas de investigación y diagnóstico. Su nombre proviene de la combinación de la primera letra de Kiel, su ciudad de origen y el número original del clon 96. Se encontró que el anticuerpo ki-67 tenía un patrón de tinción muy particular, presente en todas las células proliferativas, lo que lo convertía en un excelente auxiliar para determinar el crecimiento en un segmento celular, además de que ninguna otra proteína había mostrado un patrón de expresión celular regulada en el proceso de proliferación.¹³⁻¹⁵

Años más tarde, en 1989 Nishizaki¹⁶ utilizó el antígeno Ki-67 para estudiar la relación entre la aneuploidía del DNA en el IPC de gliomas de 48 cerebros humanos, logrando así identificar a aquellos con características histológicas de malignidad. Entre 1990 y 1995 se utilizó para evaluar la respuesta de mujeres a la quimioterapia así como el crecimiento del cáncer de mama. Por su parte, Slymen¹⁷ y colaboradores introdujeron el índice de Ki-67 como factor predictivo e identificador de parámetros de respuesta de tratamiento en el linfoma de células gigantes. Debido a estos descubrimientos, en 1997 autores como Kushner¹⁸, Ong'uti¹⁹ y Katou²⁰. Estudiaron la positividad de Ki-67 en enfermedades orales como la displasia epitelial, ameloblastomas y leiomioma mandibular, lo cual confirmó su efectividad como herramienta de pronóstico, medio de evaluación de la agresividad de tumores, método de predicción de supervivencia postratamiento, así como también para confirmar signos de malignidad y evaluar opciones de tratamiento y recidivas.^{16-19, 21-24}

En Odontología el uso de índices de proliferación celular con antígeno Ki-67 se ha utilizado mayormente en el área de patología también como método predictivo y de análisis. Las investigaciones en los últimos 20 años se han orientado al análisis del patrón de expresión de biomarcadores como Ki-67. En entidades como el quiste odontogénico calcificado, se encontró que el IPC de Ki-67 fue de 2.68% y que era ligeramente mayor en el epitelio de los quistes de tipo no proliferativo en comparación

con los de apariencia de ameloblastoma y lesiones sin odontoma, que de igual manera aunque no se encontraban manifestaciones clínicas de metástasis, sí puede ser potencialmente maligno.^{6, 12,25-27}

Más recientemente, en 2015 Carreón y Cols.²⁸ Utilizaron el antígeno Ki-67 para el cálculo de IPC de ameloblastomas, patología en la cual se han hecho comparaciones entre el conteo manual y automático para medir el índice de proliferación celular de Ki-67 solo y con otras proteínas nucleares para medir la efectividad de cada una y evaluaron las características clínicas y la relación de la expresión de las proteínas, encontraron que no existe relación entre ellas, sin embargo, es posible predecir la agresividad de los tumores.²⁸

De esta manera de 2016 a la fecha, en Odontología, Ki-67 ha sido útil como medio de predicción de recidivas de quistes, displasias y distintos tipos de carcinomas, en los que se ha demostrado que estadísticamente existe una asociación significativa entre el índice de proliferación celular y el grado del tumor, lo cual confirma los resultados de investigaciones de años anteriores acerca de que es posible identificar y predecir el potencial de malignidad y recidiva si se utilizan en conjunto biomarcadores con receptores transmembrana o de benignidad si se utiliza solo.^{7,29-33}

Hiperplasia epitelial multifocal

La hiperplasia epitelial multifocal (HEMF), es una enfermedad de la mucosa oral, asociada con los subtipos 13 y 32 del virus de papiloma humano (VPH). Se ha descrito como una patología benigna, asintomática, proliferativa, con lesiones múltiples de carácter nodular y sésiles no dolorosas, de color blanquecino o similar a la mucosa en que se localizan que tienden a degenerar por sí solas con el tiempo. Su aparición es predominante en el género femenino, adolescentes, niños y grupos étnicos de esquimales e indios del centro y sur de América, raramente en personas de origen africano o asiático.^{1-4, 34,35}

Fue reconocida internacionalmente por Archad y colaboradores¹ en 1965, quienes estudiaron lesiones orales en mucosa de 19 niños indios Navajos. Posteriormente, se otorgó el homónimo de “Enfermedad de Heck” en atribución al Dr. Heck, quien la

identificó en un paciente de Gallup, Nuevo México en 1961. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito como “Hiperplasia Epitelial Multifocal” debido a que este término define de manera más apropiada sus características. En algunos estudios realizados en América entre 1960 y 1956 se describió la presencia de verrugas intraorales y lesiones papulomatosas en indios Kátios y Caramantas en Colombia, respectivamente. Mientras que en Guatemala se estudiaba la condición papilomatosa de las lesiones a través de biopsia para descartar que se tratara de una simple verruga, así también en 1964, en Venezuela se observaban las variaciones clínicas de estas lesiones en la cavidad bucal.^{34,36}

Etiología

Posibles factores etiológicos para la HEMF son la predisposición genética, factores ambientales, socioeconómicos y nutricionales. En países como Brasil se estima como la segunda patología más frecuente en la población infantil y en México como una de las más comunes en algunas etnias del sur, como la maya y náhuatl.³⁶⁻³⁸

Clínica

Es la forma más común de virus de papiloma oral, del cual se distinguen dos tipos de manifestaciones: papulonodular y papilomatosa. La primera, es la más frecuente, tiende a ser de coloración rosácea, suave al tacto, frecuentemente localizada en mucosa labial, bucal y comisuras. El segundo tipo se encuentra en zonas de mucosa masticatoria, mayormente en encía adherida y lengua. Se reconocen lesiones de 1 hasta 10 mm de extensión, que pueden variar en tamaño, número y tiempo de evolución, según la edad del paciente. Del mismo modo, puede experimentarse coalescencia y con ello fomentar la aparición de úlceras, erosiones y/o limitaciones en la oclusión. Es importante mencionar también que la HEMF manifiesta muy baja incidencia en zona de paladares, piso de boca, orofaringe y encías.^{37,39,40}

Fisiopatología de la hiperplasia epitelial multifocal

El virus de papiloma humano pertenece a la familia de los *Papoviridae*, incluida en los papilomavirus. Se trata de un organismo pequeño, de estructura icosaédrica, con ADN circular que infecta las células del epitelio basal y a la mucosa del epitelio escamoso. En los seres humanos manifiesta su infección a través de la aparición de verrugas o estructuras papilomatosas. Existen alrededor de 200 subtipos de VPH. A pesar de que han sido vinculadas con distintos tipos de cáncer, también se hallan subtipos benignos, ejemplo de ello son el VPH13 y VPH32, asociados con el desarrollo de la HEMF. En esta patología, el VPH se distingue de otros tipos de virus porque no crece en cultivos celulares, sino que se replica según el grado de diferenciación de los queratinocitos, además de que carece de proteasas. Su patogenicidad inicia en la capa basal de las células epiteliales, donde expresa proteínas capaces de replicar y transcribir el ADN viral, provocando así la hiperplasia epitelial.^{41,42}

Los papilomavirus han coexistido con el ser humano por muchos años, tal interacción ha permitido diversos cambios en su ADN a lo largo del tiempo. De todos los subtipos conocidos, cinco géneros son VPH. En el caso de la HEMF, por métodos de análisis por reacción en cadena de polimerasa e hibridación se ha asociado más frecuentemente a los subtipos 13 y 32, considerados benignos. No obstante, Niebrügge y colaboradores⁴³ reportaron un caso de malignidad en enfermedad de Heck vinculado al subtipo 24 en una mujer europea de 64 años.^{43,44}

Un reporte de caso de HEMF en un paciente américo-africano se encontró que la inmunosupresión podría ser causa del desarrollo de esta enfermedad, se observó además que después de un trasplante de pulmón el paciente presentó pápulas en ambos labios y mucosa labial. El diagnóstico se confirmó a través de la identificación de figuras mitosoides, núcleos pignóticos y vacuolización de los núcleos, es decir, características propias de la HEMF.⁴⁵

Las lesiones por HEMF tienden a desaparecer espontáneamente, sin embargo, pueden permanecer por muchos años y así crear disfunciones en quien la padece, además de ser antiestéticas y dependiendo del tamaño y la localización, pueden ser

dolorosas. Por ello el tratamiento suele ser conservador, y clínico a través de escisión quirúrgica y crioterapia

se establecen como tratamiento terapias como la escisión quirúrgica de las lesiones, crioterapia, etc.^{46,47}

El ciclo de infección de este papilomavirus depende de tres factores: la permeabilidad celular, subtipo y estado inmunológico del huésped. A nivel celular depende directamente de los queratinocitos, debido a que este microorganismo penetra las capas supra basales del epitelio. Donde por transcripción y represión viral de L1 y L2, el VPH evade la respuesta inmunológica del huésped y logra infectar. A su vez, con la intervención de las proteínas E6 y E7 que evitan la apoptosis de las células epiteliales, promueve la transformación del virus, al tiempo que bloquean la acción del interferón 1, que también participa en la defensa contra el virus.^{46,48}

Epidemiología

La HEMF es una enfermedad que afecta principalmente a niños, sin embargo, se reportan pocos casos en adultos. Se relaciona con los subtipos 13 y 32 del VPH, posible influencia genética y factores ambientales. Es una enfermedad benigna cuyas lesiones generalmente desaparecen por sí solas. Es frecuente en indios de Centro y Suramérica, con incidencia mundial de cuatro infectados por cada 100 mil habitantes.^{10,49}

Patogenia

La hiperplasia epitelial multifocal se distingue por tener ciertas características histológicas distintivas, entre las que se incluye hiperplasia epitelial con paraqueratosis y acantosis que envuelven la epidermis. A nivel celular, se observan cambios citopatológicos como la degeneración celular, hiper cromasia, núcleos multilobulados, halo perinuclear, fragmentación nuclear y aparición de los cuerpos mitosoides.^{50,51}

También es frecuente la aparición de coilocitos en la capa superficial. Estas son células con citoplasma claro y falta de núcleo, descritas por primera vez por J. Ernest

Ayre⁵², quien encontró que presentaban un halo mononucleado o binucleado, poco queratinizado e hiperromático, posteriormente se descubrió que estas tienden a ser células precancerosas y casi siempre están asociadas con inflamaciones crónicas.^{37,53,54}

Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico se realiza a través de exploración clínica, análisis de la historia heredo-familiar del paciente, estudio de factores socioeconómicos, conocimiento de la ascendencia racial y condiciones de vida, no obstante, el método de primera elección continúa siendo la biopsia, ya que con esto se evalúan las características nucleares e histológicas distintivas de la HEMF, tales como fusión en las crestas epiteliales, hiperqueratosis y acantosis con preservación normal en la maduración de queratinocitos, la presencia de figuras mitosoides y células coilocíticas.⁵⁵

Debido a que es una enfermedad asintomática y no tiende a malignidad, el tratamiento de esta enfermedad generalmente es conservador, dependiendo de las condiciones de las lesiones, puede ir de la extirpación quirúrgica, escisión con láser, electrocauterización o crioterapia y uso de agentes tópicos como imiquimod, retinoides o ácido tricloroacético, aunque generalmente las lesiones desaparecen por sí solas.⁵⁶

Inmunohistoquímica y biomarcadores

La inmunohistoquímica es un método de diagnóstico histopatológico, desarrollada por Albert Coons y cols.⁵⁵ ha sido utilizado para identificar la presencia y el nivel específico de proteínas celulares que simplifica y complementa el diagnóstico histomorfológico. Este procedimiento consiste en aplicar anticuerpos específicos marcados con isotiocianato de fluorescencia, que se unen a la proteína de interés. Después de determinado tiempo se lava, de manera que queden solamente los anticuerpos que se unieron a la proteína aplicada, ocasionando un cambio de color en la muestra, lo que permitirá revelar no solamente si la proteína buscada está presente, sino que también en qué cantidad se encuentra. Su uso principal es identificar proteínas

tisulares, elementos inmunológicos y la localización de antígenos virales en células infectadas o tumorales en lesiones cancerígenas.⁵⁷⁻⁵⁹

Se define como biomarcador a aquella proteína que tiene la capacidad de contribuir a la identificación de características distintivas en una célula en particular para predecir el riesgo de cáncer o ayudar al desarrollo de un tratamiento o predicción de respuesta a un medicamento, por ello son muy utilizados en inmunohistoquímica.⁶⁰

La proteína Ki67 ha sido utilizada como inmunomarcador para la detección de proliferación celular en tumores mediante técnicas de inmunohistoquímica. Esta proteína ha demostrado tener una importante función en la regulación del ciclo celular, alcanzando su nivel máximo durante la mitosis. Además, se ha demostrado su valor predictivo en la respuesta a quimioterapia y como diferenciador fenotípico en algunos tipos de cáncer.^{61,62}

De esta manera, esta proteína funge como herramienta tanto en la predicción, como en el diagnóstico y tratamiento de lesiones por VPH en distintas partes del cuerpo y evaluar su expresión en células infectadas y también en la identificación de patrones anormales en el desarrollo celular.^{13,59,63}

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la salud en su 11ª edición, se define a la HEMF como la enfermedad causada por una infección de la mucosa bucal por los subtipos 13 o 32 del virus de papiloma humano, en la cual se presentan múltiples pápulas mucosas lisas que dan a la mucosa un aspecto adoquinado. Especialmente frecuente en niños indígenas del continente americano, con incidencia reportada de hasta un 30%.^{1,64}

Esta patología se manifiesta con lesiones de tipo nodular o papilomatoso, de evolución lenta, generalmente de base sésil, no dolorosas, coloración blanquecina o similar a la mucosa de labios (mayormente en el inferior), carrillos, lengua y menos frecuente en encía y paladar duro. La etiología de esta enfermedad se relaciona con falta de higiene oral, deficiencias nutricionales y factores genéticos y ambientales.^{11,64}

Los primeros estudios registraban que era una patología de desarrollo exclusivo en infantes, sin embargo, la evidencia señala que puede presentarse en cualquier etapa de la vida. Se estima como la segunda patología más frecuente en Brasil, mientras que en México, existen reportes de prevalencias de 0.53% y 0.75%. En investigaciones más recientes, se encontró que existe un alelo identificado como HLA-drbi*0404, que predispone a la población latina a desarrollar HEMF, lo que podría explicar la alta prevalencia en países latinoamericanos.^{11,37,65}

Los inmunomarcadores han permitido identificar factores en el desarrollo de múltiples tipos de cáncer, con frecuencia en los de mama, colon e intestinos. En la cavidad oral la variabilidad es de 20-50% en la prevalencia reportada de carcinoma oral y de 10-50% en displasia oral epitelial y etapas tempranas de carcinogénesis del epitelio oral, además de que participan en la desregulación de células en movimiento, control del ciclo celular y apoptosis en caso de mutación.^{18,20,26,28,66-68}

De esta manera, la evidencia científica hasta hoy ha mostrado que el antígeno Ki-67 tiene importantes funciones en el mantenimiento del orden durante el ciclo celular, diferenciación y plasticidad genómica, que se relacionan con signos de malignidad.

Se reporta también que Ki-67 además, tiene la capacidad de expresarse en las fases activas del ciclo celular, pero no en las fases de reposo.^{20,69}

Por lo anterior, surgió la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el índice de proliferación celular en la Hiperplasia Epitelial Multifocal mediante Inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo Ki-67?

4. JUSTIFICACIÓN

La Hiperplasia Epitelial Multifocal (HEMF), también conocida como enfermedad de Heck, es una patología exclusiva de la mucosa oral, cuyos primeros estudios se realizaron en el continente americano, en los que se mostró la alta prevalencia de estos en etnias de países como México, Colombia y Venezuela.^{70,71}

Se localiza con predilección en labios, carrillos, lengua, y con menor frecuencia en encía y paladar duro, las lesiones son de lenta evolución y el tamaño puede ir de 1 a 10 mm. En coalescencia pueden formarse grandes placas en estas superficies, que a su vez limitarán la oclusión o funciones como el habla o la masticación, y que, al permanecer en boca, se constituyen como un reservorio de bacterias y origen para desarrollo de otras patologías.^{63,72}

Hasta ahora la prueba confirmatoria para esta enfermedad es a través de estudios anatomopatológicos por medio de biopsia, lo que obliga a estudiar múltiples fragmentos de las lesiones. Por medio de inmunohistoquímica, se ha logrado agilizar el diagnóstico patológico de enfermedades de la cavidad oral. Método que no se ha implementado para el análisis de HEMF, patología benigna asociada directamente con afecciones virales por Virus de Papiloma Humano, por lo que es muy importante conocer con certeza sus características clínicas y valores de proliferación celular con el antígeno Ki-67 para así obtener un diagnóstico certero y prevenir posibles complicaciones o recidivas.^{73,74}

A través del método de inmunohistoquímica con Ki-67 se puede identificar la presencia y el nivel específico de proteínas celulares, alteraciones ligadas con procesos de proliferación celular combinada con algún tipo de hiperplasia, por ello resulta útil el uso de biomarcadores en la detección de patologías, aparte de su uso ya identificado como instrumento de pronóstico y tratamiento de enfermedades.⁷⁵

La utilización de inmunomarcadores como la proteína Ki67 ha permitido identificar distintos tipos de cáncer, analizar su desarrollo e incluso predecir la efectividad del tratamiento. Han sido implementados además en lesiones orales e infecciones por

VPH, por ello, al realizar este estudio, se creyó que al identificar estos elementos en la Enfermedad de Heck, se lograría la mejora en el diagnóstico y tratamiento de estas lesiones, así como también al conocimiento del mecanismo de la enfermedad, su asociación con otras entidades patológicas y la detección precoz de las mismas mediante la obtención del índice de positividad celular a estos inmunomarcadores presentes en la Enfermedad de Heck.^{67,76}

Se utilizó el método de conteo celular manual con el Software ImageJ 1. 52A, del *National Institutes of Health, USA*, donde se adaptó una cámara digital al microscopio y una computadora personal. Entre las ventajas de este método se encuentra la optimización del tiempo dedicado a la atención del paciente e interpretación de resultados histopatológicos, reducción del estrés del patólogo frente al microscopio, reproducibilidad de resultados, utilizable en imágenes, además de ser un método económico comparado con el conteo computarizado.⁷⁷

Cabe mencionar también que el índice de proliferación celular con Ki-67 está directamente relacionado con el crecimiento celular, y conocerlo en la HEMF provee una mejor visión acerca del patrón de crecimiento de las lesiones, su susceptibilidad a tratamientos farmacológicos y quirúrgicos. A su vez, permite al clínico establecer el pronóstico acuerdo con las características del paciente.^{65,78,79}

A la fecha, con este estudio ya existe evidencia en México acerca de la HEMF con estos elementos, lo cual, coloca a esta investigación como novedosa y generadora de conocimiento en Odontología.

5. HIPÓTESIS

De trabajo: El índice de proliferación celular de la HEMF mediante inmunohistoquímica con Ki-67 será alto.

Nula: El índice de proliferación celular de la HEMF mediante inmunohistoquímica con Ki-67 no será alto.

6. OBJETIVOS

General:

- Determinar el índice de proliferación celular con Ki-67 en la Hiperplasia Epitelial Multifocal.

Específicos:

- Identificar el grupo de edad con mayor índice de proliferación celular de la HEMF por medio de inmunohistoquímica con Ki-67.
- Analizar si la localización de las lesiones influye en el índice de proliferación celular de la HEMF.
- Evaluar el índice de proliferación celular por sexo en la HEMF por medio de inmunohistoquímica con Ki-67.
- Describir en qué presentación de HEMF (única o múltiple) el índice de proliferación celular es mayor por medio de inmunohistoquímica con Ki-67.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Marco metodológico

- Diseño de estudio: Transversal retrospectivo
- Universo: Bloques y laminillas producto de biopsias con diagnóstico clínico-histopatológico de HEMF del laboratorio de Histopatología de la Clínica Orocentro de la UAEMex y del laboratorio de histopatología SEDENA del período de 2006 a 2019.
- Muestra: 57 bloques y laminillas de 46 pacientes obtenidas mediante el procedimiento de biopsia en cavidad oral.
- Muestreo: Por conveniencia
- Criterios de inclusión:
 - Bloques y laminillas con registro de diagnóstico de HEMF
 - Se incluyeron en el estudio bloques de parafina que contenían material suficiente para realizar inmunohistoquímica
- Criterios de exclusión:
 - Bloques y laminillas con diagnóstico diferente a HEMF
 - Bloques de parafina que no contaban con material suficiente para realizar inmunohistoquímica
- Criterios de eliminación:
 - Bloques que durante el procesamiento perdieron el tejido de estudio
 - Casos que con la inmunohistoquímica no permitieron el análisis

7.2 Operacionalización de variables

Tabla 1. Variable dependiente

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
Índice de proliferación celular	Medida de la velocidad del crecimiento de un tumor, a mayor índice, mayor división celular. ⁸⁰	Medida que permite conocer el número de células que se están multiplicando en la HEMF a través de inmunohistoquímica con proteína Ki-67 en laminillas con cortes histológicos de HEMF	Cualitativa nominal	1. Basal (+) 2. Basal-intermedio (++) 3. Basal-intermedio-superficial (+++)	Cruces

Tabla 2. Variables independientes

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDIDA
Edad	Años cumplidos que tiene el paciente desde la fecha de su nacimiento ⁸¹	Años cumplidos que tiene el paciente desde la fecha de su nacimiento hasta el momento de la captura de datos y elaboración de la historia clínica expresado en décadas	1. 0-19 años 2. Mayores de 20 años	Cualitativa nominal	Niños-adolescentes Adultos
Sexo	Condición orgánica, masculino o femenina de los animales y las plantas ⁸²	Condición biológica que identifica a una persona como hombre o mujer	1. Hombre 2. Mujer	Cualitativa dicotómica	Hombre Mujer
Localización anatómica	Lugar en el que se localiza un elemento material ⁸³	Lugar en el que se encuentran las lesiones	1. Mucosa especializada 2. Mucosa de revestimiento	Cualitativa nominal	Mucosa especializada (dorso lingual) Mucosa de revestimiento (Comisura labial, Mucosa yugal, labio inferior)
Presentación de las Lesiones	Aspecto o características de un elemento ⁸⁴	Patrón y número en el que se presentan las lesiones por HEMF en el paciente	1. Única 2. Múltiple	Cualitativa nominal	Única Múltiple

7.3 Material

Recursos humanos:

- Investigadores de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México y de la Secretaría de la Defensa Nacional.

Recursos materiales:

- Microscopio con cámara digital (VE-BC3 PLUS VELAB)
- Computadora (HP laptop Model 14-mb00081a)
- Bloques, laminillas y expedientes clínicos con diagnóstico de HEMF procedente de expedientes clínicos de la Clínica Orocentro de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México y del laboratorio de histopatología de la Secretaría de la Defensa Nacional.
- Antígeno Ki-67 Clona MIB-1, dilución 1:100 (Dako Corporation, Carpinteria CA, USA).

7.4 Procedimiento

Técnica de Inmunohistoquímica

Se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México con el protocolo para el inmunomarcador Ki-67.

Se hizo la preparación con H&E y posterior IHQ con antígeno Ki-67 Clona MIB-1, dilución 1:100 (Dako Corporation, Carpinteria CA, USA). Se hicieron cortes de 2mm de espesor que posteriormente fueron montados en laminillas tratadas con poli-Lisina y desparafinizados en estufa por 30 minutos a temperatura de 45°C. Una vez terminado este proceso, las laminillas se colocaron en xilol por cinco minutos. Se hidrataron los cortes histológicos a concentraciones decrecientes de alcoholes (100%, 90%, 70% y 50%) y enjuagues con agua destilada. La recuperación antigénica para desenmascaramiento de los epítomos se hizo con citrato de sodio 10mM (pH 6.2) con

olla de presión en microondas a potencia máxima (750 W), enfriado a temperatura ambiente y enjuague con agua destilada.⁸⁵

Se bloquearon las peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno al 0.9%, lavadas con agua destilada y solución salina amortiguada con solución salina de fosfatos pH 7.4 (PBS). Finalmente se montaron las laminillas en placas con cubiertas y se colocarán en bastidores para la realización de inmunohistoquímica por capilaridad.⁸⁰

Selección de las imágenes

Una vez identificadas las laminillas incluidas en el estudio, se realizó la valoración y selección de áreas representativas tomando como criterio las zonas de mayor densidad de células positivas por patólogos bucales (V. H. T. R. y V. E. F. S.). Posteriormente se procedió al conteo celular, en caso de discrepancias, el caso fue reexaminado por un Patólogo experto.

Estas áreas se observaron en el microscopio con cámara digital (VE-BC3 PLUS VELAB, Co., USA) a objetivos 10x para obtener la totalidad de su superficie. Por medio de microfotografía digital calibrada a milímetros se observó la superficie epitelial y se obtuvieron de dos a cinco imágenes de cada laminilla con resolución de 2592x1944 pixeles en formato jpg.

Como siguiente paso, se determinó a través del conteo celular manual la actividad proliferativa de positividad de Ki-67.⁸⁵ Descrita como sigue:

1. Cada imagen se observó a objetivos 10x en microscopio con cámara digital (VE-BC3 PLUS VELAB, Co., USA) se obtuvieron de dos a cinco fotografías de cada caso.
2. Una vez tomadas las fotografías, se almacenaron en formato jpg. Y se importaron al software ImageJ. Con la función "lápiz" se hizo la delimitación de estratos basal, intermedio y superficial (Ver imagen 1).
3. Se hizo la delimitación de los estratos basal (Imagen 2) para observar las células positivas de cada estrato.

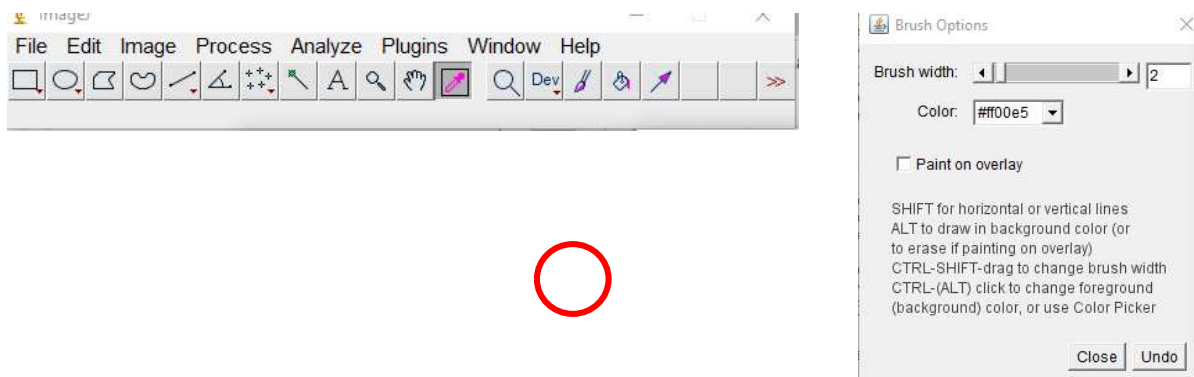


Imagen 1. Barra de tareas de ImageJ que especifica la función "lápiz" para la delimitación de los estratos en las microfotografías.

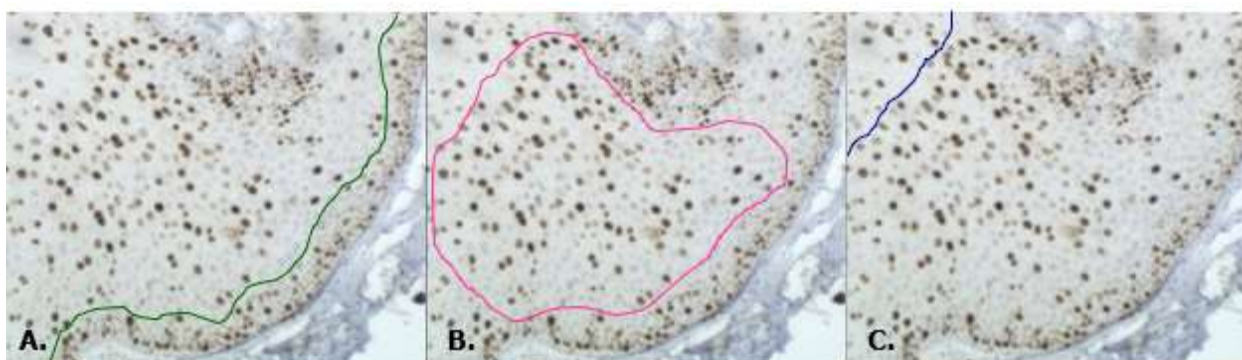


Imagen 2. Microfotografía que muestra la delimitación del estrato basal (A), intermedio (B) y superficial (C).

Fuente: directa

Se otorgó el criterio de positividad los núcleos teñidos de coloración café en matiz bajo, medio o intenso. En cuanto a la marcación de estratos, se consideró como positividad del estrato basal a las células localizadas inmediatamente encima de la membrana basal; como estrato intermedio se tomaron en cuenta los núcleos positivos de las siguientes capas por encima de la membrana basal y cercana a la capa superficial y como estrato superficial aquellos núcleos positivos que se encuentren por encima de la capa intermedia.⁸⁰

Se excluyeron aquellos núcleos que en la imagen se notasen incompletos o borrosos. Para fines estadísticos, se clasificaron de manera semicualitativa como positivas o negativas, expresadas como:

1. Negativa (-): La célula no se tiñe en ninguna de sus partes.

2. Positiva (+): La célula presenta alguna región teñida o se tiñe totalmente en matiz bajo, medio o intenso (Imagen 3).^{68,69}

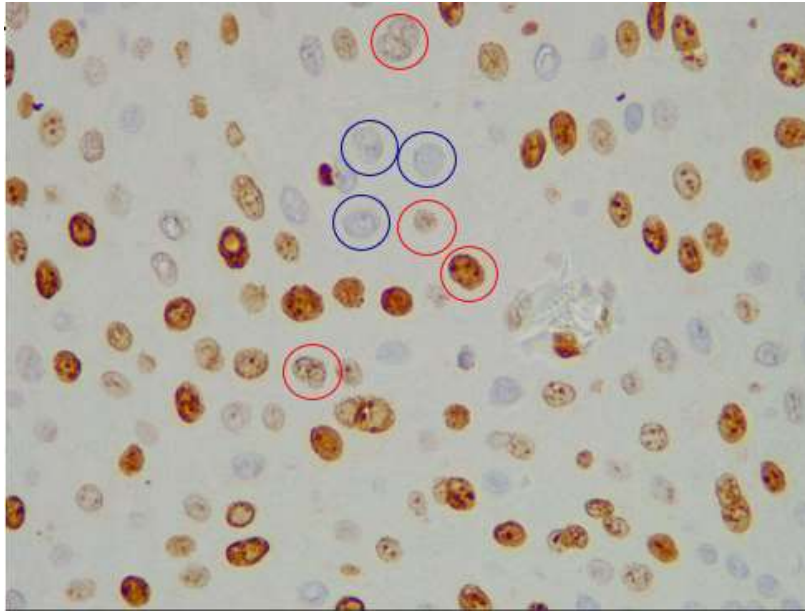


Imagen 3. Microfotografía que muestra la expresión de Ki-67 en la superficie epitelial de una lesión por HEMF (40x). Se señala con rojo los núcleos positivos (+) que presentaron coloración café en matiz bajo, medio e intenso. Con azul se señalan los núcleos negativos. Fuente directa.

La expresión de Ki-67 quedó categorizada como sigue:

1. Basal (+)
2. Basal-Intermedio (++)
3. Basal-Intermedio-Superficial (+++)

Cálculo del índice de proliferación celular con Ki-67

Se define como índice de proliferación al total de células tumorales con tinción positiva entre el total de células valoradas, expresado con una cruz (+) cuando la positividad a Ki-67 se expresó únicamente en el estrato basal, dos cruces (++) cuando la positividad se expresó en el estrato basal e intermedio, y tres cruces (+++) cuando la positividad a Ki-67 se observó en los tres estratos de la microfotografía.^{14,86}

Este proceso se describe en la imagen 4 correspondiente al caso OP-58-18, del que se obtuvieron cuatro microfotografías observadas a 10x, en las cuales se delimitaron los estratos y según la expresión de Ki-67 en cada uno, se cuantificó. A la imagen 4.1 se otorgó el criterio de dos cruces porque en el estrato superficial la expresión de Ki-67 fue mínima, no así en las imágenes 4.2, 4.3 y 4.4, donde la positividad se dio en los tres estratos, por lo tanto, para este caso el IPC Ki-67 fue de tres cruces (+++), ver tabla 3.

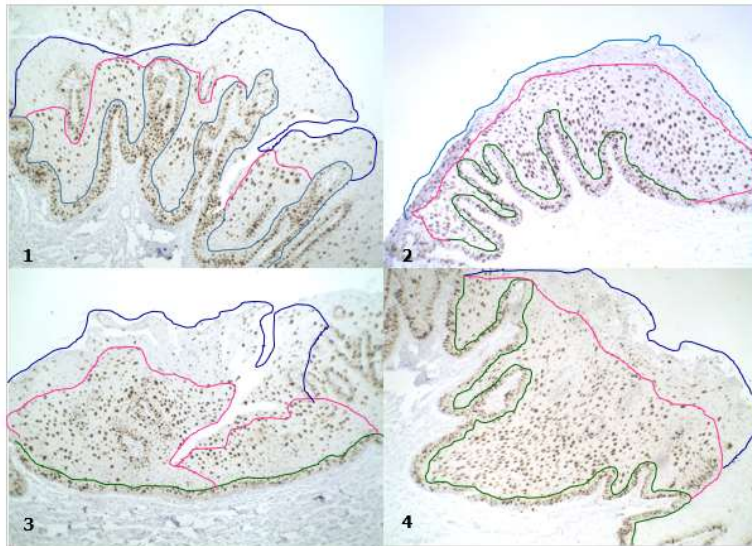


Imagen 4. Conteo celular con ImageJ de acuerdo con la positividad a Ki-67 por estratos.

Tabla 3. Ejemplo de cálculo de IPC Ki-67 del caso OP-58-18

Imagen	Estrato basal	Estrato intermedio	Estrato superficial	Total
1	XX	XX	X	XX
2	XXX	XXX	XX	XXX
3	XXX	XXX	XXX	XXX
4	XXX	XXX	XXX	XXX
Promedio	XXX	XXX	XXX	XXX

7.5 Análisis estadístico y aspectos bioéticos

Estadísticos.

Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo para verificar la distribución y normalidad de los datos recabados utilizando el software Stata/SE 11.0 para Windows.

Se hizo un análisis descriptivo para analizar las variables (edad, localización anatómica, edad del paciente, presentación de las lesiones y sexo) y sus resultados de acuerdo con la unidad de medida establecida. Asimismo, se hizo la descripción gráfica de cada una por medio de histogramas y sectores de barras.

Se utilizó Chi cuadrado para establecer las diferencias entre los grupos: comparación del IPC entre los estratos basal, intermedio y superficial de acuerdo con los datos demográficos de cada caso. Se tomó el valor de $P < 0.05$.

Bioéticos.

Esta investigación se desarrolló con base en los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (64ª Asamblea General de octubre de 2013), el cual establece en su artículo 7 que “la investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para protección de su salud y derechos individuales”.

Las muestras estudiadas en esta investigación fueron donadas por la Clínica OROCENTRO de la Facultad de Odontología de la UAEMex y del laboratorio de histopatología SEDENA, del periodo 2006 al 2019.

Con apego al Artículo 9 de la Declaración antes mencionada, se protegió a quienes participaron en esta investigación, velando por su integridad, salud, intimidad y dignidad, resguardando su información personal en calidad de confidencialidad.

De la misma manera, esta investigación se basó en el Reglamento de la Ley general de Salud en materia de investigación para la salud, Código de bioética para el personal relacionado con la salud bucal y Código de deontología de la Facultad de Odontología

de la Universidad Autónoma del Estado de México, con número de registro CEICIEAO-2021-004 (Anexo 1).

Acorde al artículo 17, se consideró este estudio como “de riesgo mínimo”, ya que involucró únicamente la obtención de laminillas provenientes de tejidos blandos de la cavidad oral, extraídos por indicación médica.

Además, en todo momento se cuidó la integridad de los investigadores, siguiendo las medidas de buenas prácticas y seguridad del laboratorio.

Con relación al investigador, se siguieron las normas del reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación para la salud en su título cuarto, de la bioseguridad de las investigaciones capítulo I, artículos 75 y 77, de la investigación con microorganismos patógenos o material biológico.

8. RESULTADOS

8.1 Acuse de envío del artículo

Med Oral Patol Oral Cir Bucal eISSN: 1698-6946

Indexed and abstracted in: Science Citation Index Expanded, Journal Citation Report, Index Medicus, MEDLINE, PubMedExcerpta Medica - Embase, SCOPUS, Indice Médico Español

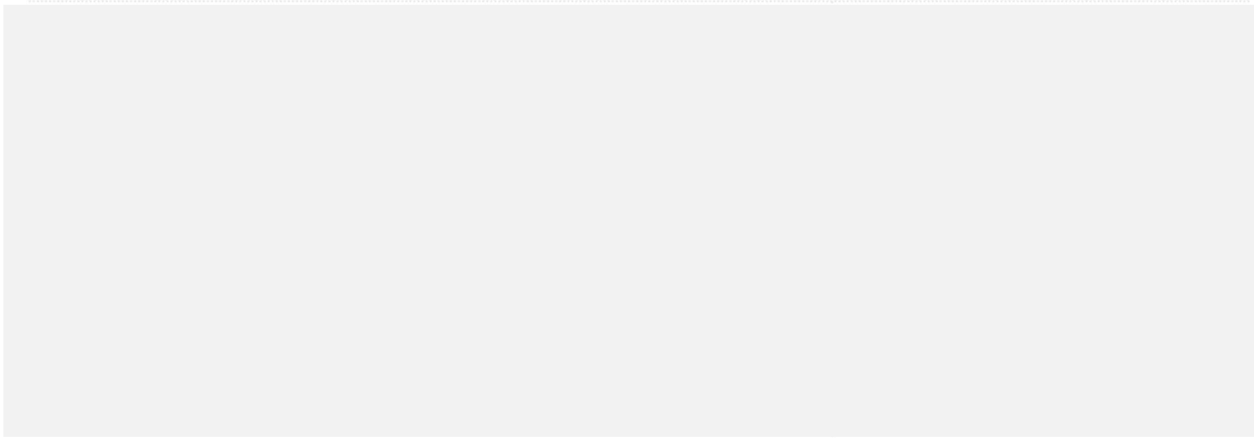
Main Menu - Edith Lara-Carrillo

[HOME](#)

[MANUSCRIPTS](#)

[SUPPORT](#)

[LOGOUT](#)



8.2 Artículo enviado/Resumen

Abstract

Background: Multifocal Epithelial Hyperplasia (MEH) is associated with the Human Papilloma Virus (HPV) 13 and 32. The proliferation index (PI) in HPV lesions is measured through immunohistochemistry (IHC) and allows to know the mechanism of the disease and its possible association with other pathologies. The goal of this research was to determine the PI in the MEH by means of IHC with Ki67. The methodology was based on manual cell counting using ImageJ software, calculated based on Ki67 positivity in the basal, intermediate, and superficial layer. The statistical analysis was done in STATA SE 11.0 with Mann Whitney U tests and Chi2 between the PI and the variables of age, sex, number, and location of lesions. $P \leq 0.05$. Results: the PI with Ki67 in MEH is 50.84%; 49.12% positive in the basal layer and intermediate; 43.85% in the entire epithelium and 7.01% in the basal layer, higher prevalence in women. The lesions in the lining mucosa were more frequent in children, adolescents, and women, and in men was specialized mucosa. The location and lesion size influences the Ki67 PI of children and adolescents. Conclusions: The PI in MEH is the total of Ki67 positive cells among the total of assessed cells 100x, in MEH it is 50.84%.

Keywords: Oral HPV, Proliferation index, Ki67, Immunohistochemistry

8.3 Resultados adicionales

Población general

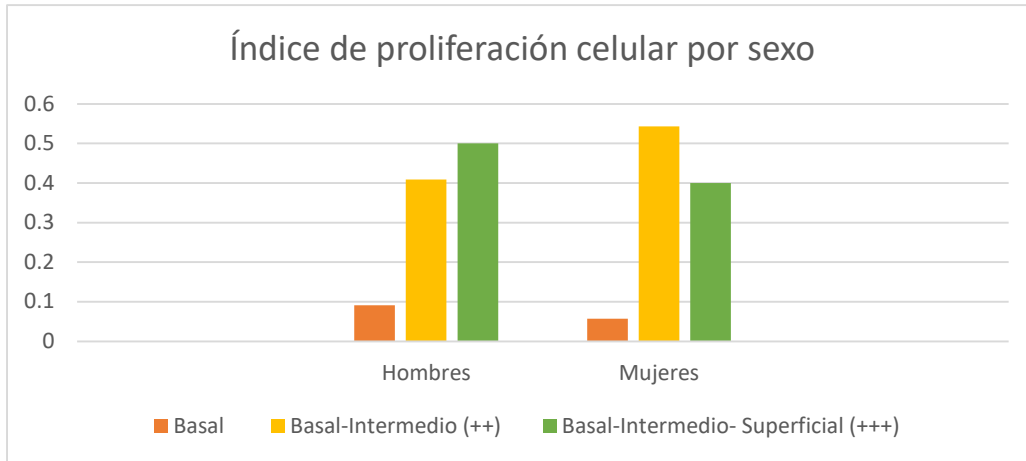
Se incluyeron 57 bloques y laminillas de 46 pacientes en un rango de edad de 3-72 años, con un promedio de edad de 28.57 años, de los cuales, el 61.04% (n=35) fueron mujeres y el 38.59% (n=22) hombres, quienes presentaron lesiones múltiples en el 57.14% y 72.73%, respectivamente, con un tamaño promedio de 30.09 mm de extensión. La tabla 3 resume las características clínicas de las lesiones por HEMF incluidas en el estudio.

Tabla 4. Características clínicas

	Frecuencia	Porcentaje	Hombres	Mujeres
Presentación de las lesiones				
Única	21	38.84%	27.27%	72.73%
Múltiple	36	63.15%	45.95%	54.05%
Localización				
Mucosa especializada (dorso lingual)	24	36.84%	50%	50%
Mucosa de revestimiento (Labios, comisuras, mucosa yugal)	33	57.89%	30.3%	69.7%
Tamaño				
0-40mm	43	75.43%	38.64%	61.36%
41-80mm	10	17.54%	22.22%	77.78%
>81mm	4	7.01%	75%	25%

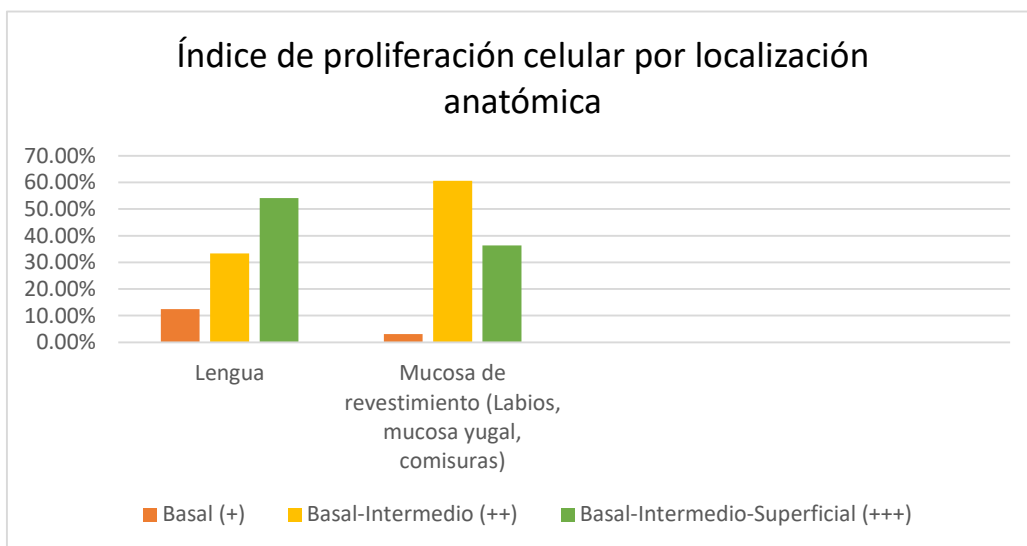
El 49.12% de las lesiones estudiadas mostraron positividad a Ki-67 en los estratos basal e intermedio. En el gráfico 1 se detalla el IPC por sexo.

Gráfico 1. Índice de proliferación celular por sexo.



Por localización anatómica, las lesiones de mucosa de revestimiento expresaron positividad mayormente en los estratos basal e intermedio, mientras que en los estratos intermedio y superficial fueron las lesiones de dorso lingual (Gráfico 2).

Gráfico 2. Índice de distribución celular por zona anatómica.



En la Tabla 5 se presentan los resultados del análisis estadístico con Chi cuadrado realizado en STATA SE 11.0 para Windows, que arrojó la muestra estudiada. Existe diferencia estadísticamente significativa entre la localización de las lesiones y el tamaño de las lesiones ($P=0.01$), es decir que mientras más grandes son las lesiones, el IPC es mayor. Asimismo, que la edad es un factor que influye en el IPC ($P=0.01$).

Tabla 5. Resultados del análisis estadístico con Chi cuadrado de la población general

Variable	Variable	Valor de p
IPC-Ki67	Edad (Adultos, Niños-Adolescentes)	0.7
IPC-Ki67	Sexo (Hombres y Mujeres)	0.6
IPC-Ki67	Localización por mucosas (Mucosa especializada, Mucosa de revestimiento)	0.08
IPC-Ki67	Presentación de las lesiones (única y múltiple)	0.1
IPC-Ki67	Tamaño de las lesiones (0 a 40mm, 41mm a 80mm, >81mm)	0.2
Sexo (Hombres y Mujeres)	Localización de las lesiones (Mucosa especializada, Mucosa de revestimiento)	0.1
Sexo (Hombres y Mujeres)	Edad (Adultos, Niños-adolescentes)	0.4
Sexo (Hombres y Mujeres)	Tamaño de las lesiones	0.1
Sexo (Hombres y Mujeres)	Localización de las lesiones (Mucosa especializada, Mucosa de revestimiento)	0.1
Localización de las lesiones (Mucosa especializada, Mucosa de revestimiento)	Tamaño de las lesiones (0 a 40mm, 41mm a 80mm, >81mm)	0.01*
Localización de las lesiones (Mucosa especializada, Mucosa de revestimiento)	Edad (niños y adultos)	0.01*

Localización de las lesiones (Mucosa especializada, revestimiento)	Mucosa	Presentación de las lesiones (única y de múltiple)	0.1
--	--------	--	-----

* $P \leq 0.05$

Análisis estadístico de niños-adolescentes

Con fines estadísticos se analizó por separado a la categoría de edad formada por niños y adolescentes de 0 a 19 años, en la que se incluyeron siete hombres (31.81%) y 15 mujeres (68.18%). Se presentan las características clínicas de las lesiones incluidas en esta categoría en la tabla 6.

Tabla 6. Características clínicas de las lesiones por HEMF en niños-adolescentes (0-19 años)

	Frecuencia	Porcentaje	Hombres	Mujeres
Presentación de las lesiones				
Única	9	40.9%	2	7
Múltiple	13	59.09%	5	8
Localización				
Lengua	5	41.66%	3	2
Mucosa de revestimiento (Labios, comisuras, mucosa yugal)	17	77.27%	4	13
Tamaño				
0-40mm	17	77.27%	6	11
41-80mm	3	13.63%	0	3
>81mm	2	9.09%	1	1

En las mujeres la positividad a Ki-67 se expresó mayormente en el estrato basal e intermedio, no se registró ningún caso en el que se expresara Ki-67 en el estrato basal en hombres. Estos resultados se pueden observar en el gráfico 3 y en la tabla 7, la frecuencia de éstas.

Gráfico 3. IPC Ki-67 por sexo en niños y adolescentes

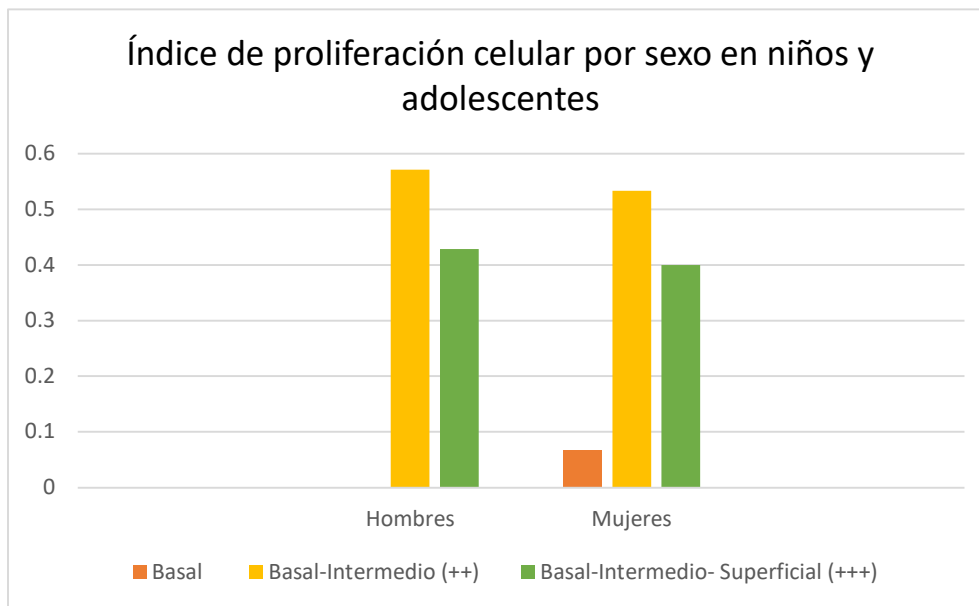


Tabla 7. Índice de proliferación celular por sexo

	Basal (+)	Basal-Intermedio (++)	Basal-Intermedio-Superficial (+++)	Total
Hombres	0	57.14% (4)	42.86% (3)	100% (7)
Mujeres	6.67% (1)	53.33% (8)	40% (6)	100% (15)
Total	4.55% (1)	54.55% (12)	40.91% (9)	100% (22)

Tanto las lesiones de lengua como las de mucosa de revestimiento expresaron positividad en el estrato basal e intermedio en el 40% (n=2) y 58.82%(n=12), respectivamente. Ver Tabla 8.

Tabla 8. Índice de proliferación celular por localización de las lesiones

	Basal (+)	Basal- Intermedio (++)	Basal- Intermedio- Superficial (+++)	Total
Mucosa especializada	0	40% (2)	60% (3)	100% (5)
Mucosa de revestimiento	5.88% (1)	58.82% (12)	35.29% (6)	100% (17)
Total	4.55% (1)	54.55% (12)	40.91% (9)	100% (22)

9. DISCUSIÓN

La Hiperplasia Epitelial Multifocal o Enfermedad de Heck es una enfermedad benigna proliferativa asociada a los subtipos 13 y 32 del VPH, adquirida por contagio directo y como consecuencia de deficiencias nutricionales, inmunológicas o de higiene, factores genéticos, entre otros.^{56,87,88}

Su prevalencia no es precisa debido a que al ser una condición asintomática, no es motivo de consulta frecuente, a menos que las lesiones se tornen antiestéticas, limitantes o dolorosas a causa de coalescencia, además de que la atención de esta patología se da también en servicios como dermatología o medicina general además de medicina bucal. Por ello, según la población estudiada, se estima entre 0.002 y 35% a nivel mundial, 3.5 a nivel Sudamérica y de 11.8 a 15.5% en México.⁸⁸⁻⁹⁰

Las investigaciones han reportado que Heck tiene predilección hacia el género femenino y población infantil. En este estudio, el 38.59% de la muestra estuvo integrada por menores de 19 años y el 61.04% por adultos, diferencia notable comparada con los reportes de otros estudios, debida posiblemente a que son los adultos quienes más acuden a los centros de atención, o a la falta de cultura de los padres en el cuidado bucal de los menores, a un desconocimiento en el diagnóstico de esta patología entre la comunidad de Cirujanos Dentistas y que por ende no remiten al paciente al área especializada, o a que como las lesiones remiten de manera espontánea se les resta importancia o son tratadas directamente por los padres con remedios caseros.^{88,90,91}

Se encontró que prevalecen las lesiones múltiples en los grupos estudiados (niños-adolescentes y adultos). No se registraron lesiones en paladares, orofaringe, piso de boca y encías, pero sí en mucosa de revestimiento.^{92,93} Estas zonas de contagio son mencionadas por Constantino-Ledesma³⁶ como de contagio directo resultado de microtraumas en la piel y mucosas. Otra posible causa es planteada por González-Losa y Cols.⁹⁴, que explica que el VPH 13 es el subtipo más frecuente presente en HEMF y se transmite a través de la saliva. Asimismo, en el estudio realizado por Padayache y cols.⁹⁵, se encontró que el VPH 32 es afín a zonas no queratinizadas,

como las mucosas bucal y labial, en tanto que el VPH 13 tiene afinidad hacia las superficies epiteliales queratinizadas como las del dorso lingual. Cabe mencionar que en el grupo etario de 0-19 años, con la prueba de Chi2 se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la localización de las lesiones y el IPC ($P=0.01$), es decir, que el IPC Ki-67 tiende a elevarse en las lesiones de mucosa de revestimiento (57.89%) comparado con las lesiones de lengua, relación que no está claramente establecida, pero que por podría deberse a las diferencias histológicas y funcionales de cada mucosa y que además podría tener una afinidad cruzada hacia ciertas áreas, es decir, que un subtipo específico determine la susceptibilidad de una persona a contraer una infección por VPH o detonar infecciones latentes por otros subtipos de riesgo bajo y de esta manera desarrollar lesiones en otras zonas a causa del VPH asociado a HEMF o a otras patologías con las que se establece el diagnóstico diferencial de la Enfermedad de Heck, tales como papilomatosis oral florida, verruga vulgar, papilomas y condiloma acuminado.^{68,90,96-98}

En relación con las lesiones la principal diferencia en las lesiones es que en Heck suelen ser asintomáticas, de aspecto adoquinado, superficie lisa, coloración blanquecina o semejante a la mucosa, en el condiloma acuminado pueden presentarse de tres formas: de crecimiento pequeño y forma redonda; de crecimiento mayor y forma plana; y lesiones gruesas y manchas dérmicas localizadas en labios, comisuras, frenillo y dorso lingual. Es importante mencionar también que los papilomas bucales son mucosotrópicos considerados de bajo grado, por ello no muestran sintomatología en personas sanas, pero sí en quienes tienen inmunosupresiones provocadas por otros virus como el de Epstein-Barr o comorbilidades como SIDA, cáncer, enfermedades renales o diabetes.^{45,75,99}

Otra de las patologías incluidas en el diagnóstico diferencial con Heck es la Papilomatosis Oral Florida (POF), en la que las lesiones son generalmente de tipo verrucoso en cavidad oral y labios e histológicamente se observa proliferación de células escamosas con epidermis papilomatosa, paraqueratosis y ligera atipia celular, y que, al igual que en la HEMF, estas lesiones coalescen y forman placas y

vegetaciones, sin embargo, el grupo de edad predilecto son varones de entre 60 y 70 años, mientras que en Heck, son las mujeres y adolescentes hasta 19 años.^{90,100}

La importancia de conocer el diagnóstico diferencial de estas lesiones es que la HEMF comparte características clínicas similares con infecciones causadas por el VPH y aunque no necesariamente Heck es una lesión con potencial de malignización, la identificación errónea de las lesiones podría confundirse y alarmar al paciente o familiares en cuanto al diagnóstico otorgado. Cabe mencionar también que el manejo de enfermedades causadas por VPH compete no solamente al área odontológica, sino también a áreas médicas como la dermatología, medicina general o pediatría, que tratan estas infecciones con procedimientos quirúrgicos, tópicos o inmunizaciones, por ello es importante conocer la etiopatogenia de la HEMF debido a que estas áreas tienen mayor flujo de atención de niños y adolescentes.^{40,101,102}

Referente al índice de proliferación celular, este se puede calcular mediante IHQ con Ki-67, una proteína utilizada como identificador de proliferación celular que se expresa en las fases activas del ciclo celular (G1, G2 y S) por tener en su estructura fragmentos de nucleótidos que codifican proteínas no estructurales involucradas en la regulación de las funciones virales en el proceso de transcripción, llamadas regiones abiertas de lectura (*ORFs*, por sus siglas en inglés).^{97,103}

De acuerdo con la clasificación de tropismo celular y las manifestaciones clínicas del VPH, los subtipos 13 y 32 relacionados con la HEMF, se ubican en el grupo mucosotrópico, cuya infección comienza con la penetración del virus al queratinocito posterior a un microtrauma con el que se logra introducir viriones en la capa basal del epitelio, esto inicia un proceso de transcripción-replicación del VPH que puede darse de dos maneras: productiva o latente. En la infecciones productivas las células morfológicamente normales del estrato basal son infectadas por el VPH y permiten la diferenciación celular al mismo tiempo que inhiben la expresión de los genes virales transformantes únicamente en células diferenciadas que inician el proceso de forma autónoma y se manifiestan en una proliferación desorganizada en los estratos intermedio y superficial del epitelio. Lo anterior explica por qué la expresión de Ki-67

en HEMF es mayor en estos estratos (49.12%) e histológicamente se observen coilocitos, acantosis, binucleación y vacuolización del citoplasma, características confirmatorias de una infección por VPH.^{97,104}

Y aunque el 43.85% de los casos estudiados, expresó positividad a Ki-67 en la totalidad del epitelio y la proliferación en HEMF es alta (52.85%), el hecho de que la mayoría de las lesiones hayan resultado positivas a Ki-67 solamente en el tercio inferior o en la mitad del epitelio, define a estas lesiones como de bajo grado, resultado consistente con Mondal y cols.,¹⁰⁵ que evaluaron la positividad de Ki-67 en leucoplasia oral (LO) y carcinoma oral de células escamosas (COCE), estudio en el que se encontró que el anticuerpo Ki-67 se expresaba en los estratos basal y parabasal de lesiones de LO, mientras que en COCE podía expresarse hasta el estrato superficial. En otro estudio realizado en Colombia por Colmenares *et al.*¹⁰⁶ para calcular el IPC en ameloblastoma y queratoquiste odontogénico, se registraron cifras de 32% y 22%, respectivamente. En otras investigaciones sobre la misma línea pero a nivel de cérvix, Méndez *et al.*¹⁰⁷ reportaron positividad de hasta 77% en carcinoma epidermoide de cuello uterino, Carrilho y cols.¹⁰⁸ de 55.5% en carcinomas invasivos; 72.2% en carcinomas escamosos queratinizados; y 50.0% de carcinomas escamosos no queratinizados. Pese a que las anteriores son consideradas lesiones malignas, se puede contrastar con el IPC de 52.85% de HEMF encontrada en este estudio, lo cual demuestra que existe una actividad proliferativa anormal en esta patología catalogada como benigna.^{107,108}

Sobre la misma línea de investigación, en un estudio de casos y controles de lesiones benignas vs malignas de tumores de glándulas salivales, se encontró correlación significativa entre ambas lesiones, de las cuales, el IPC Ki-67 fue de $18.79 \pm 18.06\%$ en las lesiones malignas, vs. $0.76 \pm 2.02\%$ de lesiones benignas, donde nuevamente se observa que las cifras son mucho menores que las encontradas en HEMF 52.85 ± 11.77 vs 30.65 ± 6.89 del grupo control.

Por lo anterior, se refuerza la teoría de que Ki-67 es útil como marcador de proliferación celular y que además su expresión facilita el cálculo del índice de fracción

de crecimiento celular en lesiones ocasionadas por VPH y que este está en estrecha relación con el grado de hiperplasia de los tejidos, por lo cual, es una herramienta de apoyo en el diagnóstico histológico de patologías benignas y malignas.^{51,109}

El fundamento biológico por el cual los niveles de proliferación celular suelen ser más altos en niños y que tienden a desaparecer espontáneamente, todavía no está completamente esclarecido, no obstante, se cree puedan estar relacionadas factores ambientales, genéticos, condición inmunológica del hospedero y su asociación a otros subtipos.^{109,110}

10. CONCLUSIONES

El Índice de Proliferación Celular en la Hiperplasia Epitelial Multifocal, o Enfermedad de Heck, es alto. Pese a ser considerada una patología benigna, las cifras de IPC encontrado son comparables a lesiones cancerígenas, sin que exista necesariamente una transición a malignidad.

Los resultados presentados en este estudio indican que existe una relación entre la localización de las lesiones y la edad de los pacientes (0-19 años). Se sugiere continuar con esta línea de investigación, ya que se tuvieron limitaciones para la obtención de una muestra mayor y equitativa en cuanto a las características demográficas y considerar además la edad de las lesiones, el acceso a los servicios de salud, nivel socioeconómico, hábitos, entre otros, para evaluar si las ausencia de diferencias estadísticas significativas se debe realmente al tamaño de la muestra o a la enfermedad en sí. De la misma manera, se recomienda realizar pruebas in situ para comprobar el genotipo de VPH asociado a la localización y tamaño de las lesiones.

Finalmente, en esta investigación se coincide en que el nombre correcto para esta patología es el de Hiperplasia Epitelial Multifocal porque envuelve sus características clínicas e histopatológicas.^{34,36,47}

11. REFERENCIAS

1. Archard HO, Heck JW, Stanley HR. Focal epithelial hyperplasia: an unusual oral mucosal lesion found in Indian children. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1965;20(2):201–12.
2. Gutiérrez HM, Delgado TUO, Díaz AGZ. Hiperplasia epitelial focal (Enfermedad de Heck). *HAMPI Run.* 2016;15(1):131–7.
3. Bertolotti M, Abbiati A, Vereza MA, Pecotche DM. Hiperplasia epitelial focal o enfermedad de Heck. *Arch Argent Dermatol.* 2015;65(1):13–5.
4. Falaki F, Amir Chaghmaghi M, Pakfetrat A, Delavarian Z, Mozaffari PM, Pazooki N. Detection of human papilloma virus DNA in seven cases of focal epithelial hyperplasia in Iran. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(10):773–6.
5. Cho NH, Kang S, Hong S, Jeong GB, Choi IW, Choi HJ, et al. Multinucleation of koilocytes is in fact multilobation and is related to aberration of the G2 checkpoint. *J Clin Pathol.* 2005;58(6):576–82.
6. Delgado Y, Torrelo A, Colmenero I, Zambrano A. Hiperplasia epitelial focal. *Actas Dermosifiliogr.* 2005;96(10):697–9.
7. Ávila FP, Ortega GC, García RM. Marcadores inmunohistoquímicos p53 y Ki67: utilización diagnóstica y pronóstica en el cáncer de colon. *Rev Andaluza Patol Dig.* 2012;35(3):173–8.
8. Instituto Nacional del Cáncer de los Insistutos Nacionales de la Salud de Ee. Uu. No Title [Internet]. Available from: <https://www.cancer.gov/Espanol/Publicaciones/Diccionario/Def/Gen-P53>
9. Gariglio P. Cáncer cérvico-uterino. Influencia de los genes celulares y de los virales. Implicaciones en el desarrollo de vacunas. *Gac Méd Méx.* 1998;134(3):297.
10. Lopez-Martinez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre JM, De-Pancorbo M. Clinical

- applications of the diagnosis of p53 alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Med Oral Organo Of la Soc Esp Med Oral y la Acad Iberoam Patol y Med Bucal*. 2002;7(2):108–20.
11. de la Teja-Ángeles E, Martínez-Sandoval B, Téllez-Rodríguez J, Ramírez-Paredes LF, Durán-Gutiérrez A, Cadena-Galdós A. Hiperplasia epitelial multifocal. Manifestaciones bucales en niños. Revisión de la literatura. *Acta Pediátrica México*. 2008;29(1):31–5.
 12. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311–22.
 13. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31(1):13–20.
 14. Galve Agudo B, Fabre González E. Valor pronóstico y predictivo del índice de proliferación Ki-67 en el carcinoma infiltrante de mama. 2017; Available from: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsbas&AN=edsbas.BBC93F5B&site=eds-live&authtype=ip,uid>
 15. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad H-D, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993;123(3):513–22.
 16. Nishizaki T, Orita T, Furutani Y, Ikeyama Y, Aoki H, Sasaki K. Flow-cytometric DNA analysis and immunohistochemical measurement of Ki-67 and BUdR labeling indices in human brain tumors. *J Neurosurg*. 1989;70(3):379–84.
 17. Slymen DJ, Miller TP, Lippman SM, Spier CM, Kerrigan DP, Rybski JA, et al. Immunobiologic factors predictive of clinical outcome in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 1990;8(6):986–93.
 18. Kushner J, Bradley G, Jordan RCK. Patterns of p53 and Ki-67 protein expression

- in epithelial dysplasia from the floor of the mouth. *J Pathol A J Pathol Soc Gt Britain Irel.* 1997;183(4):418–23.
19. Ong'uti MN, Cruchley AT, Howells GL, Williams DM. Ki-67 antigen in ameloblastomas: correlation with clinical and histological parameters in 54 cases from Kenya. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997;26(5):376–9.
 20. Katou F, Andoh N, Motegi K, Nagura H. Leiomyoma of the mandible: a rapid growing case with immunohistochemical and electron microscopic observations. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 1997;84(1):45–50.
 21. Hori M, Furusato M, Nikaidoh T, Aizawa S. Immunohistochemical Demonstration of Cell Proliferation and Estrogen Receptor Status in Human Breast Cancer: Analysis of 45 cases. *Pathol Int.* 1990;40(12):902–7.
 22. Paulus W, Meixensberger J, Hofmann E, Roggendorf W. Effect of embolisation of meningioma on Ki-67 proliferation index. *J Clin Pathol.* 1993;46(9):876–7.
 23. Ohbu M, Saegusa M, Okayasu I. Apoptosis and cellular proliferation in oesophageal squamous cell carcinomas: differences between keratinizing and nonkeratinizing types. *Virchows Arch.* 1995;427(3):271–6.
 24. Keng PC, Siemann DW. Measurement of proliferation activities in human tumor models: a comparison of flow cytometric methods. *Radiat Oncol Investig Clin Basic Res.* 1998;6(3):120–7.
 25. Matsumoto M, Komiyama K, Okaue M, Shimoyama Y, Iwakami K, Namaki S, et al. Predicting tumor metastasis in patients with oral cancer by means of the proliferation marker Ki67. *J Oral Sci.* 1999;41(2):53–6.
 26. Yoshida M, Kumamoto H, Ooya K, Mayanagi H. Histopathological and immunohistochemical analysis of calcifying odontogenic cysts. *J oral Pathol Med.* 2001;30(10):582–8.
 27. Cheng Y-SL, Wright JM, Walstad WR, Finn MD. Calcifying epithelial odontogenic

- tumor showing microscopic features of potential malignant behavior. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2002;93(3):287–95.
28. Carreón-Burciaga RG, González-González R, Molina-Frechero N, Bologna-Molina R. Immunoexpression of Ki-67, MCM2, and MCM3 in ameloblastoma and ameloblastic carcinoma and their correlations with clinical and histopathological patterns. *Dis Markers*. 2015;2015:(683087):8
 29. Okui T, Ibaragi S, Kawai H, Sasaki A. Solitary Fibrous Tumor Arising in the Buccal Space. *Case Rep Med*. 2019;2019(9459837):4
 30. Ramos-García P, González-Moles MÁ, González-Ruiz L, Ayén Á, Ruiz-Ávila I, Bravo M, et al. Clinicopathological significance of tumor cyclin D1 expression in oral cancer. *Arch Oral Biol*. 2019;99:177–82.
 31. Díaz KP, Gondak R, Martins LL, de Almeida OP, León JE, Mariano FV, et al. Fatty acid synthase and Ki-67 immunoexpression can be useful for the identification of malignant component in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med*. 2019;48(3):232–8.
 32. Fernandes D, Travassos DC, Ferrisse TM, Massucato EMS, Navarro CM, Onofre MA, et al. Oral Intravascular Papillary Endothelial Hyperplasia Associated with an Organizing Thrombus: Case Report and Immunohistochemical Analysis. *Case Rep Pathol*. 2016;2016(1908767):1–4.
 33. Vuletic M, Jancic S, Milenkovic S, Paunovic M, Milicic B, Jancic N, et al. Clinical-pathological significance of leptin receptor (LEPR) expression in squamous cell carcinoma of the skin. *Pathol Pract*. 2020;216(9):153111.
 34. Rosa LN, Gedoz L, Hildebrand L de C, Carvalho A, Chevarría MG. Hiperplasia epitelial focal: ¿ por qué enfermedad de Heck? *Av Odontoestomatol*. 2003;19(5):239–47.
 35. Agnew C, Alexander S, Prabhu N. Multifocal epithelial hyperplasia. *J Dent Child*. 2017;84(1):47–9.

36. Ledesma-Montes C, Mendez-Mendoza A. Unusually high incidence of multifocal epithelial hyperplasia in children of the Nahuatl population of Mexico. *Indian J Dermatology, Venereol Leprol.* 2017;83(6):663.
37. Said AK, Leao JC, Fedele S, Porter SR. Focal epithelial hyperplasia—an update. *J oral Pathol Med.* 2013;42(6):435–42.
38. Conde-Ferraéz L, Ek-Hernández GE, Canché-Pech JR, Gómez-Carballo JG, Kantún-Moreno NE, del Refugio González-Losa M. Genomic characterization of human papillomavirus type 13, associated to multifocal epithelial hyperplasia, in a Mayan community. *Infect Genet Evol.* 2020;104595.
39. Camacho-Aguilar S, Ramírez-Amador V, Rosendo-Chalma P, Guido-Jiménez M, García-Carrancá A, Anaya-Saavedra G. Human papillomavirus load in benign HPV-associated oral lesions from HIV/AIDS individuals. *Oral Dis.* 2018;24(1–2):210–4.
40. Schwartz Z, Magro C, Nuovo G. The molecular-based differentiation of Heck's disease from its mimics including oral condyloma and white sponge nevus. *Ann Diagn Pathol.* 2019;43:151402.
41. Concha M. Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Rev Chil infectología.* 2007;24(3):209–14.
42. de la Garza-Ramos MA, Urrutia-Baca VH, Urbina-Rios CS, Robayo DAG, Tamez-Guerra P, Gomez-Flores R. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity of an indigenous community from Southwest México. *Infect Genet Evol.* 2020;104283.
43. Niebrügge B, De Villiers E-M, Gerlach K-L, Franke I, Gollnick H. Demonstration of HPV 24 in long-standing Heck's disease with malignant transformation. *Eur J Dermatology.* 1999;9(6):477–9.
44. Marcela L-S, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología. *Hist Nat y Carcinogénesis Cancerol.*

2009;4:205–16.

45. Chompunud Na Ayudhya C, Alawi F, Akintoye SO. Unusual Oral Multifocal Epithelial Hyperplasia in an Adult African-American Lung Transplant Patient. *Transpl Infect Dis.* 2020;e13497.
46. Castro AA, Pérez MF. Virus del papiloma humano. *Rev médica costa rica y Centroamérica.* 2013;70(606):211–7.
47. Sethi S, Ali A, Ju X, Antonsson A, Logan R, Jamieson L. An update on Heck's disease—a systematic review. *J Public Health (Oxf).* 2021;Jan 27:fdaa256
48. Castro TPPG, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72(2):272–81.
49. Valdés González JL, Solís Cartas U, Muñoz Balbín M, Valdés González EM. Epithelial focal hyperplasia or Heck disease. Case presentation. *MediSur.* 2016;14(6):767–71.
50. Segura Saint-Gerons R, Toro Rojas M, Ceballos Salobreña A, Aparicio Soria JL, Fuentes Vaamonde H. Hiperplasia epitelial focal: Una rara enfermedad en nuestro medio. *Med Oral, Patol Oral y Cirugía Bucal.* 2005;10(2):128–31.
51. Piña A-R, Fonseca F-P, Flávia-Sirotheau-Corrêa Pontes H-A, Pontes R, Pires F-R, Taylor A-M, et al. Benign epithelial oral lesions—association with human papillomavirus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(3):e290.
52. AYRE JE. Cervical cytology in diagnosis of early cancer. *J Am Med Assoc.* 1948;136(8):513–7.
53. Hajdu SI, Ehya H. Foundation of diagnostic cytology. *Ann Clin Lab Sci.* 2008;38(3):296–9.
54. Hajdu SI. The link between koilocytes and human papillomaviruses. *Ann Clin Lab Sci.* 2006;36(4):485–7.
55. Vazquez-Ramos Victor Rafael T-RVH. Análisis inmunohistoquímico con Ki67 de

- las figuras mitosoides en hiperplasia epitelial multifocal. Tesis de Maestría en Ciencias Odontológicas. Facultad de Odontología, Universidad Autónoma del Estado de México; 2019.
56. Kreuter A. Multifocal epithelial hyperplasia (Heck disease) in a 7-year-old boy. *Can Med Assoc J.* 2018;190(50):E1481.
 57. Jorge Buys DL, Lara Torres CO, Ortiz Hidalgo C. Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patologia (Mex).* 2007;45(3):126–40.
 58. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers—a general review. *Curr Protoc Pharmacol.* 2017;76(1):9–23.
 59. Ikeda M, Shima K, Kondo T, Semba I. Atypical immunohistochemical patterns can complement the histopathological diagnosis of oral premalignant lesions. *J Oral Biosci.* 2020;62(1):93-98
 60. Mello FW, Melo G, Guerra ENS, Warnakulasuriya S, Garnis C, Rivero ERC. Oral potentially malignant disorders: A scoping review of prognostic biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;102986.
 61. Zhang P, Tang L-J, Gao H-H, Zhang W-X, Lin J-X, Yang H-S. Immunohistochemical features of carcinoma ex pleomorphic adenoma and pleomorphic adenoma in the lacrimal gland. *Int J Ophthalmol.* 2019;12(8):1238.
 62. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, Dowidar N, Schaper C, Ferree S, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics.* 2015;8(1):1–14.
 63. Babichenko II, Rabinovich OF, Ivina AA, Rabinovich IM, Togonidze AA. Papillomavirus in the genesis of oral leukoplakia. *Arkh Patol.* 2014;76(1):32–6.
 64. OMS. CIE-11 para estadísticas de mortalidad y morbilidad (versión 04/2019) [Internet]. 2019. Available from: <https://icd.who.int/browse11/l-m/es#/http%3A%2F%2Fid.who.int%2Ficd%2Fentity%2F155264956>

65. García IAC, Espinosa JC, Losa M del RG. Hiperplasia epitelial multifocal: revisión de 71 casos. *Dermat Cosmet Méd Quir.* 2011;9(3):176–80.
66. Matsumoto M, Komiyama K, Okaue M, Shimoyama Y, Iwakami K, Namaki S, et al. Predicting tumor metastasis in patients with oral cancer by means of the proliferation marker Ki67. *J Oral Sci.* 1999;41(2):53–6.
67. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte i). *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(2):99–127.
68. Perla cháirez Atienzo, María Elisa Vega Memije, Graciela Galván Zambrano, Alma Graciela García Calderón, Ixchel Araceli Maya García EA. Presencia del virus papiloma humano en la cavidad oral: revisión y actualización de la literatura. *Int J Odontostomat.* 2015;9(2):233–8.
69. Taniguchi Y, Nagao T, Maeda H, Kameyama Y, Warnakulasuriya K. Epithelial cell proliferation in oral lichen planus. *Cell Prolif.* 2002;35:103–9.
70. Navarro L, Ordaz K, Lacruz B, Moret Y. Prevalencia de la hiperplasia epitelial focal en pacientes de las étnias Sanema y Yekuana. Estado Bolívar. Venezuela. *Acta Odontológica Venez.* 2006;44(3):364–70.
71. ALEZ-LOSA G. Human papillomavirus 13 in a Mexican Mayan community with multifocal epithelial hyperplasia: could saliva be involved in household transmission? *Eur J Dermatology.* 2011;21(3):396–400.
72. Villa-Quigüirí AF. Enfermedad de Heck en niño nativo amazónico. *Rev Médica MD.* 2020;10(1):41–4.
73. Valdés González J, Solís Cartas U, Muñoz Balbín M, Valdés González E. Hiperplasia epitelial focal o enfermedad de Heck. Presentación de un caso. *MediSur.* 2016;14(6):767–71.
74. Villasante MA. Hermanas con hiperplasia epitelial focal. *e-Gnosis.* 2019;17.
75. Warnakulasuriya K, Johnson NW. Importance of proliferation markers in oral

- pathology. In: Oral pathology. Springer; 1996. p. 147–77.
76. García-Corona C, Vega-Memije E, Mosqueda-Taylor A, Yamamoto-Furusho JK, Rodríguez-Carreón AA, Ruiz-Morales JA, et al. Association of HLA-DR4 (DRB1* 0404) with human papillomavirus infection in patients with focal epithelial hyperplasia. *Arch Dermatol.* 2004;140(10):1227–31.
 77. Lim S, Lee MJ, Cho I, Hong R, Lim SC. Efficacy of p16 and Ki-67 immunostaining in the detection of squamous intraepithelial lesions in a high-risk HPV group. *Oncol Lett.* 2016 Feb;11(2):1447–52.
 78. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311–22.
 79. Balaguer Esteban N, Carmona Lorduy M, Harris Ricardo J, Bustillo Arrieta JM, Pupo Marrugo S. Efectividad del ácido tricloroacético en lesiones orales producidas por VPH. Universidad de Cartagena; 2018.
 80. Ortega AC, Campos DM, Barreras US, Bologna-molina R. Expresión Inmunohistoquímica de Ki-67 en Lesión Central de Células Gigantes. *Int. J. Odontostomat.* 2019;13(2):150–6.
 81. Real Academia Española: Diccionario de la lengua española [Internet]. 23 ed en línea 2020 [consultado 2020 Dec 21]. Disponible en: <https://dle.rae.es/edad>
 82. Real Academia Española: Diccionario de la lengua española [Internet]. 23 ed en línea 2020 [consultado 2020 Dec 21]. Disponible en: <https://dle.rae.es/sexo>
 83. Real Academia Española: Diccionario de la lengua española [Internet]. 23 ed en línea 2020 [consultado 2020 Dec 21].. Disponible en: <https://dle.rae.es/localizar>
 84. Real Academia Española: Diccionario de la lengua española [Internet]. 23 ed en línea 2020 [consultado 2020 Dec 21]. Disponible en: <https://dle.rae.es/presentar>
 85. Kawaguchi Y, Shiozawa E, Shimada S, Sasaki Y, Abe M, Murai S, et al. Ki-67 expression of immunohistochemistry using computerized image analysis is a useful prognostic marker in follicular lymphomas. *Int J Clin Exp Pathol.*

2018;11(7):3366.

86. Dwivedi N, Chandra S, Kashyap B, Raj V, Agarwal A. Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Contemp Clin Dent*. 2013;4(1):7.
87. García-Corona C, Vega-Memije E, Barquera R, Granados J. HLA-DR alleles associated with skin warts induced by human papillomavirus infection. *Int J Dermatol*. 2010;49(12):1376-9
88. Bennett LK, Hinshaw M. Heck's disease: diagnosis and susceptibility. *Pediatr Dermatol*. 2009;26(1):87-9.
89. Carrillo-Montiel JE, Conde-Ferrández L, Ayora-Talavera G, Puerto-Solís M, del Refugio González-Losa M. Estudio de la hiperplasia epitelial multifocal en tres comunidades rurales del Estado de Yucatán, México. *Rev Biomédica*. 2015;26(3):133-8.
90. Amores Andrade MP. Nivel de conocimiento sobre el virus del papiloma humano (hpv) y su asociación en cavidad oral: diagnóstico, manifestaciones clínicas y tratamiento, en los estudiantes de 8vos, 9nos semestres en la Facultad de Odontología de la Universidad Central del Ecu. Quito: UCE; 2016.
91. Rodríguez M, Guzmán Y, Tejada P, Pedraza RS, Rodríguez C. Percepción y experiencias frente a la hiperplasia epitelial focal en una comunidad indígena huitoto/ticuna del amazonas colombiano. *Rev la Fac Med*. 2008;56(2):101-8.
92. Ransohoff K, Teng J, Rieger KE. Multiple Mucosal Papules in a Pediatric Patient: Answer. *Am J Dermatopathol*. 2021;43(4):312.
93. Brehm MA, Gordon K, Firan M, Rady P, Agim N. Case report of focal epithelial hyperplasia (Heck's disease) with polymerase chain reaction detection of human papillomavirus 13. *Pediatr Dermatol*. 2016;33(3):e224-5.
94. González-Losa MR, Suarez-Allén RE, Canul-Canche J, Conde-Ferrández L, Eljure-Lopez N. Multifocal epithelial hyperplasia in a community in the Mayan

- area of Mexico. *Int J Dermatol.* 2011;50(3):304–9.
95. Padayachee A, Van Wyk CW. Human papillomavirus (HPV) DNA in focal epithelial hyperplasia by in situ hybridization. *J Oral Pathol Med.* 1991;20(5):210–4.
 96. Padilla MR, López PR, de Aguinaga Inurriaga AE. Human Papillomavirus and Condyloma Anogenital Infections. *Dermat Cosmet Méd Quir.* 2020;18(3):215–28.
 97. Guzmán López S, Barboza Quintana O, González Ramírez RA. Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Med Univ.* 2010;12(49):231–8.
 98. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018;127(2):175–86.
 99. Arbelo-Ramos N, Anderson K, Joshi A, Wieland C, Tying S, Rady P, et al. Heck's disease occurring after Epstein-Barr virus-associated smooth muscle tumors in an immunosuppressed child. *Pediatr Dermatol.* 2020;
 100. Nindl I, Stockfleth E. Human Papilloma Virus Infections. Burgdorf W, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M. Braun-Falco's Dermatology. 3rd ed. Berlin Heidelberg New York. Helidelberg Springer; 2009;64-72
 101. Álvarez-Santullano CAV, Hernández-Núñez A, Castaño A, Medrano RM, Guijarro SC, Martínez JB. Hiperplasia epitelial multifocal: un caso familiar. In: *Anales de Pediatría.* Elsevier; 2010. p. 357–60.
 102. Moraga-Llop FA. Ten years of human papillomavirus vaccination. From dermatology to oncology via infectology. *An Pediatría (English Ed.* 2018;88(5):289-e1.
 103. Sun X, Bizhanova A, Matheson TD, Yu J, Zhu LJ, Kaufman PD. Ki-67 contributes to normal cell cycle progression and inactive X heterochromatin in p21 checkpoint-proficient human cells. *Mol Cell Biol.* 2017;37(17):e00569-16.

104. Béziat V. Human genetic dissection of papillomavirus-driven diseases: new insight into their pathogenesis. *Hum Genet.* 2020;139:919–39.
105. Mondal K, Mandal R, Sarkar BC. Importance of Ki-67 Labeling in Oral Leukoplakia with Features of Dysplasia and Carcinomatous Transformation: An Observational Study over 4 Years. *South Asian J Cancer.* 2020;9(2):99.
106. González DRC, Vega CPP, Ortiz LVF. Expresión Inmunohistoquímica: Citoqueratinas CK19, CK14, β -Catenina y Ki67 en el Ameloblastoma y Queratoquiste Odontogénico. *CES Odontol.* 2020;33(2):86–99.
107. Toro de Méndez M, Llombart-Bosch A. Medición inmunohistoquímica de la actividad proliferativa en carcinoma epidermoide de cuello uterino. VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de preparaciones Virtuales por Internet. Valencia, España: Universidad de Valencia; 2005/Ponencia. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/16323>
108. Carrilho C, Gouveia P, Cantel M, Alberto M, Buane L, David L. Characterization of human papillomavirus infection, P53 and Ki-67 expression in cervix cancer of Mozambican women. *Pathol Pract.* 2003;199(5):303–11.
109. Barrios-García L, Agresott-Beltrán LM. Expresión simultánea de los marcadores p16INK4a y Ki-67 en extendidos de citología cérvico-vaginal anormales de archivo. *Med Lab.* 2020;20(01–02):73–85.
110. Domínguez Bauta SR, Trujillo Perdomo T, Aguilar Fabrè K, Hernández Menéndez M. Infección por el virus del papiloma humano en adolescentes y adultas jóvenes. *Rev Cuba Obstet y Ginecol.* 2018;44(1):1–13.