



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOQUIRÚRGICA

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Ki-67 Y P53 EN CANDIDIASIS BUCAL CRÓNICA

AUTORES:

Prof. Grice Rodríguez M.

Prof. Conan Laya G.

Bárbula, Julio2013



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOQUIRÚRGICA

EXPRESION DE PROTEINAS Ki-67 Y P53 EN CANDIDIASIS BUCAL CRÓNICA

Trabajo de Ascenso a la categoría de Asociado
presentado ante la ilustre Universidad de Carabobo
por los profesores Grice Rodríguez Marín C.I
8.843.690 y Conan Laya Gubaira C.I. 7.102.872.

Bárbula, Julio2013

INDICE GENERAL

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
OBJETIVOS.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
ANTECEDENTES.....	7
BASES TEÓRICAS.....	9
1. CANDIDIASIS.....	9
1.1 ETIOPATOGENIA.....	11
1.2 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	12
1.3 DIAGNÓSTICO Y EXÁMENES COMPLEMENTARIOS.....	14
1.4 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE LA MUCOSA BUCAL AFECTADA POR CANDIDIASIS.....	15
1.5 TRATAMIENTO.....	15
2. CANDIDIASIS Y LESIONES CANCEROSAS DE CAVIDAD BUCAL.....	16
3. CARCINOGENESIS.....	17
3.1 CICLO CELULAR.....	19
3.2 GENES SUPRESORES TUMORALES.....	20
3.3 APOPTOSIS.....	20
3.4 PROLIFERACIÓN CELULAR.....	21
3.5 PROTEÍNA Ki-67.....	21
3.6 PROTEÍNA p53.....	22

III MARCO METODOLÓGICO.....	24
1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	24
2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	24
3. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	24
3.1 MUESTRA.....	24
3.2 BIOÉTICA.....	25
4. TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	26
4.1 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	26
4.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	27
4.3 VALORACION CUANTITATIVA	27
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
IV. RESULTADOS.....	29
1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO.....	29
1.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNA Ki-67.....	29
1.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNA P53.....	29
1.3 PRESENCIA DE HIPERPLASIA Y DISPLASIA EPITELIAL.....	30
2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
3. ICONOGRAFÍA.....	39
V. DISCUSIÓN.....	43
VI. CONCLUSIONES.....	47
VII. RECOMENDACIONES.....	48
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
IX. ANEXOS.....	54

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. FRECUENCIA DE INMUNOREACTIVIDAD DE PROTEÍNA Ki-67.....	29
TABLA 2. FRECUENCIA DE HIPERPLASIA EPITELIAL.....	30
TABLA 3. FRECUENCIA DE DISPLASIA EPITELIAL.....	31
TABLA 4. FRECUENCIA DE LECTURA 1 DE INMUNOTINCION.....	32
TABLA 5. FRECUENCIA DE LECTURA 2 DE INMUNOTINCION.....	33
TABLA 6. FRECUENCIA DE LECTURA3 DE INMUNOTINCION.....	34
TABLA 7. FRECUENCIA DE LECTURA 4 DE INMUNOTINCION.....	35
TABLA 8. RESÚMEN ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES.....	36
TABLA 9. GRADO DE DISPERSIÓN.....	36
TABLA 10. TABLA DE MEDIAS DE LECTURAS DE INMUNOTINCIÓN.....	37
TABLA 11. GRADO DE RELACIÓN ENTRE CADA LECTURA DE INMUNOTINCIÓN Y LA PRESENCIA DE DISPLASIA EPITELIAL(CORRELACION DE SPEARMA....	38
TABLA 12. GRADO DE RELACIÓN ENTRE CADA LECTURA DE INMUNOTINCIÓN Y LA PRESENCIA DE HIPERPLASIA EPITELIAL.....	38
TABLA 13. VALORACIÓN DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN.....	39

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DE HIPERPLASIA EPITELIAL.....	30
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DE DISPLASIA EPITELIAL.....	31
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN DE LECTURA 1 DE INMUNOTINCION.....	32
FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN DE LECTURA 2 DE INMUNOTINCION.....	33
FIGURA 5. DISTRIBUCIÓN DE LECTURA 3 DE INMUNOTINCION.....	34
FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE LECTURA 4 DE INMUNOTINCION.....	35
FIGURA 7. MUCOSA SANA DE PALADAR DURO. REACCIÓN NEGATIVA AL ANTÍ- GENO Ki-67.....	39
FIGURA 8. CANDIDIASIS CRÓNICA CON INMUNORAECTIVIDAD CELULAR DE ES- TRATOS BASAL Y SUPRABAL DEL ESPITELIO AL ANTÍGENO Ki-67. 200X...	39
FIGURA 9. CANDIDIASIS CRÓNICA CON INMUNOREACTIVIDAD CELULAR DE ES- TRATOS BASAL Y SUPRABASAL AL ANTÍGENO Ki-67. 1000X.....	40
FIGURA 10. MUCOSA SANA DE PALADAR DURO CON REACCIÓN NEGATIVA PARA PROTEÍNA P53. 200X.....	40
FIGURA 11. CANDIDIASIS CRÓNICA CON INMUNOREACTIVIDAD NEGATIVA PARA PROTEÍNA P53. 200X.....	40
FIGURA 12 HIFAS DE <i>Cándida</i> EN ESTRATO INTERMEDIO DEL EPITELIO. 400X....	41

FIGURA 13. HIPERPLASIA EN ESTRATOS BASAL Y SUPRABASAL DEL EPITELIO.

200X.....41

FIGURA 14. DISPLASIA EN ESTRATOS BASAL Y SUPRABASAL DEL EPITELIO.

400X.....42

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. LECTURAS DE INMONUTINCIÓN CELULAR ANTE EL MARCADOR DE PROLIFERACIÓN CELULAR Ki-67.....	54
ANEXO 2. PRESENCIA DE HIPERPLASIA Y DISPLASI EPITELIAL.....	55

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer constituye uno de los mayores problemas que enfrenta la humanidad, no sólo en el ámbito de la salud pública, sino también para las ciencias en general, por lo que su combate compete a todos, por ejemplo el orofaríngeo es el que hoy muestra menor índice de supervivencia después de 5 años, con sólo 52 % de los enfermos (1). Esta enfermedad es la principal causa de muerte a escala mundial ya que se le atribuyen 7,6 millones de defunciones (aproximadamente 13% del total) ocurridas en todo el mundo en 2008 y se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere 13,1 millones en 2030 (2). Dentro de los tipos de cáncer se encuentra el de cabeza y cuello, en donde la mayoría se originan de la mucosa del tracto aerodigestivo superior (excluyendo el de piel), siendo el carcinoma de células escamosas el tipo predominante en más del 90% de los casos y rara vez ocurre antes de los 40 años de edad (3).

Estadísticamente, el cáncer bucal constituye la sexta causa de muerte más común entre todos los cánceres del mundo (2), con mayor incidencia en hombres mayores de 38 años (4). En Venezuela no existe un reporte oficial en el anuario de mortalidad del Ministerio del Poder Popular para la Salud que oriente al número de muertes por cáncer bucal, sin embargo, si existe información mundial certera de la relación que existe entre este tipo de cáncer y algunos factores como el consumo de tabaco, la infección por virus (VPH), consumo de alcohol, dotación genética, exposición a radiación solar, tipo de alimentación (4) y algunos autores han evidenciado la presencia del microorganismo *Cándida* en lesiones catalogadas de premalignas, como el caso de leucoplasias orales, ya que identificaron la presencia de hifas de *Cándida* en las capas queratinizadas de lesiones displásicas del epitelio oral, especialmente de localización retrocomisural, lo cual permite inferir la posible relación de este microorganismo en la génesis del precáncer y cáncer oral, tal

como se evidenció en el estudio realizado en 48 paciente con cáncer bucal en estadio terminal, en donde se obtuvo como resultado el 94% de pacientes con diagnóstico clínico de candidiasis bucal (5).

Por otra parte la candidiasis de la mucosa bucal (CMB) es una de las enfermedades más frecuente, y sin dudas, la afección micótica más común en esta localización, su magnitud depende fundamentalmente de las condiciones del hospedero, pues el establecimiento del padecimiento ocurre cuando se perturban los parámetros de equilibrio fisiológico que mantienen la homeostasia del medio bucal; la enfermedad está catalogada como una enfermedad cosmopolita muy frecuente y una de las micosis más importantes, afectando a ambos sexos y a cualquier edad, aunque son más frecuentes en los extremos de la vida; el microorganismo causal es la *Cándida* y está presente en la economía bucal en el 40 % de la población. Se ha encontrado que 70% de individuos con signos clínicos de estomatitis subprótesicas exhiben un crecimiento fúngico siendo la *C. albicans* la especie aislada con mayor frecuencia en 75% (6). Estas estadísticas implicaría que una gran parte de la población está en riesgo, si se toma en cuenta que la infección por *Cándida* produce daños en los tejidos que pueden involucrar la formación de neoplasias malignas (5).

Las investigaciones en el campo de las ciencias de la salud, han logrado erradicar enfermedades y aumentar la calidad de la salud de los seres humanos, y este avance se debe, principalmente, al estudio de los factores que desencadenan las diferentes enfermedades. Una de las enfermedades más estudiada es el cáncer, y como consecuencia de esos estudios, se ha demostrado la relación que existe entre los procesos neoplásicos y las alteraciones genómicas. Las neoplasias presentes en los seres humanos son diversas y heterogéneas, sin embargo, la gran mayoría de ellas comparten la presencia de algunos procesos críticos necesarios para que se desencadene el proceso carcinogénico, como son: la proliferación celular y la apoptosis. La proliferación celular se puede determinar a través de la medición del antígeno Ki-67 (7), y el índice de supresión apoptótica y arresto del ciclo celular mediante la expresión de la proteína p53 (8).

La práctica odontológica, debe enfrentarse en su quehacer, el tratamiento de pacientes con patologías orales de diversas etiologías como neoplasias, micosis, tumores, enfermedades inmunológicas, etc., en los cuales la pericia y el conocimiento son indispensables para un abordaje óptimo de los pacientes, muchos de las cuales deben ser de forma interdisciplinaria, y en consecuencia, el odontólogo de atención primaria, debe orientar al paciente, en relación a la importancia de este tipo de abordaje. Es por esta razón que la producción de evidencias a través de la investigación debe aportar cada vez mayor información, con la finalidad de que los abordajes sean los más acertados posibles. Esta investigación ofrecerá información que permita orientar la conducta de los profesionales de la odontología ante una enfermedad infecciosa muy frecuente como lo es la candidiasis, facilitando encender las luces de alerta en estos pacientes, con el fin de prevenir la producción de cambios tisulares que pueden involucrar lesiones con comportamientos malignos.

Basándose en la literatura científica del caso, se realizó la presente investigación, para obtener información acerca de las posibles consecuencias que puede producir la candidiasis bucal, en relación al aumento de la proliferación celular, la inhibición de los mecanismos de apoptosis y la posible transformación neoplásica de las células epiteliales afectadas, por este hongo. Para ello es necesario, describir los cambios tisulares que se producen en la mucosa bucal afectada por diferentes géneros de *Cándida*, con especial énfasis en la reacción de las células que conforman estos tejidos ante marcadores inmunohistoquímicos como Ki67 y p53, por lo que surge la interrogante ¿Cómo es la expresión de las proteínas Ki-67 y p53 en candidiasis bucal crónica?

Con este propósito, se plantearon los objetivos que se presentan a continuación:

Objetivo General

Determinar la expresión de las proteínas Ki-67 y p53 en candidiasis bucal crónica de pacientes diagnosticados en la Unidad de Investigación en Ciencias Morfopatológicas (UNIMPA) en los años comprendidos de 1.994 a 2010.

Objetivos Específicos

1. Describir la proliferación celular mediante la expresión proteica de Ki-67, utilizando anticuerpos monoclonales MIB-1, de las células epiteliales de la mucosa bucal en pacientes diagnosticados con candidiasis bucal crónica.
2. Describir la expresión de p53, mediante la reacción con anticuerpos monoclonales DO-7, de las células epiteliales en pacientes diagnosticados con candidiasis bucal crónica.
3. Relacionar la expresión de las proteínas en estudio con la presencia de hiperplasia y/o displasia epitelial en pacientes diagnosticados con candidiasis bucal crónica.

JUSTIFICACION

Una de las disciplinas de la odontología íntimamente relacionada con las alteraciones de la mucosa bucal es la patología bucal, en la cual se conjugan componentes de las ciencias básicas y de la odontología clínica, correspondiéndole como función, diagnosticar y establecer el plan de tratamiento idóneo en las diferentes alteraciones nosológicas del sistema estomatognático, requiriendo para ello, identificar las diferentes lesiones orales según su componente etiopatogénico, formando parte de este universo de lesiones se encuentran la candidiasis y las neoplasia bucales.

La candidiasis bucal es una de las patologías mas frecuentemente observada en la práctica odontológica, motivo por el cual esta alteración ha sido objeto de innumerables investigaciones, con la finalidad de obtener información sobre su comportamiento clínico, terapéutica y posibles efectos inductores de otras patologías. De igual forma se ha evidenciado la presencia del microorganismo *Cándida* en lesiones catalogadas de premalignas, como el caso de leucoplasias orales y se ha encontrado en verdaderas lesiones neoplásicas, como el carcinoma de células escamosas oral , pero aún no se ha podido demostrar que el microorganismo sea un factor desencadenante de procesos neoplásicos orales; razón que motiva a la realización de la investigación, en la cual, a través de diferentes técnicas inmunohistoquímicas, se persigue obtener información de marcadores como las proteínas ki-67 y p53, las mismas indicarían posibles cambios celulares que degenerarían en cambios displásicos y futuras neoplasias.

Esta investigación aporta nuevos hallazgos acerca de la posibilidad de los daños que el microorganismo *Cándida* puede producir en las células del epitelio bucal, permitiendo obtener mayor información que relacione de forma directa esta infección con las neoplasias epiteliales malignas bucales, y en este punto fundamentalmente radica su importancia, ya que la candidiasis es la

infección bucal con mayor incidencia, la cual en la mayoría de los casos al cursar de forma asintomática permanece sin tratamiento por largos períodos de tiempo, ya sea porque pase desapercibida por parte del paciente y/o sea catalogada de menor importancia por parte del odontólogo general, por lo que serviría de información al profesional de la odontología.

Los avances de las técnicas inmunohistoquímicas han ampliado el mundo de la investigación, tomando en cuenta que mediante su aplicación se logra la obtención de información acerca de cambios o alteraciones celulares, por lo que con la aplicación de estas técnicas para determinar la expresión de las proteínas Ki-67 y p53 en muestras de tejido que presentan infección por *Cándida*, se realizarán importantes aportes a la categorización de este microorganismo como factor biológico predisponente de neoplasias epiteliales malignas de cavidad bucal.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ANTECEDENTES

Uno de los mayores legados de las técnicas inmunohistoquímicas es el reconocimiento y cuantificación de proteínas que se expresan cuando existen alteraciones en los genes que la codifican; en una investigación sobre expresión de proteína p53 en carcinomas escamosos de la cavidad bucal, se afirma que en más del 60% de los carcinomas se han detectado mutaciones del gen p53; parece, por tanto que la presencia de la proteína p53 está estrechamente asociada a la malignidad, ya que en la mucosa oral normal o con lesiones benignas, la expresión de proteína p53 es frecuentemente negativa, sin embargo, la demostración inmunohistoquímica de la proteína p53 no se debe asumir como un marcador absoluto de mutaciones del gen p53 en el cáncer bucal, puesto que esta expresión puede ser el resultado de la estabilización de la proteína p53 silvestre (no mutada) (9).

En otro estudio realizado en leucoplasias bucales, se concluyó que la expresión de proteína p53 en dicha patología con diferentes grados de displasia, y la negatividad de la misma en tejidos normales, afirma en darse la importancia de este marcador tumoral en lesiones de cavidad bucal (10). De igual manera, la expresión de la proteína p53 mutada, en lesiones de liquen plano bucal, indica un proceso de proliferación activo, lo cual, junto con otros factores precipitantes, podría constituir un microambiente propicio para una posible alteración oncogénica (11). Fortaleciendo las investigaciones realizadas en pacientes con liquen plano bucal se admite que la sobreexpresión de p53 en esta patología puede indicar daño del ADN celular debido a la inflamación crónica, simultáneamente con disminución de expresión de proteína p63 (involucrada en el proceso de estratificación normal del epitelio (12). De igual

forma el bloqueo de la función de la proteína p53 por el factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) y posiblemente otros mediadores de la inflamación pueden incrementar el riesgo de cáncer bucal en pacientes con liquen plano (13).

En un estudio realizado en queilitis actínica, se afirma que esta es una lesión premaligna en la cual la sobreexpresión de la proteína ki-67 se relaciona con el grado de displasia, mientras que la sobreexpresión de la proteína p53 no es significativa, por lo que el uso del marcador de proliferación celular ki-67 es una herramienta predictoria para evaluar la posibilidad de avance hacia un carcinoma epidermoide de labio y mucosas por la relación significativa que guarda con el grado de displasia (14).

Simultáneamente, la asociación entre la infección por *Cándida*, y el riesgo de desarrollo de malignidad, se origina por la relación entre la infección por *Cándida* y leucoplasias no homogéneas, las cuales presentan diferentes grados de displasia (5). Por otra parte, no solo se reporta una asociación significativa entre la infección por hongos y la presencia de displasia epitelial moderada y severa, en lesiones precancerosas de cavidad oral (15), sino, que se reconoce la asociación con lesiones precancerosas y de alta tasa de transformación maligna debido a que la *Cándida albicans* es capaz de producir metabolitos carcinogénicos que pueden activar oncogenes en los queratinocitos (16).

En otra investigación se reconoce que la expresión de Ki-67 y p53, en leucoplasias orales manifiesta la inestabilidad y alteración del genoma de acuerdo a la severidad de la displasia, ya que no se manifiestan en tejidos sanos (17). Se ha observado sobreexpresión de p53 y p21 en un significativo número de leucoplasias orales que no detectan displasias en sus estudios microscópicos y se cree que estos tejidos pueden sufrir transformación maligna (18), así como, inmunoreacción de Ki-67 y ciclina D1 en las capas basales y suprabasales del epitelio en este tipo de lesiones, en las que pese a su remoción quirúrgica total han desarrollado carcinomas bien diferenciado al cabo de cuatro años (19). Adicionalmente, la sobreexpresión de p53 en las

capas suprabasales del epitelio está directamente relacionada con el carcinoma de células escamosas y desórdenes potencialmente malignos (20).

BASES TEORICAS

1. Candidiasis.

La candidiasis incluye un grupo de enfermedades mucocutáneas vinculadas con un factor etiológico común del género *Cándida* de hongos. Este hongo produce la infección micótica más común de la boca, aunque es difícil determinar la tasa de frecuencia, dada la prevalencia del organismo causal en una gran proporción de la población (21). Otros sinónimos utilizados son candidosis y moniliasis. De igual manera, todos los miembros del género están presentes como comensales que se vuelven patógenos cuando tiene lugar una alteración de la inmunidad del huésped (22).

En el año 1839, Langebeck, describió el microorganismo del muguet, al observarlos en placas que se formaban en las membranas mucosas de boca y otros órganos, en cadáveres, antes de la autopsia. Grugby, en 1842, lo denominó *Oidium albicans* y posteriormente en 1923, Berkhout, propone el género *Cándida* y la especie *C. albicans*, lo cual fue aceptado en el 3er Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939 (22) El Género *Cándida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies, igualmente, son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular, se reporta que de las 150 especies, solo una docena de ellas, pertenecientes al género *Cándida*, poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre, entre otras, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr (pseudotropicalis)*, *C. krusei*, *C. guillermonti*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii* (23).

Desde el punto de vista taxonómico, la *Cándida* pertenece al reino de los hongos imperfectos, clase blastomices, orden criptococalea, familia criptococacea, las levaduras son células redondas u ovales reproduciéndose por gemación y los hongos filamentosos están formados por estructuras tubulares denominada hifas las cuales crecen en ramificaciones y extensión longitudinal. Por lo general, la *Cándida* más aislada es la *Cándida albicans*, sin embargo, otras especies han sido también aisladas como la *C. tropicales* que se encuentra con mayor frecuencia en la vulvovaginitis, endocarditis, septicemias, otitis, conjuntivitis y osteitis. La *C. parapsilosis* ha sido aislada en oniquia, paroniquia, conjuntivitis, septicemias y endocarditis. La *C. guilliermondii* aislada en vulvovaginitis, muguet del niño recién nacido, septicemias y endocarditis. La *C. krusei* se ha aislado en candidiasis del tracto respiratorio, en muguet del recién nacido, queratomycosis, endocarditis, septicemia y en heces humana. La *C. stellatoidea* es una especie que está estrechamente relacionadas con la *C. albicans* y su identificación puede ser en algunos casos confundida con dicha especie, se ha aislado en vaginitis, esputo, muguet, pielonefritis y endocarditis. La *C. viswanathii* es una especie relativamente nueva que fue aislada en líquido cefalorraquídeo de meningitis y en esputo. Se debe reseñar, igualmente, la existencia de la especie *C. dubliniensis*, la cual se ha asociado a las infecciones por *Candida* orofaríngea en pacientes con infección HIV/SIDA (22).

Se precisa, entonces, que la *Cándida albicans* es una levadura Gram positiva alargada semejante a hifas (seudohifas), constituyendo organismos aeróbios, levaduriforme, capaces de desarrollar pseudofilamentos y producir clamidosporas (tipo de espora asexual), esta es capaz de producir hifas verdaderas, con ancho uniforme, que crecen por elongación apical y forman tabiques en ángulos rectos con poros revestidos de membrana. Las hifas, tan solo se forman en el momento de la invasión a los tejidos, existiendo numerosos estímulos ambientales que desencadenan o bloquean la conversión *in vitro* de la levadura a hifas, desconociéndose la regulación de la morfogénesis de *Cándida albicans*, igualmente es un patógeno oportunista que suele encontrarse en números pequeños en las superficies de las mucosas y

se disemina cuando las condiciones son favorables para ello. En ese sentido, se han identificado diversas adhesinas de *C. albicans* y se cree que favorecen la colonización y permiten que el microorganismo persista en la superficie del cuerpo y esto se sustenta, molecularmente, con la identificación de un receptor del hongo, análogo al receptor de complemento 3 (CR3), el cual se enlaza con el C3b (iC3b), permitiéndole mayor adhesión, así como también se detectaron adhesinas de glucoproteínas para células huésped (24).

Desde el punto de vista químico, la composición de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas, 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. Ultraestructuralmente, la pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos manán, glucán y quitina formando una compleja microarquitectura, presentando la misma un espesor variable, conformando varias capas, las cuales se han puesto de manifiesto por diferencias en la densidad electrónica; el número de capas y su morfología varían de acuerdo a distintos factores como son, la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación (25).

1.1. Etiopatogenia

La patogénesis de la candidiasis oral es compleja e implica diferentes factores y mecanismos del hongo y del hospedador. La posibilidad de que la *Cándida* colonice las superficies orales depende tanto de la efectividad de los mecanismos defensivos del hospedador, como de la capacidad de adhesión del hongo y de su poder de crecimiento, de esta forma, el balance entre colonización y candidiasis depende de la capacidad de la *Cándida* para modular la expresión de los factores de virulencia en respuesta a los cambios ambientales, combinado con la competencia del sistema inmunológico del hospedador y las pautas terapéuticas antifúngicas. La naturaleza de este equilibrio es frágil y en muchos aspectos desconocida (26).

La transformación de comensal a patógeno depende de la combinación de tres grupos de factores: del hospedador, del hongo y la modificación del microambiente de la cavidad bucal; existen muchos aspectos en el hospedador, tanto locales como sistémicos, que pueden facilitar el desarrollo de una candidiasis bucal, es por ello, que todas aquellas circunstancias que alteren la integridad de la mucosa mediante traumatismo, maceración u oclusión (como ocurre en los portadores de prótesis dentales) favorecen la adhesión del hongo y la invasión mucosa (22). La mucosa bucal posee propiedades antifúngicas que protegen contra la invasión candidiásica, gracias a la presencia de ciertas proteínas y otros factores no determinados. La saliva constituye un elemento antifúngico de primer orden, ya que tiene una labor de barrido mecánico que dificulta la adhesión del hongo, y un poder antifúngico, merced a sus componentes proteico (lisozimas, lactoferrina, lactoperoxidasa, y glucoproteínas), así como la presencia de Inmunoglobulina A; no obstante, factores que conlleven a la reducción del pH salival, como ocurre bajo las prótesis dentales removibles, o que reduzcan la producción de la misma, como enfermedades, radioterapia local y anticolinérgicos, favorece bien sea la adhesión o producción del hongo (6). Dentro de los factores sistémicos que favorecen la aparición de la enfermedad, se pueden mencionar: la incapacidad del sistema inmunológico, el uso de antibióticos de amplio espectro, la existencia de deficiencias inmunitarias congénitas, la presencia de prótesis dentales desajustadas, enfermedades endocrinas (hipotiroidismo e insuficiencia suprarrenal), deficiencias nutricionales de minerales (deficiencia de hierro), avitaminosis, como el déficit de folato, hipovitaminosis A y la deficiencia de vitaminas del complejo B y C, dietas ricas en carbohidratos, neoplasias y fármacos citotóxicos e inmunosupresores (26).

1.2. Clasificación y características clínicas

La infección por *Cándida* presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas, las cuales pueden ser locales y sistémicas. La candidiasis se puede clasificar de acuerdo al tejido u órgano que afecte, en: candidiasis mucosa, la

cual afecta la mucosa bucal, esofágica, vaginal y abdominal; la candidiasis cutánea, que afecta la piel y se observa con frecuencia en ingles, axilas, pliegues interglúteos, debajo de mamas, dedos de manos o pies, zona donde contacta pañal en niños y también, en uñas y cutículas; la candidiasis sistémica, se observa en pacientes inmunocomprometidos, incluyen infección de vías urinarias, endocarditis, meningitis y septicemia (25).

Las manifestaciones bucales de esta enfermedad son variables y se ha identificado un gran número de formas: la candidiasis aguda (seudomembranosa y atrófica) y la candidiasis crónica (hiperplásica y atrófica) La Candidiasis seudomembranosa: también conocida como algodoncillo o muguet, se manifiesta como placas blancas, de consistencia blanda a gelatinosa o nódulos que crecen en dirección centrífuga y se mezclan. Las placas se componen de microorganismos fúngicos, desperdicios queratósicos, células inflamatorias, células epiteliales descamadas, bacterias y fibrina; el desprendimiento de las placas o seudomembranas con un apósito de gasa deja una superficie eritematosa, erosionada o ulcerada (21).

La Candidiasis atrófica aguda es una lesión roja, eritematosa que aparece por desprendimiento de la película de una candidiasis seudomembranosa, que ha persistido por un período de tiempo. La Candidiasis atrófica crónica es un subconjunto de lesiones atróficas frecuente, esta se presenta en un 65% de los pacientes geriátricos portadores de prótesis total maxilar (26).

La Candidiasis hiperplásica se produce por una reacción hiperplásica del tejido en una candidiasis crónica, puede producirse en zona retrocomisural denominándose leucoplasia por *Cándida*, o puede afectar el dorso de la lengua conociéndose como glositis romboidal media (21).

La candidiasis pseudomembranosa, es el prototipo de infecciones bucales por el hongo *Cándida*. Es una infección superficial de las capas superiores de la mucosa bucal y resulta en la formación de placas blancas difusas, compuestas de células epiteliales descamadas, células de la inflamación,

fibrina, levaduras y elementos miceliales. La candidiasis atrófica aguda, incluye la estomatitis por antibióticos y otros padecimientos en que persiste una placa roja atrófica, dolorosa, de mucosa denudada, con mínima presencia de lesiones pseudomembranosa (26).

La candidiasis atrófica crónica, incluye estomatitis por dentadura y queilitis angular, es una inflamación difusa del área de los maxilares en la que se apoya la dentadura, con grietas e inflamación de comisuras bucales (queilitis angular) o sin ella, la mucosa del paladar puede estar aterciopelada y hemorrágica al presionarla ligeramente; durante los períodos de exacerbación suele haber ardor, pero el área denudada roja persistirá mientras no se cambie la dentadura (21).

1.3. Diagnóstico y exámenes complementarios

El diagnóstico clínico es por lo general acertado, sin embargo, para corroborarlo se puede identificar al hongo a través de la observación directa al microscopio de un frotis macerado con hidróxido de potasio o teñido con PAS (ácido periódico de Schiff), también, se puede identificar el agente causal a través de un cultivo en diferentes medios, incluyendo caldo de Saboraud, agar con sangre y agar con masa de maíz. A través de estudio histológico se puede observar como las pseudohifas de *Cándida* penetran en el epitelio y a nivel intracelular (21).

En la candidiasis pseudomembranosa, el diagnóstico debe establecerse realizando un frotis o cultivo. En la candidiasis de tipo atrófica, los frotis citológicos fracasan, por lo general, en la demostración de las formas micelares de los hongos, aunque un estudio cuidadoso, puede revelar a veces formas esporuladas del hongo. Sin embargo, la presencia de levaduras adheridas en la dentadura, es un factor causal importante (27).

1.4. Características histopatológicas de la mucosa bucal afectada por candidiasis

En infecciones superficiales, el hongo *Cándida* se limita a las capas superficiales del epitelio; en casos más graves, las hifas se extienden a mayor profundidad en el epitelio. Es típico observar infiltración del epitelio con neutrófilos y formación de microabscesos superficiales. Las formas predominantes de hongos que crecen en esta forma particular de la afección son pseudohifas, estas penetran en el epitelio y en realidad pueden entrar a los queratinocitos, para convertirse en parásitos intracelulares. En la candidiasis hiperplásica retrocomisural, la invasión del hongo penetra hasta el borde del estrato espinoso, con frecuencia aumenta su actividad mitótica y pueden ser prominentes las alteraciones displásicas. Se han presentado diversas pruebas que justifican una acción de *Cándida* en el origen de la transformación neoplásica e incluyen producción de hiperplasia epitelial (21).

En la candidiasis atrófica (eritematosa), histológicamente se observa, adelgazamiento generalizado del epitelio, y aumento de células inflamatorias en el tejido conjuntivo subyacente (27).

1.5. Tratamiento

El tratamiento de la candidiasis involucra, un agente antimicótico y una profusa higiene oral conjuntamente con el control del factor predisponente (inmunidad, antibioticoterapia, corticoterapia, etc.), así como el cambio de la prótesis, el fármaco antifúngico puede ser de uso tópico (nistatina) y en ocasiones de lesiones resistentes de uso sistémico por vía oral (fluconazol, ketoconazol). La reposición de una prótesis desajustada y la limpieza exhaustiva de la prótesis es factor fundamental en el tratamiento (27).

Hoy en día, las candidiasis de tipo crónico han producido resistencia al tratamiento antimicótico, debido a la formación de películas o biofilms, estos biofilms son comunidades universales, complejas, interdependientes, de

microorganismos de superficie asociados, alojándose los microorganismos en una matriz de polisacáridos. En las suspensiones los microorganismos crecen de esta forma más que individualmente, y en este ambiente pueden presentar fenotipos alterados. Los biofilms pueden estar compuestos por un solo tipo de microorganismos o por múltiples especies. Para infectar la cavidad oral, las levaduras deben primero adherirse a las superficies. La formación de biofilms por parte de *C. albicans* se produce en tres etapas: temprana (0 a 11 horas), intermedia (12 a 30 horas) y madura (38 a 72 horas). El biofilm maduro consiste en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas, con frecuencia en asociación con bacterias (28).

Por las razones antes planteadas, el tratamiento debe en muchas oportunidades combinar enjuagues germicidas o bactericidas con potentes antimicóticos (fluconazol, miconazol, sertaconazol), tanto de uso local como sistémico (22).

2. Candidiasis y lesiones cancerosas de cavidad bucal

La cavidad oral está conformada por una serie de órganos como: labios, carrillos, paladar, lengua, dientes y encías, revestida, excepto los dientes, por una membrana mucosa formada por epitelio plano estratificado y corion o lámina propia de tejido conjuntivo. El mantenimiento de la integridad de esta mucosa, viene dado por la constante renovación de sus células perdidas gracias al proceso de Proliferación Celular, conduce al crecimiento normal de los tejidos y órganos de acuerdo al desarrollo del Ciclo Celular, a su vez formado por dos períodos: interfase y división o mitosis (29).

La transformación de una célula normal comprende una serie de procesos complejos, en el cual inciden factores externos sobre alteraciones intrínsecas de esa célula, produciendo lesiones cancerosas, es por ello, que es de suma importancia describir el efecto de los factores externos, así como también las condiciones y factores intrínsecos de la célula que pueden desencadenar los procesos cancerígenos, al afectarse el ciclo celular (30). En este sentido, son innumerables los estudios que se han realizado por conocer cada vez mas

cuales son los factores involucrados en la formación de lesiones cancerosas de la cavidad bucal, y basados en esos estudios la OMS las lesiones y condiciones potencialmente malignas, en donde la candidiasis crónica es categorizada como un desorden de alto potencial de malignización (70%), según las circunstancias (16).

3. Carcinogénesis

Es un proceso que ocurre en múltiples etapas e incluye numerosos eventos genéticos y epigenéticos (30). El cáncer es de origen monoclonal, y para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica deben ocurrir mutaciones genéticas en la misma, que ocasionen la modificación de los productos que en condiciones normales codificaría el gen y finalmente, producirían un cáncer. El cáncer resultante puede ser hereditario, por mutaciones en uno o ambos alelos de las células germinales, o esporádico, por la acción de agentes mutágenos ambientales, por lo que el resultado de la proliferación celular descontrolada de una célula normal marca el proceso de evolución de una célula normal hacia una célula con potencial tumorigénico, la cual pierde la capacidad de diferenciación, el aumento de invasividad y la disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas (31).

Así se describe que la carcinogénesis es el producto de las alteraciones moleculares del ADN, en el cual se han identificado sus fases, en la primera fase la célula perteneciente a una población normal sufre una alteración de su ADN por la exposición a factores carcinogénicos endógenos y exógenos que aumenta su propensión a proliferar cuando debería estar normalmente en reposo. En la segunda fase, la célula alterada y sus descendientes continúan con apariencia normal pero se dividen demasiado (hiperplasia) y sufre otra mutación genética que la hace perder el control del crecimiento celular. La tercera consiste en los cambios de la célula en su apariencia tanto en forma como en función (displasia), además de la constante proliferación. En la cuarta fase las células afectadas se hacen más anormales en su crecimiento y apariencia, si este grupo de células no excede los límites del tejido se denomina cáncer *in situ*. La quinta fase consiste en la invasión de este grupo

de células a los tejidos subyacentes y su migración a la sangre y/o linfa estableciendo nuevos focos de células alteradas (metástasis) (8).

Las neoplasias, de manera general, pueden clasificarse como benignas y malignas. Lo que diferencia una neoplasia benigna de una maligna o cáncer, es el hecho de que en la primera, la formación tumoral está delimitada por una pared o cápsula que la separa del tejido circundante, y así permanece casi siempre indefinidamente. En cambio, la neoplasia se maligniza y se habla de cáncer cuando las células tumorales no están formando una estructura bien circunscrita y local, sino que por el contrario, pueden migrar, atravesar la membrana basal del tejido original y trasladarse mediante el torrente sanguíneo o linfático a órganos remotos que pueden colonizar o invadir (32).

Por otra parte, se afirma que el desarrollo del cáncer representa una falta en la respuesta inmune antitumoral, ya que su función normal es reconocer antígenos asociados a tumores y desarrollar respuestas específicas, mediada por linfocitos T, sin embargo, también reconoce que el cáncer es una enfermedad multifactorial, de etiología discutida, donde la edad, el sexo, la raza y la herencia se reconocen como factores genéticos de riesgo, según las distintas localizaciones. La dieta, los hábitos tóxicos, el estilo de vida y el medio en general, incluyendo la infección por microorganismos (virus, bacterias y hongos), son factores que actúan sobre el genoma de las células como iniciadores ó promotores en el complejo proceso de transformación celular hacia formas de mayor complejidad biológica. Debe señalarse la relación Medio Ambiente – Herencia como los extremos de un espectro en cuyo centro se sitúa la casualidad de la mayor parte de las neoplasias que padece el hombre (33).

En relación a la influencia de la infección por microorganismos, es importante mencionar que la asociación entre inflamación y cáncer fue descrita en el año 1.863, cuando Virchow observó leucocitos en tejido tumoral, de esta manera se conectan las infecciones largas y crónicas con la formación de inflamación crónica, en donde los leucocitos, fagocitos y otras células inflamatorias producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), induciendo al daño del ADN (12).

De esta manera, cuando la afección ocurre en genes implicados en la proliferación y crecimiento celular se desarrolla la neoplasia, ya que existen genes supresores de tumores, los cuales forman parte directa del control del ciclo celular, y oncogenes, los cuales definen los diferentes niveles de señalización celular desde el exterior hasta el núcleo (8).

3.1. Ciclo celular

Se define como una serie ordenada de eventos responsables de coordinar la duplicación del material genético y citoplasmático de una generación celular a la siguiente, y de asegurar la segregación balanceada del material genético en las dos células hijas. En células eucarióticas el ciclo celular se divide en cuatro fases basadas en eventos visibles o medibles, denominadas G1, S, G2 y M. Durante la fase G1, las células están sujetas a estimulación, por mitógenos extracelulares y factores de crecimiento, transitan en esta fase para proceder con la síntesis de ADN en la fase S, en la cual se lleva a cabo la duplicación de los cromosomas y del centrosoma, es el momento en que la célula se prepara para la división celular y se caracteriza por la expresión de las enzimas necesarias para la biosíntesis de purinas y pirimidinas y de la maquinaria de replicación, en donde destacan el antígeno de proliferación nuclear “PCNA” y la polimerasa de ADN. Durante esta fase se expresa el antígeno Ki-67 cuya función se desconoce, pero, sirve como un marcador histopatológico de células proliferantes. La fase G2 es el intervalo entre la culminación de la síntesis de ADN y la mitosis (M). Esta última es visible al microscopio y comprende la citocinesis (división del contenido citoplasmático) y la cariocinesis (división del contenido cromosómico celular). Existe también un estadio denominado G0, el cual es usado para describir las células que han salido del ciclo celular y permanecen en un estado de quiescencia, no proliferativo (34).

Este complejo ciclo es controlado por un sistema que supervisa cada etapa, en donde se comprueba que se cumplan las condiciones adecuadas para pasar de una etapa a la siguiente, si no se cumplen estas condiciones el ciclo se detiene. Este control está regulado por genes, los cuales se dividen en tres

grupos: genes que codifican proteínas para el ciclo (enzimas y precursores de la síntesis de ADN), genes (protooncogenes) que codifican proteínas que activan la proliferación celular, así como ciclinas y cinasa dependientes de ciclina (proteínas que actúan en diferentes etapas del ciclo celular a través de procesos de fosforilación y desfosforilación, impulsando el funcionamiento del ciclo celular) , y el tercer grupo de genes llamados supresores tumorales que codifican proteínas que regulan negativamente el ciclo (8).

3.2. Genes supresores tumorales

Los genes supresores tumorales están implicados en diversos procesos de división celular, como son, la regulación de la expresión génica, control del ciclo celular, programación de la muerte celular y estabilidad del genoma. La pérdida de actividad de estos genes provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular; de modo que se produce una proliferación más o menos incontrolada de la célula, lo cual conduce, en ocasiones, al desarrollo de neoplasias y a la evolución de las mismas hacia procesos tumorales más agresivos (35).

Dentro de estos genes supresores tumorales se encuentran el gen p53, gen p21, gen BRCA-1, gen BRCA-2 y otros, algunos con funciones muy específicas y otros a los cuales aún no se les conoce el rol que cumplen como supresores (36).

3.3. Apoptosis

Es un término griego que hace referencia a la caída de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles. El proceso de apoptosis tarda aproximadamente 30 minutos. Los fenómenos que se producen son: la fragmentación del citoesqueleto y las organelas que conlleva a la fragmentación celular, con la condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son posteriormente fagocitados por los macrófagos o las células vecinas. La apoptosis es un proceso activo, genéticamente controlado y destinado a la autoeliminación celular. Es un

fenómeno imprescindible para mantener el equilibrio, ya que el crecimiento celular mediante la proliferación celular debe ser equivalente a la degradación tisular mediante muerte celular o apoptosis. Distinguimos 3 fases en el proceso apoptótico: iniciación, ejecución y degradación. La fase de iniciación es activada por una gran variedad de señales que incluyen el daño del ADN, hipoxia, falta de nutrientes, factores de crecimiento u hormonas y la activación de los receptores de la muerte. Las señales que estimulan las dos fases siguientes son menos variadas. La regulación de la apoptosis está dada por un gran número de moléculas como la familia bcl-2, el factor de necrosis tumoral (TNF), genes supresores de tumores, oncogenes, factores mitocondriales y la familia de las caspasas (8).

3.4. Proliferación celular

La tasa de proliferación celular de un tejido, se determina por la diferencia entre la tasa de división celular y la tasa de pérdida celular. Es así, como las neoplasias que presentan esta tasa de división superior a la tasa de división de las células normales pueden crecer, progresar, debido a una vida media más prolongada. Existen marcadores, que se han utilizado para la medición del índice de proliferación celular, entre ellos, el antígeno Ki-67, MDM-2 y PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) (34).

3.5. Proteína Ki-67

En los últimos años, las técnicas inmunohistoquímicas han contribuido a mejorar el diagnóstico y pronóstico en los casos de neoplasias. Entre tales técnicas destaca el anticuerpo monoclonal Ki-67, el cual detecta un antígeno nuclear que se expresa en las células que entran al ciclo celular, proporcionando una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido (35). La expresión de este antígeno ocurre durante las etapas G1, S, G2 y M del ciclo celular, en condiciones de normalidad la expresión de este antígeno es considerada como actividad proliferativa, la cual puede ser detectada solamente en el estrato basal del epitelio bucal (37).

Este anticuerpo monoclonal, identifica un antígeno nuclear proteico con un peso molecular de 345 a 395 kDa, que se encuentra en células en las fases proliferativas del ciclo celular, mientras que no identifica células en la etapa de descanso (G). Los nuevos anticuerpos que se han desarrollado actualmente permiten su identificación en tejidos fijados y en biopsias procesadas en forma rutinaria. Altos índices de Ki-67 están asociados con una baja diferenciación histológica y con la ocurrencia de metástasis ganglionares, y afirma que el antígeno Ki-67 es el marcador tumoral que mejor predice el desarrollo de enfermedades metastásicas precoces, constituyendo el principal marcador pronóstico en la serie de carcinoma ductal infiltrante de mama (7). De igual manera, otros autores aseguran que este anticuerpo es un recurso fácil y rápido, para evaluar con exactitud la fracción de crecimiento de las neoplasias humanas y se sugiere que se utilice como parte del procedimiento para complementar las pesquisas y diagnóstico de cáncer y lesiones precancerosas (35).

La proliferación celular, en lesiones orales asociadas a candidiasis, parece ser similar a la proliferación de lesiones que presentan displasias, utilizando Ki-67 (37), y la mayor utilidad de este, es su uso en la predicción de la capacidad de malignización de lesiones cancerizables y la posibilidad de crecimiento tumoral ya que evalúa el comportamiento biológico de las células displásicas (38).

3.6. Proteína p53

El término de proteína p53 es designado a una familia de proteínas celulares que varían en su peso molecular, desde 48 Kd hasta 55Kd en diferentes especies. Esta proteína es codificada por el gen supresor de tumores, que está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 en humanos (35). Se ha confirmado que cuando ocurren mutaciones en el gen p53, se produce una síntesis anormal de proteína, p53 mutada, que tiende a estabilizarse y acumularse en el núcleo. Esta proteína mutada pierde su capacidad supresora del crecimiento celular, la cual es ejercida mediante la regulación negativa del gen p53 sobre la replicación ante diferentes tipos de

agresiones en el ADN, aumentando entonces la cantidad de proteína nuclear p53. La consecuencia inmediata del incremento de p53 es la detención del ciclo celular en G1, actuando mientras los mecanismos de reparación del ADN subsanan el daño, siendo este su mecanismo principal de protección del genoma. Si la reparación del ADN es satisfactoria, p53, activará a un gen denominado mdm2, cuyo producto se une e inhibe a la propia p53, levantando así el bloqueo celular. Si las alteraciones del ADN son muy extensas y el daño no puede ser reparado, la proteína p53 puede inducir el inicio de muerte celular fisiológica (apoptosis). De esta forma, la proteína salvaje p53 actúa como un verdadero guardián de la integridad del contenido genético, estableciendo la posibilidad de que las células dañadas reparen su ADN, previniendo la inestabilidad genómica (8).

Adicionalmente, a los dos mecanismos anteriormente señalados, la proteína p53 bloquea la angiogénesis necesaria para el crecimiento y proliferación del tejido tumoral, así como induce la transcripción de la proteína GAD D45, la cual interviene en la reparación del ADN (16).

Otra vía de inactivación de la proteína p53 se debe a la unión con la oncoproteína E6 de los virus de papiloma humano 16 y 18 con dos sitios diferentes en la estructura de la misma. En numerosos carcinomas han sido reportadas alteraciones de p53 en el DNA tumoral, entre los más comunes están los carcinomas de hígado, mama, colon y pulmón, así como el osteosarcoma (31), motivo por el cual se ha aprovechado la capacidad que tiene la proteína mutada de poseer una vida media más prolongada (de 48 horas, a diferencia de la silvestre que es de 5 a 30 horas), lo que favorece la acumulación de la proteína y su detección mediante métodos inmunohistoquímicos; sin embargo, como no todas las mutaciones se acompañan de sobreexpresión, las detecciones inmunohistoquímicas se deben complementar con métodos moleculares como la secuenciación por PCR o SSCP, los cuales son capaces de detectar eficientemente el 90% de las mutaciones del gen p53 (16).

III. MARCO METODOLÓGICO

Tomando en cuenta los objetivos planteados y basados en los datos aportados por la bibliografía se realizó la investigación sobre tejidos bucales, como se presenta a continuación:

1. Tipo de investigación

De acuerdo a su propósito se realizó una investigación de tipo descriptiva correlacional, ya que está dirigida a determinar “como es” o “como está” la situación de las variables que deberán estudiarse en una población y por querer conocer el grado de relación que existe entre dos o más variables y posteriormente analizar dicha situación (39).

2. Diseño de investigación

Tomando en cuenta las estrategias que se utilizaron para la obtención de la información, la investigación se enmarca en el diseño no experimental, transeccional, debido a que se observaron situaciones ya existentes no provocadas, recolectando los datos en solo momento (40) para determinar el comportamiento de las variables, específicamente la expresión de las proteínas Ki67 y p53 conjuntamente con la presencia de hiperplasia y displasia epitelial de la mucosa bucal afectada por *Cándida*.

3. Población y muestra

3.1. Muestra

Las unidades de investigación (muestra) están conformadas por 20 muestras de tejido, con diagnóstico de candidiasis atrófica crónica de paladar duro, procesadas desde el año 1994 hasta el año 2010, ambos inclusive, en la Unidad de Investigaciones Morfopatológicas (UNIMPA), de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo. Adicionalmente se incorporaran 3 casos de tejido de mucosa bucal sana, las cuales se obtuvieron de encía libre

y papilar, al realizar exodoncias de terceros molares superiores. Los 3 casos de tejido de mucosa sana se añadieron con la finalidad de someterlas a las mismas técnicas aplicadas en los tejidos afectados por candidiasis atrófica crónica y comparar los resultados en cada caso.

3.2. Bioética

De acuerdo con las reflexiones que en el ámbito internacional han promovido la reflexión en pro de la vida, un experimento que exponga a los sujetos de investigación a determinados riesgos e inconvenientes sin razón o justificación alguna, se convierte en un experimento inaceptable. Es por ello necesario integrar el enfoque filosófico y científico, poniendo en práctica los valores éticos en beneficio del sujeto de investigación, sea éste la especie humana, los animales, la vegetación o el ambiente. Todo esto dentro de un profundo respeto a la dignidad de todos los organismos vivos y de la naturaleza (41).

La bioética, entendida como un conjunto de orientaciones filosóficas y metodológicas, guía los procesos y decisiones en las investigaciones científicas, sociales y humanísticas, con el propósito de alcanzar el bien. Todo ello como resultado del debate que incorpora la diversidad y pluralidad del pensamiento en pro del resguardo y respeto a la vida, fundamentados en principios y normas básicas que han sido tomadas de la filosofía y de la práctica humana. La bioética es un campo interdisciplinario que en las últimas décadas ha presentado una expansión constante ante las contradicciones, conflictos y dilemas que se generan en el desarrollo y la innovación de distintas vertientes del conocimiento y la tecnología, al influir sobre la vida. Su inclusión en el campo médico es una realidad que impera establecer una relación con las consideraciones éticas sobre el impacto de la intervención tecnocientífica en la vida del individuo. En este trabajo de investigación no experimental, transeccional, descriptivo-correlacional se cumplirá con los ordinales 4 y 5 del Capítulo I de la Norma para la investigación biomédica en humanos del Código de Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología del Ministerio de Ciencia y Tecnología, manteniendo en el anonimato la

identificación de los pacientes de los cuales provienen las muestras biológicas ya que solo serán utilizados para fines netamente académicos. Adicionalmente debido a que estas muestras biológicas se obtuvieron en años anteriores se dificulta la localización de estos pacientes para el cumplimiento del ordinal 8 relacionado con el consentimiento y autorización previa información (41).

4. Técnica e instrumento de recolección de datos

De acuerdo al enfoque cuantitativo y contexto de la investigación la técnica de recolección de datos que se utilizó fue la observación, la cual consiste en el registro sistemático, válido y confiable de comportamiento o conducta (40). La misma se registró posterior a la aplicación del procedimiento específico para cada variable a estudiar, empleando un cuadro de registro como instrumento de recolección de datos.

4.1 Estudio Inmunohistoquímico:

Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalidad celular (42), por lo que se realizaron varios cortes de 3 a 5 μm , de cada una de las 20 muestras de biopsias con diagnóstico de candidiasis atrófica y de mucosa sana. Se procedió al desparafinado y la hidratación, posteriormente el marcaje con solución de verde luz, durante 5 minutos, se lavó y se colocó en serie creciente de alcoholes y por último se procedió al montaje.

El estudio Inmunohistoquímico para Ki-67 y p53 se realizó utilizando la técnica Avidina-Biotina inmunoperoxidasa, a través de la ejecución de varios cortes de 4 μm , se desparafinó en xilol al 100% con 3 cambios de 5 minutos cada uno y en alcohol etílico absoluto con 3 cambios de 30 segundos cada uno. Se añadió solución buffer fosfato (PBS) por 5 minutos. Posteriormente se llevó a solución de PBS-Peróxido de Hidrógeno al 3% por 10 minutos y luego otro cambio en PBS durante 5 minutos. Para la recuperación de antígenos, se utilizó ácido cítrico y se llevó al microondas, para hervir durante 15 minutos, se dejó reposar por 20 minutos, seguido de un lavado con PBS. Las muestras

fueron incubadas por 2 horas con un anticuerpo (IgG1) monoclonal para Ki67 antihumano (clone MIB-I, DAKO). Después se realizó un lavado con PBS-TWEEN por 5 segundos, seguido de la succión con aspirador. Se agregó el complejo Avidina-Biotina y se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente, lavando posteriormente con PBS-TWEEN. Se agregó el cromógeno D.A.B. durante 5 minutos, luego se lavó con agua corriente para contrastar con verde luz durante 5 minutos. Para la proteína p53, se realizó el mismo procedimiento anterior, utilizando el anticuerpo monoclonal proteína p53 antihumana clone DO-7 de DAKO.

Para ambos marcadores inmunohistoquímicos se realizaron controles positivos para descartar falsos negativos.

4.2. Estudio histopatológico

Para la constatación de la presencia de hiperplasia y displasia epitelial, se realizaron varios cortes de 4µm de cada una de las muestras de mucosa sana y con diagnóstico de candidiasis, para posteriormente realizar la tinción de hematoxilina y eosina de Mayer. Se desparafinaron las láminas de los cortes, se hidrataron para su posterior teñido en una solución de hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Se lavaron por 15 minutos, y se colocaron en etanol al 80% por 2 minutos. Se realizó el contraste con solución de eosina-Floxina por 2 minutos. Se deshidrató y se aclaró a través de 2 cambios de etanol a 95%, etanol absoluto y xileno por 2 minutos cada uno. Por último se realizó el montaje.

4.3. Valoración cuantitativa

La interpretación cuantitativa de la inmunocoloración de las pruebas inmunohistoquímicas Ki67 y p53, se realizó de forma manual, observando la cantidad de células teñidas en un campo, expresándolas en porcentaje, utilizando una escala de 4 niveles: menos del 10% de células teñidas se considerará negativo, del 10% a 29% de células teñidas se considerará discreto índice de proliferación, del 30% a 69% de células teñidas se

considerará índice proliferativo moderado y del 70% al 100% se considerará alto índice de proliferación (43).

Para la valoración cuantitativa del análisis histopatológico se tomarán en cuenta la presencia o ausencia de hiperplasia y displasia epitelial.

4.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la técnica inmunohistoquímica Ki67, se realizaron 4 lecturas por cada lámina a 1000x, cuya actividad fue llevada a cabo por el anatomopatólogo. A los resultados obtenidos se le aplicó el programa Statistical Product and Service Solutions (SPSS) 20 para Windows, con la finalidad de obtener la distribución de frecuencia de cada una de las lecturas, así como media, mediana, moda, varianza, desviación típica y coeficiente de variación para interpretar el comportamiento individual de cada uno de estos valores. Se realizó el análisis de la varianza, con la finalidad de corroborar si existe diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes lecturas.

Para el análisis estadístico del estudio histopatológico se expresó la presencia o ausencia de hiperplasia epitelial y displasia epitelial en valores absolutos y relativos utilizando el programa señalado anteriormente.

También se realizó la correlación de Spearman, entre cada una de las lecturas, con la presencia de hiperplasia y displasia, esta prueba es no paramétrica y mide la asociación e interdependencia entre dos variables (44).

IV. RESULTADOS

1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

1.1. Expresión de proteína Ki-67

No se observó expresión de la proteína Ki-67 en las células de tejidos sanos, mientras que se evidenció inmunoreactividad de la proteína en todos los casos de candidiasis, específicamente, en el 25 % de las muestras la inmunoreactividad fué discreta (de 10 a 29 % de células teñidas); en el 30% la inmunoreactividad fué moderada (30 a 69% de células teñidas) y en el 45% la inmunoreactividad resultó alta o intensa (de 70 a 100% de células teñidas); observándose la tinción en mayor proporción en los estratos basal y suprabasal del epitelio bucal (Tabla 1).

Tabla N° 1. Frecuencia inmunoreactividad de proteína Ki-67

Inmunoreacción	Frecuencia	Porcentaje
Discreta	5	25
Moderada	6	30
Intensa	9	45

Fuente: anexo 1

1.2. Expresión de proteína p53

No se evidenció inmuno-reactividad nuclear ante la proteína p53 en las muestras de mucosa sana y en los casos de candidiasis crónica.

1.3. Presencia de Hiperplasia y displasia epitelial

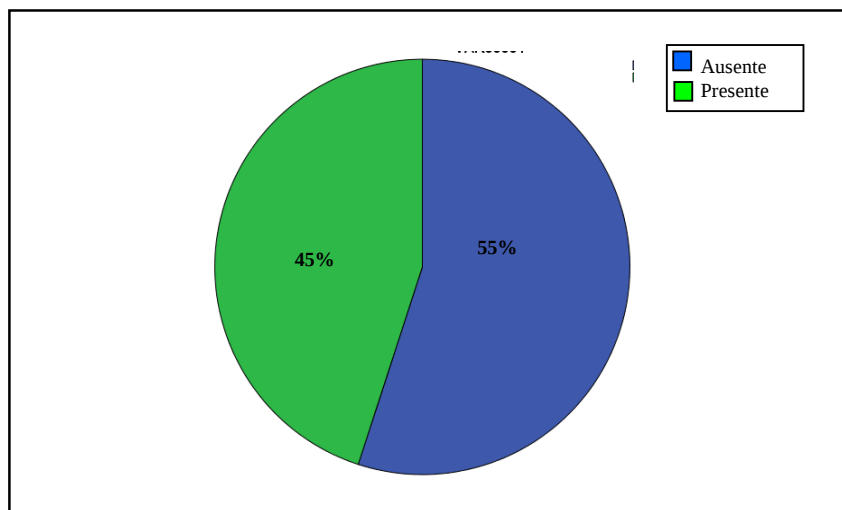
Se observó que un gran porcentaje de las muestras (75%) mostró la característica de hiperplasia de los estratos basal y suprabasal del epitelio (Tabla 2 y figura 1).

Tabla N° 2. Frecuencia de hiperplasia epitelial.

Hiperplasia	Frecuencia	Porcentaje
Ausente	5	25
Presente	15	75

Fuente: anexo 2

Figura 1. Distribución de hiperplasia epitelial



Fuente: tabla 2

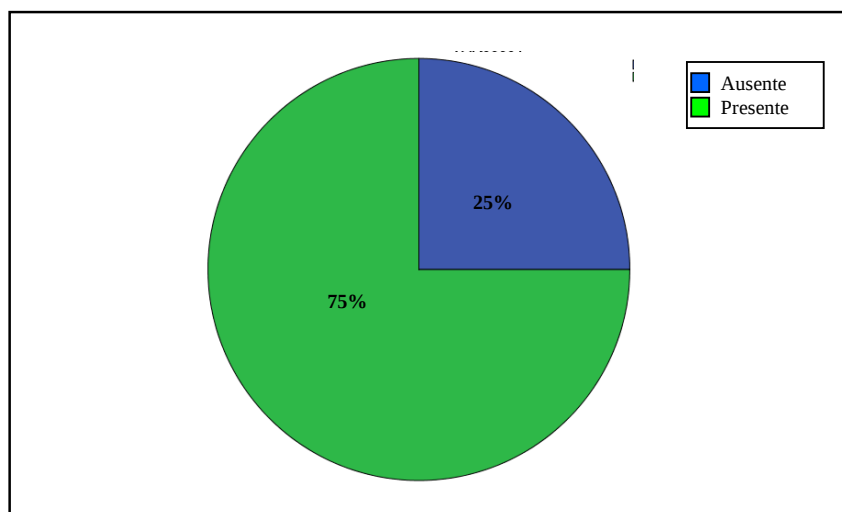
También se presentó cambios de displasia leve en estratos basal y suprabasal del epitelio en el 45% de las muestras, coincidiendo en todos los casos con hiperplasia epitelial, es decir, 9 de las 15 muestras que presentaron hiperplasia adicionalmente presentaron displasia (Tabla 3 y figura 2).

Tabla N° 3. Frecuencia de displasia epitelial.

Displasia	Frecuencia	Porcentaje
Ausente	11	55
Presente	9	45

Fuente: anexo 2

Figura 2. Distribución de hiperplasia epitelial



Fuente: tabla 3

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

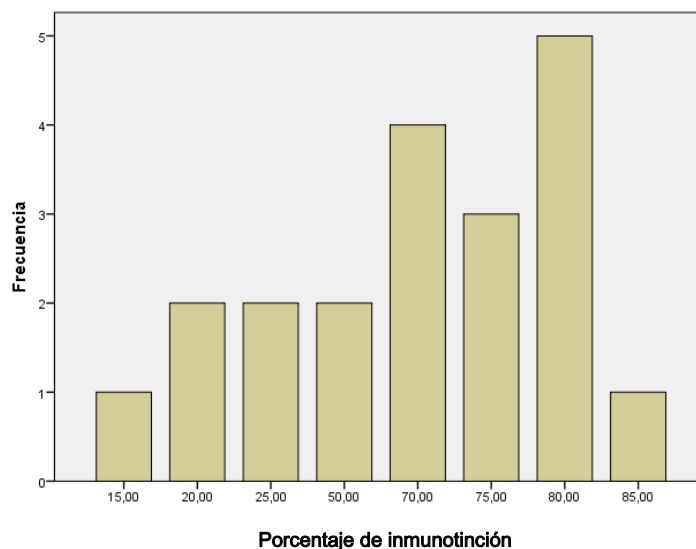
En relación a las lecturas de cada muestra inmunoreactiva para correlacionar la expresión de la proteína Ki-67 con la presencia de displasia epitelial, se observó que en la primera lectura, el mayor número de muestras, que fueron 5 de las 20 muestras presentó 80% de células inmunoteñidas (Tabla 4 y figura 3); en la segunda lectura el mayor número fue de 5 con 75% de células inmunoteñidas (Tabla 5 y figura 4); en la tercera lectura el mayor número de muestras fue de 4 con un 80% de células inmunoteñidas (Tabla 6 y figura 5) y en la cuarta lectura, el mayor número de muestras fue de 6 con 80% de células inmunoteñidas (Tabla 7 y figura 6).

Tabla N° 4. Frecuencia de lectura 1 de inmunotinción

Porcentaje de inmunotinción	15	20	25	50	70	75	80	85
Frecuencia	1	2	2	2	4	3	5	1
Porcentaje	5	10	10	10	20	15	25	5

Fuente: anexo 1

Figura N° 3. Distribución de lectura 1 de inmunotinción



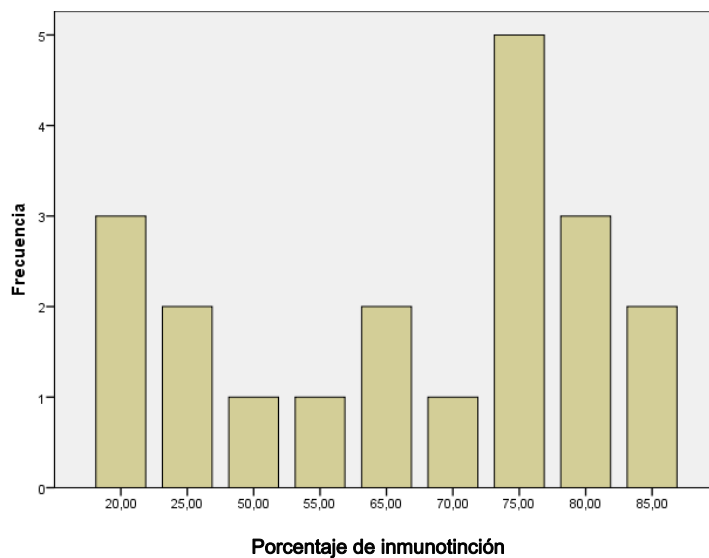
Fuente: tabla 4

Tabla N° 5. Frecuencia de lectura 2 de inmunotinción

Porcentaje de inmunotinción	20	25	50	55	65	70	75	80	85
Frecuencia	3	2	1	1	2	1	5	3	2
Porcentaje	15	10	5	5	10	5	25	15	10

Fuente: anexo 1

Figura N° 4. Distribución de lectura 2 de inmunotinción



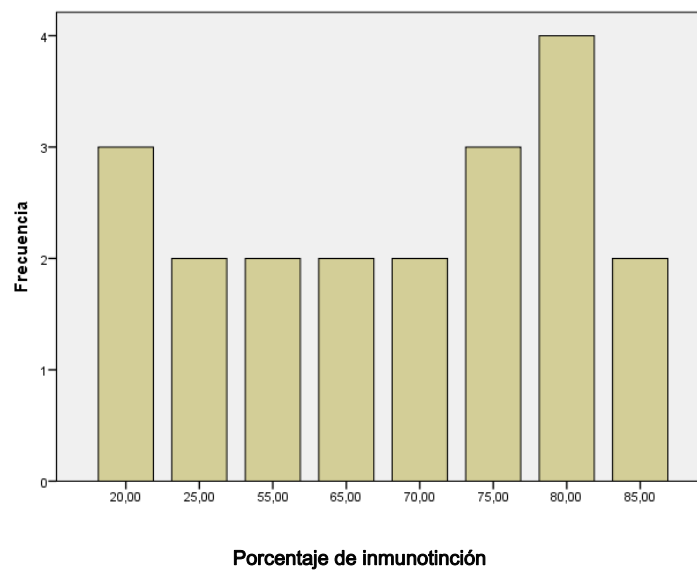
Fuente: tabla 5

Tabla N° 6. Frecuencia de lectura 3 de inmunotinción

Porcentaje de inmunotinción	20	25	55	65	70	75	80	85
Frecuencia	4	1	1	1	1	3	3	6
Porcentaje	20	5	5	5	5	15	15	30

Fuente: anexo 1

Figura N° 5. Distribución de lectura 3 de inmunotinción



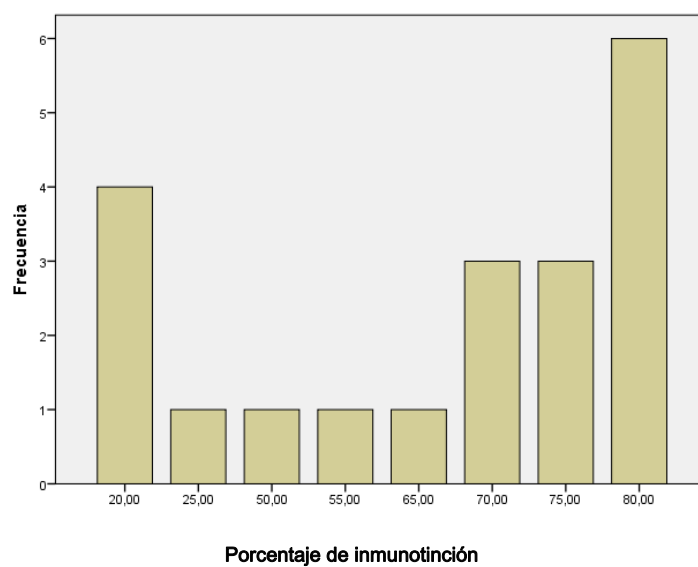
Fuente: tabla 6

Tabla N° 7. Frecuencia de lectura 4 de inmunotinción

Porcentaje de inmunotinción	20	25	55	65	70	75	80	85
Frecuencia	4	1	1	1	1	3	3	6
Porcentaje	20	5	5	5	5	15	15	30

Fuente: anexo 1

Figura N° 6. Distribución de lectura 4 de inmunotinción



Fuente: tabla 7

El grado de dispersión de cada una de las variables es Moderado o Normal, de acuerdo a las tablas 8, 9 y 10 (44).

Tabla N° 8. Resumen estadístico de las variables.

LECTURAS INMUNOTINCIÓN	MEDIA	MEDIANA	MODA	DESVIACIÓN TÍPICA	VARIANZA	RANGO	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
1	59,75	70,00	80,00	24,68	609,14	70	47,06
2	60,00	72,50	75,00	24,17	584,21	65	42,67
3	60,25	70,00	80,00	24,14	582,82	65	44,87
4	59,50	70,00	80,00	24,21	586,57	60	44,32

Tabla
Grado de

COEFICIENTE DE VARIACIÓN	DISPERSIÓN
81-100	Muy alta
61-80	Alta
41-60	Moderada o Normal
21-40	Baja
01-20	Muy baja
0	Nula

N° 9.

dispersión

Tabla N° 10. Tabla de medias de las lecturas de inmunotinción

LECTURAS INMUNOTINCIÓN	MEDIA	ERROR TÍPICO DE LA MEDIA	LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
1	59,75	5,51	48,19	71,30
2	60,00	5,40	48,68	71,31
3	60,25	5,39	48,95	71,54
4	59,50	5,41	48,16	70,80

Respecto a la relación existente entre cada una de las cuatro lecturas de inmunotinción con la variable displasia, se observa en las tablas 11 y 12 que la relación tiene un sentido directo (relación positiva), de tipo imperfecto (valor diferente a 1) y un grado alto de correlación, según tabla 13, lo que significa que a mayor porcentaje de células teñidas expresadas en las lecturas de Ki67 aumenta la posibilidad de presencia de displasia, y a menor porcentaje de células teñidas menor presencia de displasia.

Tabla N° 11. Grado de relación entre cada lectura de inmunotinción y la presencia de displasia.
(Correlación de Sperman)

LECTURAS INMUNOTINCIÓN	DISPLASIA
	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
1	0,630
2	0,684
3	0,605
4	0,682

Tabla N° 12. Grado de relación entre cada lectura de inmunotinción y la presencia de hiperplasia.
(Correlación de Sperman)

LECTURAS INMUNOTINCIÓN	HIPERPLASIA
	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)

1	0,801
2	0,680
3	0,703
4	0,797

Tabla N* 13. VALORACIÓN DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (44)

COEFICIENTE DE CORRELACION ($\pm$)	GRADO
0	Nula
0,01 – 0,20	Muy baja
0,21 – 0,40	Baja
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Alta
0,81 – 0,99	Muy alta
1	Perfecta

3.ICONOGRAFÍA

La proteína Ki-67 no se evidenció expresión en tejidos sanos (Figura 7).

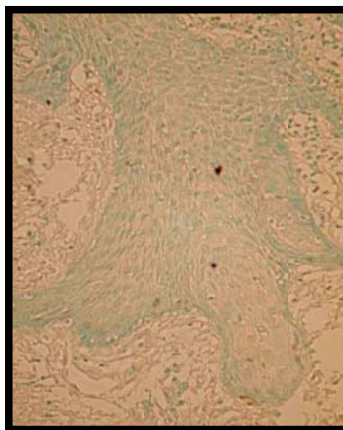


Figura 7. Mucosa sana de paladar duro. Reacción negativa del antígeno Ki-67. 200x

En muestras de candidiasis crónica de paladar se observó inmunotinción celular traduciendo la expresión de la proteína Ki-67 (Figura 8 y 9).

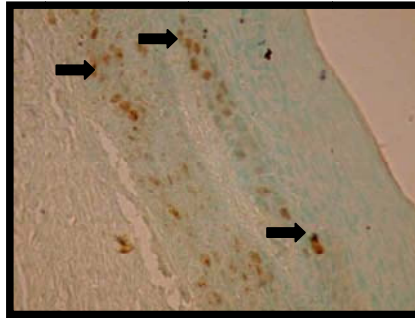


Figura 8. Candidiasis crónica con inmunoreactividad celular de estratos basal y suprabasal del epitelio al antígeno Ki-67. 200x

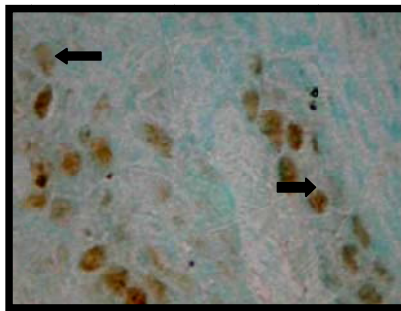


Figura 9. Candidiasis crónica con inmunoreactividad celular del estrato basal y suprabasal al antígeno Ki-67. 1000x

No se detectó inmuno-reactividad nuclear ante la proteína p53 en las muestras de mucosa sana (Figura 10) y en los casos de candidiasis crónica (Figura 11).

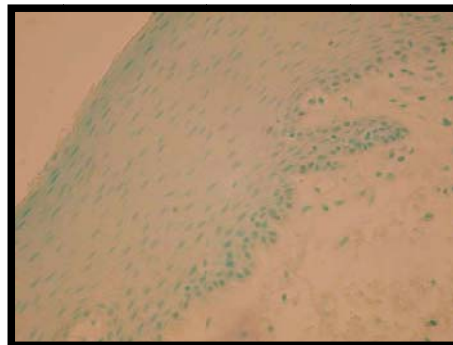


Figura 10. Mucosa sana de paladar duro con reacción negativa para proteína p53.200x

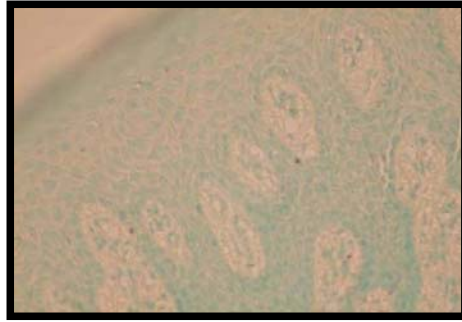


Figura 11. Candidiasis crónica con inmunoreactividad negativa para proteína p53. 200x

Dentro de las características histopatológicas de interés a relacionar con la expresión de las proteínas en estudio, se observó que en las veinte (20) muestras obtenidas y procesadas, se diagnosticó candidiasis oral crónica, observándose hifas y esporas de *Cándida* (Figura 12). En quince (15) muestras se evidenció hiperplasia de las capas basal y espinosa del epitelio (Figura 13) y en nueve (9) muestras se observó displasia leve de células del estrato basal y espinoso (Figura 14), tal como es expresado en otras investigaciones, caracterizando al marcador Ki-67.

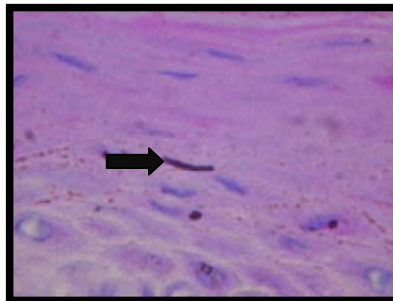


Figura 12. Hifas de *Cándida* en estrato intermedio del epitelio.400x

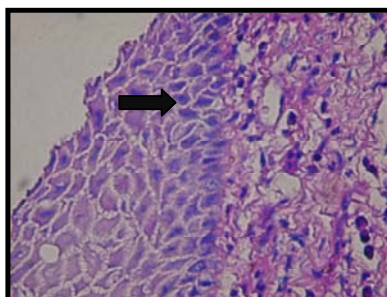


Figura 13. Hiperplasia de estratos basal y suprabasal del epitelio.200x

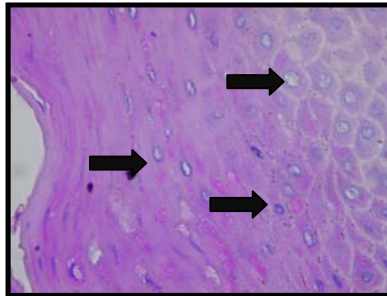


Figura 14. Displasia de estratos basal y suprabasal del epitelio.400x

V. DISCUSIÓN

La inmuno-reactividad negativa de los tejidos sanos ante los marcadores inmunohistoquímicos de proteínas Ki-67 y p53, demuestran el comportamiento normal de las células del epitelio en cuanto a actividad proliferativa se refiere, tal como ha sido afirmado (10). No obstante la inmunotinción nuclear de las células del epitelio del paladar duro con candidiasis bucal crónica, ante el antígeno de proliferación celular Ki67, demuestra el estado de actividad proliferativa de las células, coincidiendo con la característica histológica de hiperplasia y displasia. Este hecho es muy importante a considerar, debido a que algunas investigaciones han reportado que las lesiones orales asociadas a candidiasis, parecen ser similares a las encontradas en lesiones displásicas en referencia a la proliferación celular (38), y en este caso, la positividad a la proteína Ki67 evidenció el estado proliferativo que presenta la mucosa afectada por candidiasis, presentándose mayor proporción en las células de los estratos basal y suprabasal del epitelio.

Tomando en consideración que algunos autores aseguran que la proteína Ki-67 puede expresarse en los estratos basales del epitelio en células que se encuentran en fases específicas del ciclo celular, lo cual indica el estado proliferativo de esta capa epitelial (37), en este estudio no se evidenció expresión en tejidos sanos. La capa basal del epitelio bucal es la zona donde

en condiciones de normalidad se ubica el comportamiento proliferativo celular, mientras que la capa suprabasal incluye la zona de maduración celular, por lo que la detección de Ki-67 en la capa suprabasal es un marcador objetivo a la presencia de displasia epitelial (45); sin embargo, otros autores consideran que la utilización de la enzima topoisomerasa 11α , es un mejor marcador en estados previos a la presencia de displasia, ya que la corta vida media de Ki-67 impide su expresión en el total de los casos (37), aun así, en el total de las muestras de candidiasis crónica de paladar se observó inmunotinción celular traduciendo la expresión de la proteína Ki-67.

No se evidenció inmuno-reactividad nuclear ante la proteína p53 en las muestras de mucosa sana y en los casos de candidiasis crónica, tal como se ha observado en otras investigaciones de mucosa bucal sana (46), aunque también se ha reportado expresión de bajo índice de la proteína p53 en estrato basal de mucosa bucal sana, y alto índice de su expresión en estratos basal y suprabasal en lesiones inflamatorias como la hiperplasia papilar inflamatoria asociada o no a *Cándida* (47) y en candidiasis crónica hiperplásica en mucosa labial (48). Algunos estudios han demostrado la sobreexpresión de esta proteína codificada por un antioncogen, en lesiones como el liquen plano, leucoplasias, candidiasis crónica hiperplásica, en las que se ha observado diferentes grados de displasia, así como en carcinomas de células escamosas (10, 11, 38, 45). La inmunoreactividad en lesiones displásicas, *ca in situ*, y en áreas de mucosa de apariencia normal de los márgenes periféricos de carcinomas, permite sugerir que la expresión de p53 es una actividad que vaticina la transformación maligna de el epitelio bucal (16). A lo anteriormente descrito, la ausencia de inmunotinción (negatividad) en las muestras de candidiasis, a la presencia de la proteína p53, indica que esta proteína no se encuentra alterada en estas células, por lo tanto los mecanismos de apoptosis y supresión tumoral aportados por ella, se encuentran funcionando; es por ello que se coincide con la importancia descrita a este marcador tumoral en lesiones de cavidad bucal (10).

Dentro de las características histopatológicas de interés a relacionar con la expresión de las proteínas en estudio Ki-67, en las diagnosticadas con candidiasis oral crónica, con evidencias de hiperplasia de las capas basal y espinosa del epitelio y displasia leve de células del estrato basal y espinoso son similares a las encontradas en otras investigaciones caracterizando al marcador Ki-67 (45).

La expresión positiva ante Ki-67 indica el estado de proliferación celular, y si recordamos las fases de la carcinogénesis descritas en la bibliografía consultada, en las cuales un estado de proliferación activa y continua generan hiperplasia del tejido, cuya cronicidad produce cambios en la forma y presentación de las células, transformándose en displasia, y de mantenerse la misma, puede generar una neoplasia ó cáncer alcanzando la quinta fase del proceso (8). Este comportamiento, permitiría relacionar la candidiasis oral, con la génesis de cáncer a través de un estado proliferativo activo crónico de las células del epitelio, afianzando la hipótesis que demostró la existencia de diferentes biotipos de *Cándida Albicans* capaces de producir nitrosamina carcinogénica a partir del precursor N-nitrosobenzilmetilamina, al implantar nitrosaminas dentro de las células epiteliales de ratas, desarrollándose posteriormente al cabo de 3 semanas carcinomas, adjudicándole la posibilidad de este microorganismo actúe como factor promotor en carcinogénesis bucal en la rata, existiendo la posibilidad de actuar de forma similar en el humano tanto a nivel bucal como en la patogénesis del cáncer de cuello uterino (48).

Las alteraciones histológicas de hiperplasia y displasia reportadas en investigaciones anteriores se limitaban a la candidiasis crónica hiperplásica (9, 13, 38, 49), en la investigación se evidenció que en la mucosa bucal palatina afectada por el hongo *Cándida*, clasificada como candidiasis crónica, existe un estado proliferativo de las células de los estratos basales y espinoso del epitelio, lo cual se manifiesta con hiperplasia y alteraciones displásicas, que aunque este último se aprecie en grado leve, no había sido reportado hasta el presente.

El análisis estadístico realizado con las diferentes lecturas de la inmunotinción, presenta confiabilidad en los valores, correlacionando el porcentaje de tinción de las células de forma particular con la presencia de hiperplasia epitelial y displasia epitelial, evidenciando que existe una relación directa, es decir, ante la tinción o inmunoreactividad mayor probabilidad de hiperplasia y displasia, esta es una asociación entre el estado de proliferación celular y la presencia de displasia, tal como se ha manifestado en investigaciones anteriores, afirmando que la expresión de Ki-67 y p53 en leucoplasias orales manifiestan la inestabilidad del genoma de acuerdo a la severidad de la displasia (17).

Cabe destacar que la permanencia del efecto del hongo *Cándida* sobre las células del epitelio oral, puede desencadenar cambios displásicos que conlleven a la formación de un proceso neoplásico. Algunos autores han afirmado que los epitelios que desarrollan displasia con mayor incidencia son los que están sometidos a irritación continua, como por ejemplo el epitelio vaginal, bucal y bronquial este último en pacientes fumadores, los cambios displásicos se comienzan a observar a nivel de la capa basal del epitelio, en donde las células pueden perder su orientación normal, pueden verse muchas mitosis en esta capa, es decir, hay un aumento de la multiplicación celular, la membrana basal se mantiene sin cambios y el conjuntivo suele presentar infiltrado inflamatorio y en ocasiones fibrosis (50). Estos cambios corresponden a displasia leve y la importancia de esta, radica en que se corresponde con una de las primeras fases de la cancerización de los tejidos, es decir, es precursora del cáncer. Es de suma importancia señalar que la asociación entre cáncer e inflamación en un órgano o tejido se encuentra sólidamente establecida, en efecto, se sabe que en sitios de inflamación crónica, existe una mayor probabilidad de que se origine un tumor y que procesos inflamatorios locales pueden acelerar el crecimiento de tumores preexistentes en animales y seres humanos (51). Molecularmente se ha explicado como la inflamación crónica aumenta el riesgo de mutación genética produciendo la transformación maligna de la célula, debido a que se menciona a mediadores químicos de los linfocitos

T, específicamente el factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF), poseería la capacidad de suprimir la transcripción de la proteína supresora de tumores p53 (13); quedando en evidencia el efecto potencialmente maligno del microorganismo *Cándida* al ser capaz de aumentar la tasa de proliferación celular lo cual podría desencadenar la formación de carcinomas si sus efectos perduran en el tiempo, afirmando que tanto los marcadores Ki-67 y p53 poseen la capacidad de medir la agresividad de la displasia de los carcinomas orales (52).

VI. CONCLUSIONES

1. La inmunoreactividad nuclear de las células epiteliales de mucosa palatina sana, con marcador inmunohistiquímicos para Ki67 fué negativa.
2. La inmunotinción nuclear de las células epiteliales de la mucosa palatina con candidiasis crónica con el marcador para Ki67, se presentó tanto en el estrato basal como suprabasal.
3. La inmunoreactividad nuclear de las células epiteliales, de la mucosa palatina tanto sana como afectada por candidiasis crónica, fue negativa al marcador inmunohistoquímico para p53.
4. La mucosa bucal con candidiasis crónica, presenta a nivel epitelial, hifas y esporas de *Cándida* en los diferentes estratos, hiperplasia y displasia de los estratos basales y suprabasal, estos últimos no reportados por otros autores.
5. Existe una relación directa entre la inmunotinción nuclear de la proteína Ki-67 en las células epiteliales de la mucosa palatina con candidiasis crónica y la presencia de displasia epitelial, es decir, a mayor inmunotinción, mayor presencia de displasia, por lo que el odontólogo clínico debe tener un seguimiento continuo y oportuno de éstos casos.

6. Existe una relación directa entre la inmunotinción nuclear de la proteína Ki-67 en las células epiteliales de la mucosa palatina con candidiasis crónica y la presencia de hiperplasia epitelial, es decir, a mayor inmunotinción, mayor presencia de hiperplasia, señalando esto la actividad proliferativa estimulada por el microorganismo *Cándida*.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere realizar estudios con otros marcadores inmunohistoquímicos de proliferación celular que complementen y ratifiquen la condición proliferativa de la mucosa palatina con candidiasis crónica y en mayor cantidad de muestras.
2. Es conveniente realizar estudios ultraestructurales que complementen la información obtenida de las alteraciones histopatológicas como hiperplasia y displasia epitelial de la mucosa bucal afectada por *Cándida*.
3. Complementar las investigaciones correlacionando los resultados histológicos con los datos clínicos, así como el tiempo de evolución de la enfermedad, para determinar la influencia de la cronicidad con los cambios observados.
4. Realizar estudios experimentales que certifiquen los efectos bioquímicos proliferativos del microorganismo *Cándida* en las células epiteliales.
5. Informar a los profesionales de la odontología, que tratan este tipo de patología, de la importancia de la realización de biopsias, lo cual

contribuye a la confirmación del diagnóstico y al aporte de muestras de tejidos para futuros estudios, realmente necesarios para la obtención de resultados concluyentes.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ariosa, J., González, F., Rodríguez, G., Rodríguez, J. Cáncer bucal. Estudio de 5 años. Revista Médica Electrónica. 2006;28(6). Disponible: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202006/vol6%202006/tema11.htm>. Consulta: 30 Mayo 2013
2. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Nota descriptiva 297. 2013. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es>. Consulta: 31 Mayo 2013
3. Lamura, A., Garriga, E. Factores de riesgo, pesquisa y diagnóstico precoz en el cáncer de la cavidad bucal. Revisión de la literatura. Acta Odontológica Venezolana. 2002;40(1):56-60.
4. Tirado, L., Granados, M. Epidemiología y etiología del cáncer de cabeza y cuello. Cancerología. 2007;2(9):9-17
5. Reibel, J. Prognosis of oral premalignant lesions: significance of clinical, histopathological, an molecular biological characteristic. Oral Biol Med. 2003; 14: 47-62.
6. Rodríguez, J., Miranda, J., Morejón, H., Santana, J. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión de la bibliografía. Rev. Cubana Estomatol. 2002;39(2):35-39.
7. Louredo, A. Valor pronóstico de los factores clínicos e inmunohistoquímicos en la recidiva precoz del carcinoma ductal infiltrante de mama. Tesis doctoral Biblioteca Universidad Complutense. 200665-71.

8. García, V., González, M., Bascones, A. Bases moleculares del cáncer oral. *Avances en Odontoestomatología*. 2005 21, 287-295.
9. González, M. Precáncer y Cáncer. Ediciones AvancesMedico-Dentales. Madrid; 2002:83-88.
10. Santos, A. Abad, M. Fonseca, E. Cruz, J. Bullon, A. Expresión proteica de P53 en leucoplasias orales. *Med. Oral Patol. Oral*. 2005; 10: 1-8.
11. Villarroel, M., Correnti, M. Expresión de proteína la p53 en lesiones de liquen plano bucal. *Venezuela Odontológica*. 2006; 58: 19-23.
12. Ebrahimi, M. Studie of p63 and p63 related proteins in patients diagnosed with oral lichen planus. *UMEA University Medical Dissertations*. 2007:8-21.
13. Sugerman, P., Sage, N. Oral lichen planus: causes, diagnosis and managment. *Australian Dental Journal*. 2002;47:290-297.
14. Mercadillo Patricia, Moreno Luis M. Hallazgos histopatológicos y expresión de p53 y Ki-67 en queilitis actínica. *Rev. Med. Hosp. Gen. Mex*. 2012;75(2):90-97.
15. Barret, A., Kinsmill, V., Speigght, P. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Disease*. 1999; 4: 26-31.
16. Sarrión M. Estudio clinico del carcinoma oral de células escamosas y su relación con la expresión de los linfocitos T reguladores infiltrantes en el tejido tumoral. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia. Servei Publicacions. 2011:21-23.
17. Kosevi, G., Szende, B. Expresión de p53- Ki67 en leucoplasia. *Oral Oncology*. 2003; 65: 331-336.
18. Visioli, F., Lauxen, I., Sant' ana, M., Rados, P. Expression of the cell cycle regulation proteins p53 and p21 in different types of non-dysplastic leukoplakia. *J Appl Oral Sci*. 2012;20:369-75.
19. Weyll, B., Oliveira, T., Carneiro, B., Ramalho, L. Oral leucoplaquia: malignant transformation after four years of surgical excision. *Rev. Gaucha odontol*. 2012;60:385-389.
20. Correa, A., Venturi, B., Daumas, F., Pedrea, E., Grillo, M. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hERTin squamous cell

- carcinoma and potentially malignant disorders. Braz Oral Res. 2011;25:34-41.
21. Regezi, J. Sciubba, J. Patología Bucal, Correlaciones Clínico Patológicas (4ta. Ed.). McGrawHill Interamericana, México. 2002:110-115.
 22. Sosa, L. Candida albicans. Clínica al día. 1999; 25: 69-76.
 23. Pardi, G., Cardozo, E. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontológica Venezolana. 2002; 40: 27-31.
 24. Williams, D., Lewis, M. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. Oral Disease. 2000; 6: 3-11.
 25. Aguirre, J. Candidiasis oral. Rev. Iberoam. Micol. 2002; 19: 17-21.
 26. Mayoral, J.; Chavez, M.; Ribera, M. La candidiasis oral. Revisión de la literatura. Revista Odontológica de Especialidades. 2009: 67-75
 27. Sapp, J. Eversole, L. Wisoki, G. Patología Oral y Maxilo Facial Contemporánea. Harcourt-Brace, Madrid. 2001:228-231.
 28. Jabra, R., Falkler, W., Meiller, T. Fungal biofilms an drugs resistente. Emerging Infections Disease. 2004; 10: 14-19.
 29. Geneser, Finn. Histología. (3ra. Ed.) Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. 2000: 205-215.
 30. Meza, J., Montaña, A., Aguayo, A. Bases moleculares del cáncer. Revista de Investigaciones Clínica. 2006; 58: 56-70.
 31. Martin de Civetta, M, Civetta J. Carcinogénesis. Salud Pública de México. 2011;53:405-414.
 32. Senra, A. El cáncer, epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención. Hartcourt. España. 2002.75-100.
 33. Ferbeyre, L., Salinas, J. Bases genéticas y moleculares del cáncer. Gamo. 2005; 4: 44-45.
 34. Alvarado, J., Mayany, H. El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas. Gaceta Médica. 2007; 143: 150-156.
 35. Roa, J. Marcadores tumorales: proliferación celular e inestabilidad microsatelital. Gastr. Latinoam. 2003; 14: 155-199.

36. Toro de Mendez, M., Llombert, A. Medición inmunohistoquímica de la actividad proliferativa en carcinoma epidermoide de cuello uterino. Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2005 Disponible:http://www.conganat.org/7congreso/final/trabajo.asp?id_trabajo=160 Consulta:30 enero 2013.
37. Reiiikka, Mattila. Molecular markers of oral lichen planus. Anales Universitatis Turkuensis. Médica Odontológica. 2009.25-28.
38. Moldaver, M., Safadi, R., Hellstein, J., Qian, F., Timmons, S., Kurago, Z. Ki67 expression in *Candida* asociated oral lesion. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology. 2007;13: 21-24.
39. Sierra, C. Estrategias para la elaboración de un proyecto de investigación. Insertas Médicas de Venezuela. Maracay-Aragua 2004. 38-62
40. Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. Metodología de la Investigación (3ra. Ed.). McGraw-Hill interamericana, México. 2003:114-124.
41. Código de Bioética y Bioseguridad del Ministerio de Ciencia y Tecnología, Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. Academia Biomédica Digital. Facultad de Medicina. UCV. 2013:53:15-24 Disponible: <http://vitae.ecv.ve/?module=articulo&n=1175> Consulta:28 Abril 2013.
42. Ceccotti, E., Sforza, R., Carzoglio, J., Luberti, R., Flichman, J. El diagnóstico en la clínica estomatológica. Editorial Medica Panamericana. Argentina. 2007:67-72.
43. Taylor, C. The test aporoach to standarization of immunohistochemistry. Arch Pathology Lab Med. 2000; 129: 945-951.
44. Chourio, J. Estadística I. Editorial Biósfera. Caracas. 1987:62-85.
45. Rodríguez, J. Estudio de los reguladores del ciclo celular asociados al desarrollo de cáncer oral en una muestra de la Provincia de Álavea. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2010:83-91.
46. Kaplan, I., Verod, M., Moskona, D., Buchner, A., Dayan, D. An immunohistochemical study of p53 and PCNA in inflamatory papillary

- hiperplasia of the palate: a dilemma o interpretation. Oral Diseases. 1998;4:194-199.
47. Croshmate, N., Teale, D., Franklin, C., Foster, G., Stringer, B. P53 protein expression in malignant, premalignant and non-malignant lesions of de lip. J.Clin.Phatholo. 1996;49:648-653.
 48. McIntyre, G. Candidiasis oral. Dent Updite. 2001;2001;28:132-139.
 49. Sitheequ, M., Samaranayake, L. Chronic hyperplastia candidosis/ candidiasis (candidal leukoplakia). C. ROBM. 2003;14:253.
 50. Calanche, I., Rivas, C. Manual de histopatología básica para Odontólogos. Universidad de los Andes. Consejo de Publicaciones. Mérida-Venezuela. 2002:43-56.
 51. Bruzzo, J., Chiarella, P., Fernández, G., Bustuoabad, o., Ruggero, R. Cáncer experimental e inflamación sistémica en un modelo murino. Medicina. Buenos Aires. 2007. 67(5):465-474.
 52. Dragomir, L. Simonescu, C., Margaritesca Cl., Stepan, A., Dragomir, I., Popescu, M. P53, p16 and Ki67 immunoexpression oral squamus carcinoma. Rom L Morpholo Embryol. 2012, 53: 89-93.

	MUESTRA	1	2	3	4
IX.	1	15	20	20	20
AN	2	70	65	70	70
EX	3	25	25	25	20
OS					

AN
EX
O 1.
LE
CT
UR
AS
DE
INM
OR
EA
CTI
VID
AD
CE

LULAR ANTE EL MARCADOR DE PROLIFERACIÓN CELULAR Ki-67

4	80	80	80	80
5	LECTURAS DE INMUNOREACTIVIDAD			
6	80	75	75	75
7	50	55	55	50
8	80	85	85	80
9	75	75	75	80
10	70	70	65	70
11	80	80	80	80
12	80	75	75	75
13	25	20	25	25
14	75	75	80	75
15	50	50	55	55
16	20	20	20	20
17	70	65	65	65
18	85	85	85	80
19	75	80	80	80
20	70	75	70	70

ANEXO 2. PRESENCIA DE HIPERPLASIA Y DISPLASIA EPITELIAL

MUESTRA	HIPERPLASIA	DISPLASIA
1	-	-
2	+	-
3	-	-
4	+	+
5	-	-
6	+	+
7	+	-
8	+	+
9	+	+
10	+	-
11	+	+
12	+	+
13	-	-
14	+	+
15	+	-
16	-	-
17	+	-
18	+	+
19	+	+
20	+	-

PRESENCIA :+

AUSENCIA : -