

## Relación histopatológica de la displasia epitelial con la oncoproteína p53 en la leucoplasia bucal

### Histopathological relation of epithelial dysplasia to p53 oncoprotein in oral leukoplakia

Zenia Batista Castro,<sup>I</sup> Irene Rodríguez Pérez,<sup>I</sup> Josefa Dolores Miranda Tarragó,<sup>I</sup> Enrique Rengifo Calzado,<sup>II</sup> Teresita Rodríguez Obaya,<sup>II</sup> Mónica Elena Fernández Jiménez<sup>I</sup>

<sup>I</sup> Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Cuba.

<sup>II</sup> Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

La leucoplasia bucal es una lesión precancerosa bien conocida debido a su asociación con la presencia de displasia epitelial y su tendencia a la transformación maligna. Con el fin de eliminar la subjetividad en la determinación de los grados de la displasia epitelial se han utilizado marcadores biológicos, entre ellos, el AcM anti p53. Por ello se propuso evaluar la expresión del AcM anti p53 en los diferentes grados de displasia epitelial en la leucoplasia bucal. Se emplearon las biopsias de 46 pacientes con diagnóstico de leucoplasia bucal, procedentes del Departamento de Patología Bucal de la Facultad de Estomatología de La Habana. Las muestras fueron procesadas por la técnica de inclusión en parafina y coloreadas con la técnica inmunohistoquímica del complejo avidina-biotina-peroxidasa para el AcM p53. Se estudió la correlación entre el patrón de inmunoensayo para p53 y el grado de displasia epitelial. Se evidenció que existe una asociación significativa entre la inmunocoloración de las células basales y suprabasales del epitelio con la oncoproteína p53, en los distintos grados de severidad de la displasia epitelial, lo que pudiera estar relacionado con el incremento progresivo de atipia celular observada. Se concluyó que en las muestras estudiadas existió una relación coincidente del aumento del grado de severidad de la displasia epitelial, con el marcaje de la oncoproteína p53. Estas evidencias sugirieron que el análisis inmunohistoquímico de p53 en conjunto con los parámetros histológicos, principalmente relacionados con el grado de severidad de la displasia epitelial, pudiera ser utilizado para lograr un diagnóstico más certero y contribuir a la prevención del cáncer bucal.

*Palabras clave:* leucoplasia bucal, displasia epitelial, oncoproteína p53.

## ABSTRACT

The oral leukoplasia is a well known precancerous injury due to its association with the presence of epithelial dysplasia and its trend to malignant transformation. To eliminate the subjectivity in the determination of the epithelial dysplasia degrees, biological markers have been used among them the AcM.anti p53. Thus, authors assessed the expression of AcM anti p53 in the different degrees of epithelial dysplasia in the oral leukoplasia. Biopsies from 46 patients diagnosed with oral leukoplasia were used from the Oral Pathology Department of the Stomatology Faculty of La Habana. Samples were processed by the paraffin-inclusion technique and stained with immunohistochemical technique of the avidin-biotin-peroxidase complex for the AcM p53. The correlation between the immunoassay pattern for p53 and the degree of epithelial dysplasia was studied. It was demonstrated that there is a significant association between the immunostain of basal and supra-basal cells of epithelium with the p53 oncoprotein in the different degrees of severity of the epithelial dysplasia, which could be related to the progressive increase of the observed cellular atypia. We concluded that in the study samples there was a coincident relation of the increase in the degree of severity of the epithelial dysplasia, with the marking of the p53 oncoprotein. These evidences suggested that the immunohistochemical analysis of p53 overall with the histological parameters mainly those related to the degree of severity of the epithelial dysplasia could be used to made a more accurate diagnosis and to contribute to prevention of oral cancer.

*Key words:* Oral leukoplakia, epithelial dysplasia, p53 oncoprotein.

---

## INTRODUCCIÓN

El cáncer bucal ocupa el sexto lugar de incidencia de cáncer en el mundo.<sup>1</sup> Al menos el 95 % de las neoplasias de la cavidad bucal son carcinomas epidermoides. Aunque la mayor parte son fáciles de descubrir resulta desalentador que muchos se detectan tardíamente y que el 50 % de estas lesiones demuestran ser mortales.<sup>1,2</sup> Uno de los problemas para el diagnóstico precoz del cáncer bucal está representado por la identificación de trastornos no neoplásicos que tienen una alta asociación con él, por lo que han sido nombradas lesiones precancerosas. Según los criterios de la Organización Mundial para la Salud (OMS), entre estas lesiones se encuentran: la leucoplasia bucal, la eritroplasia y las lesiones del paladar en fumadores inversos. De todas ellas la leucoplasia bucal es la más frecuente.<sup>3-6</sup>

La leucoplasia bucal se define como una lesión predominantemente blanca de la mucosa bucal que no desaparece al frotarla y no puede ser caracterizada como otra lesión definida; en dependencia de las circunstancias del examen será posible llegar a un diagnóstico provisional o definitivo.<sup>6</sup> Microscópicamente se caracteriza por una aparición de un proceso de queratinización, cambios en el grosor epitelial, ulceraciones en el epitelio y presencia de displasia epitelial, así como cambios celulares en el tejido conjuntivo subyacente.<sup>7,8</sup> Hay evidencias de que entre todas estas observaciones la displasia epitelial es el predictor histológico que guarda una mayor relación con el carcinoma epidermoide.<sup>7-11</sup>

Su nivel de riesgo de transformación maligna se ha asociado con la presencia de la displasia en la medida en que se incrementa su grado de severidad y la tasa global presenta grandes variaciones que van del 0,13 al 17,5 % y es distinta en función del tiempo de seguimiento realizado sobre las mismas.<sup>7,8,11-13</sup> El cáncer bucal lleva consigo el desarrollo de grados crecientes de displasia epitelial que no son más que el resultado de la acumulación de diversas alteraciones genéticas.

Los modelos más recientes de génesis tumoral muestran que es un proceso en el que median múltiples transformaciones moleculares, a través de las cuales se activan protooncogenes que estimulan el crecimiento celular y genes supresores de tumores que inhiben la proliferación celular en condiciones normales, que se vuelven inactivos y conducen a la célula hacia una transformación neoplásica.<sup>1,14,15</sup> Dentro de estas alteraciones, adquiere especial relevancia el gen p53, diana más frecuente de las alteraciones genéticas en el cáncer humano.<sup>1,14-19</sup>

Su sobreexpresión se ha observado con una elevada frecuencia en el carcinoma epidermoide bucal más que en ningún otro tumor maligno humano (15-60 %).<sup>12,14</sup> Además se ha observado que en las lesiones premalignas bucales y en los carcinomas *in situ*, la sobreexpresión de p53 no está restringida solo a las células neoplásicas, sino que frecuentemente aparece en áreas displásicas o en queratinocitos adyacentes a células neoplásicas positivas al p53, lo que sugiere que esta alteración es un evento que ocurre tempranamente en el proceso de carcinogénesis bucal.<sup>1,20,21</sup> Por ello puede convertirse en un indicador útil para el diagnóstico y el pronóstico de las lesiones potencialmente malignas, como es el caso de la leucoplasia bucal.<sup>20-23</sup>

Algunos investigadores refirieron una correlación entre el aumento en la proporción de las células inmunorreactivas y el grado de severidad de la displasia epitelial, que llega a mostrarse en aumentos crecientes a partir de las displasias ligeras y moderadas, hacia las severas, y que sugieren que la expresión de la oncoproteína p53 puede ser un excelente indicador a la predisposición a la malignidad en la leucoplasia bucal.<sup>14-19,24,25</sup> En el presente estudio se propuso evaluar la expresión del AcM anti p53 en los diferentes grados de displasia epitelial en la leucoplasia bucal.

## MÉTODOS

Se realizó una investigación descriptiva y transversal a partir del análisis de los cortes de todas las biopsias conservadas en parafina, de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de leucoplasia bucal o carcinoma epidermoide, realizados en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Estomatología de La Habana, Cuba, procedentes del proyecto de investigación "Seguimiento clínico y caracterización histopatológica de las lesiones precancerosas bucales", ejecutado en la Clínica de Patología Bucal del mismo centro, entre los años 1991 y 2008. Se consideró como requisito que estas tuvieran un grado de conservación adecuado para el estudio inmunohistoquímico, con 66 muestras como resultado.

Del total de muestras procesadas, 46 correspondieron a pacientes con diagnóstico de leucoplasia bucal, con diferentes grados de displasia epitelial y 20 correspondieron al diagnóstico de carcinoma epidermoide. Como medida de control para las observaciones microscópicas de las biopsias se obtuvieron 5 muestras de mucosa bucal aparentemente normal de pacientes a los que se les realizó extracciones múltiples con alveoloplastia, en el Departamento de Cirugía Maxilofacial del Hospital "Enrique Cabrera", en La Habana. Los fragmentos de aproximadamente 5 mm de diámetro correspondían a la zona periférica de la

incisión descrita para este proceder quirúrgico y que deben ser desechadas, sin que esto representara ningún riesgo a la salud de esos pacientes.

Todas las muestras de mucosa aparentemente normal y patológicas fueron tratadas según los criterios tradicionales de los laboratorios de Anatomía Patológica del país y fueron fijadas en formalina neutra al 10 %, procesadas mediante la técnica de inclusión en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina.<sup>26</sup> Los criterios tomados para la determinación de la displasia epitelial se establecieron de acuerdo a los aprobados por el Grupo de Estudio para las Lesiones Precancerosas de la OMS.<sup>7</sup>

El estudio inmunohistoquímico se realizó en el Departamento de Calidad de los Anticuerpos Monoclonales del Centro de Inmunología Molecular. Para ello se realizaron 2 cortes seriados de 5 µm de grosor en un micrótopo vertical Spencer y se aplicó la técnica inmunohistoquímica para la p53. Para ello se utilizó el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa, con el uso del anticuerpo monoclonal AcM murino antiproteína p53 (1:1000, DAKO).

Como control positivo se empleó una muestra de carcinoma epidermoide de pulmón que sobreexpresa este antígeno, incubada con el AcM primario (Dako) o con isotipo control Inmunoglobulina G (Pharmigen). Se utilizó como controles negativos uno de los cortes incubados con TBS en lugar del AcM primario. La reacción positiva consistió en un precipitado de color pardo-café en la zona de reacción del complejo antígeno-anticuerpo. En cada corte observado se estudiaron de 8 a 10 campos escogidos al azar en un microscopio óptico Karl Zeiss, con magnificaciones de 100 X, 400 X y 1000 X. A partir de esto, la reacción del AcM fue valorada cuantitativamente y se establecieron como positivos los núcleos que se colorearon de marrón. Se calculó la media del porcentaje de células marcadas positivamente para lo cual se utilizó el siguiente criterio tomado de la literatura,<sup>27-30</sup> Positiva: p53 ≥ 50 % de células positivas y Negativa: p53 < 50 % de células positivas.

Se digitalizaron las imágenes en un microscopio Leyca acoplado a la computadora programada con el sistema Atply. Los resultados se recogieron en una base de datos y se usó el programa *Microsoft Excel*. El análisis de estos se hizo mediante el empleo de las estadísticas descriptivas con la realización de las tablas de contingencia de 2 entradas y el cálculo del estadígrafo  $\chi^2$  correspondiente con en el programa SPS versión 9.0.

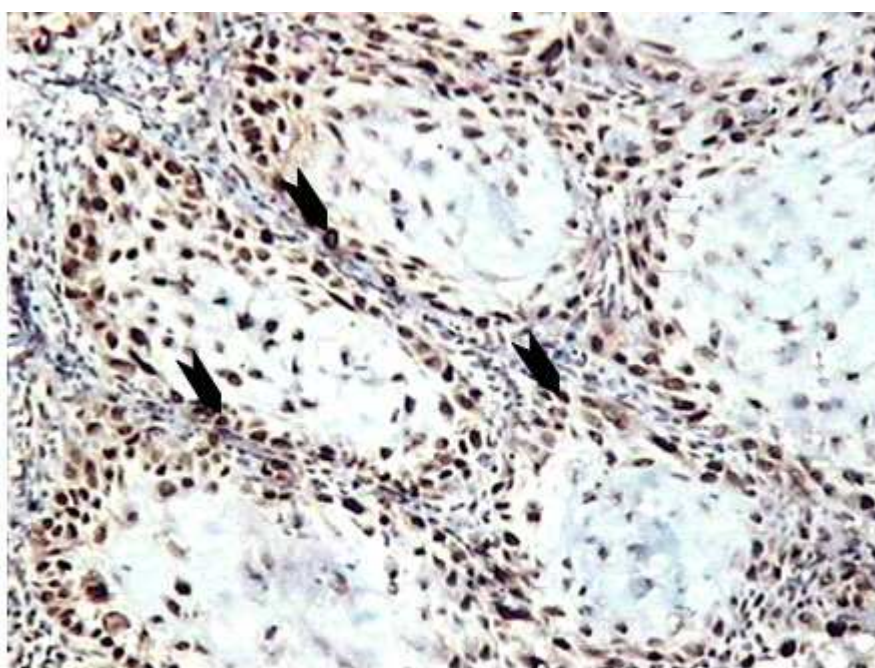
## RESULTADOS

En las muestras analizadas se observó un mayor número de casos positivos al p53 en carcinoma epidermoide con respecto al grupo de muestras con diagnóstico de displasia epitelial, lo cual arrojó diferencias significativas entre estos 2 grupos ( $\chi^2 = 11,26$ ;  $p < 0,05$ ), las biopsias de mucosa normal fueron todas negativas al p53 como se muestra en la tabla 1.

Se observó un inmunomarcaje nuclear distinguible e intenso en las células tumorales de las muestras de carcinoma epidermoide (Fig. 1). En las biopsias con displasia epitelial se encontró que el grado de expresión de la oncoproteína p53 aumentó significativamente con el incremento del grado de severidad de la displasia epitelial ( $\chi^2 = 9,36667$ ;  $p < 0,05$ ).

**Tabla 1.** Patrón de expresión de la oncoproteína p53 en pacientes con mucosa normal, displasia epitelial en cada uno de sus grados histológicos y carcinoma epidermoide

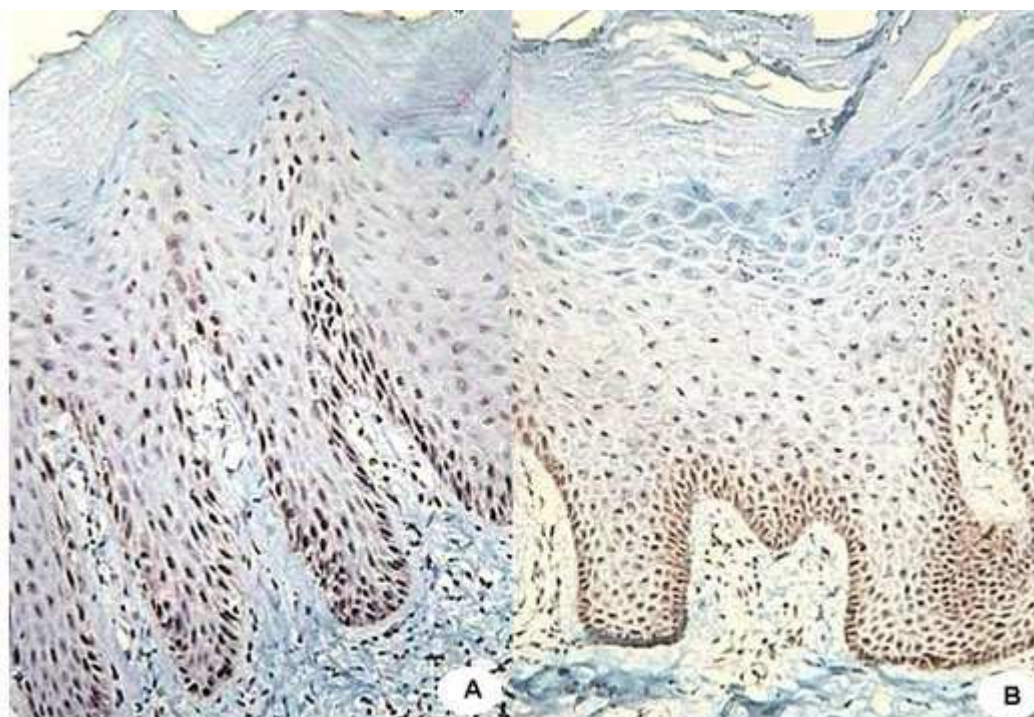
Grado histológico	No. de casos	P53 Casos + (%)		P53 Casos - (%)	
		No.	%	No.	%
Mucosa normal	5	0	-	5	100,0
Displasia epitelial ligera	25	10	40,0	15	60,0
Displasia epitelial moderada	14	9	64,3	5	35,7
Displasia epitelial severa	7	5	71,4	2	28,6
Carcinoma epidermoide	20	19	95,0	1	5,0



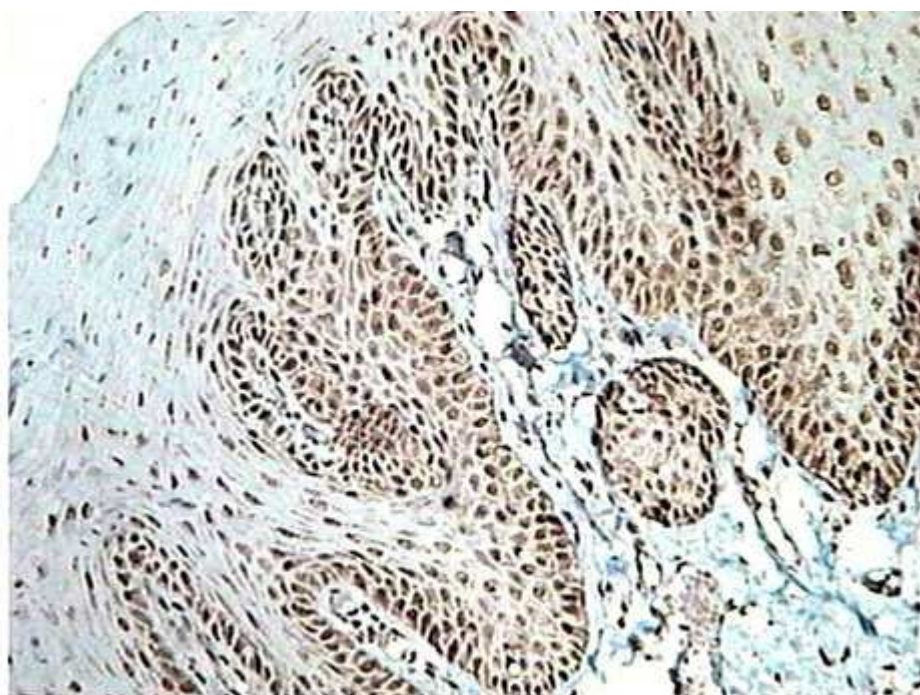
**Fig. 1.** Las flechas señalan el inmunomarcaje nuclear, distinguible e intenso de p53, IHC-AcM p53, distribuido fundamentalmente hacia la periferia en las células tumorales de las muestras de carcinoma epidermoide (250 X).

Los núcleos positivos en las lesiones displásicas se asociaron generalmente con las células que mostraron atipia celular (Fig. 2). En las displasias ligera y moderada la positividad de los núcleos estuvo confinada a los estratos basal y a la zona parabasal del estrato espinoso, mientras que en la displasia severa la distribución de los núcleos teñidos positivamente fue mucho más amplia y se pudo observar también en la zona suprabasal o superior del estrato espinoso (Fig. 3).





**Fig. 2. A.** Progresión histológica de la displasia epitelial ligera a moderada. **B.** IHC-AcM p53, nótese el inmunomarcaje confinado a los estratos basal y espinoso (250 X).



**Fig. 3.** Displasia epitelial severa. IHC-AcM p53. Inmunomarcaje nuclear distribuido en todos los estratos (250 X).

## DISCUSIÓN

Todos los cortes marcados de mucosa normal de la muestra estudiada fueron p53 negativos, resultados que coincidieron con lo reportado por la mayoría de los investigadores.<sup>14,22,29,30</sup> Es posible que esto se deba a que en condiciones fisiológicas, en las células normales la proteína p53 normal o salvaje, tiene una vida media fisiológica muy corta (20 min), lo que hace que, usualmente, sea indetectable a través del uso de técnicas inmunohistoquímicas.<sup>22,24</sup>

La oncoproteína p53 es el gen supresor de tumor más importante, debido a que desempeña un papel trascendental en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, progresión del ciclo celular, diferenciación celular, reparación del ADN y apoptosis, que puede ser inactivada por mutaciones puntuales, deleciones y unión con células y proteínas víricas. Estas situaciones de daño al material genético causan cambios en los niveles de expresión de p53 y su activación como factor de transcripción. El tipo natural de p53 acumulado se une al ADN y estimula la transcripción de varios genes que intervienen en los 2 efectos principales de p53: la detención del ciclo celular y la apoptosis.<sup>1,15,20-22</sup>

Es ampliamente aceptado que el carcinoma epidermoide se desarrolla como resultado de la acumulación de errores genéticos, donde las mutaciones en el gen supresor de tumores p53, es el más común en todos los cánceres humanos. Esto resulta en una sobreproducción de la proteína p53 inactiva que se acumula en las células epiteliales,<sup>1,15,22</sup> que fue lo encontrado en las muestras de carcinoma epidermoide estudiadas.

Se ha reportado que en las displasias ligeras hay una proliferación o hiperplasia de las células del estrato basal y parabasal que no se extienden más allá del tercio inferior del epitelio, con cambios mínimos en la arquitectura celular. No sucede así en las displasias moderadas, donde se observa una proliferación de células atípicas que se extienden dentro del tercio medio del epitelio con cambios típicos en la arquitectura celular tales como hiper Cromatismo, pleomorfismo nuclear y aumento en el número de mitosis anormales y llega el máximo de atipia celular en las displasias severas, donde existe una proliferación anormal desde el estrato basal hasta el tercio superior del epitelio. Se observa un marcado pleomorfismo celular, numerosas mitosis suprabasales, cuerpos apoptóticos, pérdida completa de la estratificación regular del epitelio y queratinización anormal.<sup>9,14</sup>

En las muestras analizadas se encontraron niveles significativos de positividad de p53, que aumentaron sucesivamente en relación con el grado de severidad de la displasia epitelial. Se observó una inmunocoloración de esta oncoproteína en el estrato basal en los casos de displasia epitelial ligera y suprabasal en las muestras de displasia epitelial moderada, con una distribución abundante en las células de la zona suprabasal en la displasia epitelial severa, lo que concordó con lo reportado por otros autores.<sup>16-18,27-29,30</sup>

En los 2 últimos trabajos citados los autores<sup>29,30</sup> argumentaron que esto pudiera deberse a que la expresión de p53 en las lesiones displásicas está confinada a aquellas regiones donde se observa atipia celular. Aunque en otros tipos de tumores la sobreexpresión de p53 es un acontecimiento tardío, un alto porcentaje de carcinomas epidermoides de cavidad bucal tienen niveles elevados de expresión de p53 (15-60 %).<sup>22</sup> Esto coincidió con los resultados de este trabajo en el cual el 100 % de las muestras con carcinoma epidermoide fueron p53 positivas, lo que pudiera estar relacionado con el alto grado de pleomorfismo y atipia celular observada.

Se concluyó que en las muestras estudiadas existió una relación coincidente del aumento del grado de severidad de la displasia epitelial, con el marcaje de la oncoproteína p53. Estas evidencias sugirieron que el análisis inmunohistoquímico de p53 en conjunto con los parámetros histológicos, principalmente relacionados con el grado de severidad de la displasia epitelial, pudiera ser utilizado para lograr un diagnóstico más certero y contribuir a la prevención del cáncer bucal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hunter T, Pustzal L. Neoplasias. En: Cotran RS, Kumar MD, Path GR, Collins T. Robins. Patología estructural y funcional. Boston: Mc Graw-Hill-Interamericana; 2007. p. 778-80.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman DM, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
3. Ben L. Potentially malignant disorders of the oral mucosa: terminology and classification. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2010;111(4):208-12.
4. Warnakulasuriya S, Newell WJ, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36:575-80.
5. Amagasa T, Yamashiro M, Uzawa N. Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. *Int J Clin Oncol*. 2011;16(1):5-14.
6. Petersen PE. Strengthening the prevention of oral cancer: the WHO perspective. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005;33(6):297-9.
7. Pindborg JJ, Reichart CJ. Who histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. New York: Springer; 1997.
8. Rodríguez Pérez I, Bánóczy J. Oral leukoplakia. A histopathological study. *Acta Morphologica Acad Sci Hung*. 1982;30(3-4):289-98.
9. Santana JC. Atlas de patología del complejo bucal. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2010.
10. Batista Castro Z, Rodríguez Pérez I, Miranda Tarragó JD, Rengifo Calzado E, Rodríguez Obaya T, Fernández-Jiménez ME. Caracterización histopatológica de la leucoplasia bucal en La Habana durante diez años. *Rev Cubana Estomatol*. 2011;48(4). [Citado: 29 dic 2011]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072011000400004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072011000400004&lng=es)
11. Vázquez AR, Fernández GF, Gándara VP, Reboiras LD, García GA, Gándara RJ. Correlation between clinical and pathologic diagnosis in oral leukoplakia in 54 patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(6):832-8.
12. Reibel J, Holmstrup P. Premalignant disorders and cancer of the oral mucosa. *Ugeskr Laeger*. 2010;172(44):3040-2.



13. Pereira JS, Henriques AC, de Queiroz CT, Miguel MC, Freitas RA. Epidemiology and correlation of the clinicopathological features in oral epithelial dysplasia: analysis of 173 cases. *Ann Diagn Pathol.* 2011;2:98-102.
14. Speight PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head and Neck Pathol.* 2007;1:616.
15. Montebugnoli L, Felicetti L, Gissi DB, Cervellati F, Servidio D, Marchetti C, et al. Predictive role of p53 protein as a single marker or associated to ki67 antigen in oral carcinogenesis. *Dentistry J.* 2008;2:24-9.
16. Yasuo O, Michiko M. Immunohistochemical study of differential expressions of cytokeratin -13, -14, -17 and p53 in epithelial dysplasia and carcinoma of the tongue. *JHTB.* 2010;2(19):123-30.
17. Abrahao AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res.* 2011;25(1):34-41.
18. Angiero F, Berenzi A, Benetti A, Rossi E, del Sordo R, Sidoni A, et al. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer Res.* 2008;28(5):2535-9.
19. Prado SM, Cedrún JL, Rey RL, Villamil VM, García AA, Ayerbes MV, et al. Evaluation of COX-2, EGFR and p53 as biomarkers of non-dysplastic oral leukoplakias. *Exp Mol Pathol.* 2010;89(2):197-203.
20. Gold KA, Kim ES. Role of molecular markers and gene profiling in head and neck cancers. *Curr Opin Oncol.* 2009;21(3):206-11.
21. White AC, Tran K, Khuu J, Dang C, Cui Y, Binder SW, et al. Defining the origins of Ras/p53-mediated squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(18):7425-3.
22. Santos GA, Abad HM, Fonseca SE, Cruz HJ, Bullón SA. Expresión proteica de P53 y proliferación celular en leucoplasias orales. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10:1-8.
23. Regezi JA, Zarbo RJ, Regev E, Pisanty S, Silverman S. P53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and in situ carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1995;24:18-22.
24. Vered M, Allon I, Dayan D. Maspin, p53, p63, and Ki-67 in epithelial lesions of the tongue: from hyperplasia through dysplasia to carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(3):314-20.
25. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(1):47-62.
26. Rodiles H, Campañón JL, Laza C. Citohistopatología. Procedimientos básicos. La Habana: Ecimed; 2008.

27. Montebugnoli L, Felicetti L, Gissi D, Cervellati F, Servidio D, Marchetti C, et al. Predictive role of p53 protein as a single marker or associated to Ki67 antigen in oral carcinogenesis. *Open Dent J.* 2008;2:24-9.
28. Kikegawa A. Immunohistochemical analysis of the p53 tumour suppressor gene product in oral leukoplakia. *Kokubyo Gakkai Zasshi.* 2001;68:51-9.
29. Cruz I, Napier SS, van der Waal I, Snijders PJ, Walboomers JM. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol.* 2002;55:98-104.
30. Cruz I, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow BG, Walboomers JM, et al. P53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 1998;(4):360-8.

Recibido: 11 de diciembre de 2011.

Aprobado: 21 de diciembre de 2011.

*Dra. Zenia Batista Castro.* Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Cuba. Correo electrónico: [zenia.batista@infomed.sld.cu](mailto:zenia.batista@infomed.sld.cu)