



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

HIPERPLASIA EPITELIAL MULTIFOCAL, ANÁLISIS
CLÍNICO E INMUNOHISTOQUÍMICO.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ULISES RAMOS TIERRAFRÍA

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

ASESOR: Dr. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Te agradezco mamá, Lilia Tierrafría Hernández por ser ese gran pilar en mi vida, un ejemplo de mujer, una luchadora incansable, por esa fortaleza y valentía que te caracteriza. Por brindarme tu apoyo incondicional y jamás darte por vencida, te agradezco infinitamente. Todo esto es gracias a ti...
Te amo.

ÍNDICE

Resumen	
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Generalidades	7
2.2 Antecedentes	8
2.3 Etiología	9
2.4 Epidemiología	11
2.5 Características clínicas	12
2.6 Patogenia	15
2.7 Histopatología	16
2.8 Métodos de diagnóstico	18
2.9 Diagnóstico diferencial	21
2.10 Pronóstico	22
2.11 Tratamiento	22
2.12 Marcadores biológicos asociados a HEM	24
2.12.1 Bcl-2	24
2.12.2 p53	25
2.12.3 VPH	27
2.12.4 Ciclina D1(Bcl-1)	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. METODOLOGÍA	35
5.1 Inmunohistoquímica por peroxidasa	35
5.2 Determinación de intensidad de expresión	36
5.3 Recursos	37
6. RESULTADOS	38
6.1 Clínicos	38
6.2 Histopatológicos	39
6.3 Inmunohistoquímicos	40

7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES	46
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

Resumen

La Hiperplasia epitelial multifocal es una patología benigna asociada al virus de papiloma humano 13 y 32, se presenta con mayor frecuencia en el género femenino y pacientes infantiles.

Se revisaron expedientes de 11 pacientes que acudieron a la clínica de patología bucal en el DEPeI, UNAM del año 2010 al 2015 con diagnóstico de HEM, 8 de ellos contaban con biopsia y laminilla en HyE, se analizaron sus características histopatológicas y clínicas, también se obtuvieron muestras de tejido de sus cubos de cera para analizarse con 4 marcadores; Bcl-2, p53, VPH y ciclina D1.

Los resultados obtenidos respecto a las características clínicas e histopatológicas confirmaron lo reportado en la literatura, clínicamente se caracterizó la presencia de múltiples nódulos asintomáticos en diferentes sitios de la mucosa bucal, superficie lisa y color similar a la mucosa adyacente. Los hallazgos histopatológicos fueron epitelio plano estatificado paraqueratinizado con acantosis y presencia de coilocitos y cuerpos mitosoides en diferentes estratos del epitelio.

La inmunexpresión obtenida con los marcadores utilizados fue positiva con el marcador Bcl-2 predominante en células de la región basal sugiriendo una mayor actividad de esta molécula previniendo la apoptosis en este estrato. La expresión de p53 en la región basal indica que existen células con genoma dañado ocasionado por infección viral. También se expresó positivamente VPH confirmando la presencia del virus en región suprabasal. Diferente al marcador ciclina D1 expresado con mayor intensidad en estrato basal sugiriendo un aumento en el número de células. Estos resultados nos dieron un mayor conocimiento sobre la patogenia de HEM.



1. INTRODUCCIÓN

La Hiperplasia Epitelial Multifocal (HEM) es una patología de etiología viral asociada al virus de papiloma humano (VPH) principalmente los tipos 13 y 32, que afecta el epitelio de la mucosa oral. Tiene una predilección al género femenino y en su mayoría pacientes infantiles. Clínicamente se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones papulares o nodulares, asintomáticas, de superficie lisa y del mismo color de la mucosa adyacente, de tamaño pequeño que puede variar de 0.1 a 10 milímetros de diámetro, predominantemente se encuentran en mucosa bucal, lengua y labio inferior. Esta enfermedad se considera de curso lento y benigno.

La HEM presenta características histopatológicas como hiperplasia en epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado, con marcada acantosis, proyecciones epiteliales que en ocasiones tienden a anastomosarse, se puede observar también la presencia de cuerpos mitosoides y de células del estrato espinoso con núcleos grandes y citoplasma vacuolado (coilocitos) en los estratos superiores del epitelio.

Los tipos virales asociados a esta entidad se han determinado por medio de técnicas como la hibridación *in situ*, PCR e inmunohistoquímica muy limitadamente. La infección de este virus repercute en cambios celulares y moleculares que han sido reportados escasamente. En la actualidad el estudio inmunohistoquímico es una herramienta empleada para poder inferir la conducta de una lesión a través del análisis de la expresión de marcadores seleccionados, puede ser el caso de la detección de bcl-2, p53 y ciclina D1.

El objetivo del presente trabajo fue presentar las características clínicas e inmunohistoquímicas de determinados marcadores en casos de pacientes con HEM que acudieron a la clínica de medicina y patología bucal del DEPEI, Facultad de Odontología, UNAM.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

La hiperplasia es un aumento en el número de células de un órgano o tejido, que en general determina un aumento de la masa de los mismos. La hiperplasia puede ser fisiológica (hormonal y compensadora) o patológica (actividad de un exceso de hormonas o factores de crecimiento sobre las células diana).

Un ejemplo de la hiperplasia patológica puede ser la respuesta ante determinadas infecciones virales, como la asociada al virus del papiloma humano, que produce verrugas cutáneas y lesiones mucosas formadas por masas de epitelio hiperplásico. Por tanto, los factores de crecimiento producidos por los genes virales o por las células infectadas pueden estimular la proliferación celular.

Aunque la hiperplasia patológica es anormal, es un proceso que sigue controlado, porque no se producen mutaciones en los genes reguladores de la división celular y la hiperplasia regresa cuando desaparece el estímulo responsable.¹

La hiperplasia epitelial multifocal (HEM) es una proliferación del epitelio escamoso estratificado atribuido principalmente al virus del papiloma humano (VPH) tipos 13 y 32, es una enfermedad de afección exclusiva de la mucosa oral.² Clínicamente se caracteriza por la presencia de una o múltiples elevaciones papulares o nodulares, asintomáticas, sésiles de aspecto liso o rugoso y del mismo color de la mucosa adyacente. Las localizaciones más comunes donde encontramos este tipo de lesiones incluyen la mucosa labial, bucal y lingual, aunque se puede encontrar en cualquier zona de la cavidad oral con menor frecuencia. Inicialmente a esta enfermedad se le conocía como “hiperplasia epitelial focal”, pero se prefiere el término *hiperplasia epitelial multifocal* por que los pacientes usualmente presentan múltiples lesiones.^{3,4,5}



Se reporta que los principales afectados son los niños y adolescentes. Puede presentarse en un patrón familiar, así como asociarse a VPH y la presencia de alelos del gen HLA-DR4 (DRB1*0404). Otros autores consideran al bajo estado socioeconómico, hacinamiento, higiene deficiente, malnutrición e infección por VIH como factores de riesgo.^{2,4,5,6,7,8,9}

2.2 Antecedentes

March en 1881, describió por primera vez una enfermedad con un patrón similar a HEM al publicar un caso de tumores papilares de la mucosa oral en una niña de 9 años, cuya clínica coincidió con los casos observados posteriormente por Helms en esquimales de Groenlandia en 1894 y por Stern en un caucásico en Berlín en 1922.^{6,8,10}

Estrada en 1956, describió la presencia de verrugas intraorales y lesiones papilomatosas en indios Caramantas en Colombia y las mismas lesiones en indios Katios también colombianos en 1960. Reyes en 1962 notó esa misma condición clínica en Guatemala. Soneira y Fonseca en 1964 describieron de manera completa esta entidad, mencionando sus variantes clínicas en las distintas regiones de la mucosa bucal, además de realizar la toma de biopsias y la descripción de los hallazgos microscópicos, sugiriendo una etiología viral.

Archard, Heck y Stanley en 1965 dieron a conocer esta patología internacionalmente a través de la publicación de casos aislados en 15 indios norteamericanos del estado de Nuevo México, un Xavante brasileño y un niño esquimal de Alaska, debido al análisis de estos hallazgos se acuñó el término de Hiperplasia Focal del Epitelio. A partir de esto, se han reportado casos en diversos grupos étnicos, siendo América latina la región geográfica con más reportes de HEM.

El epónimo de “enfermedad de Heck” fue derivado del Dr. Heck que identificó a un paciente con esta enfermedad en Nuevo México en 1961.



Praetorius-Clausen en 1971 fueron los primeros en demostrar partículas de VPH en esta enfermedad. Diversos reportes mencionaban a esta enfermedad en etnias y regiones más allá de América, tal como Nigeria, el Oeste Africano, Sudán y Kenia.

Pindborg en 1994 cuestionó la nomenclatura de enfermedad de Heck, debido a que no daba el crédito a los autores que la describieron anteriormente, así como, no proporcionaba ninguna idea con relación a la naturaleza ni a las características de la entidad.^{3,4}

Posteriormente March en 1999 y debido a que las lesiones son de carácter múltiple se propuso el término “hiperplasia epitelial multifocal”.⁶

2.3 Etiología

La etiología de la HEM es desconocida, sin embargo, se le asocia como probable etiología el componente viral por la presencia de VPH. A través de estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ*, se ha detectado específicamente a los tipos 13 y 32, en los cuales la base viral puede ser transmitida por una especificidad tisular *in situ*, sugerido por algunos investigadores que observaron que el VPH 13 se encuentra comúnmente en el epitelio queratinizado, mientras que el VPH 32 se detecta con mayor frecuencia en superficies no queratinizadas. Aunque este tipo de especificidad no se ha demostrado estadísticamente, podría indicar el papel de los sitios anatómicos en la susceptibilidad a la infección.^{3,11}

También se menciona que puede haber presencia de VPH-1, VPH-55, y un tipo de VPH relacionado al tipo 11, así como VPH-6, VPH-16 y VPH-18, estos dos últimos asociados a un alto potencial oncogénico.¹² En un estudio realizado en Paraguay por Aldama Caballero et. al. se encontró mediante el estudio virológico por PCR VPH-25, este tipo de virus no había sido descrito anteriormente en la literatura.^{3,4,6,7,13} Es posible detectar más de un genotipo de VPH en el mismo paciente.¹¹



Carlos y Sedano en 1994 mencionaron que la infección por virus de VPH depende de los receptores que estén presentes en la superficie celular (receptores asociados a la unión epitelio-membrana basal) y una predisposición genética en el número de receptores, describiendo que a mayor número de receptores es mayor el riesgo del contagio.^{4,14}

Entre otros factores a los que se asocia la HEM se menciona una predisposición genética, por ejemplo, en algunos estudios se ha encontrado una alta incidencia de alelos del gen HLA-DR4 (DRB1 *0404) como posible factor de riesgo para la enfermedad, asociado principalmente a rasgos étnicos, se ha reportado su presencia en nativos americanos, población amerindia autóctona, como Mazateca y Náhuatl, y población mestiza mexicana. Este alelo no se encuentra en raza caucásica y negra.^{2,6,7,8,9}

Se considera que también existe relación hereditaria al observar casos en al menos uno de los familiares directos que presenta las mismas lesiones.^{3,6}

La mayor parte de los afectados son pacientes infantiles. Aunque no se tiene una explicación concreta, se menciona que puede ser causada por una respuesta inmune menos desarrollada en los niños y que la enfermedad va desapareciendo conforme se desarrolla el sistema. Si el adulto se encuentra en un estado de inmunocompromiso se podría presentar la HEM.

La malnutrición, malas condiciones de vida o pobreza extrema, la irritación por corrientes galvánicas asociadas a amalgamas dentales, masticar tabaco, la deficiencia de vitamina K y A, y el compartir objetos de uso común también han sido considerados como factores de riesgo, se ha demostrado la presencia de partículas virales libres en saliva; debido a la naturaleza infecciosa de la enfermedad se sugiere como una posible vía de transmisión, sugiriendo la posibilidad de transmisión a través del beso, ya que hay personas que pueden ser portadoras asintomáticas del virus.^{2,3,4,15,16,17,18}



Existe una controversia respecto a si este tipo de lesiones son causadas en menores con antecedente de abuso sexual, ya que al igual que el virus del herpes simple tipo 1 y 2, Epstein Barr, citomegalovirus, herpes virus humano 8, virus del papiloma humano y el virus de la inmunodeficiencia humana, puede transmitirse por contacto orogenital. A la fecha se han identificado 160 tipos de VPH de los cuales 40 se han detectado en mucosa bucal, que entre otras lesiones producen la HEM. Es necesario el diagnóstico para descartar lesiones papilomatosas o condilomatosas observadas en niños con el antecedente de abuso sexual, debido a que la HEM aunque es una enfermedad asociada al VPH, no tiene connotación sexual.^{2,17,19,20} Las vías de transmisión no sexual incluyen transmisión intraparto e inoculación.²¹

2.4 Epidemiología

La frecuencia de esta enfermedad es variable de una amplia gama desde 0,002 hasta 35%, dependiendo de la población estudiada y la región geográfica del mundo.²² La epidemiología reportada en México es relativamente baja con 0.026% y puede estar subestimada, ya que nuestra población al ser mestiza es la más afectada como ha sido reportada previamente,²³ esta patología en México es pobremente reportada, sin embargo, un trabajo ha mencionado la presencia de 9 casos sobre 1,000 pacientes estudiados.^{3,23}

A pesar de que se ha descrito El VPH-13 y VPH-32 como principal etiología de la HEM, el VPH-13 tiene un mayor predominio que el tipo VPH-32. Evidencias actuales no han puesto de manifiesto al genotipo 32 en la población mexicana.^{8,16,17,18,24,25}

La literatura reporta que la HEM es más frecuente entre los 2 y los 18 años; se menciona que no es común observar estas lesiones por encima de los 18 años de edad, sin embargo, se ha reportado casos en pacientes adultos. Existen reportes aislados de casos por encima de los veinte años de edad en



poblaciones mestizas, y en cuanto al sexo se encuentra relacionada con mayor predominio en el género femenino con respecto al masculino, la proporción ha sido reportada tan alta como 5: 1. La causa exacta de la mayor incidencia en las mujeres es desconocida, aunque las condiciones de vida en las mujeres de ciertos grupos étnicos, podría explicar una mayor incidencia de esta enfermedad en las mujeres más que en los hombres.^{10,21,26}

La hiperplasia epitelial multifocal, es una enfermedad que se encuentra en mayor número en grupos aislados de indios de América del norte, Centroamérica, y Brasil, aunque también en pueblos nativos nórdicos y otros grupos de Europa y África. Sudamérica y México son lugares geográficos donde se han presentado la mayor cantidad de reportes de casos que demuestran la prevalencia de esta lesión y su posible relación con las zonas geográficas.

En cuanto a la raza, la enfermedad disminuye en mestizos y es aún más rara en caucásicos e individuos de raza negra.^{11,21}

2.5 Características clínicas

La HEM es caracterizada por la presencia de múltiples lesiones papulonodulares (aunque en raras ocasiones son únicas), sésiles o pediculadas, suaves distribuidas a través de toda la mucosa superficial, suelen ser de color similar a la mucosa adyacente, aunque también pueden ser un poco más blanquecinas dependiendo su grado de queratinización, son asintomáticas, con límites bien definidos, suelen ser redondeadas u ovales de crecimiento lento y el curso de la enfermedad es benigno, no se ha observado transformación neoplásica maligna.^{3,4,5,27,28}

Aunque el VPH-13 es un virus no oncogénico, se ha postulado que la inflamación crónica derivada de un trauma crónico puede causar la transformación celular maligna, las lesiones generalmente están expuestas a

un trauma continuo como resultado de la masticación, lo que puede causar la transformación maligna a largo plazo. Sin embargo, esto es muy raro.¹⁸

La transformación maligna se reportó en un caso de HEM relacionada con el VPH 24. Sin embargo, en este caso hay alguna duda sobre si el diagnóstico era carcinoma verrucoso en lugar de HEM.²⁶

Es muy característico que las lesiones presenten resiliencia, que consiste en que cuando se estira la lesión, esta tiende a desaparecer y al disminuir la tensión la lesión re-appearece (Fig. 1). Todas las alteraciones ocurren en la capa epitelial de la mucosa, con prácticamente ninguna alteración en el tejido conectivo subyacente.^{3,24} La participación mucocutánea concomitante es extremadamente rara.¹²

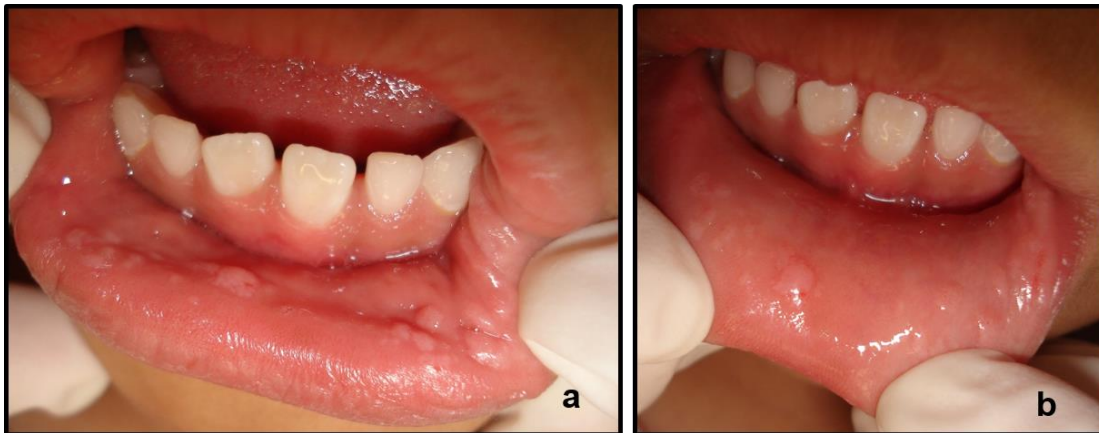


Figura 1. Aspecto clínico de las lesiones por HEM en mucosa labial inferior. a) Múltiples pápulas de superficie lisa y color similar a la mucosa adyacente. b) Se muestra resiliencia al retraer la mucosa, característica común de la HEM. Fuente: Archivo clínico de Clínica de Medicina Bucal, DEPEI

Los sitios más afectados suelen ser mucosa labial, mucosa bucal y mucosa lingual (Fig. 2), suele aparecer frecuentemente en áreas de trauma oclusal y puede seguir un patrón similar a la línea de oclusión y los labios; el más afectado es el inferior, aunque también suelen aparecer con menor frecuencia en encía, paladar, no afecta piso de boca, tonsilas, pilar amigdalino anterior u orofaringe. Así como la involucración de la conjuntiva ha sido descrita muy raramente.^{2,5,19,21}



Figura 2. Paciente con lesiones múltiples en el borde lateral derecho de la lengua. Fuente: Archivo clínico de Clínica de Medicina Bucal, DEPEl.

Existen 2 variantes clínicas: papulonodular y papilomatosa. La variante papulonodular es la más común y se caracteriza por pápulas o nódulos de color rosado, superficie lisa, esta variante tiene predilección a la mucosa bucal, labial y comisural. La variante papilomatosa es menos común suele aparecer de aspecto papilomatoide, rugosa, color blanquecino o rosa pálido, y se presenta generalmente en la mucosa masticatoria como nódulos en lengua y encía adherida.^{5,11}

La tendencia de estos tipos clínicos para afectar a diferentes superficies de la mucosa oral es probablemente un reflejo del epitelio afectado. La dermis subyacente de la mucosa labial y bucal favorece el crecimiento endofítico, mientras que la densidad dérmica del tejido conectivo de la encía adherida y la lengua va a favorecer un crecimiento exofítico.¹¹

En ambas variantes las lesiones individuales son pequeñas que van de 0.1 a 1.0 cm, discretas y bien delimitadas, las lesiones pueden coalescer formando lesiones de mayor tamaño y dando una apariencia fisurada entre ellas (aspecto de empedrado). La presentación clínica también puede estar influenciada por la edad del paciente, debido a que las lesiones que afectan a los pacientes más jóvenes tienden a ser múltiples, exofíticas y nodulares,

mientras que las lesiones planas y papulares más pequeñas e individuales o menores en número, comúnmente afectan a los pacientes de mayor edad (Fig. 3). Por supuesto, la asociación entre el número de las lesiones y la edad de los pacientes puede reflejar el comportamiento de lesiones de la HEM, que tienden a desaparecer espontáneamente con el tiempo.^{4,5,11,20}



Figura 3. Hiperplasia epitelial multifocal, pápulas planas en diferentes sitios de la mucosa bucal. a) Mucosa labial superior, b) Mucosa labial inferior, c) Mucosa yugal derecha en la cual se pueden observar lesiones de un color rosa pálido en comparación con la mucosa normal adyacente. Las lesiones planas pueden estar asociadas a pacientes de edad adulta. Fuente: Archivo clínico de Clínica de Medicina Bucal, DEPEI.

2.6 Patogenia

La historia natural de la enfermedad es aún desconocida, las teorías actuales han postulado la irritación local de baja intensidad hasta las deficiencias vitamínicas como posibles factores de riesgo, pero el curso clínico de la enfermedad y las lesiones que varían en tamaño, número, periodo de regresión y el patrón de aparición es comparable al de algunas otras infecciones por VPH. Es cuestión abierta si esta variación indica diferentes niveles de infección o diferentes niveles de respuesta inmune.²⁹ El virus del papiloma humano es un virus de ADN que se replica en los núcleos de las



células epiteliales planas infectadas con el VPH, la infección puede resultar en un curso subclínico o de forma latente de lesiones relacionadas con el VPH que pueden aparecer y desaparecer o persistir durante mucho tiempo. Es imposible predecir si las lesiones recurrirán o cuando pueden surgir nuevas lesiones, aun no se sabe si la recurrencia de las lesiones se relaciona con la infección latente, cambios en la respuesta inmune o infecciones nuevas.^{22,25,29}

Los virus no se reproducen por sí mismos, ellos necesitan la presencia de otro organismo o huésped para reproducirse o replicarse, el huésped posee ribosomas, que el propio virus no puede sintetizar. Los virus contienen sólo un tipo de ácido nucleico, ya sea ADN o ARN. Se reproducen únicamente de su ácido nucleico, es decir, un virus no surge directamente de un virus pre-existente. La mayor parte de los virus humanos son icosaédricos y poseen una cubierta de proteínas llamada nucleocápside, algunos también tienen una envoltura que rodea la cápside, hecha a partir de lípidos que derivan de las membranas de la célula huésped, proyectando 'picos' de la superficie de la nucleocápside viral. Estas proteínas son normalmente glicoproteínas que le sirven al virus en la unión y la infección del huésped. El área dentro de la nucleocápside se conoce como el núcleo.³⁰

2.7 Histopatología

Los hallazgos microscópicos de la Hiperplasia Epitelial Multifocal comprenden epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado con acantosis marcada, los clavos epiteliales pueden llegar a ser largos y romos inclusive puede ocurrir hiperplasia vertical anastomosante de las crestas interpapilares en diferentes estratos. En otras ocasiones los clavos epiteliales pueden ser anchos, romos y confluentes hacia el centro de la lesión (Fig. 4).^{3,5,7,25}

La capa de células basales muestra un aumento de la actividad mitótica, también se presentan células con una disposición del material nuclear que semeja figuras mitóticas anormales, denominadas cuerpos mitosoides en el



estrato espinoso, es importante la presencia de cuerpos mitosoides ya que estos son los que diferencian la HEM del papiloma, verruga vulgar y condilomas.³¹ Dentro de la membrana epitelial se presentan células con citoplasma vacuolado claro, con núcleos picnóticos o ausencia del mismo (coilocitos), localizados principalmente en las capas superiores del epitelio.^{3,5,7,25}

El tejido conjuntivo subyacente suele ser laxo y estar bien vascularizado; presenta un infiltrado variable de linfocitos.^{7,20}

En los estudios ultraestructurales se observan, dentro de las células espinosas superficiales, partículas similares a virus que presentan un patrón parecido al del cristal y miden alrededor de 50 nm. También se encuentran virus dentro de los núcleos y en el citoplasma de las células espinosas.²⁵

En ocasiones no se aprecian partículas virales en las células, la ausencia de estas estructuras ha sido reportada por algunos autores como partículas que se pierden al queratinizarse y descamarse las células infectadas; debido a esto se ha sugerido que el virus se replica en las células superficiales, de forma similar a lo que sucede en el condiloma y la verruga vulgar, en un estudio de hibridación *in situ*, se demostró positividad en todos los casos de células superficiales no queratinizadas y escasa en las más profundas.

A pesar de ello, la hiperplasia, la vacuolización del epitelio, la degeneración granular y la picnósis en coilocitos, además de los cambios degenerativos en células basales y parabasales, sugiere que se trata de una infección viral. El aumento en el número de indentaciones y la condensación en la periferia de la cromatina en las células basales, así como el aumento de los organelos celulares, son manifestaciones del daño celular inducidos por la infección viral, al parecer están relacionados con el proceso degenerativo.

Estos hallazgos histológicos y el estudio de ultraestructura confirman el carácter viral de la enfermedad.³²

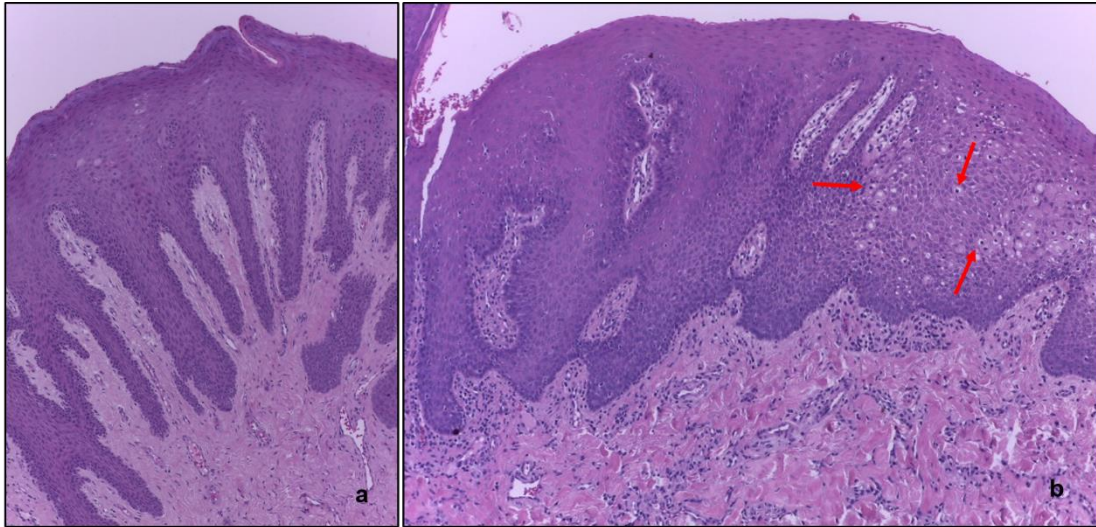


Figura 4. Fotomicrografías de HEM teñidas con Hematoxilina y Eosina a 100X. a) Se observan clavos epiteliales largos y delgados, convergentes hacia el centro de la lesión, presencia de acantosis e hiperqueratosis en el estrato superficial, tejido conjuntivo sin aparente alteración. b) Se observan crestas epiteliales fusionadas en diferentes estratos, con presencia de acantosis y coilocitosis en la región suprabasal (flechas). Fuente: Archivo clínico de Clínica de Medicina Bucal, DEPel.

2.8 Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de estas lesiones se hace básicamente por el aspecto clínico de las lesiones, basado también en un cuidadoso examen, y la historia clínica del paciente revisada exhaustivamente. Los datos importantes como el origen racial, el estatus socioeconómico, condiciones de vida, antecedentes familiares de lesiones similares que afectan a parientes cercanos o de primer grado que viven en el mismo hogar, el intercambio de objetos de uso común, y de la falta de higiene, que se observa típicamente en las comunidades indígenas. Las lesiones también son fáciles de identificar debido a su multiplicidad, características clínicas, y la topografía típica intraoral.^{23,24}

Sin embargo, el diagnóstico definitivo siempre se garantiza por medio del examen histopatológico y la detección de VPH en el tejido lesional. La aplicación local de una solución de ácido acético al 3% se ha usado en algunos estudios para ayudar a la localización de un sitio de la biopsia cuando las



lesiones no se detectaron fácilmente, pero son sospechosas clínicamente.^{11,23,24}

Se pueden pedir adicionalmente exámenes de laboratorio para VIH y otras enfermedades de transmisión sexual para descartar lesiones de origen sexual e inmunosupresión.²²

El conocimiento que se tiene sobre la HEM y su estudio son muy limitados. Sin embargo, a partir de la década de los 70's, que la etiología fue asociada a causas virales, específicamente VPH, ha cobrado mayor fuerza a medida que se realizan investigaciones en área de biología molecular, como la hibridación del ADN, técnica basada en la capacidad de los ácidos nucleicos de unirse entre sí, que presentan las monocadenas con secuencias de bases complementarias con las que se puede demostrar con gran especificidad la presencia de determinadas secuencias de DNA o de RNA en su localización en la célula, mediante una sonda formada por un ácido nucleico monocatenario. con una secuencia de bases complementaria a la secuencia que se desea demostrar.³³ Y la PCR, que han servido como herramienta diagnóstica donde se muestra la sensibilidad y especificidad del virus.^{7,24}

En la actualidad la detección de rutina de VPH en lesiones ocasionadas por la HEM sigue siendo difícil por los diferentes métodos de detección disponibles, ya que no son 100% positivas, y cada método tiene sus propias ventajas y desventajas.

Se utilizan los marcadores inmunológicos de suero para la detección de anticuerpos de VPH por ELISA, pero la presencia de anticuerpos contra VPH en suero no se considera una indicación de la presencia de infección activa. La hibridación *In situ* (ISH) tiene la desventaja de ser lento y tiene baja sensibilidad. La transferencia de Southern blot (SB) ha sido uno de los métodos estándar de oro utilizados para la detección de VPH y tiene la ventaja de diferenciar entre el ADN episomal (que es extra cromosómico y de



replicación autónoma) y el ADN que se integra dentro del cromosoma huésped, tiene una alta sensibilidad y puede detectar aproximadamente 0,1 copia de ADN del VPH por célula; sin embargo, se requiere para aislar y purificar el ADN celular y digerir en fragmento.

Aunque la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es uno de los métodos más específicos y sensibles que se ha utilizado para la detección de ADN de VPH, todavía hay una posibilidad de resultados falsos negativos debido a la selección del cebador, y existe una probabilidad de contaminación de la muestra; además la presencia de ADN de VPH no siempre puede indicar la presencia de la producción viral activa.¹¹

Una ventaja adicional de PCR es que hay una gran gama de diversidad viral que puede ser identificada.²⁴

En general, muchas causas se han relacionado con el fracaso en la detección del VPH como la insuficiencia de llevar a cabo el procedimiento de secciones seriadas durante el procesamiento de muestra de tejido debido a la falta del material de estudio, por ejemplo, puede conducir a la falta de células positivas. La degeneración de ADN también puede reducir la tasa de detección de HPV durante la fijación en formalina, el ADN de las muestras incluidas en parafina puede tener menos accesibilidad para las sondas virales debido al efecto de la formalina.

La técnica de detección puede pasar por baja cantidad de ADN del VPH en algunas lesiones de HEM examinados. La contaminación también es posible debido al uso de guantes, instrumentos o aerosolización. En algunos estudios, la pérdida de detección de VPH en lesiones de HEM puede ser debido a la presencia de un genotipo de VPH, desconocido en el momento del estudio y, por lo tanto, no fueron adecuadas las sondas utilizadas.¹¹

Otra técnica que debe de mencionarse es el análisis inmunohistoquímico, el cual identifica antígenos específicos en los tejidos o células por medio de la



interacción antígeno-anticuerpo, este sitio de unión del anticuerpo se identifica por el marcado directo del anticuerpo, o mediante el uso de un método de marcaje secundario.^{34,35}

Los estudios anteriormente mencionados demostraron la presencia de VPH 13 y 32 principalmente para la HEM, el hecho de no realizar estos procedimientos no descarta la enfermedad; sin embargo, es importante insistir en la realización de alguna de estas técnicas ya que puede haber otras cepas incriminadas en la etiopatogenia de esta entidad, y que solamente serán identificadas si se emplea rutinariamente esta metodología diagnóstica.⁸

Es de suma importancia un diagnóstico preciso de la HEM debido a la necesidad de diferenciar de otras entidades patológicas que son similares y tienen una etiología, tratamiento y pronóstico distinto.²⁴

2.9 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial debe realizarse con otras lesiones benignas producidas por el VPH como son el papiloma viral (VPH 6, 11, 13, 26 y 32) la verruga vulgar (VPH 2, 4), el papiloma escamoso múltiple y el condiloma acuminado bucal (VPH 2, 6, 11, 16, 32).¹³

Asimismo, con entidades aisladas como hiperplasia fibrosa inflamatoria, hiperplasia papilar inflamatoria, verruciforme xantoma, estos tres tipos de lesiones son reactivas, y en la mayoría de los casos un agente irritante puede ser identificado, el carcinoma verrugoso es una neoplasia que se produce en un grupo de edad diferente, síndrome de Cowden presenta hamartomas múltiples característica de un grupo de mayor edad, presenta pólipos fibroepiteliales consistentes, menos móviles y tienen diferente topografía intraoral y en otras partes del organismo como piel, mama, tiroides, estomago o colon, también el síndrome de Gorlin-Goltz (hipoplasia dérmica focal) y neurofibromatosis entre otros que presentan aspectos clínicos mucocutáneos.



También debe diferenciarse de las lesiones de la Enfermedad de Darier, de Crohn y la piostomatitis vegetante.^{3,7,10,22,24,28}

2.10 Pronóstico

El pronóstico de las lesiones de la HEM es bueno, debido a que el curso de la enfermedad es benigno con nula tendencia a malignizarse. Y a que la mayoría de las lesiones remiten espontáneamente, sin embargo se recomienda la revisión periódica, para evitar la malignización de las lesiones sobre todo si están asociados con hábitos que puedan afectar las mucosas (fumar, beber alcohol, relaciones orogenitales y facticias).²¹ Las lesiones que no remitan o causen problemas funcionales o estéticos deben ser eliminadas mediante una variedad de tratamientos tales como escisión quirúrgica, la ablación con láser, crioterapia, electrocauterización, administración de interferón, ácido retinoico y la cirugía láser con CO.^{5,23,26}

2.11 Tratamiento

No existe un tratamiento particular, sobre todo cuando la lesión es extensa. Se recomienda la abstinencia terapéutica, se ha sugerido desde la vigilancia de las lesiones, debido a que en ocasiones se resuelven espontáneamente, en meses, o persistir por varios años; también dado el carácter asintomático de la enfermedad y que suele haber una involución espontánea, las lesiones que no remiten y requieren tratamiento son aquellas que interfieren en la masticación, se ulceran, presentan fricción continuamente o las cuales son un problema estético para el paciente. La elección es la eliminación quirúrgica dado que se resuelve rápidamente, y se puede confirmar el diagnóstico mediante un estudio histopatológico.^{5,6,7}

Se han sugerido varias modalidades de tratamiento como el tratamiento quirúrgico, la criocirugía y la ablación con 808nm de láser dióxido de carbono (CO₂) que actúa destruyendo los tejidos, la fuerza del rayo es ampliamente absorbida por los tejidos que contienen agua y dentro de ellos es convertida



en calor, el resultado es una destrucción muy localizada de los tejidos por una evaporación, sufriendo un mínimo daño a los tejidos adyacentes, también la cauterización, así como la utilización de medicamentos como sulfonamidas, también la administración de vitamina A y E, en lesiones pequeñas.

En la literatura se ha sugerido la utilización de medicamentos para el VPH que no son de uso en cavidad bucal por su alta agresividad a los tejidos como el imiquimod 5% o 7.5% el cual es un medicamento que actúa como inmunomodulador local, amplificando la respuesta inmune innata mediante la unión a receptores de la superficie celular que induce la liberación de citocinas, en especial interferón alfa (IFN- α), interleucina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) a partir de monocitos, macrófagos y células dendríticas; y la activación de la inmunidad adquirida (principalmente la respuesta inmune celular) por la estimulación de células natural killer, macrófagos, la proliferación y la diferenciación de los linfocitos B para producir inmunoglobulinas y la función de los linfocitos T citotóxicos que actúan contra células infectadas por virus o activan células tumorales, inhibiendo la replicación viral de VPH, también aplicaciones tópicas de interferón- β el cual es una citoquina con actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora, de igual manera se ha utilizado interferón α sistémico o intralesional, (el interferón- α puede ser más eficaz que el interferón- β)¹¹ la resina de podophyllin al 25% la cual es una resina obtenida de podophyllum utilizado como cáustico, la cantaridina que es un compuesto químico obtenido de un coleóptero, con la capacidad de producir ampollas, el ácido retinoico, 5-Fluorouracilo bleomicina y el ácido tricloroacético de 35 a 70%. Aunque es probable que las lesiones sean resistentes y recidivantes al tratamiento.^{3,5,7,8,11,13,24}

Recientemente se ha planteado la posibilidad de utilizar antivirales como el methisoprinol.²



2.12 Marcadores biológicos asociados a HEM

De los estudios inmunohistoquímicos utilizados anteriormente para HEM cabe resaltar el Factor de proliferación celular (PC10) mediante la técnica avidina-biotina. La tinción fue positiva en todos los especímenes con la misma intensidad.³²

Otro estudio inmunocitoquímico se realizó mediante la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa, y se utilizó un anticuerpo policlonal contra citoqueratinas de alto peso molecular (Dakopatts) las citoquinas implicadas incluyeron 14, 15, 16 y 19 (localizada por el anticuerpo anti citoqueratina KA4), 65 a la gama de 67-kD (localizada por el anticuerpo anti citoqueratina KA5), así como de citoquinas 72-kD (localizadas por el anticuerpo monoclonal KA5). Tejido normal, tejido oral epitelial, tejido de la glándula salival normal, de verrugas vulgares, y los casos de carcinoma epidermoide bien diferenciados se utilizaron como controles, resultando en una expresión alterada de citoqueratinas debido al proceso degenerativo celular inducido por este virus, las partículas virales también pueden modificar el patrón metabólico de citoqueratinas epiteliales y causar la degeneración irreversible de las células epiteliales que modifican la síntesis de citoqueratina.^{36,37}

Existen otros marcadores empleados para determinar qué características de la conducta biológica puede verse alteradas o modificadas. Es el caso de bcl-2, p53 y ciclina D1, que han sido empleados en otro tipo de enfermedades aportando información útil para poder inferir cuál es su conducta.

2.12.1 Bcl-2

El gen bcl-2 codifica una familia de proteínas de 25 Kd, localizadas en la membrana externa de la mitocondria, envoltura nuclear y retículo endoplásmico de las células. Se ha visto una sobreexpresión de bcl-2 en neoplasias hematopoyéticas y en algunos tumores que incluyen al cáncer oral.



Fue identificado por primera vez como el gen implicado en los linfomas B de células foliculares, de los cuales el 85% tiene como característica común la translocación del gen *bcl-2* a la posición 14q32. La proteína *bcl-2* se encuentra en linfocitos B y T normales y su expresión disminuye en los centros germinales estimulados para la proliferación.

El protooncogén *bcl-2* bloquea una vía común de apoptosis, lo que impide que el ADN dañado funcione como una señal de activación de muerte celular o mediante el bloqueo de los productos de genes implicados en la muerte celular programada. Su acción es prevenir la muerte prematura de las células mitóticas y prolongar la supervivencia celular para favorecer la aparición de más mutaciones.

La proteína *bcl-2* por sí misma no puede transformar las células, pero puede hacerlas susceptibles de ser transformadas por otros oncogenes como *myc*.^{38,39}

2.12.2 p53

El supresor de tumores *p53* es una fosfoproteína encontrada en las células tumorales de diferente origen, pero apenas detectable en el núcleo de las células normales. En el estrés celular inducido por daño en el ADN, *p53* puede detener la progresión del ciclo celular, permitiendo que el ADN sea reparado o puede conducir a la apoptosis. Estas funciones se consiguen, por la propiedad de transactivación de *p53*, que activan una serie de genes implicados en la regulación del ciclo celular.

El gen *p53* muestra varias características inusuales, la más importante es la capacidad de actuar ya sea como un oncogén dominante o un gen supresor de tumor recesivo. La combinación de eventos genéticos que afectan a ambos alelos del gen da lugar a la pérdida de expresión de *p53* de tipo salvaje (WT). Esto se debe a una pérdida completa de un alelo del gen como resultado de



una delección cromosómica combinada con un punto de mutación de sentido erróneo en el otro alelo.

En las células cancerosas que llevan un p53 mutante, esta proteína ya no es capaz de controlar la proliferación celular, lo que resulta en la reparación del ADN ineficiente y la aparición de células genéticamente inestables. El gen p53 se encuentra en el brazo corto del cromosoma humano 17 y la mayoría de las mutaciones en el gen se agrupan en los dominios mayormente conservados en los exones 4-9.

Una de las características más llamativas de la proteína p53 mutante inactivo es su mayor estabilidad (vida media de varias horas en comparación con 20 minutos para la p53 de tipo salvaje) y su acumulación en el núcleo de las células neoplásicas. La inmunotinción positiva suele ser indicativo de anomalías del gen *p53*, pero es dependiente del tipo de mutación de p53.

La pérdida de actividad de p53 de tipo salvaje induce una liberación del punto de control del ciclo celular G1-S después de daño en el ADN, aumentando la inestabilidad genómica y la amplificación del gen.

La unión de p53 WT a proteínas víricas como proteína E6, producto del virus del papiloma humano, así como a algunas proteínas celulares, puede dar lugar a un complejo inactivado y una pérdida de actividad de supresión de la transformación.

Existe concordancia entre la frecuencia de la inmunotinción positiva y la frecuencia de los tumores con mutaciones detectadas por secuenciación directa del ADN.

El análisis de p53 en los estados neoplásicos o preneoplásicos es una útil herramienta que nos puede proporcionar información sobre el proceso oncogénico que permite su investigación.^{1,38,40}



2.12.3 VPH

El virus de VPH es un virus pequeño, icosaédrico miembro de la familia papillomaviridae. Es epiteliotrópicos tienen un genoma de ADN circular de doble cadena dentro de un encapsulado no envuelto partícula viral y se agrupan en más de 120 tipos sobre la base de secuencias genéticas de la proteína de la cápside externa L1. La infección por VPH comienza cuando entra en el cuerpo a través de pequeñas abrasiones, cortes o desgarros en las membranas de piel o mucosa. El virus infecta los queratinocitos basales que tienen el potencial para la diferenciación y asume el control de procesos celulares para hacer ADN viral y las proteínas. Nuevos virus se ensamblan y se liberan de la superficie del epitelio; no se reconoce ninguna transmisión por vía sanguínea sistémicamente. En base a su tropismo de tejidos, los tipos de VPH se dividen en cutaneotrópico (tipos 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 y 65) y mucosotrópico de este último existen más de 40 tipos.⁴¹ Distintos genotipos específicos de VPH se correlacionan con lesiones morfológicas, por ejemplo, VPH 6/11 asociadas a condilomas mientras VPH 16/18 suelen ocasionar neoplasias de alto grado intraepitelial cervical (NIC) y el carcinoma de células escamosas invasivo.

En base a su potencial oncogénico, los virus se clasifican en alto y bajo riesgo. Se ha establecido una asociación entre el VPH de alto riesgo y cáncer de cuello uterino. Por lo que se piensa que la detección de VPH puede ayudar a predecir el potencial invasivo de alto grado CIN.

La detección de HPV en muestras clínicas depende de la demostración de los componentes virales en las células y tejidos. Esto implica la detección de proteína o ácido nucleico. Las proteínas virales pueden ser visualizadas mediante técnicas de inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos dirigidos a las proteínas virales son dependientes de la expresión/síntesis de estas por el virus, que es dependiente de la transcripción/traducción del genoma viral dentro del núcleo.



Los anticuerpos policlonales dirigidas a proteínas de la cápside del virus del papiloma bovino son aplicables a tipos de VPH en muestras de biopsias humanas ya que produce una reacción cruzada con varios subtipos humanos. La síntesis de proteínas de fusión bacterianas utilizadas como inmunógenos en ratones ha dado lugar a la generación de anticuerpos monoclonales para proteínas virales específicas para lograr especificidad viral.

Debido al uso de la proteína VPH 16 L1 (cápside) se han producido varios anticuerpos de diferente especificidad. La inmunorreactividad de los anticuerpos a la proteína de la cápside de VPH depende de la replicación viral activa que está estrechamente relacionada con la producción de queratina. Lo cual produce una señal intranuclear en el tercio superior de los epitelios escamosos que albergan el virus.^{38,41}

2.12.4 Ciclina D1 (bcl-1)

El gen de ciclina G1, la ciclina D1 (PRAD-1, CCND-1), localizado en el cromosoma 11q13, es una proteína de 36 kD, muestra características de oncogenes celulares conocidos. Desempeña un papel integral en el control normal del crecimiento celular y una función complementaria en la transformación in vitro de las células cultivadas.

Una regulación anormal conduce a la sobreexpresión de ciclina D1 incluyendo amplificación genómica en una variedad de carcinomas con translocaciones recíprocas cromosómicas en el linfoma de células del manto. En conjunto, se requieren actividades de ciclina D1 y quinasa dependiente de ciclina (CDK) y para la finalización de la transición G1 / S en el ciclo celular normal de los mamíferos.

En tejidos normales, la expresión de ciclina D1 está restringido a la zona proliferativa de los tejidos epiteliales y está ausente de otros tejidos como los ganglios linfáticos, el bazo y las amígdalas.



Se demostró con inmunohistoquímica la proteína ciclina D1 nuclear en el 75% de los linfomas de células del manto; no se encuentra en las células B normales y de otros linfomas de células B.^{38,42}

Tabla 1. Métodos y marcadores empleados en la HEM				
Nombre	Tipo de estudio o prueba	Localización celular (si aplica)	Patrón de expresión	Autor
Hibridación <i>in situ</i>				
VPH-6 y 11	Hibridación <i>in situ</i> Sondas marcadas con digoxigenina.	Reacción nuclear azul	Más prominente en las células superficiales y también se detectó, aunque la tinción de los núcleos más profundos en células capas del estrato espinoso se observó en algunas muestras.	Premoli de Percoco G. y cols. 1992. ⁴³
VPH-13 y 32	IHQ Hibridación <i>in situ</i>	Negativos Núcleo		Henke RP. y cols. 1989. ⁴⁴
VPH VPH-13	Hibridación <i>in situ</i> PCR cebadores MY09 y MY11	Tinción positiva nuclear No aplica		Tehranchinia Zohreh. y cols. 2014. ²⁶
HPV-13	Hibridación <i>in situ</i> PCR	Tinción positiva nuclear		Bennett LK. y cols. 2009. ⁴⁵
VPH-32, 13 y 11	IHQ Hibridación <i>in situ</i>	Inmunoperoxidasa-PAP Depósito intranuclear azul-marron.	Mostraron una mezcla de señales fuertes, medios y débiles que se extienden desde la capa superficial del epitelio a	Padayachee A. y cols. 1991. ⁴⁶



	con biotina trifosfato de desoxiuridina		la capa intermedia y en algunos casos, las áreas parabasales, siendo este último señales débiles.	
PCR				
VPH	PCR Cebadores MY11 y MY9	No aplica		Jayasooriya PR. Y cols. 2004. ⁴⁷
VPH-6 y 25	PCR usando 3 juegos de oligonucleótidos universales contra el gen L1 y secuenciación de ADN	No aplica	Mucosa labial sup. e inf. Positiva 2+ (infección leve).	Aldama Caballero A. Y cols. 2013. ¹³
VPH-11, 13 y 32	PCR cebadores MY09/MY11	No aplica	Mucosa labial sup. e inf. y lengua.	Güitekin SE. Y cols. 2011. ⁴⁸
VPH-13	PCR método del polimorfismo de longitud de fragmentos PCR inversa. Cebadores MY11 y MY9	No aplica		García Corona C. y cols. 2004. ⁹
VPH-13	PCR	No aplica	Encía inferior izquierda.	Martins A. y cols. 2006. ⁴⁹
VPH-13	PCR Cebadores de consenso MY09 y MY11	No aplica	Correspondiente a la proteína de la cápside L1 de VPH.	Borborema Santos y cols. 2006. ²⁴
VPH-13	PCR	No aplica	Mucosa labial sup. e inf.	Vera Iglesias E. y cols. 2007. ⁵⁰



VPH-13	PCR cebadores MY09/MY11	No aplica		Alsadat Hashemipour M. y cols. 2010. ⁵¹
VPH-13	PCR cebadores GH20, β globin y PC04	β -globina positiva en células de descamación.		González Losa MR. Y cols. 2011. ¹⁸
VPH-13	PCR	No aplica	Mucosa bucal y labial.	Liu N. y cols. 2012. ⁵²
VPH-13	PCR	No aplica		Lama González E. y cols. 2012. ¹⁶
VPH-13	PCR	No aplica	Labio inf. (++) levemente positivo y (+++) moderadamente positivo.	León L. y cols. 2012. ⁸
VPH-13	PCR oligonucleótidos PC04 y GH20	No aplica		Carrillo Montiel JE. Y cols. 2015. ¹⁷
VPH-16	PCR	No aplica	Localización palatal.	Prabhat MPV. y cols. 2013. ¹²
VPH-32 y 16	PCR	No aplica	Mucosa bucal derecha y mucosa lingual inferior.	Liu N. y cols. 2013. ⁵³
VPH-13 y 32	PCR	No aplica		Mosannen Mozaffari P. y cols 2010. ⁵⁴
VPH-13 y 32	PCR Cebadores MY11/MY9	No aplica		Falaki F. y cols. 2009. ⁵⁵
VPH-32	PCR cebadores HPV A6/A8	No aplica	Mucosa labial superior e inferior.	Binder B. y cols. 2007. ⁵⁶
VPH-32	PCR	No aplica	Mucosa labial superior.	Ozden B. y cols. 2011. ⁵⁷



VPH-32	PCR con cebadores genéricos GP5-GP6	No aplica		Gemigniani F. y cols. 2015. ⁵⁸
VPH-55 VPH-13	VPH PCR hibridación. GP5+/GP6+	No aplica		Leonor V. y cols 2005. ⁵⁹
IHQ				
Citoqueratina de alto peso molecular	IHQ	Citoplasma	Patrón heterogéneo en los diferentes estratos epiteliales.	Ledezma Montes C. y cols. 2007. ³⁶
PC10	IHQ	Citoplasma	Capas basales y suprabasales.	González Lopez BS, 2000. ³²
Otras pruebas				
VPH-13	Hibridación de transferencia Southern			Pfister H. y cols. 1983. ⁶⁰
VPH-13	PCR VLP ELISA	No aplica		Cuberos V. y cols 2006. ⁶¹



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la HEM es considerada una patología con un fuerte componente etiológico viral, asociada a la infección por VPH. Su enfoque sobre cuál podría ser la patogenia desarrollada, aún sigue siendo limitado ya que el número de estudios sobre que marcadores podrían ser indicativos de cambios proliferativos o malignos es reducido. Esta patología en la población mexicana ya tiene una presencia importante en regiones del sur del país, por lo que el tener mayor información sobre esta patología es importante, para mejorar el manejo de estos pacientes.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Presentar las características clínicas e inmunohistoquímicas de una serie de casos de HEM de pacientes que acudieron a la clínica de medicina y patología bucal del DEPEI, Facultad de Odontología, UNAM.

4.2 Objetivos específicos

Describir las características clínicas predominantes de una serie de casos de pacientes con HEM.

Describir la inmunoexpresión de Bcl-2, P53, VPH y Ciclina D1 en una serie de casos de HEM.



5. METODOLOGÍA

El presente estudio incluyó la revisión completa de expedientes de un total de 11 pacientes del año 2010 al 2015 con un diagnóstico clínico, e histopatológico en 8 de ellos de Hiperplasia Epitelial Multifocal, en los cuales los últimos mencionados contaban con una biopsia excisional previa, por lo tanto, se analizaron sus laminillas correspondientes y se utilizaron sus cubos de cera para la obtención de muestras de tejido para su posterior análisis inmunohistoquímico. Todos los pacientes fueron diagnosticados e intervenidos en la Clínica de Medicina y Patología bucal del Departamento de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México desde el año 2010 hasta el 2015. Tras la evaluación clínica completa y la realización de las biopsias de las lesiones, como protocolo las muestras fueron colocadas inmediatamente en una solución de formaldehído al 10% e incluidas posteriormente en parafina para llevar a cabo el procesado histológico de las muestras y la posterior tinción de rutina de Hematoxilina y Eosina (HyE).

Este trabajo se realizó sobre cortes histológicos de 5 micras de espesor de bloques incluidos en parafina según el método peroxidasa. Los anticuerpos utilizados fueron: Bcl-2 (sc-492), p53 (sc-126), VPH (BSB-5657) y Ciclina D1 (sc-753).

5.1 Inmunohistoquímica por peroxidasa

Los cortes histológicos fueron colocados sobre portaobjetos silanizados.

Posteriormente se desparafinaron y rehidrataron los cortes mediante inmersiones en xilol y alcohol de manera convencional. Para recuperar los antígenos se empleó un buffer de citratos mediante la ebullición en microondas durante 3'30". Posterior a dejar a temperar las muestras se realizaron lavados a las laminillas con PBS para después incubar con peróxido de hidrógeno al 3% por 20 minutos, con el proceso de lavado con PBS entre cada paso, lo



siguiente fue la incubación con albúmina por el mismo tiempo, terminando la incubación se realizó un lavado con una solución de tritón X-100 por 20 minutos para su posterior incubación con el anticuerpo primario incubando durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C, se utilizó PBS como control negativo.

Posteriormente se realizó el proceso de lavado con PBS y se incubaron nuevamente las laminillas con el anticuerpo secundario y complejo HRP-estreptavidina por 10 minutos a temperatura ambiente cada uno, terminando se reveló el inmunomarcaje con diaminobenzidina (DAB), desechando el sobrante y lavando nuevamente con PBS.

Por último, las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina de Mayer's, deshidratadas y montadas con resina hidrofóbica convencional.

A continuación, se llevó a cabo la toma de las fotomicrografías correspondientes a cada muestra de tejido a través un microscopio de luz marca Leica modelo ICC50HD mediante un software llamado Las EZ las cuales se tomaron a 100 aumentos y 400 aumentos respectivamente considerando la región basal, suprabasal y tejido conjuntivo para cada uno de los marcadores (Bcl-2, p53, VPH y Ciclina D1). De igual forma se tomó una fotomicrografía de cada muestra en su H y E correspondiente.

5.2 Determinación de intensidad de expresión

Obtenidas las fotos, se determinó la intensidad de expresión de cada marcador junto con su control negativo en las regiones asignadas, por medio de un software llamado Imagej, en el cual se marcó manualmente 100 células en cada fotomicrografía incluyendo células que expresaron marca positiva. Por medio del cual se obtuvo la intensidad numérica de cada imagen, lo cual representó la densidad óptica expresada en unidades ópticas (uo). El control negativo fue empleado para normalizar los resultados de expresión. Se obtuvo



media y desviación estándar, así como proporción de las cifras de inmunoexpresión y variables clínicas, respectivamente.

5.3 Recursos

Este estudio fue realizado gracias al apoyo del proyecto PAPIIT IN223414.



6. RESULTADOS

6.1 Clínicos

En los 11 expedientes revisados del año 2010 al 2015 con diagnósticos de HEM la edad promedio de los pacientes fue de 24.3 años, con una mínima de 6 y máxima de 57 años, respecto al sexo 72.7% corresponde al género femenino y 27.2% al masculino. Las regiones anatómicas afectadas con mayor frecuencia fueron la lengua, mucosa yugal, el labio inferior-superior y comisuras (Tabla 2). Cuatro pacientes (36.4%) presentaron lesiones solo en una zona anatómica, 4 (36.4%) en dos zonas, dos (18.2%) en tres zonas y solo 1 paciente (9%) presento afección en 4 zonas anatómicas. Clínicamente se presentó como lesiones pápulo-nodulares elevadas, múltiples en su mayoría, asintomáticas, consistencia blanda, del mismo color de la mucosa adyacente, de superficie lisa o ligeramente rugosa variantes en tamaño, de 2 a 12 mm de diámetro y de bordes bien definidos.

Tabla 2. Localización de las lesiones de HEM y porcentajes					
Paciente	M. Yugal	Labio Sup.	Labio Inf.	Lengua	Comisuras
PB 248-10	*			*	
PB 202-12		*	*		*
PB 486-12	*		*		
PB 525-12				*	
PB 302-13				*	
PB 347-14	*			*	
PB 474-14	*	*	*		
PB 094-15	*			*	
PB 287-15				*	
PB 334-15				*	
PB 499-15	*	*	*	*	

6.2 Histopatológicos

Microscópicamente los hallazgos fueron epitelio plano estratificado paraqueratinizado con acantosis, clavos o crestas epiteliales alargadas y con terminación roma, dirigidos hacia el centro de la lesión, en algunas muestras se presentó la fusión horizontal de las proyecciones epiteliales en diferentes estratos, formando pequeños espacios con tejido conjuntivo. Se pudieron identificar la presencia de coilocitos en las capas más superficiales del epitelio principalmente y se observaron también células con degeneración nuclear (cuerpos mitosoides) en diferentes estratos del epitelio (Fig. 5 y 6).

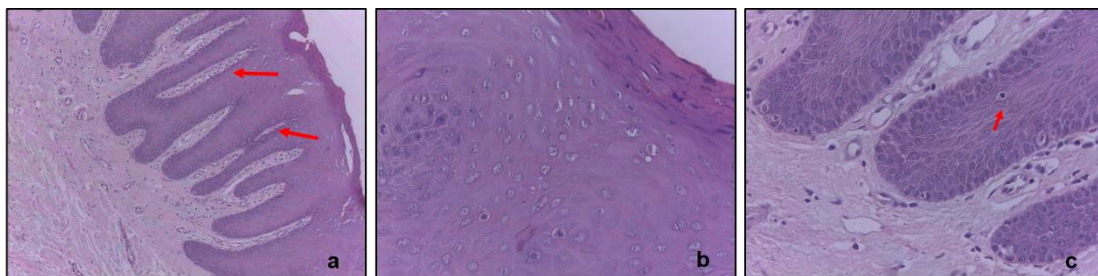


Figura 5. Fotomicrografías de HEM teñidas con Hematoxilina y Eosina. a) Se observan clavos epiteliales largos y con terminación roma, acantosis y fusión de los procesos interpapilares en diferentes estratos. (Flechas) 100X. b) Se observan células con núcleos vacuolados, presencia de coilocitos y figuras mitosoides. 400X c) El tejido conjuntivo no parece tener algún cambio, se observa la presencia de un coilocito (Flecha). Fuente: Archivo clínico de Clínica de Medicina Bucal, DEPel.

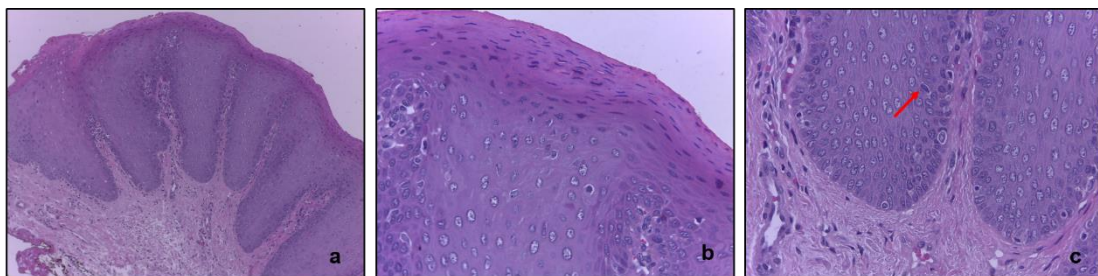


Figura 6. Fotomicrografías de HEM teñidas con Hematoxilina y Eosina. a) Se observan crestas epiteliales alargadas anchas, de terminación roma, convergentes hacia el centro, con acantosis. 100X. b) Se observan células con núcleos vacuolados claros, presencia de coilocitos y figuras mitosoides. 400X c) El tejido conjuntivo no parece tener alteración, sin embargo en el estrato basal existe presencia de células o cuerpos mitosoides (Flecha). Fuente: Archivo clínico de Clínica de Medicina Bucal, DEPel.

6.3 Inmunohistoquímicos

La inmunoexpresión de los diferentes marcadores fue analizada en epitelio como en tejido conjuntivo. Para nuestro análisis inmunohistoquímico solo se emplearon 8 especímenes los cuales contaban con biopsia.

Bcl-2

La inmunoexpresión de Bcl-2 en epitelio de la región suprabasal fue en el 100% (n=8) de las muestras a nivel citoplasmático perinuclear en células espinosas; con una intensidad de 31.05 uo. En la región basal fue el 100% (n=8) en citoplasma con una intensidad de 39.06 uo, en tejido conjuntivo la expresión fue citoplasmática en los fibroblastos en el 100% (n=8) de las muestras con una intensidad de 31.3 uo. En todas las muestras se observó una tendencia de mayor intensidad en el estrato basal, disminuyendo su expresividad en la región suprabasal. (Fig.7)

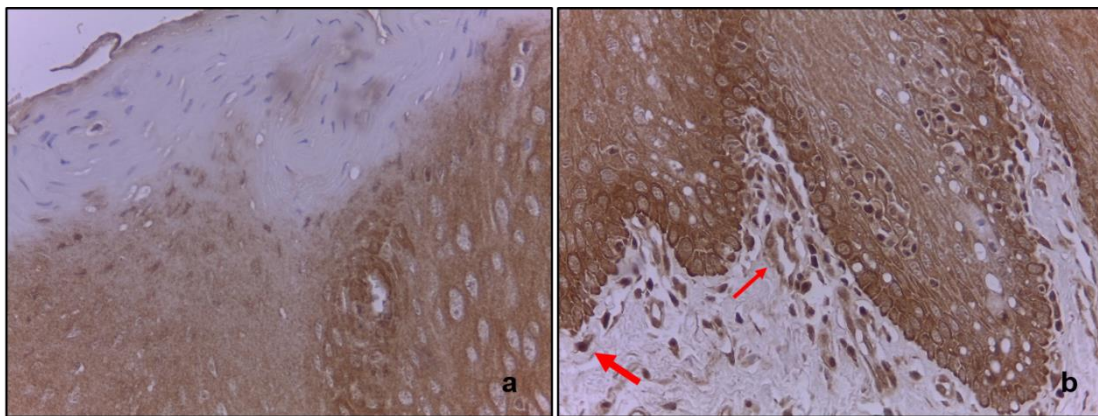


Figura 7. Inmunoexpresión de Bcl-2 a) Región suprabasal de epitelio de HEM, b) Región basal y tejido conjuntivo. La expresión de bcl-2 en región suprabasal fue citoplasmática, al igual que en la región basal. En tejido conjuntivo la expresión fue asociada a fibroblastos (flecha gruesa) y a células endoteliales (flecha delgada). Fotomicrografías a 400 aumentos. Fuente directa.

p53

La inmunoexpresión de p53 en epitelio de la región suprabasal fue en el 37.50% (n=3) de las muestras presentándose en núcleo; con una intensidad

de 6.6 uo. En la región basal fue en el 87.50% (n=7) en núcleo con una intensidad de 16.8 uo, mientras que en tejido conjuntivo fue negativo. (Fig.8)

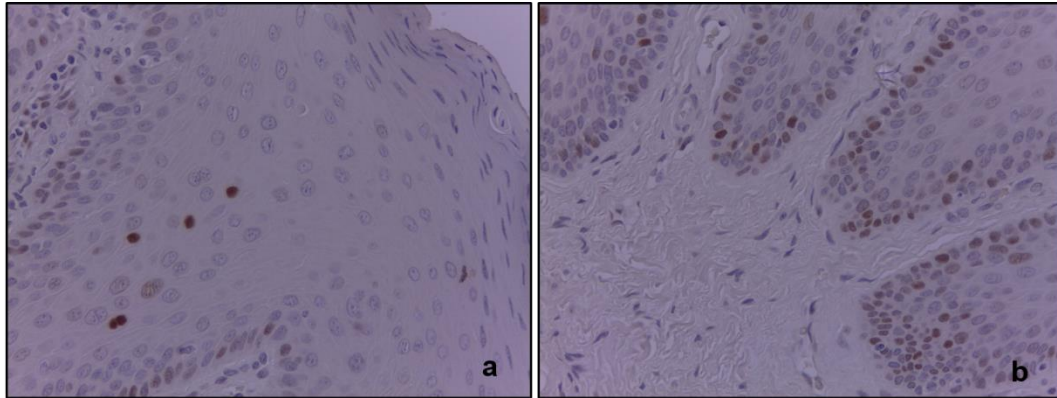


Figura 8. Inmunoexpresión de P53 a) Región suprabasal de epitelio de HEM, b) Región basal y tejido conjuntivo. En la región subbasal se expresa en los núcleos celulares de forma intensa pero menor numero. La expresión en el estrato basal es intensa, mientras que en tejido conjuntivo la expresión es negativa. Fotomicrografías a 400 aumentos. Fuente directa.

VPH

La inmunohistoquímica de VPH en epitelio de la región suprabasal fue de 37.50% (n=3) a nivel nuclear, con una intensidad de 40.01 uo; en la región basal se presentó en el 12.50% (n=1) de las muestras en núcleo, con una intensidad de 5.5 uo, mientras que en tejido conjuntivo fue negativo. (Fig. 9)

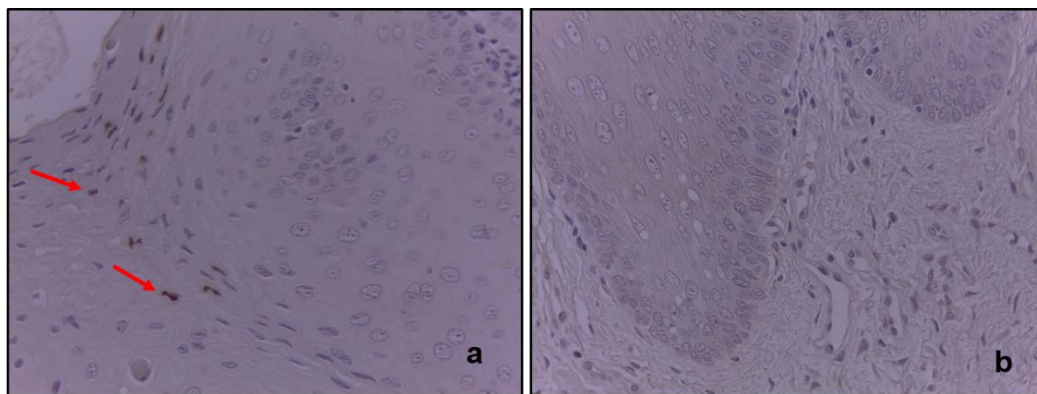


Figura 9. Inmunoexpresión de VPH a) Región suprabasal de epitelio de HEM, b) Región basal y tejido conjuntivo. En la región subbasal se expresa en el núcleo de las células (flechas). Mientras que su expresión es negativa en el estrato basal y tejido conjuntivo. Fotomicrografías a 400 aumentos. Fuente directa.

Ciclina D1

La inmunexpresión de ciclina D1 en epitelio de la región suprabasal fue de 100% (n=8) a nivel citoplasmático, con una intensidad de 2.1 uo, en la región basal se presentó de la misma manera en el 100% (n=8) de las muestras en citoplasma con una presencia mínima de células de expresión nuclear 25% con intensidad de 5.6 uo. Mientras que en el tejido conjuntivo el 100% de las muestras presentó expresión citoplasmática con intensidad de 6.5 uo. (Fig.10)

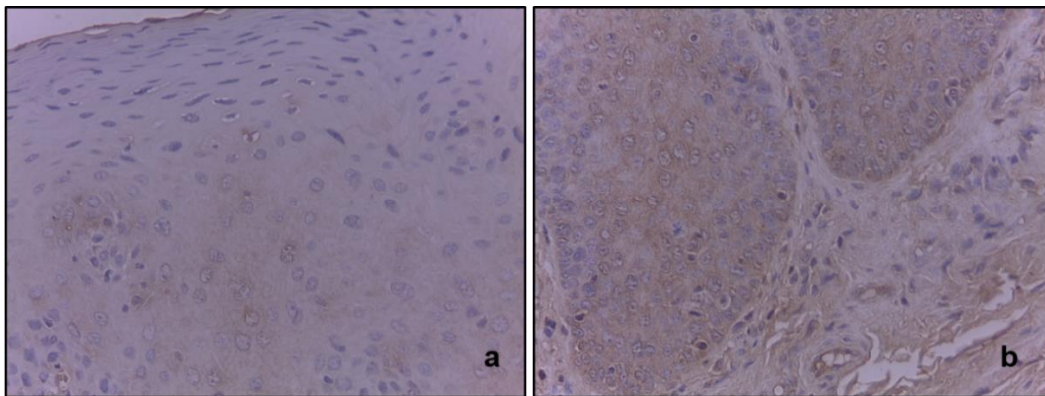


Figura 10. Inmunexpresión de Ciclina D1 a) Región suprabasal de epitelio de HEM, b) Región basal y tejido conjuntivo. La expresión epitelial es leve a moderada en la región suprabasal en el citoplasma de las células, mientras q en el estrato basal se expresa con más intensidad en el citoplasma. En tejido conjuntivo su expresión es citoplasmática. Fotomicrografías a 400 aumentos. Fuente directa.

La inmunexpresión de los marcadores utilizados se graficó de la siguiente manera: (Fig. 11)

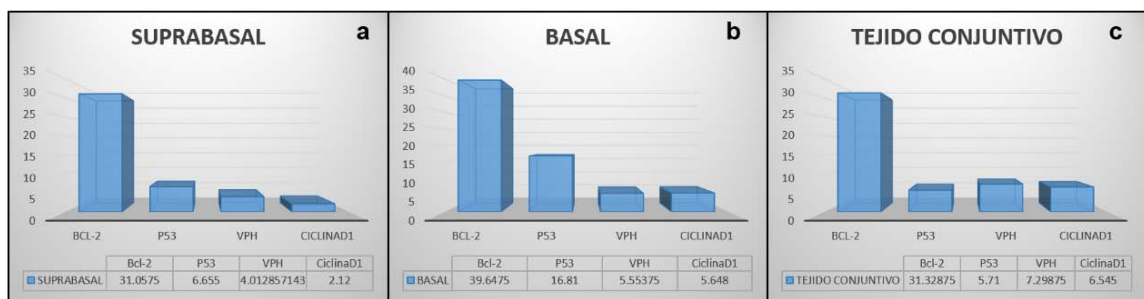


Figura 11. Se muestra la inmunexpresión de los marcadores en: a) Región suprabasal, observando un predominio de Bcl-2, siendo Ciclina D1 el marcador con menor expresión. b) En la región basal, podemos observar el predominio de expresión de Bcl-2, mientras que VPH su expresión es muy baja. c) En tejido conjuntivo se observa una mayor expresión en Bcl-2 mientras que p53 tiene la expresión más baja. Fuente Directa.



7. DISCUSIÓN

En base a nuestro análisis de resultados podemos observar una edad promedio de 24.3 años con un predominio de 72.73% en el género femenino con respecto al masculino de 27.27%.

La cifra más cercana en cuanto al promedio de la edad la reportó Mosannen-Mozaffari en el 2010 con un promedio de edad de 19.5 años,⁵⁴ sin embargo, la mayor parte de las poblaciones reportadas se encuentran en la primera y segunda década de la vida. Diversos autores han reportado una edad promedio menor con un rango de edad de 3 a 17 años mayoritariamente.^{2,3,8,17,18,19,22,23,24,48,52,56}

La diferencia de edad promedio del presente trabajo a los casos reportados anteriormente, puede sugerir una probable predisposición geográfica de los casos estudiados para esta entidad, hecho que nos proporciona un rango de edad diferente. Lo que nos permite creer que la distribución en base a la edad es muy heterogénea.

El género femenino es mayormente afectado que el género masculino, situación que es encontrada por diversos autores en la mayoría de la literatura reportada sobre HEM.^{2,3,17,18,23,37,52,54}

Lo que puede sugerir que la condición de vida en las mujeres o sus hábitos, las predisponen a adquirir la enfermedad, exponiéndose a mayor número de factores de riesgo, lo cual puede deberse a la región de donde provengan.

La región anatómica que presenta una mayor presencia de lesiones de HEM encontramos a la lengua, mucosa bucal, mucosa labial inferior y con menor frecuencia las comisuras labiales.

Ledezma Montes y colaboradores en el 2005 reportaron un resultado similar encontrado en el Servicio de Dermatología del Hospital Manuel Gea González, pero con la mucosa bucal como zona con mayor número de lesiones de HEM.³



A diferencia de Cerón García y colaboradores que en el 2011 en el estudio que realizaron en el Centro Dermatológico de Mérida Yucatán encontraron que la localización más frecuente de las lesiones era en la lengua de sus 71 casos revisados.² Al igual que González Loza y colaboradores en el 2011 y otros autores, que reportaron resultados similares.^{17,18,37}

Clínicamente las lesiones se presentaron de forma papular o nodular; múltiples, asintomáticas de consistencia blanda, superficie lisa y del mismo color de la mucosa adyacente con medidas desde 2 hasta 12 milímetros. Diversos autores han mencionado las características clínicas de la enfermedad, las cuales son similares en la mayoría de los casos, aunque pueden diferir en aspectos como un menor número de lesiones o de menor diámetro y tamaño en pacientes de mayor edad, a diferencia de las lesiones presentadas en pacientes infantiles.

Histopatológicamente encontramos en todas las muestras hiperplasia epitelial consistente en hiperparaqueratosis, acantosis con una elongación de los clavos y crestas epiteliales, también observamos una fusión anastomosante de los procesos interpapilares en diferentes estratos del epitelio, desapareciendo en algunas ocasiones y formando zonas con tejido conjuntivo dentro, se observó la presencia de células con vacuolización nuclear (cuerpos mitosoides), y la presencia de coilocitos. El tejido conjuntivo no presentó alteración en ninguna de las muestras. Muy similares a los hallazgos microscópicos encontrados por Ledezma Montes en 2005.³

La inmunoexpresión de bcl-2 en nuestros casos de HEM fue predominantemente en citoplasma con una mayor intensidad a nivel de estrato basal, disminuyendo su expresión en estratos superiores. Como se ha mencionado, esta molécula su función principal es la de evitar la apoptosis, en la HEM, esta función podría estar vinculado con el desarrollo de la hiperplasia epitelial. Ya que para poder desarrollar una mitosis constante se debe asegurar la supervivencia del mayor número de células.



La inmunoexpresión de p53 en epitelio de HEM en la región suprabasal y basal fue en núcleo, con predominio de la región basal. p53 es una molécula reconocida como un gen supresor tumoral, cuya función es vigilar el correcto estado de las células, su formación y degradación es constante, solo se observa aumento de su presencia en las células cuando existe un daño o transformación neoplásica.^{38,40,1} En nuestros casos observamos que el 87.5% de ellos presento positividad nuclear, sugiriendo que en la HEM la alta proliferación celular o hiperplasia puede estar acompañada de cambios o transformaciones en el ADN de dichas células.

Es conocido que el VPH es el factor de riesgo por excelencia para el desarrollo de HEM. Nuestro análisis inmunohistoquímico indicó que la localización de este virus es mayor a nivel suprabasal con el 37.5% de las muestras a nivel nuclear. Esto concuerda con los datos histopatológicos, al coincidir con la localización de coilocitos. Estas son reconocidas como células características afectadas por una infección viral por VPH. Lo cual concuerda con resultados de diferentes autores a considerar a este patógeno dentro de la etiología y desarrollo del HEM.

La inmunoexpresión de ciclina D1 en epitelio fue a nivel citoplasmático tanto para área basal como suprabasal, solo en la región basal se observó expresión a nivel nuclear, lo cual sugiere la capacidad germinativa exclusiva de dicho estrato.^{38,42} Esta molécula es un mediador del ciclo celular para el paso de G1 a S. Su presencia a nivel nuclear es indicativa de dicha función. Lo cual nos indica que en la HEM los cambios epiteliales propios de la lesión pueden ser derivados de modificaciones el estrato basal.



8. CONCLUSIONES

Los resultados clínicos e histopatológicos obtenidos concuerdan con lo reportado anteriormente en la literatura, por ejemplo, las lesiones papulo-nodulares, de superficie lisa o ligeramente rugosas, asintomáticas, del mismo color de la mucosa adyacente o ligeramente pálidas, bien delimitadas y con una variedad de tamaño de 0.2 a 10 milímetros, lo cual es característico de las lesiones por HEM. En cuanto a los hallazgos microscópicos, las muestras de tejido teñidas con H y E analizadas al microscopio presentaron en todas sus muestras epitelio plano estratificado paraqueratinizado, con una marcada acantosis, clavos epiteliales de diferente espesor que presentaban ocasionalmente anastomosis de las proyecciones papilares, coilocitosis en algunas de las muestras en su mayoría en la región suprabasal y también la presencia de cuerpos mitosoides en diferentes estratos del epitelio.

Por medio de este trabajo se llegó a la conclusión que la inmunoexpresión con el marcador Bcl-2 fue predominante en la región basal, lo que sugiere que es en el estrato basal donde mayormente puede estar activo esta molécula previniendo la muerte prematura de las células mitóticas favoreciendo el crecimiento de las lesiones. Esto se confirmó al analizar la expresión de ciclina D1, que presentó una conducta similar, y mayor expresión nuclear a nivel del estrato basal. Esto nos sugiere un aumento en el número celular (hiperplasia), asociado a la HEM que puede derivar de la actividad de estas dos moléculas. Respecto a la inmunoexpresión p53, interesantemente esta molécula se presentó únicamente en células de la región basal, lo cual es indicativo de células con genoma dañado por la infección por VPH, el cual fue comprobado inmunohistoquímicamente.

Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo, el conocimiento respecto a la patogenia de esta enfermedad es mayor, ya que fue la primera vez que se reportan hallazgos inmunohistoquímicos similares. Lo cual podría servir a futuro para nuevas investigaciones encaminadas o dirigidas respecto al HEM.



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins y Cotran Patología estructural y funcional*. 8ª ed. USA. Editorial Saunders Elsevier; 2010. p 8-9.
2. Cerón García IA, Cerón Espinosa J, González Loza MR. *Hiperplasia epitelial multifocal: revisión de 71 casos*. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. 2011; 9 (3): 176-180.
3. Ledesma Montes C, Vega Memije E, Garcés Ortíz M, Cardiel Nieves M, Juárez Luna C. *Hiperplasia multifocal del epitelio. Reporte de nueve casos*. Medicina y Patología Oral. 2005; 10: 394-401.
4. Rosa LN, Gedoz L, Hildebrand LC, Carvalho A, Chevarría MG. *Hiperplasia Epitelial Focal: ¿por qué Enfermedad de Heck?*. Avances en odontoestomatología. 2003; 19 (5): 239-244
5. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AD. *Oral and maxillofacial pathology*. 4ª ed. USA. Editorial Saunders Elsevier; 2016. p336-338.
6. Villanueva Álvarez Santullano SA, Hernández Nuñez A, Castaño A, Miñano Medrano R, Córdoba Guijarro S, Borbujo Martínez J. *Hiperplasia epitelial multifocal: un caso familiar*. Anales de pediatría. 2010; 73 (6): 357-360.
7. Fernández López RG, Bárcenas Cabrera J. *Hiperplasia epitelial multifocal. Presentación de dos casos clínicos*. Odontología. 2012; 9 (112): 10-14.
8. León L, Cubilla E, Guzmán A, Mendoza G, Celas L, Arenas R, et. al. *Hiperplasia epitelial multifocal. Reporte de dos casos relacionados con VPH-13*. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. 2012; 10 (4): 256-259.
9. 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: 1227-1231.

10. Segura Saint GR, Toro Rojas M, Ceballos Salobreña A, Aparicio Soria JL, Fuentes Vaamonde H. *Focal epitelial hiperplasia. A rare disease in our área*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005; 10: 128-131.
11. Said AK, Leao JC, Fedele S, Porter SR. *Focal epithelial hiperplasia – an update*. Journal of Oral Pathology & Medicine. 2013; 42: 435-442.
12. Prabhat MPV, Raja Lakshmi C, Madhavi NS, Mulk Bhavana S, Sarat G, Ramamohan K. *Multifocal Epithelial Hyperplasia of Oral Cavity Expressing HPV 16 Gene: A Rare Entity*. Case Report in Dentistry. 2013; 1-4.
13. Aldama Caballero A, Acosta Sens R, Rivelli V, Guglielmone C, Mendoza G, Berumen J, et. al. *Hiperplasia epitelial multifocal relacionada a HPV 6 y 25. A propósito de dos casos en Paraguay*. Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana. 2013; 43 (1): 44-48.
14. Scheffer KD, Berditchevski F, Florin L. *The tetraspanin CD151 in papillomavirus infection*. Viruses. 2014 Feb 18;6(2):893-908.
15. Romero Martínez CA, Reyes Velázquez JO. *Hiperplasia epitelial focal (enfermedad de Heck). Presentación de un caso*. Medicina Oral 2001; 3 (3): 118-121.
16. Lama González E, Conde Ferréaz L, Puerto Solís M, González Loza MR. *Detección del papilomavirus 13 en pacientes con hiperplasia epitelial multifocal y sus familiares asintomáticos*. Revista Odontológica Latinoamericana. 2012; 4 (2): 29-32.
17. Carrillo Montiel JE, Conde Ferréaz L, Ayora Talavera G, Puerto Solís M, González Loza MR. *Estudio de la hiperplasia epitelial multifocal en tres comunidades rurales del estado de Yucatán, México*. Revista Biomédica. 2015; 26: 133-137.
18. González Loza MR, Suarez Allén RE, Canul Canche J, Conde Ferréaz L, Eljure López N. *Multifocal epithelial hyperplasia in a community in the*



- Mayan área of Mexico*. International Journal of dermatology. 2011; 50: 304-309.
19. Méndez Santillán E. *Hiperplasia epitelial focal (enfermedad de Heck)*. *Reporte de un caso*. Revista Mexicana de Pediatría 2003; 70 (3): 132-134.
 20. 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 de México. 2008; 29 (1): 31-35.
 21. Corrado G, Haroyan E, Martín Guerra MC, Pérez Sánchez B, Tamayo Gutiérrez D. *Hiperplasia epitelial focal (Enfermedad de Heck): Búsqueda bibliográfica de los últimos 12 meses*. Asignatura de Anatomía Patológica General y Bucal, URCJ – Grupo V: Curso Académico 2009- 2010.
 22. Puriene A, Rimkevicius A, Gaigalas M. *Focal epithelial hiperplasia: Case report*. Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal. 2011; 13 (3): 102-104.
 23. Martínez Serna IV, Hernández Molinar Y, Tejeda Nava FJ, Bologna Molina R, Aranda Romo S. *Hiperplasia epitelial multifocal: Reporte de tres casos clínicos y revisión de la literatura*. Revista ADM. 2014; 71 (1): 23-27.
 24. Borborema Santos CM, De Castro MM, Benevides dos Santos PJ, Talhari S, Astolfi Filho S. *Oral Focal Epithelial Hyperplasia: Report of Five Cases*. Braz Dent Journal. 2006; 17 (1): 79-82.
 25. Regezi JA. *Patología Bucal*. 1ª Ed. USA. Interamericana McGraw-Hill; 1991.p182-184.
 26. Tehranchinia Z, Mozafari N, Barikbin B, Nadji Seyed A. *Multifocal epithelial hiperplasia: report of 3 cases*. Dermatology Online Journal. 2014; 20 (8).



27. Cawson RA, Odell EW. *Fundamentos de Medicina y Patología*. Ed. Churchill Livingston. 8a ed. 2009. p318
28. Gnepp DR. *Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck*. 2ª Ed. USA. Saunders Elsevier; 2009. p256-257.
29. Braz Campos D, Vargas Pinto JM, Jacks Jorge Jr, Oslei Paes de Almeida. *Extensive Focal Epithelial Hyperplasia: Case Report*. J. Can. Dent. Assoc. 2005; 71(10): 769–71.
30. McCullough MJ, Savage NW. *Oral viral infections and the therapeutic use of antiviral agents in dentistry*. Aust Dent Journal. 2005; 50 (2): 31-35.
31. Harris Ricardo J, Fortich Mesa N. *Caso severo de manifestaciones bucales de la hiperplasia epitelial focal*. Salud Uninorte. 2012; 28 (3): 445-450.
32. González López BS. *Hallazgos histológicos de inmunohistoquímica y ultraestructura en hiperplasia epitelial focal*. Ciencia Ergo Sum. 2007; 7 (2): 121-125.
33. Geneser F. *Histología. Sobre bases biomoleculares*. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana; 2000. p 45-46.
34. Kim Suvarna S, Layton C, Bancroft JD. *Bancroft's, Theory and Practice of Histological Techniques*. 7ª ed. UK. Churchill Livingstone Elsevier; 2013. p 381-384.
35. Wild D, Rhys J, Sheehan C, Binder S. *The immunoassay Handbook*. 4 ed. USA. Editorial Saunders Elsevier; 2013. p 357.
36. Ledesma Montes C, Garcés Ortiz M, Hernández Guerrero JC. *Clinicopathological and Immunocytochemical Study of Multifocal Epithelial Hyperplasia*. Journal Oral Maxillofacial Surgery. 2007; 65: 2211-2217.
37. Hall C, McCullough M, Angel C, Manton D. *Multifocal Epithelial Hyperplasia: a case report of a family of Somalian descent living in*



- Australia*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109: e20-e24.
38. Leong AS, Cooper K, Leong FJ. *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology*. 1ª ed. United Kingdom. Oxford University Press; 1999. p 21-22, 59-60, 127-128, 211-212, 261-262.
39. García García V, González-Moles MA, Bascones Martínez A. *Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. Resultados preliminares*. Avances en Odontostomatología. 2006; 22 (5): 263-269.
40. Soussi T. *p53 Antibodies in the Sera of Patients with Various Types of Cancer: A Review*. Cancer Research. 2000; 60: 1777-1788.
41. Procop GW, Pritt BS. *Pathology of Infectious Diseases*. 1ª ed. USA. Editorial Saunders Elsevier; 2015. p 49-52.
42. Moyano L, Franco C, Carreño L, Robinson Ma P, Sánchez G. *HBME-1 y ciclina D1: marcadores diagnósticos de carcinoma folicular del tiroides*. Revista Médica de Chile. 2004; 132: 279-284.
43. Premoli-de-Percoco G, Galindo I, Ramirez JL. *In situ hybridization with digoxigenin-labelled DNA probes for the detection of human papillomavirus-induced focal epithelial hiperplasia among Venezuelans*. Virchows Archive A Pathological Anatomy and Histopathology. 1992; 420: 295-300.
44. Henke R-P, Guerin-Reverchon I, Milde-Langosch K, Stromme-Koppang H, Löning T. *In situ detection of human papillomavirus Types 13 and 32 in focal epithelial hiperplasia of the oral mucosa*. J Oral Pathol Med. 1989; 18: 419-421.
45. Bennett LK, Hinshaw M. *Heck's Disease: Diagnosis and Susceptibility*. Pediatric Dermatology. 2009; 26 (1): 87-89.
46. Padayachee A, Van Wyk CW. *Human papillomavirus (HPV) DNA in focal epithelial hiperplasia by in situ hybridization*. J Oral Pathol Med. 1991; 20: 210-214.



47. Jayasooriya PR, Abeyratne S, Ranasinghe AW, Tilakaratne WM. *Focal epithelial hiperplasia (Heck's disease): report of two cases with PCR detection of human papillomavirus DNA*. Oral Diseases. 2004; 10: 240-243.
48. Güitekin SE, Tokman Yildinm B, Sansoy S. *Oral Focal Epithelial Hyperplasia: Report of 3 cases With Human Papillomavirus DNA Sequencing Analysis*. Pediatric Dentistry. 2011; 33 (7): 522-524.
49. Martins WD, De Lima AAS, Vieira S. *Focal epithelial hiperplasia (Heck's disease): report of a case a girl of Brazilian Indian descent*. International Journal of Paediatric Dentistry; 2006; 16: 65-68.
50. Vera Iglesias E, García Arpa M, Sánchez Caminero P, Romero Aguilera G, Cortina de la Calle P. *Focal Epithelial Hyperplasia*. Actas Dermosifiliogr. 2007; 98: 621-623.
51. Alsadat Hashemipour M, Shoryabi A, Adhami S, Mehrabizadeh Honarmand H. *Extensive Focal Epithelial Hyperplasia*. Archives of Iranian Medicine. 2010; 13 (1):48-52.
52. Liu N, Li Y, Zhou Y, Zeng X. *Focal epithelial hiperplasia (Heck's disease) in two Chinese females*. Internacional Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2012; 41 (8): 1001-1004.
53. Liu N, Wang J, Lei L, Li Y, Zhou M, Dan H, et. al. *Human Papillomavirus-32-Associated Focal Epithelial Hyperplasia Accompanying HPV-16-Positive Papilloma-Like Lesions in Oral Mucosa*. Journal Craniofacial Surgery. 2013; 24: 905-908.
54. Mosannen Mozaffari P, Falaki F, Amirchaghmaghi M, Pakfetrat A, Dalirsani Z, saghafi Khadem S. *Multifocal epithelial Hyperplasia, a rare oral infection in Asia: Report of twelve cases in Iran*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010; 15 (4): 591-595.
55. Falaki F, Chaghmaghi A, Pakfetrat A, Delavarian Z, Mozaffari PM, Pazooki N. *Detection of human papiloma virus DNA in seven cases of focal epithelial hiperplasia in Iran*. J Oral Pathol Med. 2009; 38: 773-776.



56. Binder B, Wieland U, Smolle J. *Focal Epithelial Hyperplasia (Heck Disease) in a Black Child*. Pediatric Dermatology. 2007; E31-E32.
57. Ozden B, Gunduz K, Gunhan O, Otan Ozden F. *A Case Report of Focal Epithelial Hyperplasia (Heck's Disease) with PCR Detection of Human Papillomavirus*. Journal Maxillofacial and Oral Surgery. 2011; 10 (4): 357-360.
58. Gemigniani F, Hernández-Losa J, Ferrer B, García-Patos V. *Focal epithelial hiperplasia by human papillomavirus (HPV)-32 misdiagnosed as HPV-16 and treated with combination of retinoids, imiquimod and quadrivalent HPV vaccine*. The Journal of Dermatology. 2015; 42: 1172-1175.
59. González LV, Gaviria AM, Sanclemente G, Rady P, Tying SK, Carlos R, et. al. *Clinical, histopathological and virological findings in patients with focal epithelial hiperplasia from Colombia*. International Journal of Dermatology. 2005; 44: 274-279.
60. Pfister H, Hettich I, Runne U, Gissmann L, Chilf G. *Characterization of Human Papillomavirus Type 13 from Focal Epithelial Hyperplasia Heck Lesions*. Journal of Virology. 1983; 47 (2): 363-366.
61. Cuberos V, Pérez J, López CJ, Castro F, González LV, Correa LA. *Molecular and serological evidence of the epidemiological association of HPV 13 with focal epithelial hiperplasia: A case-control study*. Journal of Clinical Virology. 2006; 37: 21-26.