



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL

**EXPRESIÓN DE KI-67, P53 Y BAX EN EL EPITELIO DE AMELOBLASTOMAS
SÓLIDOS Y TUMORES ODONTOGÉNICOS QUERATOQUÍSTICOS SOLITARIOS**

LORENA ANDREA PONCE AEDO

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 1103

TUTOR PRINCIPAL

TM. Cristián Peñafiel Edhkal

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Enrico Escobar Lopez

Dra. Ana Ortega Pinto

Santiago - Chile

2013

AGRADECIMIENTOS

Creo que esto es el cierre de un ciclo, y por lo mismo hay muchas personas a las que debo agradecer, sin embargo, existe algunos que siempre estuvieron ahí, en las

Agradezco a mis padres Mirtha y Juan Carlos

Por sus consejos, sus valores, por no dejarme flaquear cuando todo parecía difícil, y por estar siempre ahí para ayudarme

A mi hermano Carlos

Por acompañarme en todos estos años, además de aguantarme y escuchar.

Y a mis docentes por apoyarme y guiar en la realización de esta tesis.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Marco Teórico.....	5
Cambios en la clasificación de los Ameloblastomas.....	6
Cambios en la clasificación del Tumor Odontogénico Queratoquístico.....	7
Epidemiología del Ameloblastoma Sólido y Tumor Odontogénico Queratoquístico.....	8
Características clínicas de Ameloblastoma Sólido.....	9
Características clínicas del Tumor Odontogénico Queratoquístico.....	11
Características histológicas del Ameloblastoma Sólido.....	13
Características histológicas del Tumor Odontogénico Queratoquístico.....	15
Proliferación celular epitelial y factores relacionados a apoptosis.....	16
Apoptosis mediada por daño en el ADN.....	19
Hipótesis.....	21
Objetivo General y Objetivos Específicos.....	21
Materiales y Métodos.....	22
Resultados.....	28
Caracterización de la muestra.....	28
Resultados Inmunohistoquímicos.....	32
Comparación de la expresión de las proteínas ki-67, p53 y bax en el epitelio de Ameloblastomas Sólidos y Tumor Odontogénico Queratoquístico.....	36

Discusión..... 41

Conclusión..... 47

Bibliografía..... 48

Anexo1..... 57

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los Tumores Odontogénicos (TO) constituyen un grupo heterogéneo de lesiones, algunas de ellas, con potencial metastásico. Actualmente la clasificación usada para este tipo de lesiones, se basa en la publicada por la OMS el año 2005 que considera su comportamiento biológico, así como, el tipo de tejido odontogénico involucrado. En esta clasificación se realizaron cambios substanciales en relación a la del año 1992, incorporando lesiones, por ejemplo, el Tumor Odontogénico Queratoquístico (TOQQ) y aumentando el énfasis clínico-patológico-terapéutico en subdividir al Ameloblastoma en 4 tipos. Para una mayor comprensión del comportamiento clínico de éstas lesiones es necesario entender los mecanismos biológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de estas, es por esto que el objetivo de este estudio es describir y comparar la expresión de proteínas, mediante inmunohistoquímica, relacionadas a proliferación celular (ki-67) y apoptosis (p53 y bax)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 10 muestras de Ameloblastoma Sólido (AS) y 10 de TOQQ de entre los años 1998 y 2011, y se sometieron a inmunohistoquímica para ki67, p53 y bax.

RESULTADOS

Todas las muestras presentaron marcación positiva para los 3 anticuerpos. TOQQ y AS mostraron un índice de marcación de 6,45% y 13,98%, respectivamente. P53 presentó un 6,08% en AS y un 7,0% en TOQQ. Bax mostró un 58% para AS y un 64,65% en el caso de TOQQ.

CONCLUSIONES

El índice de expresión inmunohistoquímica para el marcador de proliferación celular ki-67, fue más alto para TOQQ que para AS. Pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de p53 y ni bax entre AS y TOQQ.

INTRODUCCIÓN

La Odontogénesis es un conjunto de complejas interacciones entre el epitelio oral y el ectomesénquima, los cuales culminan con la formación del diente. Después de este proceso, permanecen latentes, indefinidamente, células epiteliales y mesenquimáticas de manera residual en los maxilares que pueden generar tumores odontogénicos. Los tumores odontogénicos constituyen un grupo heterogéneo de lesiones que comprenden Hamartomas, neoplasias benignas y neoplasia malignas con potencial metastásico. Estos derivan de elementos epiteliales, ectomesenquimáticos y/o mesenquimáticos precursores de la pieza dentaria. A pesar que los tumores odontogénicos son poco frecuentes, pueden suponer evidentes desafíos diagnósticos y terapéuticos. Estos tumores son localizados exclusivamente en los huesos maxilares ó en los tejidos blandos (gingiva y mucosa de revestimiento) adyacentes a estos, pudiéndose presentar en cualquier etapa de la vida de un individuo¹.

La clasificación más usada en la actualidad para este tipo de lesiones, se basa en la publicada por la OMS el año 2005 en el libro “Patología y Genética de los Tumores de Cabeza y Cuello” y se basa en el comportamiento biológico de las lesiones (benigno y maligno), así como, en el tipo de tejido odontogénico involucrado: epitelio odontogénico con estroma fibroso maduro sin ectomesenquima odontogénico, epitelio odontogénico con ectomesenquima odontogénico con o sin formación de tejidos duros y mesénquima y/o ectomesénquima con o sin presencia de epitelio odontogénico¹.

En esta clasificación y tipificación histológica para tumores odontogénicos del año 2005, se realizaron cambios substanciales en relación a la Clasificación OMS del año 1992³, en relación a la incorporación de nuevas lesiones, por ejemplo, el Tumor Odontogénico Queratoquístico (TOQQ) y en el énfasis clínico-patológico-terapéutico en subdividir al Ameloblastoma en 4 tipos. Estas modificaciones respecto a la clasificación anterior, han significado cambios importantes en el orden de las frecuencias para este tipo de lesiones, siendo además, estas dos

lesiones, junto a los Odontomas, las más frecuentes en la actualidad para tumores odontogénicos¹.

De acuerdo a esta nueva clasificación, se ha denominado Tumor Odontogénico Queratoquístico al anteriormente considerado Queratoquiste Odontogénico, sin embargo, solo se consideran dentro de este concepto las variedades paraqueratinizadas del Queratoquiste Odontogénico. Las variedades revestidas por un epitelio ortoqueratinizado, denominado por Wright, como Quiste Odontogénico Ortoqueratinizado (QOO), según esta nueva definición, no forman parte del espectro del Tumor Odontogénico Queratoquístico. Lo interesante de esto, es que el QOO presenta un comportamiento clínico distinto al TOQQ, ya que, su potencial infiltrativo local es menor, y se ha descrito una escasa recidiva¹⁶, a diferencia del TOQQ, que presenta un comportamiento biológico agresivo y una relativa alta tasa de recurrencia, asimismo, se puede asociar al Síndrome de Nevos Basos Celulares. Sin embargo, a pesar de las evidencias genéticas, anatomopatológicas y el comportamiento biológico localmente agresivo en relación al TOQQ, algunos investigadores y clínicos están escépticos en la actualidad a aceptar esta lesión como una neoplasia. Este escepticismo puede estar basado en parte a la resistencia al cambio desde un concepto tradicional del carácter no neoplásico de un quiste¹.

Por otro lado, en la clasificación anterior OMS, del año 1992, se reconocían la existencia de 3 variedades clínico-patológicas de Ameloblastomas: Sólido (AS), Uniquístico y Periférico. Posterior a esto, se detectaron diferencias clínicas e imagenológicas entre Ameloblastomas que presentaban exclusivamente el patrón histológico desmoplástico de los otros patrones histológicos comprendidos en los Ameloblastomas Sólidos. Es por esto, que en la clasificación OMS 2005, se excluye al patrón desmoplástico del espectro de los Ameloblastomas Sólidos, y se considera una variedad distinta, denominándola Ameloblastoma Desmoplástico, por lo que en la actualidad se consideran 4 tipos clínico-patológicos de Ameloblastomas. El AS se considera un neoplasia benigna, pero con un alto potencial de infiltración y localmente agresiva¹.

Este potencial de crecimiento estaría en relación a la expresión de múltiples genes y sus consiguientes proteínas, entre estos ki-67 involucrado en la proliferación celular y p53 en la vía nuclear de la apoptosis, los cuales, han sido previamente descritos estudiados en la oncogénesis y citodiferenciación de tumores y quistes odontogénicos, sin embargo, estudios de la expresión de la proteína bax en la vía intrínseca mitocondrial han sido poco estudiados.

Para una mayor comprensión del comportamiento clínico de estas lesiones es necesario entender los mecanismos biológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de estas, es por esto que el objetivo de este estudio es describir, comparar y analizar la expresión de proteínas, mediante inmunohistoquímica, relacionadas a proliferación celular (ki-67) y apoptosis (p53 y bax) que contribuyan a la comprensión del comportamiento biológico, al pronóstico y, que puedan permitir el desarrollo de nuevos conceptos de manejo clínicos- terapéutico de estos dos tumores odontogénicos.

MARCO TEÓRICO

Los Tumores Odontogénicos constituyen un grupo de enfermedades heterogéneas que incluyen desde proliferaciones de tejido harmartomatoso o no neoplásico, a neoplasias benignas y tumores malignos con potencial metastásico. Los Tumores Odontogénicos son derivados de elementos epiteliales, ectomesenquimáticos y/o mesenquimáticos formadores del aparato dentario. Estos tumores son infrecuentes, algunos incluso son extremadamente raros, pero puede suponer un importante reto diagnóstico y terapéutico.¹ Estos tumores, por lo tanto, se encuentran exclusivamente dentro de los huesos maxilares (intraóseos o situado centralmente) o en tejidos blandos (encía), superpuestos con dientes o en áreas de mucosa alveolar en las zonas desdentadas (extraóseos o localizados periféricamente). Estos tumores pueden ser generados en cualquier etapa de la vida de un individuo¹.

El año 2005¹ la OMS publicó en el libro “Patología y Genética de los Tumores de Cabeza y Cuello”, la última tipificación histológica y clasificación para Tumores Odontogénicos, en la cual se realizaron cambios sustanciales, pero conservando los conceptos embriológicos de la clasificación anterior de la OMS, del año 1992. La clasificación usada en la actualidad está basada primero, en el comportamiento de la lesiones, clasificándolas en benignas, malignas y no neoplásicas. Subdivisiones de las lesiones benignas están basadas en los tipos de tejidos odontogénicos involucrados: epitelio odontogénico con un estroma fibroso maduro, sin ectomesénquima odontogénico; epitelio odontogénico con ectomesénquima odontogénico, con o sin formación de tejido duro; mesénquima y/o ectomesénquima odontogénico con o sin presencia de epitelio odontogénico¹.

CAMBIOS EN LA CLASIFICACIÓN DE LOS AMELOBLASTOMAS

La clasificación actual, OMS 2005, define a los Ameloblastomas como tumores de los huesos maxilares originados a partir de epitelio odontogénico de crecimiento lento, pero localmente invasivo, con una alta tasa de recurrencia si no es removido adecuadamente, pero sin una tendencia a generar metastasis¹.

En la clasificación anterior OMS, del año 1992, se reconocía la existencia de 3 variedades clínico-patológicas de Ameloblastomas: Sólido (AS), Uniquístico y Periférico. Por otro lado, se han descrito patrones histológicos para estas lesiones como: folicular, plexiforme, acantomatoso, desmoplástico, células basales y granular³. Posteriormente, a la clasificación OMS 1992, varios reportes de casos y estudios retrospectivos describieron importantes diferencias clínicas e imagenológicas entre Ameloblastomas que presentaban exclusivamente el patrón histológico desmoplástico de los otros patrones histológicos comprendidos en los Ameloblastomas Sólidos. De tal manera, que la clasificación OMS 2005 para este tipo de lesiones, excluye al patrón desmoplástico del espectro de los Ameloblastomas Sólidos y lo considera una variedad distintiva, denominándolo como Ameloblastoma Desmoplástico¹, por lo que en la actualidad se consideran 4 tipos clínico-patológicos de Ameloblastomas, siendo, los Ameloblastomas Sólidos y los Ameloblastomas Uniquísticos los más frecuentes⁴.

CAMBIOS EN LA CLASIFICACIÓN DEL TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO

En otro cambio relevante, el Queratoquiste Odontogénico (QO), considerado como un quiste epitelial del desarrollo según la tipificación histológica para tumores odontogénicos del año 1992², se reclasificó, según OMS 2005¹, como una neoplasia odontogénica benigna y se recomendó el término Tumor Odontogénico Queratoquístico (TOQQ), que fue definido como un tumor Odontogénico benigno, uni o múltiquístico, que presenta un epitelio característico lineal estratificado escamoso paraqueratinizado y con potencial agresivo local infiltrativo.

Sin embargo, la OMS 2005 solo considera dentro de este concepto las variedades paraqueratinizadas del Queratoquiste Odontogénico. Las variedades revestidas por un epitelio ortoqueratinizado, denominado por Wright⁵, como Quiste Odontogénico Ortoqueratinizado (QOO), según esta nueva definición, no forma parte del espectro del Tumor Odontogénico Queratoquístico. Anteriormente a la clasificación OMS 2005, el conocimiento del comportamiento biológico localmente agresivo y la relativa alta tasa de recurrencia, la actividad mitótica incrementada en el revestimiento epitelial quístico¹, la asociación con el Síndrome Nevo Basocelular (SNBC) y el potencial de brotes epiteliales del estrato basal o quistes satélites de la pared quística⁶ sugiriendo el concepto del QO como una neoplasia quística⁷. El descubrimiento de anormalidades cromosomales⁷⁻⁹ y alteraciones genéticas como la mutación del gen supresor de tumores PCTH, confirman este concepto de neoplasia para el TOQQ.¹⁰ Asimismo, se han publicado casos de Tumores Odontogénicos Queratoquísticos sólidos, lo que eventualmente reforzaría el concepto de la naturaleza neoplásica del TOQQ¹¹.

EPIDEMIOLOGÍA DE AMELOBLASTOMA SÓLIDO y TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO

En la literatura internacional existen en la actualidad varios estudios epidemiológicos para tumores odontogénicos que se basan en la clasificación OMS 2005¹²⁻¹⁹. Según estos estudios, los tumores odontogénicos son lesiones infrecuentes, representando entre el 1,3% al 5,78%¹²⁻¹⁹ de todas las lesiones de la cavidad oral en servicios de anatomía patológica. El Ameloblastoma (considerando los 4 tipos clínicos-patológicos) constituye la primera frecuencia en series de: Brazil (2011)¹⁴, Sri Lanka (2012)¹⁵, India (2011)¹⁹, China (2007)²⁰, Egipto (2010)²² y, en tanto el TOQQ constituye la primera frecuencia en las series de: Brazil (2008 y 2012)^{12 y 17}, China (2009)¹⁶, Mexico (2010)¹⁸ y Libia (2009)²¹.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL AMELOBLASTOMA SÓLIDO

La OMS considera al AS como un tumor Odontogénico epitelial de los huesos maxilares, como una lesión sólida, de crecimiento lento, localmente invasivo, con una alta tasa de recurrencia sino es removido quirúrgicamente de manera adecuada, pero y sin tendencia a dar metástasis¹. Aunque es poco común, el AS se considera dentro de los tumores odontogénicos más frecuentes, dependiendo de la localización geográfica del estudio^{1, 14, 15, 19,20, 22}. En algunas publicaciones se ha observado que se presenta en un amplio rango etario, diagnosticándose principalmente entre la cuarta y quinta década de vida, salvo la variedad uniuística que se diagnostica entre los 20 y 30 años^{13,14,22}. Varkhede et al., observó que el Ameloblastoma es más frecuente en la 3era y 4ta década de vida¹⁹. Mientras que Siriwardena et al. y Costa DO et al., observaron que el AS se presentan principalmente en la 3era década de vida^{12,15}

Autores como Cepeda et al.¹⁸, Ebenezer et al.²³, Varkhede et al.¹⁹, Osterne et al.¹⁴, Siriwardena et al.¹⁵, Servato et al.¹³, Costa DO et al.¹², en estudios de más de 100 pacientes observaron que no hay encontrado una predilección por sexo tanto para el AS como para el TOQQ, sin embargo se han descrito marcadas diferencias geográficas y raciales, para estas lesiones. En relación a la localización anatómica, se presenta casi exclusivamente en mandíbula (80%), principalmente en la región molar, ángulo y rama, excepto en población africana, en quienes, cualquier área de la mandíbula puede estar involucrada, particularmente la sínfisis. Así mismo, se localiza en baja proporción en maxilar, en la región posterior y raramente en cavidades sinusales¹. Tawfik et al., observó que el 94,11% de los Ameloblastomas se ubicaron en mandíbula. De este porcentaje, 35,29% se ubicaron en zona molar, 29,41% en ángulo y 14,7%²². Servato et al, estudió 431 casos en niños y adolescentes de Brazil, observando que el 74,6% de los Ameloblastomas se ubica en mandíbula, principalmente en la zona de molar y rama (61,9%)¹³.

Los AS de volumen reducido pueden ser eventualmente asintomáticos, sin embargo, las lesiones de gran volumen pueden provocan expansión y abombamiento de las corticales óseas de los huesos maxilares, y en el caso de la

zona maxilar posterior obliterar el seno maxilar y con posterioridad, extenderse a nivel intracraneal. Por otro lado el dolor y la parestesia son síntomas raros¹.

Dientes incluidos pueden estar asociadas con el Ameloblastoma Sólido, en tanto, que la reabsorción de las raíces de piezas adyacentes es común. La naturaleza agresiva de los ameloblastomas intraóseos ha sido atribuida a sus características celulares y a la naturaleza biológica de los huesos maxilares, lo que permite la propagación rápida y clínicamente indetectable en las etapas primarias del tumor¹.

CARACTERÍSTICA CLÍNICAS DEL TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO

El TOQQ se clasifica en la actualidad según OMS 2005¹, como un tumor odontogénico epitelial benigno. Esta nueva clasificación fue basada en su comportamiento clínico, el alto porcentaje de recurrencia, su asociación con el SNBC, sus características histológicas y el descubrimiento de anormalidades genéticas¹. El TOQQ comprende entre el 13%²³ al 38,9%¹⁸ de todos los tumores odontogénicos, describiéndose diferencias según la localización geográfica del estudio^{12, 16, 17, 18 y 21}. En los estudios de Avelar et al.¹⁷, El-Gehani et al.²¹ y Luo et al.¹⁶, el TOQQ es el tumor odontogénico más frecuente, con el 30%, 35,1% y 38,7% respectivamente, seguido por el Ameloblastoma y el Odontoma. En tanto en México, con el 38,9%, también es el tumor odontogénico más frecuente, seguido por el Odontoma y el Ameloblastoma respectivamente¹⁸.

La mayoría de los casos se presentan intraóseos, sin embargo, se han descrito casos de TOQQ periféricos. Las lesiones intraóseas en la mayoría de los casos son asintomáticas y son detectadas como hallazgos radiográficos, con menor frecuencia se pueden presentar con aumento de volumen por expansión de las corticales óseas y provocar desplazamiento de las piezas dentarias vecinas. Asimismo, pueden exteriorizarse e infectarse provocando una intensa respuesta inflamatoria y dolor²⁴. En estudios epidemiológicos no se han observado diferencias según sexo^{12,13,14,15,18,19,23}. El TOQQ, se presenta frecuentemente entre la 3era y 4ta década de vida^{17,20, 23}, existiendo variaciones como la observada por Costa DO, siendo su mayor frecuencia entre la 5ta y 6ta década de vida¹². Estos estudio no mencionan si descartaron lesiones asociadas al SNBC, sin embargo, Luo et al., en el estudio de 1309 casos de TO destaca que de los 462 que estudió, 45 fueron asociados al síndrome, obteniendo una mayor frecuencia en la 3era década de vida¹⁶.

Boffano et al. el año 2010 y González-Alva et al. en el 2008, estudiaron 261 y 183 casos de TOQQ, respectivamente. Describieron un rango etario de 7-87 años y 6-

78 años, con un peak entre la cuarta (promedio 43,34 años) y tercera (promedio 32,8 años) década de vida. La relación hombre: mujer fue de 2:1 y 1,05:1. El sitio anatómico más frecuentemente comprometido fue el mandibular con un 73,2% y 70,5%^{26,27}. Según Boffano et al., un 52,1% de estos se presentaron en el región molar, ángulo y rama mandibular y según González-Alva et al., donde un 41% en el área molar. La recurrencia post-quirúrgica se presentó en el 11,9% y 13,1% de todos los pacientes²⁶. Según González-Alva et al., el de las recurrencias 66,6% fueron mujeres y sólo el 33,3% hombres. El rango de recurrencia se presentó entre 1 a 23 años posterior cirugía. Este último estudio determinó una asociación con el SNBC en el 6% de los casos, todas lesiones múltiples, en tanto, el 21,8% de estas lesiones se encontraron en relación a una pieza incluida²⁷.

El TOQQ se puede asociar al SNBC, el cual fue descrito por primera vez por Gorlin y Goltz en 1960²⁸ el cual es un desorden autosómico dominante con penetración completa y expresividad variable, causado por la mutación de un gen supresor de tumores (PCTH), mapeado en el cromosoma 9q22.3-q3²⁸. En ocasiones puede no presentarse historia familiar por lo que el síndrome podría ser esporádico y generarse por mutación espontánea²⁹.

Clínicamente se caracteriza por la asociación de una serie de manifestaciones, destacando como las más habituales TOQQ múltiples y carcinomas baso celulares cutáneos y otras menos frecuentes: alteraciones cardíacas (persistencia del ducto arteriovenoso), prominencia frontal y parietal, hipertelorismo, bradimetarcapalismo del 4º y 5º dedo, costillas bífidas, quistes dermoides, hidrocefalia, calcificación de la hoz del cerebro, meduloblastomas, etc³⁰. Aunque se ha informado de más de 100 anomalías en el SNBC, el desarrollo de TOQQ múltiples se considera una de las características más importantes y que constituye el primer signo de este síndrome. La incidencia de TOQQ en el SNBC varía entre el 75% al 90%.³¹. Los criterios diagnósticos mayores y menores para el diagnóstico clínico del SNBC han sido establecidos por Evans et al. (1993)³² y Kimonis (1997)³³. Asimismo, se ha descrito transformación carcinomatosa para el TOQQ³⁴.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL AMELOBLASTOMA SÓLIDO

El AS presenta características bastante clásicas, basadas en la predominancia de 2 poblaciones celulares. La primera población corresponde a células basales que presentan a menudo una distribución en empalizada, con células que remedan a los ameloblastos (o más estrictamente los pre-ameloblastos), lo que le da el nombre a este tumor. Estas células muestran polaridad reversa, es decir, el núcleo se ubica en posición distante u opuesta a la lámina basal, lo que se observa en los ameloblastos previo al comienzo de la secreción de matriz del esmalte. Sin embargo, la presencia de cualquier proteína tal (de la matriz del esmalte), es incompatible con el diagnóstico de ameloblastoma^{1, 24}.

La segunda población característica es un epitelio pluriestratificado con relativamente pocos contactos intercelulares y un sobresaliente espacio extracelular centralizado, a menudo formado por pequeños quistes (microquistes), y que recuerda al retículo estrellado del órgano del esmalte^{1, 24}. Todas las células epiteliales de los ameloblastomas tienen una apariencia citológica descrita como “suave” (carecen de variación cromática en la tinción nuclear que generalmente indica un fenotipo maligno). Figuras mitóticas son escasa en la mayoría de los ameloblastomas, de acuerdo con su lenta tasa de crecimiento²⁴.

Los componentes epiteliales a menudo están dispuestos en uno o 2 patrones: islas o folículos, aparentemente rodeados por tejido conectivo; o entrelazados en una red “plexiforme”, presentándose el soporte de tejido conectivo aparentemente rodeado por epitelio. Esto 2 patrones son referidos como folicular y plexiforme, respectivamente, pero no hay evidencia que ellos difieran en su historia natural o en la respuesta al tratamiento. De hecho, muchos ameloblastomas muestran ambos patrones en varias proporciones²⁴. A veces, se observa una engrosada membrana basal hialinizada, pero esto no progresa a una formación dentinaria como, por ejemplo, en el caso del Fibroma Odontogénico Ameloblástico²⁴. Como los ameloblastomas se extienden, la mayoría se transforma en quistes por degeneración quística en el tejido conectivo, sobre todo en la variante plexiforme²⁴.

Existen varios subtipos histológicos de AS que han sido descritos. Ellos incluyen acantomatoso, de células granulares, de células basales y ameloblastomas queratopapilares, aunque estos, se presentan usualmente superpuestos en 1 o 2 patrones principales²⁴.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO

El TOQQ está formado por un epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado formando por una delgada capa con un espesor de 5-8 células. El estrato basal, a menudo en empalizada, presenta células columnares o cuboidales. El núcleo de las células basales puede orientarse lejos de la membrana basal y a menudo es intensamente basófilo. Otra característica importante distintiva es la paraqueratinización en la superficie luminal del epitelio, la cual, a menudo presenta una superficie corrugada^{1,24}. En presencia de una intensa inflamación, esta lesión pierde sus características celulares y arquitecturales morfológicas¹. Figuras mitóticas, inusuales para los Quistes Odontogénicos (QO) y de hecho para la mayoría de los TO benignos, pueden ser frecuentes así como suprabasales. En tejido conectivo epitelial es a menudo plano y a veces se encuentra separado de la membrana basal, pero en algunos casos puede mostrar una incipiente patrón, ocasionalmente asociados con múltiples restos epiteliales odontogénicos o quistes satélites en la pared. Algunos de estos factores pueden contribuir a la recurrencia en una parte de los casos²⁴.

PROLIFERACIÓN CELULAR EPITELIAL Y FACTORES RELACIONADOS A APOPTOSIS.

El crecimiento, diferenciación y proliferación celular son fenómenos finamente regulados por mecanismos moleculares que actúan a diferentes niveles del ciclo celular. El pronóstico de los tumores con frecuencia se relaciona con su capacidad de proliferación. La tasa de crecimiento de los tejidos está determinada por la actividad proliferativa y la muerte celular programada (apoptosis)³⁵. Los métodos inmunohistoquímicos usados en la evaluación de proliferación celular y apoptosis presentan ventajas particulares sobre otras técnicas debido a la mantención de la arquitectura celular y tisular, la relativa simplicidad de la técnica y la rapidez en los resultados⁷⁻⁹.

La proteína ki-67 o MIB-1 es un antígeno que se determina mediante el anticuerpo monoclonal desarrollado por Gerdes y colaboradores³⁵. Ki-67 es una proteína nuclear no histónica que se expresa en todas las fases del ciclo celular excepto en G_0 ⁷⁻⁹, por lo tanto, el anticuerpo monoclonal ki-67 permite la detección inmunohistoquímica de células que se encuentran en alguna etapa del ciclo celular y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido³⁶. La expresión de ki-67 ha sido descrita como un óptimo marcador de proliferación celular en lesiones premalignas y malignas³⁶. El análisis de la expresión de ki-67 se usa para determinar el índice de proliferación de las células en tejido normal y en muestras de tumor³⁷. Estudios previos han demostrado que los altos índices de ki-67 observados en carcinomas bucales de células escamosas estaban correlacionados con la gravedad de la enfermedad y con un peor pronóstico³⁸. Estudios anteriores al año 2005, han estudiado la expresión de ki-67 en el epitelio de Queratoquistes Odontogénicos respecto a otros quistes Odontogénicos^{39,40}. Estudios comparativos entre Queratoquistes Odontogénicos y Quistes Dentígeros han demostrado un incrementado potencial proliferativo del revestimiento epitelial del Queratoquiste Odontogénico comparable al del Ameloblastoma^{41,42}. Thosaporn et al, observó un índice de proliferación similar al comparar la expresión del marcador de proliferación celular IPO-38, localizándose

principalmente en la capa celular suprabasal en el caso de Quistes Odontogénicos, mientras que en el caso del Ameloblastoma se encontró en la porción periférica en particular, en los tipos foliculares y plexiformes⁴³.

La muerte celular programada y su manifestación morfológica, apoptosis, es un mecanismo de auto-destrucción que está dado esencialmente por una variedad de eventos biológicos. La excesiva o insuficiente apoptosis contribuye a variadas enfermedades relacionadas a isquemia, neurodegeneración, autoinmunidad, infecciones virales y está involucrada en el crecimiento y regresión de tumores. La ausencia de apoptosis y la inducción de mecanismos antiapoptóticos permiten que las células tumorales sobrevivan y proliferen incontroladamente. Existen múltiples vías celulares de gatillo de la apoptosis, dos de las cuales, la vía intrínseca y extrínseca son las más estudiadas y caracterizadas. La Vía intrínseca mitocondrial es el resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y liberación de moléculas pro-apoptóticas al citoplasma⁴⁴. La vía mitocondrial se ejecuta en respuesta a intromisiones externas y a daño en el DNA.

Las distintas vías de respuesta convergen en la mitocondria, a menudo a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia de bcl-2. La familia de bcl-2 se divide en dos grupos de proteínas, proapoptóticas como bax, bad y bak y antiapoptóticas como bcl-2, bcl-xL, mcl-1 y A1, según su estructura química^{45,46}. Tanto las proteínas proapoptóticas como las antiapoptóticas forman heterodímeros en los que se produce la inhibición de la actividad del otro respectivamente. Esta dimerización se ve influenciada por la fosforilación de los residuos terminales de aminoácidos de los miembros proapoptóticos, bax, bak y bik. Así pues, la apoptosis está muy relacionada con la fosforilación de las proteínas de la familia bcl-2⁴⁶. El protooncogén bcl-2 bloquea una vía común de apoptosis, impidiendo que el ADN dañado actúe como una señal de activación de muerte celular programada o mediante el bloqueo de los propios productos de los genes implicados en la muerte celular programada. Por lo tanto, su acción es prevenir la muerte prematura de las células mitóticas y prolongar la supervivencia celular para favorecer la aparición de más mutaciones⁴⁷.

La proteína bcl-2 no transforma a las células por sí misma, pero las hace susceptibles de ser transformadas por otros oncogenes como myc. Se ha descrito una sobreexpresión de bcl-2 y bax en variados tumores sólidos incluyendo cánceres orales⁴⁸. Diversas investigaciones han estudiado la inmunoreactividad de la proteína bcl-2 en Gérmenes Dentarios, Ameloblastomas, Queratoquistes Odontogénicos y Quistes Dentígeros, sin embargo, estudios para identificar la expresión de la proteína pro-apoptótica bax en tumores y quistes odontogénicos son escasos⁴⁹⁻⁵¹.

Rangiani et al., en el 2009 estudió la expresión de bax y bcl-2 en TOQQ y Quistes Odontogénicos Ortoqueratinizados, observando un 100% de marcación de bax y un 96,78%, respectivamente⁵¹. Recientemente Soluk et al., han comparado la expresión de bax, bcl-2 y ki67 en TOQQ, Quiste Radicular y Ameloblastomas, observando una alta expresión en el epitelio para bax en Quistes Radiculares (80% aprox.), pero no se observaron diferencias significativas entre TOQQ (60%) y Ameloblastomas (43% aprox.), pero ambos mostraron inmunoreactividad para bax. En el caso de ki67, se observó una expresión significativamente mayor en TOQQ (2,2% aprox.) que en Ameloblastomas (1,75% aprox.) y Quistes Radiculares (1% aprox.), y a su vez, los Ameloblastomas mostraron una expresión significativamente mayor que los Quistes Radiculares. Células inmunopositivas fueron encontradas en capas suprabasales del epitelio de TOQQ, especialmente destacable en el núcleo de células grandes, mientras que en Ameloblastomas la expresión se observó principalmente en capas periféricas de las islas tumorales. La alta expresión de estas proteínas en el TOQQ se correlaciona con su comportamiento clínico, explicando su agresividad local y alta recurrencia⁵². Los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de bcl-2 se encuentran en la superficie de la mitocondria donde regulan la salida del citocromo c por un mecanismo todavía debatido. Si los miembros proapoptóticos se imponen, una gran cantidad de moléculas son liberadas desde la mitocondria. La principal de estas moléculas liberadas es el citocromo c, que se asocia con Apaf-1 y después con la procaspasa-9 para formar el complejo multimérico denominado apoptosoma⁵¹.

APOPTOSIS MEDIADA POR DAÑO EN EL ADN

El mecanismo molecular que está prioritariamente implicado en el control del ciclo celular en células que han sufrido una agresión en su genoma es el sistema p53, constituido por el gen p53, localizado en el brazo corto del cromosoma 17, y su producto, la proteína p53. Fueron descritas por primera vez por Lane y Crawford en 1979. p53 es un supresor de tumor que reduce la proliferación celular y la replicación del DNA, ejerce un control sobre el ciclo celular bloqueando la progresión desde la fase G₁ a la fase S. Por lo tanto, la prolongación de la vida de la proteína p53 tiene como resultado una pérdida de control del ciclo celular⁵¹. En células normales el tipo normal de la proteína p53, debido a su corta vida, es normalmente indetectable por inmunohistoquímica, de forma que la detección inmunohistoquímica de la proteína p53 indica alguna alteración en p53, ya sea debidas a mutaciones en el gen, infecciones virales, etc. Entre las proteínas cuya producción esta estimulada por p53, hay varios miembros pro-apoptóticos de la familia bcl-2, especialmente bax y bak, así como apaf-1. Estas proteínas activan las caspasas y producen apoptosis⁵¹⁻⁵³.

El gen supresor tumoral p53 es uno de los que mutan de forma más habitual en neoplasias malignas en humanos. Figueroa et al. describe positividad para p53 en 5 de 12 casos (42%) de TOQQ solitarios y en uno de 7 casos (14%) para TOQQ asociado a SNBC⁵⁴. La actividad incrementada de p53 en el epitelio del QO respecto a otros quistes odontogénicos podría explicar la alta tasa de recurrencia y el elevado potencial intrínseco de su crecimiento^{39,54}. Estudios posteriores al año 2005, con la actual denominación, basados en la sobreexpresión de este marcador, apoyarían el concepto de neoplasia para el TOQQ^{55,56}.

Actualmente, existe información controvertida respecto a p53 y los ameloblastomas, Autores como Gomes, indican que la alteración de la proteína p53 no juega un rol importante en la patogénesis del Ameloblastoma e incluso han visto que la metilación de p53 no es un evento común, y que la sobre expresión de MDM2 puede regular su función sin necesidad de una regulación epigenética o

mutación⁵⁷. Por otro lado, en un reciente estudio Ramchandra et al., se observó un alto índice de expresión de p53 y ki67 en Ameloblastomas en comparación con TOQQ, asociándose esto a un comportamiento biológico más agresivo⁵⁸⁻⁶³.

Aunque diversos estudios han detectado alteraciones genéticas y epigenéticas en tumores odontogénicos epiteliales, especialmente en Tumor Odontogénico Queratoquístico y Ameloblastoma, los mecanismos detallados de oncogénesis, citodiferenciación y progresión tumoral parecen inciertos. La detección e identificación de la expresión proteica de ciertos marcadores, relacionados a proliferación celular y apoptosis, tales como: ki-67, p53 y bax, mediante inmunohistoquímica, podrían contribuir al pronóstico y presumir el comportamiento clínico- biológico de éstas para su aplicación con fines terapéuticos. A pesar de que tanto el TOQQ y el AS son lesiones reconocidas por ser localmente agresivas y eventualmente ser de riesgo vital para el paciente, el AS presenta mayor capacidad de invasión de estructuras vecinas como base de cráneo. Por lo que el comportamiento localmente agresivo de estos dos tumores odontogénicos epiteliales podría ser explicado por la expresión de estas proteínas, considerando las diferencias morfológicas de ambos.

HIPÓTESIS

Existe una mayor expresión en los índices de marcación para las proteínas ki-67, p53 y bax en el epitelio de Ameloblastomas Sólidos en relación al epitelio de Tumores Odontogénicos Queratoquísticos solitarios.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el índice de marcación de ki-67, p53 y bax en el epitelio de Ameloblastomas Sólidos y Tumores Odontogénicos Queratoquísticos solitarios registrados en el Instituto de Referencia de Patología Oral (IREPO) entre los años 2000-2011.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la expresión de las proteínas ki-67, p53 y bax mediante inmunohistoquímica en el epitelio de TOQQ solitarios.
2. Cuantificar la expresión de las proteínas ki-67, p53 y bax mediante inmunohistoquímica en el epitelio de AS.
3. Comparar la expresión de las proteínas ki-67, p53 y bax en el epitelio de TOQQS y AS.

MATERIALES Y MÉTODO

1. TIPO DE ESTUDIO REALIZADO

Estudio Observacional Descriptivo Transversal

2. MUESTRA

2.1 UNIVERSO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

De un universo de 356 casos del registro de biopsias del Instituto de Referencia de Patología Oral (IREPO), que corresponde a diagnósticos histopatológicos de Tumor Odontogénico Queratoquístico de tipo solitario y otro universo de 145 biopsias de Ameloblastomas, se seleccionaron 27 muestras (14 muestras de TOQQ y 13 muestras de AS) según criterios de inclusión y exclusión del estudio. Estas muestras corresponden a los envíos de biopsias para solicitud de informe anatomopatológico con fines diagnósticos, principalmente de hospitales públicos y servicios de cirugía máxilofacial universitarios de la Región Metropolitana de Santiago de Chile entre los años 1998 y 2011. El muestreo correspondió al tipo no probabilístico por conveniencia.

2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras que correspondan a los siguientes diagnósticos histopatológicos definitivos: Tumor Odontogénico Queratoquístico (TOQQ) y Ameloblastoma Sólido (AS)

2.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Muestras que dispongan información clínica incompleta en relación a edad, sexo y localización anatómica.
2. Casos de TOQQ asociados a síndrome.
3. Muestras de TOQQ que correspondan a recurrencias y/o recidivas post-tratamiento quirúrgico, según la revisión de las fichas de las biopsias de los registros del IREPO.

4. Muestras que dispongan de escaso epitelio y/o presenten inflamación moderada a severa según Clark et al.⁶⁴ y/o epitelio hiperplásico, para los TOQQs.
5. Muestras que presenten escaso epitelio en los tacos de parafina, es decir, que al ser reevaluados presenten menos de 10 campos para cortar.

2.4 VARIABLES DEL ESTUDIO

Definiciones operacionales:

- I. Sexo: El sexo del paciente será determinado por el registro de la ficha de biopsia de cada individuo.
- II. Localización anatómica: Para la distribución de la localización anatómica de las lesiones en los huesos maxilares se considerará las siguientes áreas: (A) anterior, (B) premolares, (C) molares, esta última, en el caso de la mandíbula, comprenderá además la rama ascendente y ángulo mandibular y (>) para dos o más áreas.
- III. Edad: La edad se expresara en años y se distribuirá por décadas.
- IV. Tipo de lesión: Estará dada por los criterios diagnósticos histopatológicos para Tumor Odontogénico Queratoquístico y Ameloblastomas Sólidos basados según la Clasificación para Tumores Odontogénicos de la Organización Mundial de la Salud del año 2005.^{65,66}

3. PROCEDIMIENTOS

3.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se obtuvieron los bloques de parafina correspondientes a los casos registrados en la base de datos digital del IREPO entre los años 2000-2011 para lesiones que presenten el diagnóstico histopatológico de Tumor Odontogénico Queratoquístico y Ameloblastoma Sólido según criterios de la clasificación de la OMS del año 2005^{65,66}; se realizaron los procedimientos de laboratorio correspondientes a la obtención de nuevas laminillas para tinción corriente hematoxilina-eosina.

Posteriormente, se reevaluaron según los criterios histopatológicos acordados (OMS 2005⁶⁵) a microscopía óptica a distintos aumentos (objetivos: 10x, 40x y 100x). Estas observaciones microscópicas se realizaron en forma ciega, por un Patólogo Bucal calibrado para los criterios OMS, en un microscopio Olympus BX41. De las 27 muestras pre-seleccionadas se seleccionaron 20 muestras (10 TOQQ y 10 AS).

3.2 RECOPIACIÓN DE DATOS CLÍNICOS

La información clínica (sexo, localización anatómica y edad) fue obtenida a partir de las fichas clínicas de los pacientes registradas en la base de datos digital del IREPO (Microsoft®Access2003). La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa Microsoft Office: Microsoft Excel 2007. Esta información fue corroborada revisando directamente las fichas en papel.

3.3 PROCESAMIENTO

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se seleccionaron 14 bloques de parafina de biopsias de Tumor Odontogénico Queratoquístico solitario y 13 bloques de parafina de Ameloblastoma Sólido. Estas muestras han sido fijadas en formalina al 10% y procesadas para técnica histológica convencional. Se realizaron secciones de 4 µm de espesor en un micrótopo de rotación Leitz-Wezlar, obteniendo 3 cortes de cada muestra, una para cada uno de los anticuerpos utilizados, los que fueron montados en portaobjetos silanizados (3-Aminopropyltriethoxysilane, Polysciences, Inc., U.S.A.).

I. Las placas fueron desparafinadas e hidratadas mediante una batería de desparafinación consistente en xilol, alcohol de 99°, alcohol de 95°, agua corriente y agua destilada.

II. Lavados con PBS (Buffer Fosfato salino) PH 7.4 y se recuperaron los sitios antigénicos en buffer citrato a PH 7,4 con calor según protocolo del anticuerpo:

vaporera, precalentados por 10 minutos, llevados por 20 minutos al vapor y posteriormente enfriados a temperatura ambiente.

III. A continuación se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% con metanol por 20 minutos. Luego 3 lavados con buffer de citrato PH 7,4.

IV. Posteriormente, se realizó bloqueo de antígenos inespecíficos con suero según protocolo del sistema de inmuno detección (BSB 0203, Bio SB, Santa Barbara, California) por 20 minutos. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: mouse anti ki-67 monoclonal antibody (BSB 5711, Bio SB, Santa Barbara, California), Mouse anti p-53 monoclonal antibody (BSB 5842, Bio SB, Santa Barbara, California) y Mouse anti-bax monoclonal antibody (BSB 6081, Bio SB, Santa Barbara, California).

ANTIC	TIPO	CLON	ISOTIPO	CATALO G NO.	TIPO DE ANTIC	DILUSIÓN	LOCALIZAC
ki67	Conejo/ Monoclonal	SP6	IgG	BSB 5711/5712	Concentrado	1:50	Nuclear
bax	Ratón/ Monoclonal	SPM336	IgG1/K	BSB 6081	Concentrado	1:50	Citoplasma y Membrana celular
p53	Ratón/ Monoclonal	DO7	IgG2b/K	BSB 5842/5845	Concentrado	1:400	Nuclear

V. Para la inmunodetección se utilizó el método Avidina-Biotina-Peroxidasa y revelado con DAB (BSB 0203, Bio SB, Santa Barbara, California).

CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS

Se emplearon las siguientes muestras para los controles positivos:

- ki-67 y p53: Carcinoma espino celular primario de mucosa ora bucal humano.
- Bax: Amígdala humana.

Para los controles negativos se omitió el anticuerpo primario en las muestras empleadas.

3.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS EN ESTUDIO

La presencia y cuantificación de células marcadas positivamente a la inmunodetección se determinó contabilizando visualmente el número de células positivas (color marrón) en relación al total de células del campo con objetivo 40x a microscopía óptica convencional (Olympus BX41), esto en 10 campos por caso estudiado. Este método semi-cuantitativo se basó en el empleado por Dong et al⁶⁷. Se evaluaron exclusivamente los epitelios odontogénicos tanto en TOQQ como en AS. Se obtuvo un índice de marcación (IM) entre el cociente de células marcadas (positivas) y el número total de células (marcadas y no marcadas) por cada campo. El promedio del IM de cada muestra se calculó a partir de 10 campos estudiados y se expresó en términos de porcentaje (%). Este recuento se realizó en forma ciega por un observador. Para cuantificar el grado de concordancia interna se realizó el Test estadístico de Kappa recomendados por Landis y Koch⁶⁸. Se tomó una microfotografía por cada campo estudiado y se procesaron con el software Micrometrics SE Premium. La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa Microsoft Office: Microsoft Excel 2007.

3.5 ANALISIS DE LA INFORMACIÓN

Se realizó un análisis exploratorio mediante estadística descriptiva para caracterizar las variables demográficas de la muestra. La estadística descriptiva y analítica se realizó usando el programa STATA 11 SE.

Se utilizó la prueba de Mann Whitney-Wilcoxon para determinar si existe asociación entre las distintas variables categóricas. Se comparó frecuencia de expresión de marcación existente entre los grupos TOQQ y AS para células marcadas con inmunohistoquímica en los campos observados.

Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si la significancia bilateral arrojada en cada test fue menor o igual que 0,05 ($p < 0,05$), con un intervalo de confianza del 95%.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabajo forma parte del proyecto PRI_ODO 11.03 cuyo investigador responsable es el Dr. Enrico Escobar que cuenta con aprobación del Comité Ético Científico y del Comité Institucional de Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, (Anexo 1).

RESULTADOS

Del universo de 356 casos del registro de biopsias del Instituto de Referencia de Patología Oral (IREPO), que corresponde a diagnósticos histopatológicos de Tumor Odontogénico Queratoquístico de tipo solitario y otro universo de 145 biopsias de Ameloblastomas, se seleccionaron 27 muestras (14 muestras de TOQQ y 13 muestras de AS) según criterios de inclusión y exclusión del estudio. Estos casos provienen de los envíos de biopsias para solicitud de informe anatomopatológico con fines diagnósticos, los que son enviados principalmente desde hospitales públicos y servicios de cirugía máxilofacial universitarios de la Región Metropolitana de Santiago de Chile entre los años 1998 y 2011.

A partir de los bloques de parafina correspondientes a estos casos, se obtuvieron cortes histopatológicos los que fueron sometidos a técnicas de inmunohistoquímica, descartándose aquellas lesiones que por desprendimiento del epitelio no permitieron obtener 10 campos a 40X. Esto resultó en 10 muestras de TOQQ y 10 de AS para el estudio inmunohistoquímico.

1. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA

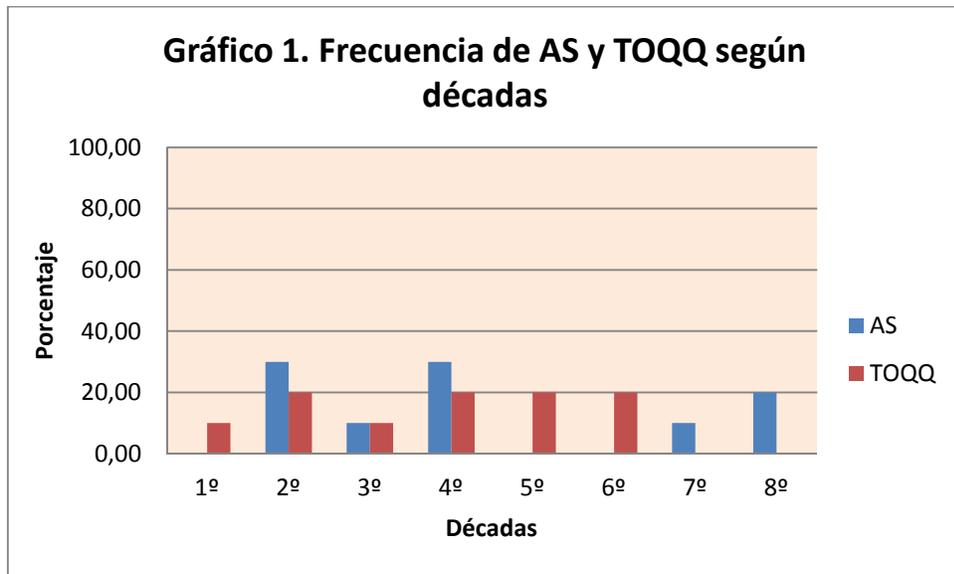
Características demográficas.

La muestra quedó constituida por 6 mujeres y 4 hombres en el caso de AS, y 5 mujeres y 5 hombres en el caso de TOQQ. Ver tabla 1.

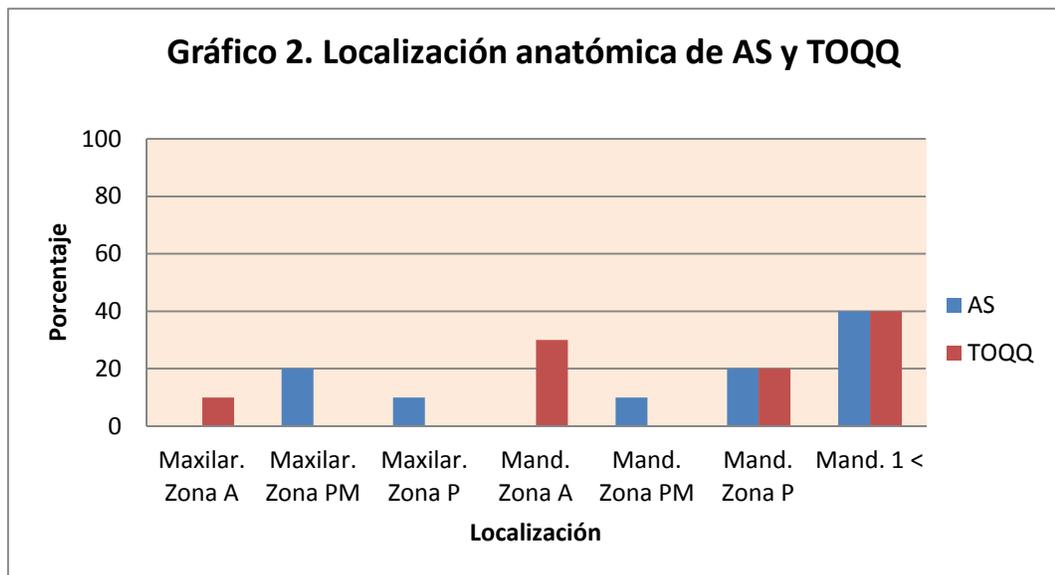
Tabla 1. Relación hombre:mujeres, promedio etario y relación maxilar:mandibular para las lesiones de AS y TOQQ

Lesión	Relación hombre:mujer	Promedio de edad años	Relación maxilar:mandibular
AS	1,5:1	40,30	1:2,3
TOQQ	1:1	33,30	1:3

El rango de edad para AS va entre los 16 y 75 años, encontrándose la mayoría de los pacientes entre la 2da y 4ta década, con un promedio de 40,3 años. En el caso de TOQQ, se presentó de 9 a 67 años, distribuyéndose entre la 1era y 6ta década, con un promedio de 33,3 años. Ver gráfico 1



El AS se localizó principalmente en los siguientes sectores: sector premolar mandibular con un 20%, zona maxilar molar con un 20% y en más de una zona con un 40%. La región más frecuente de localización en el caso de TOQQ, fue el sector antero inferior con un 30% y más de una zona con un 40%, que en la mayor parte de los caso comprendió ángulo y rama. Ver gráfico 2.



Características histopatológicas de AS, TOQQ y controles

Previo al estudio inmunohistoquímico se observó previamente las distintas muestras en estudio más sus respectivos controles positivo y negativo, con tinción hematoxilina-eosina, Figura 1. En todas estas muestras se encontraban zonas sin inflamación o inflamación muy escasa y ausencia de necrosis.

De las 10 lesiones de AS, 2 presentaron un patrón folicular (20%), 6 patrón plexiforme (60%) y 2 folicular-plexiforme (20%).

2. RESULTADOS INMUNO HISTOQUÍMICOS

2.1. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ki-67, y p53 y bax en AMELOBLASTOMAS SÓLIDOS.

Los 10 casos de AS presentaron marcación positiva para los tres anticuerpos en estudio en el epitelio odontogénico neoplásico. Las proteínas ki-67 y p53 se detectaron a nivel nuclear, mientras que la proteína bax se observó en el citoplasma de las células en estudio. En los AS se observó marcación de Ki-67 predominantemente en las células periféricas, en tanto, las células que semejan el retículo estrellado presentaron menor marcación. Figura 2. El promedio de marcación del total de células epiteliales evaluadas en 10 campos por caso, fue de un 6,45% para ki-67, 6,08% para p53 y 58% para bax (Tabla 2).

Tabla 2. Índice de marcación de cada una de las lesiones de AS y promedios finales para ki-67, p53 y bax.

Casos AS	ki-67 %	p53 %	bax %
1	4,8	9,4	81,8
2	1,9	0,5	46,6
3	4,6	2,1	50,7
4	20,5	9,4	62,5
5	2,7	3,7	72,3
6	3,8	8,2	61,4
7	9,1	3,9	78,7
8	7,5	19	64,4
9	6,9	0,1	50,3
10	2,3	4	13,2
Promedio	6,45	6,08	58

2.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ki-67, y 53 y bax EN TUMORES ODONTOGÉNICOS QUERATOQUÍSTICOS SOLITARIOS.

Los 10 casos de TOQQ presentaron marcación positiva para todos los anticuerpos en el epitelio odontogénico en los distintos campos evaluados. De estos anticuerpos, Ki-67 y p53 presentaron distribución nuclear y bax localización citoplasmática. En TOQQ la proteína Ki-67 fue observada principalmente en estratos suprabasales del epitelio. Figura 3. El promedio de células epiteliales positivas fue de un 13,98% para ki-67, 7% para p53 y 64,65% para bax, Tabla 3.

Tabla 3. Índice de marcación de cada una de las lesiones de TOQQ y promedios finales para ki-67, p53 y bax.

Casos TOQQ	ki67 %	p53 %	Bax %
1	4,7	0,5	81,6
2	11,3	4,5	21,1
3	13,9	1	56,8
4	15,8	4,1	29,8
5	29,2	19,5	98,2
6	9,2	0,3	15,4
7	6,6	2	94,2
8	13,2	11,9	94,1
9	21,6	28,8	94,8
10	13,8	1,3	60,2
Promedio	13,98	7	64,65

3. 1. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS KI-67, P53 Y BAX EN EL EPITELIO DE AS Y TOQQ.

I. Comparación de la expresión de ki-67 entre AS y TOQQ

Al aplicar el test de Mann-Whitney (Wilcoxon) se obtiene que para el caso de ki-67, la expresión de los anticuerpos mostró diferencias significativas entre las lesiones de AS y TOQQ, siendo mayor para esta última, con un 13,98%. Ver gráfico 3 y figura 4.

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

LESIÓN	OBS	SUMA DE RANGOS	ESPERADA
AS	10	70	105
TOQQ	10	140	105
COMBINADAS	20	210	210

$$\text{Prob} > |z| = 0.0080$$

(Se rechaza H_0)

II. Comparación de la expresión de p53 entre AS y TOQQ

Al comparar la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en AS y TOQQ se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre estas lesiones. Ver gráfico 3 y figura 5.

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

LESIÓN	OBS	SUMA DE RANGOS	ESPERADA
AS	10	108	105
TOQQ	10	102	105
COMBINADAS	20	210	210

$$\text{Prob} > |z| = 0.8191$$

(No se rechaza H_0)

III. Comparación de la expresión de bax entre AS y TOQQ.

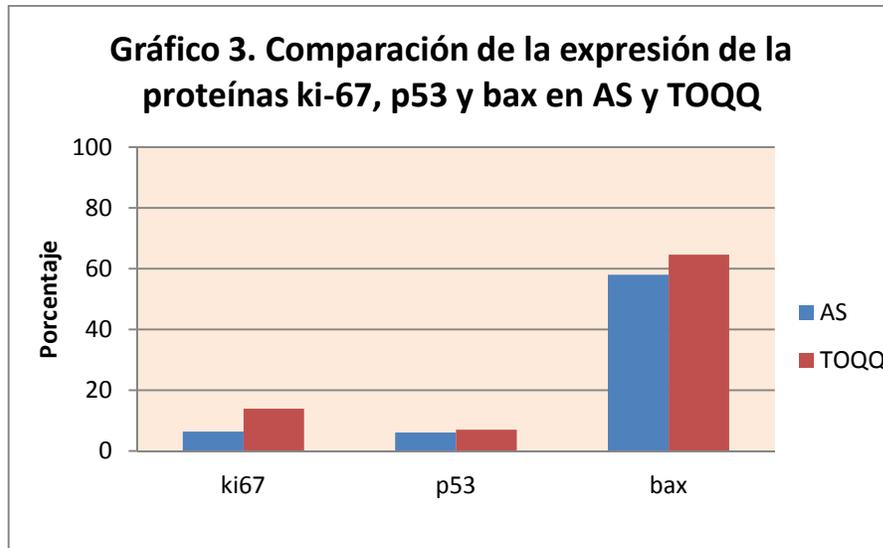
Al comparar la expresión inmunohistoquímica de la proteína bax en AS y TOQQ no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estas lesiones. Ver gráfico 3 y figura 6.

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

LESIÓN	OBS	SUMA DE RANGOS	ESPERADA
AS	10	94,5	105
TOQQ	10	115,5	105
COMBINADAS	20	210	210

Prob > |z| = 0.4270

(No se rechaza Ho)



DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con el objetivo principal de comparar el índice de marcación de ki-67, p53 y bax en el epitelio de Ameloblastomas Sólidos y Tumores Odontogénicos Queratoquísticos solitarios registrados en el Instituto de Referencia de Patología Oral (IREPO) entre los años 2000-2011.

En los casos analizados en relación a la distribución por sexo, el AS se presentó con una relación hombre:mujer de 1,5:1 y en el caso del TOQQ una proporción 1:1. Esta relación es similar a la encontrada por autores como Ebenezer et al.²³, Varkhede et al.¹⁹, Osterne et al.¹⁴. Quienes describen relaciones de 1:1 en AS y 1,6:1 en TOQQ; 1,3:1 en AB y 2:1 en TOQQ; 1,28:1 en AB y 1,56:1 en TOQQ, respectivamente.

El rango etario del AS, comprendió entre los 16 y 75 años, encontrándose la mayoría de los pacientes entre la 2^{da} y 4^{ta} década de vida, con un promedio etario de 40 años. El rango de edad para TOQQ se presentó entre los 9 y 67 años, con una amplia distribución que va desde la 1^{ra} a la 6^{ta} década, con un promedio de 33 años. Servato et al., describió un rango etario mayor que va desde 11 a 83 años para AS y desde 10 a 87 años para TOQQ, sin embargo, los promedios etarios son muy similares siendo de 36 y 34 años respectivamente, observándose con mayor frecuencia en la 2^{da} década de vida en AS y TOQQ¹³. Siriwardena et al., obtuvo similares resultados, determinando un promedio etario para AS de 34,2 y para TOQQ de 31,3; siendo de mayor prevalencia la 3era para ambas lesiones¹⁵.

En relación a la localización anatómica, el AS se distribuyó principalmente en maxilar y mandíbula en una relación 1:2,3 y el TOQQ en una relación de 1:3. Para el resultados son distintos a los obtenidos por Osterne et al., que obtuvo una relación de 1:10,7 y 1:3,6 respectivamente¹⁴, aunque este autor consideró las variantes de Ameloblastoma por separado, a diferencia de Siriwardena et al., quien obtuvo una relación mandibular:maxilar de 12,9: para el AS y 2,9:1 para el TOQQ¹⁵.

En este estudio la proliferación celular epitelial para AS y TOQQ fue evaluado por medio de la detección Inmunohistoquímica de ki-67, el cual es uno de los

marcadores de proliferación más ampliamente usados y confiable, siendo considerado en la actualidad uno de los mejores marcadores específicos para proliferación celular^{42,59}. Sin embargo, otros estudios han usado diferentes marcadores para evaluar índice de proliferación celular como PCNA e IPO-38 en QO y AS⁶¹. Cuando el TOQQ se consideraba un Quiste Odontogénico del Desarrollo (Queratoquiste Odontogénico Paraquetinizado), varios autores habían descrito y comparado la expresión para ki-67 entre esta lesión y otros quistes y tumores odontogénicos^{41,43}. Según la denominación de TOQQ la expresión de ki-67 ha sido estudiada por Amaral et al (2012), Soluk et al(2012), Mendes (2011), Gadball et al(2011), Nadalin et al (2011), en tanto , la expresión de ki-67 en Ameloblastomas Sólidos ha sido estudiada por: Soluk et al(2012), Amaral et al (2012), Florescu et al (2012), Gadball (2011), Bologna-Molina (2008), Migaldi (2008) y Meer et al (2003). Sin embargo, la expresión conjunta de la proteína Ki-67 para TOQQ y AS ha sido poco estudiada^{39,50,52,58,56,59}.

En el presente trabajo, en el caso del TOQQ, el índice de marcación de ki-67 fue significativamente alto en comparación a AS, siendo de un 13,98% y 6,45% respectivamente. Este mayor índice de proliferación del TOQQ respecto al AS también es descrito por Amaral et al., en un estudio realizado con 11 muestras de Ameloblastomas Sólidos y 11 muestras de TOQQ recolectadas en dos Servicios de Patología Oral (Pontificia Universidad Católica de Minas Gerais y la Universidad Federal de Minas Gerais), con índices de marcación en TOQQ respecto al AS de 9,8 y 3,4 respectivamente. Además, determinaron que la expresión de ki-67 fue mayor en las células epiteliales periféricas que en las centrales en los AS con un índice de proliferación de 3,8 y 3,0 respectivamente. Soluk et al., en un estudio con 20 muestras de AS y 20 muestras de TOQQ, realizado en la Universidad de Estambul, también describe un mayor índice de proliferación para ki-67 del TOQQ respecto al AS, en el cual se observó una mayor expresión de ki-67 en los estratos epiteliales suprabasales del TOQQ⁵⁹.

Sin embargo, los resultados de este estudio difieren de los de Gabdail et et al., cuyo trabajo realizado en el Instituto de Ciencias Médicas de la Universidad, Sawangi (India) incluyó 14 muestras de AS y 32 de TOQQ, obteniendo como

resultados un índice de marcación de ki-67 mayor en AS que en TOQQ, siendo de 14,75% y 12,92% respectivamente⁵⁸.

Mendes et al. con 20 muestras de TOQQ, 2 de estos asociados al Síndrome Nevo Baso Celular, obtenidas de la Universidad Central Medica de Amsterdam, evaluó y comparó la expresión inmunohistoquímica conjunta de ki-67, p53 y cox-2 describiendo marcación positiva para proliferación en 18 casos (80%). Asimismo, Nadalin et al, en Brazil (Universidad de Ribeirao Preto) describió inmunopositividad similar para ki-67 en 16 muestras (94,1%) de un total de 17, especialmente en los estratos suprabasales del epitelio del TOQQ, esto último, es similar a la expresión principalmente suprabasal en este estudio⁵⁶.

Florescu et al, el año 2012 en Rumania, demostró inmunopositividad para ki-67 en 14 muestras (82,3%) de AS de un total de 17, asimismo, no encontró diferencias estadísticamente significativas, entre las células periféricas y centrales en los AS. Bologna-Molina et al. señala un promedio de índice de proliferación para ki-67 de 12,8% en 45 muestras de AS de los registros del Laboratorio de Patología Oral de la Universidad Autónoma de Xochimilco. En dicho estudio, se observó un mayor índice de proliferación entre los AS foliculares. Asimismo, se estudió el índice de proliferación para 120 ameloblastomas (se consideraron 45 muestras de AS y 75 muestras de AU) según recurrencia (10 casos) o no de la lesión (110 casos), con índices de proliferación de 17,2% y 14,2% respectivamente⁶². En nuestro estudio, no se analizó la variables recurrencia o no recurrencia para AS y TOQQ debido a que no existe un seguimiento clínico prospectivo de todas las lesiones consideradas en este estudio.

En el caso de p53, en nuestro estudio AS y TOQQ no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el índice de marcación, presentando un 7% y 6,08%, observándose una expresión más notoria en las células periféricas de los AS y suprabasal del epitelio del TOQQ. La expresión de la proteína p53 puede sugerir un comportamiento local invasivo y hablar del rol en la patogénesis y desarrollo de estas 2 lesiones influyendo en la terapéutica con que deben ser abordadas y aunque la expresión de p53 no necesariamente implica una asociación con neoplasias malignas puede implicar un comportamiento más

agresivo en lesiones benignas⁶². Siendo la sobreexpresión de p53 un factor que promueve la proliferación celular en lesiones odontogénicas⁵⁸.

Gabdail et al, señala que la mutación del gen p53 en Ameloblastomas puede ser esporádica y acumulativa. Este autor ha reportado que la sobreexpresión de la proteína p53 en Ameloblastomas tiene efectos en la actividad celular proliferativa y puede ser utilizada como un importante marcador de pronóstico celular. En un estudio de este mismo autor, del 2012, para el caso de p53 se observaron diferencias significativas en la expresión en AS (14 muestras) y TOQQ (32 muestras), presentando un índice de marcación de 22,06% y 13,56%, respectivamente, siguiendo el mismo patrón de mayor marcación para el AS, como en el caso de ki-67. Esta marcación positiva de p53 fue más notoria en los estratos suprabasales del TOQQ y en los AS, en las células periféricas en comparación a las suprabasales (semejantes a retículo estrellado). El 100% de las muestras para AS fueron positivas para la proteína p53⁵⁸, resultados similares a los encontrados por Barboza et al, con 16 casos de AS positivos para p53 con un 100% (16 muestras), presentando una mayor expresión los AS plexiformes. Estos resultados son distintos a los descritos por Florescu et al, en el cual se señala una inmunopositividad para la proteína p53 en 9 (52,9%) de 17 muestras de Ameloblastoma y para ki-67, observó positividad en 14 (82,3%) muestras de las 17.

Kumamoto et al. encontró inmunopositividad para p53 en 13 muestras de un total de 29 Ameloblastomas y en un 100% de las muestras para Ameloblastomas malignos, sugiriendo que la expresión de p53 se asocia con la oncogénesis del epitelio odontogénico, en tanto, la reactividad para p53 fue significativamente alta en los AS plexiforme que en los foliculares, por lo que el tipo morfológico de AS podría determinar una expresión distintiva para p53⁶³.

Mendes et al, estudió pacientes que fueron tratados en el Centro Médico Universitario (Vumc) en Amsterdam, tomando 20 biopsias de TOQQ las que fueron sometidas a inmunohistoquímica para p53, 5 lesiones resultaron ser negativas, 9 presentaron marcación de mediana intensidad, y 6 presentaron una

marcación de alta intensidad, obteniendo un 25%, 45% y 30% respectivamente, siendo el índice de marcación total de un 75%⁵⁶.

Kichi et al., tomó 20 muestras de Queratoquiste Odontogénico considerando la antigua clasificación OMS de la lesión, del Departamento de Patología, Universidad Dental de Tokio, y las sometió a inmunohistoquímica obteniéndose un índice de marcación de la capa superficial de $3,6\% \pm 1,8$, y de la capa intermedia de $36,4\% \pm 2,1$, lo que conlleva a un total de expresión de $60,9\% \pm 1,9$. Determinaron que la mayoría de las células que fueron positivas para p53, se ubicaron en la capa intermedia, sin embargo, las células inmunoreactivas para p53 fueron detectadas también en las basales y superficiales⁵⁰.

La expresión de p53 y su relación con la capacidad de proliferación en TOQQ es controversial según algunos autores³⁹.

Según Gabdail *et al.*, la sobreexpresión de la proteína p53 en TOQQ probablemente no es sólo debido a la mutación del gen p53, pero se cree que está asociado con el exceso de producción y/o estabilización de su forma normal para esta proteína⁵⁸.

Considerando que la proteína p53 es un producto de gen p53 supresor de tumores, que actúa en G1, para permitir la reparación del daño en el ADN y para evitar que la célula entra en la fase S del ciclo celular, o, alternativamente, para guiar a las células dañadas a la apoptosis, muchos estudios han demostrado hasta ahora que la proteína es detectable en un rango medio en lesiones malignas, pero no en células normales. p53 mutado permite una larga vida media de la proteína y su acumulación, mostrando una fuerte reacción inmunohistoquímica en el tejido. Por lo tanto, no se puede excluir que p53 mutante esté involucrada en las altas relaciones positivas en el epitelio de los TOQQ⁵⁰.

La evaluación de p53 podría ser usado para una mejor comprensión del proceso de transformación neoplásica de lesiones benignas localmente agresivas como el AS y el TOQQ y ser usado en la evaluación pronóstica y terapéutica.

Existen pocos estudios en la literatura que describan simultáneamente la expresión de ki-67 y p53 en Ameloblastomas Sólidos y TOQQ⁵⁸, sin embargo no

existen estudios que describan la expresión de Ki-67, p53 y bax en forma conjunta.

Bax, es considerado un antagonista pro-apoptótico de bcl-2. En este estudio se expresó de manera importante en ambas lesiones, presentándose en un 58% en AS y un 65% en TOQQ, aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ambas lesiones.

Suluk et al., en el mismo estudio mencionado anteriormente comparó la expresión de bax en AS y TOQQ, obteniendo promedios similares en ambas lesiones de un 40% aproximadamente, la única variación observada fue en la desviación estándar con respecto al promedio de ambas lesiones, siendo mucho más alta en TOQQ que en AS. Estos resultados muestran un menor índice de marcación que en nuestro estudio⁵².

Sandra et al., seleccionó bloques de Ameloblastomas de 32 pacientes, que habían sido operados en el hospital de la Universidad de Kyushu, Japón. De los cuales 24 eran AS, 9 foliculares, 9 plexiformes, 3 de células basales, y 3 acantomatosos. Obteniendo un índice de marcación de un $31,25\% \pm 6,15$ en la capa celular externa, y un $39,32\% \pm 8,14$ en la capa celular interna. La relación de bcl-2 a bax determina la supervivencia o la muerte después de un estímulo apoptótico. En este estudio, la proporción de bcl-2/bax fue significativamente mayor para células de la capa exterior que para células de la capa interna, indicando que la células periféricas tiene características de inhibición apoptótica, mientras que las de la interna entran en apoptosis⁶⁰.

En resumen, los resultados del presente estudio indican que tanto el AS como el TOQQ tienen un importante potencial inhibidor de la apoptosis teniendo en cuenta la expresión de las distintas proteínas estudiadas. Lo que sugiere, que podrían tener una actividad de supervivencia alta. Esto explicaría porque presentan una alta recurrencia y un comportamiento clínico- patológico relativamente agresivo.

CONCLUSIONES

- El índice de expresión inmunohistoquímica para el marcador de proliferación celular ki-67, fue más alto para TOQQ que para AS.
- No se encontró diferencias en el índice expresión inmunohistoquímica para p53 y tampoco para la proteína pro-apoptótica bax entre AS y TOQQ.
- La inmunopositividad para ki-67, p53 y bax fue detectada para todos los casos de AS y TOQQ.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, 2005:IARC Press,, p. 282- 319.
2. Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. Histological typing of odontogenic tumours. Berlin: Springer Verlag; 1992. p. 34-42.
3. Adebisi KE, Ugboko VI, Omoniyi-Esan GO, Ndukwe KC, Oginni FO. Clinicopathological analysis of histological variants of ameloblastoma in a suburban Nigerian population. Head Face Med. 2006;2:42.
4. Siar CH, Lau SH, Ng KH. Ameloblastoma of the jaws: a retrospective analysis of 340 cases in a Malaysian population. J Oral Maxillofac Surg. 2012 Mar;70(3):608-15.
5. Wright JM. The odontogenic keratocysts: orthokeratinized variant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1981; 51(6): 609-18.
6. Myoung H, Hong S-P, Hong S-D, Lee J-I, Lim C-Y, Choung P-H, et al. Odontogenic keratocyst: review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91:328-33.
7. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. Oral Oncol 2002;38:219-26.
8. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. Oral Oncol 2002;38:323-31.

9. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 3. Immunocytochemistry of cytokeratin and other epithelial cell markers. *Oral Oncol* 2002;38:407-15.
10. Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, DeMarco L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2000;79:1418-22.
11. Vered M, Buchner A, Dayan D, Shteif M, Laurian A. Solid variant of odontogenic keratocyst. *J Oral Pathol Med* 2004;33:125-8.
12. Costa DO, Maurício AS, Faria PA, Silva LE, Mosqueda-Taylor A, Lourenço SQ. Odontogenic tumors: A retrospective study of four Brazilian diagnostic pathology centers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 May 1;17(3):e389-94.
13. Servato JP, de Souza PE, Horta MC, Ribeiro DC, de Aguiar MC, de Faria PR, Cardoso SV, Loyola AM. Odontogenic tumours in children and adolescents: a collaborative study of 431 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jun;41(6):768-73.
14. Osterne RL, de Matos Brito RG, Negreiros Nunes Alves AP, Cavalcante RB, Sousa FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(4):474-81.
15. Siriwardena BS, Tennakoon TM, Tilakaratne WM. Relative frequency of odontogenic tumors in Sri Lanka: Analysis of 1677 cases. *Pathol Res Pract*. 2012 Apr 15;208(4):225-30.
16. Luo HY, Li TJ. Odontogenic tumors: a study of 1309 cases in a Chinese population. *Oral Oncol*. 2009;45(8):706-11.

17. Avelar RL, Antunes AA, Santos Tde S, Andrade ES, Dourado E. Odontogenic tumors: clinical and pathology study of 238 cases. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008;74(5):668-73.
18. Gaitán-Cepeda LA, Quezada-Rivera D, Tenorio-Rocha F, Leyva-Huerta ER. Reclassification of odontogenic keratocyst as tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. *Oral Dis.* 2010;16(2):185-7.
19. Varkhede A, Tupkari JV, Sardar M. Odontogenic tumors: a study of 120 cases in an Indian teaching hospital. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Nov 1;16(7):e895-9.
20. Jing W, Xuan M, Lin Y, Wu L, Liu L, Zheng X, Tang W, Qiao J, Tian W. Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Jan;36(1):20-5.
21. El-Gehani R, Orafi M, Elarbi M, Subhashraj K. Benign tumours of orofacial region at Benghazi, Libya: a study of 405 cases. *J Craniomaxillofac Surg.* 2009 Oct;37(7):370-5.
22. Tawfik MA, Zyada MM. Odontogenic tumors in Dakahlia, Egypt: analysis of 82 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Feb;109(2):e67-73.
23. Ebenezer V, Ramalingam B. A cross-sectional survey of prevalence of odontogenic tumours. *J Maxillofac Oral Surg.* 2010 Dec;9(4):369-74. Epub 2011 Feb 26.
24. Morgan P. Odontogenic tumor: a review. *Periodontology* 2000, 2011, vol 57,160-176.

25. Adebayo ET, Ajike SO, Adekeye EO. A review of 318 odontogenic tumors in Kaduna, Nigeria. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jun;63(6):811-9.
26. Boffano P, Ruga E, Gallesio C. Keratocystic odontogenic tumor (odontogenic keratocyst): preliminary retrospective review of epidemiologic, clinical, and radiologic features of 261 lesions from University of Turin. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Dec;68(12):2994-9.
27. González-Alva P, Tanaka A, Oku Y, Yoshizawa D, Itoh S, Sakashita H, Ide F, Tajima Y, Kusama K. Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective study of 183 cases. *J Oral Sci.* 2008 Jun;50(2):205-12.
28. Ahn SG, Lim YS, Kim DK, Kim SG, Lee SH, Yoon JH. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a retrospective analysis of 33 affected Korean individuals. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jul;33(5):458-62.
29. Cobourne MT, Xavier GM, Depew M, Hagan L, Sealby J, Webster Z, Sharpe PT. Sonic hedgehog signalling inhibits palatogenesis and arrests tooth development in a mouse model of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dev Biol.* 2009 Jul 1;331(1):38-49.
30. Díaz-Fernández JM, Infante-Cossío P, Belmonte-Caro R, Ruiz-Laza L, García-Perla-García A, Gutiérrez-Pérez JL. Basal cell nevus syndrome. Presentation of six cases and literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005 Apr 1;10 Suppl 1:E57-66.
31. Bakaeen G, Rajab LD, Sawair FA, Hamdan MA, Dallal ND. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature and a report of a case. *Int J Paediatr Dent.* 2004 Jul;14(4):279-87.
32. Evans DGR, Ladusan EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA. Complications of the nevoid basal cell carcinoma syndrome: results of the population based study. *J Med Genet* 1993; 30:460-4.

33. Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, et al. Clinical manifestation in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* 1997;69:299-308.
34. Falaki F, Delavarian Z, Salehinejad J, Saghafi S. Squamous cell carcinoma arising from an odontogenic keratocyst: a case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14(4):E171-4.
35. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13-20
36. De Manzoni G, Verlato G, Tomezzoli A, Guglielmi A, Pelosi G, Ricci F, Di Leo A, Cordiano C. Study on Ki-67 immunoreactivity as a prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 1998;28:534-7.
37. Bongers V, Snow GB, de Vries N, Braakhuis BJ. Potential early markers of carcinogenesis in the mucosa of the head and neck using exfoliative cytology. *J Pathol* 1996;178:284-9.
38. Lamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J. Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Path Med* 2004.33;30-6.
39. Slootweg PJ. p53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 1995 Oct;24(9):393-7.
40. Kim DK, Ahn SG, Kim J, Yoon JH. Comparative Ki-67 expression and apoptosis in the odontogenic keratocyst associated with or without an impacted tooth in addition to unilocular and multilocular varieties. *Yonsei Med J* 2003;44:841-6.

41. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. *J Oral Pathol Med.* 1995 May;24(5):221-6.
42. Browne DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathol* 1990;17:489-503.
43. Thosaporn W, Iamaroon A, Pongsiriwet S, Ng KH. A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, and ameloblastoma. *Oral Dis.* 2004 Jan;10(1):22-6.
44. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
45. Schoelch ML, Le QT, Silverman S Jr, McMillan A, Dekker NP, Fu KK, Ziober BL, Regezi JA. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999 Jan;35(1):77-85.
46. Loro LL, Johannessen AC, Vintermyr OK. Decreased expression of bcl-2 in moderate and severe oral epithelia dysplasias. *Oral Oncol.* 2002 Oct;38(7):691-8.
47. McAlinden RL, Maxwell P, Napier S, Hamilton P, Cowan CG, Lundy FT, Lamey PJ, Marley JJ. Bcl-2 expression in sequential biopsies of potentially malignant oral mucosal lesions assessed by immunocytochemistry. *Oral Dis.* 2000 Sep;6(5):318-26.
48. Gibson SA, Pellenz C, Hutchison RE, Davey FR, Shillitoe EJ. Induction of apoptosis in oral cancer cells by an anti-bcl-2 ribozyme delivered by an adenovirus vector. *Clin Cancer Res.* 2000 Jan;6(1):213-22.

49. Kolár Z, Geierová M, Bouchal J, Pazdera J, Zboril V, Tvrđý P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med.* 2006 Feb;35(2):75-80.
50. Eisuke Kichi, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, Shimono M. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005 May;34(5):280-6
51. Rangiani A, Motahary P. Evaluation of bax and bcl-2 expression in odontogenic keratocysts and orthokeratinized odontogenic cysts: A comparison of two cysts. *Oral Oncol.* 2009 Jul;45(7):e41-4.
52. Soluk Tekke in M, Mutlu S, Olgaç V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg.* 2012;28(1):49-55.
53. Lopez-Martinez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre JM, Martinez de Pancorbo. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (p53 en el CECC). *Med Oral* 2002;7:108-20.
54. Figueroa A, Correnti M, Avila M, Andea A, DeVilliers P, Rivera H. Keratocystic odontogenic tumor associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome: Similar behavior to sporadic type?. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;142:179:83.
55. de Vicente JC, Torre-Iturraspe A, Gutiérrez AM, Lequerica-Fernández P. Immunohistochemical comparative study of the odontogenic keratocysts and other odontogenic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Sep 1;15(5):e709-15.
56. Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. A comparative immunohistochemical analysis of COX-2, p53, and Ki-67 expression in keratocystic odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Mar;111(3):333-9.

57. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2010 Sep;39(8):585-91.
58. Gadbail AR, Patil R, Chaudhary M. Co-expression of Ki-67 and p53 protein in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Acta Odontol Scand*. 2012 Dec;70(6):529-35.
59. Amaral F, Mateus G, Bonisson L, Andrade B, Mesquita R, Horta M y Marigo H. Cell proliferation and apoptosis in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors (2012). *Braz Dent J* (2012) 23(2): 91-96
60. F Sandra, N Nakamura, T Mitsuyasu, Y Shiratsuchi y M Ohishi. Two relatively distinct patterns of ameloblastoma: an anti-apoptotic proliferating site in the outer layer (periphery) and a pro-apoptotic differentiating site in the inner layer (centre)
61. Takahashi H, Fujita S, Yamabe S, Moriishi T, Okabe H, Tajima Y, et al.. Comparison of proliferating cell nuclear antigen expression in odontogenic keratocyst and ameloblastoma: an immunohistochemical study. *Anal Cell Pathol* 1998;16:185-192.
62. Florescu A., Simionescu C, Ciurea R, Pitru A. P53, Bcl-2 and Ki67 immunoexpression in follicular solid ameloblastomas. *Rom J Morphol Embryol* 2012, 53(1):105–109
63. Kumamoto H., Ohki K., Ooya K. Expression of p63 and p73 in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* (2005) 34: 220–6
64. Clark P, Marker P, Bastian HL, Krogdahl A. Expression of p53, Ki-67, and EGFR in odontogenic keratocysts before and after decompression. *J Oral Pathol Med*. 2006 Oct;35(9):568-72.

65. Philipsen H.P Keratocystic odontogenic tumour. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours-Pathology & Genetics, Head and Neck Tumours. Lyon, IARC Press, 2005 p.306-7.
66. Gardner DG, Heikinheimo K, Shear M, Philipsen HP, Coleman H. Ameloblastomas. In: Barnes I, L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours-Pathology & Genetics, Head and Neck Tumours. Lyon, IARC Press, 2005 p.306-7.
67. Dong Q, Pan S, Sun LS, Li TJ. Orthokeratinized odontogenic cyst: a clinicopathologic study of 61 cases. Arch Pathol Lab Med. 2010 Feb;134(2):271-5.
68. Landis J.R., Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics.1977;33:19-174.

Figura 1. Ameloblastoma Sólido, Tumor Odontogénico Queratoquístico y controles.

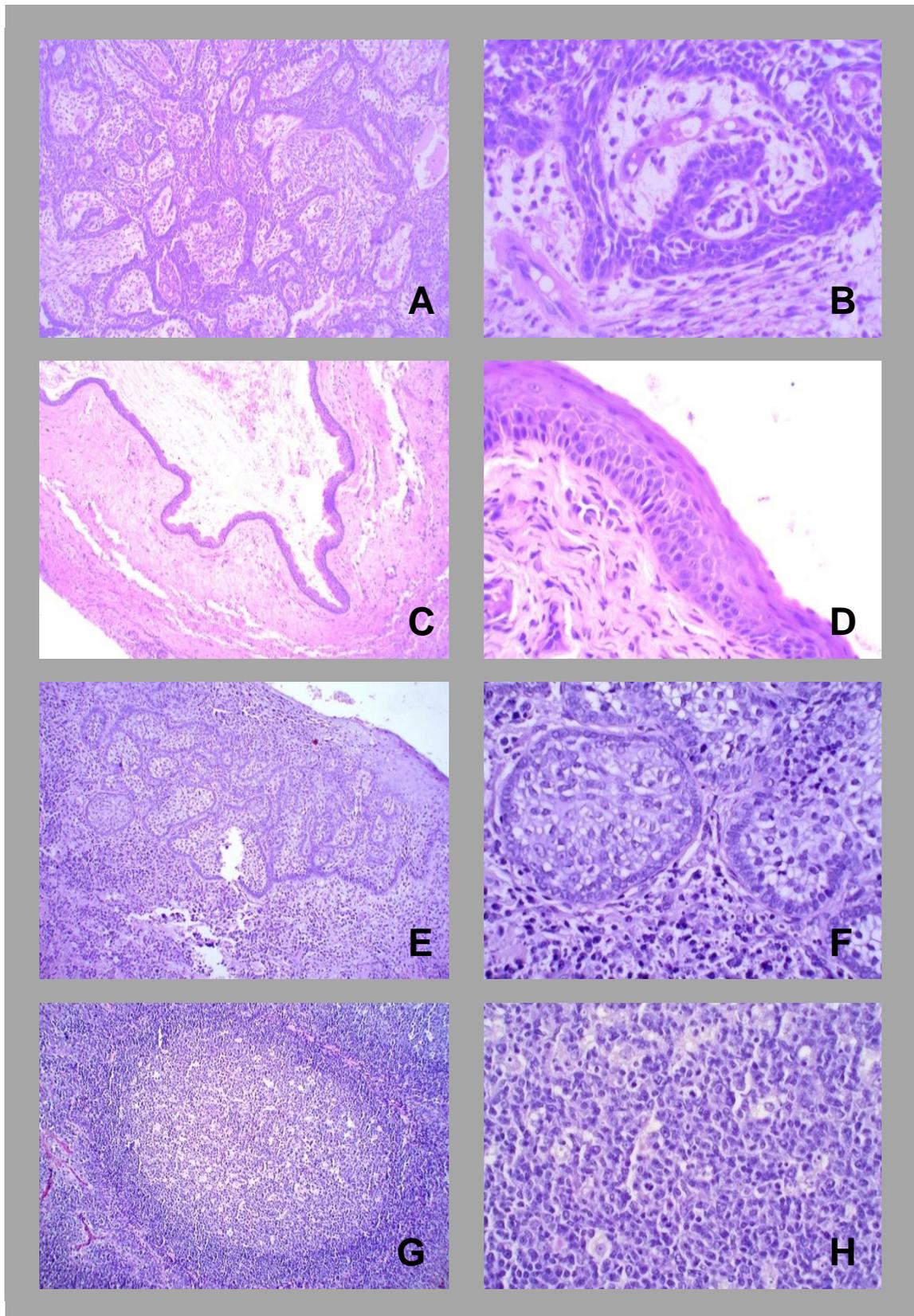


Figura 1. Tinción Hematoxilina-Eosina. Columna izquierda, aumento de 10x. Columna derecha, 40x. Figuras 1A y 1B: AS. Figuras 1C y 1D: TOQQ. Figuras: 1E y 1F: Carcinoma de células escamosas. Figuras 1G y 1H: Amígdala.

Figura 2. Expresión de la proteínas ki-67, p53 y bax en Ameloblastomas Sólidos

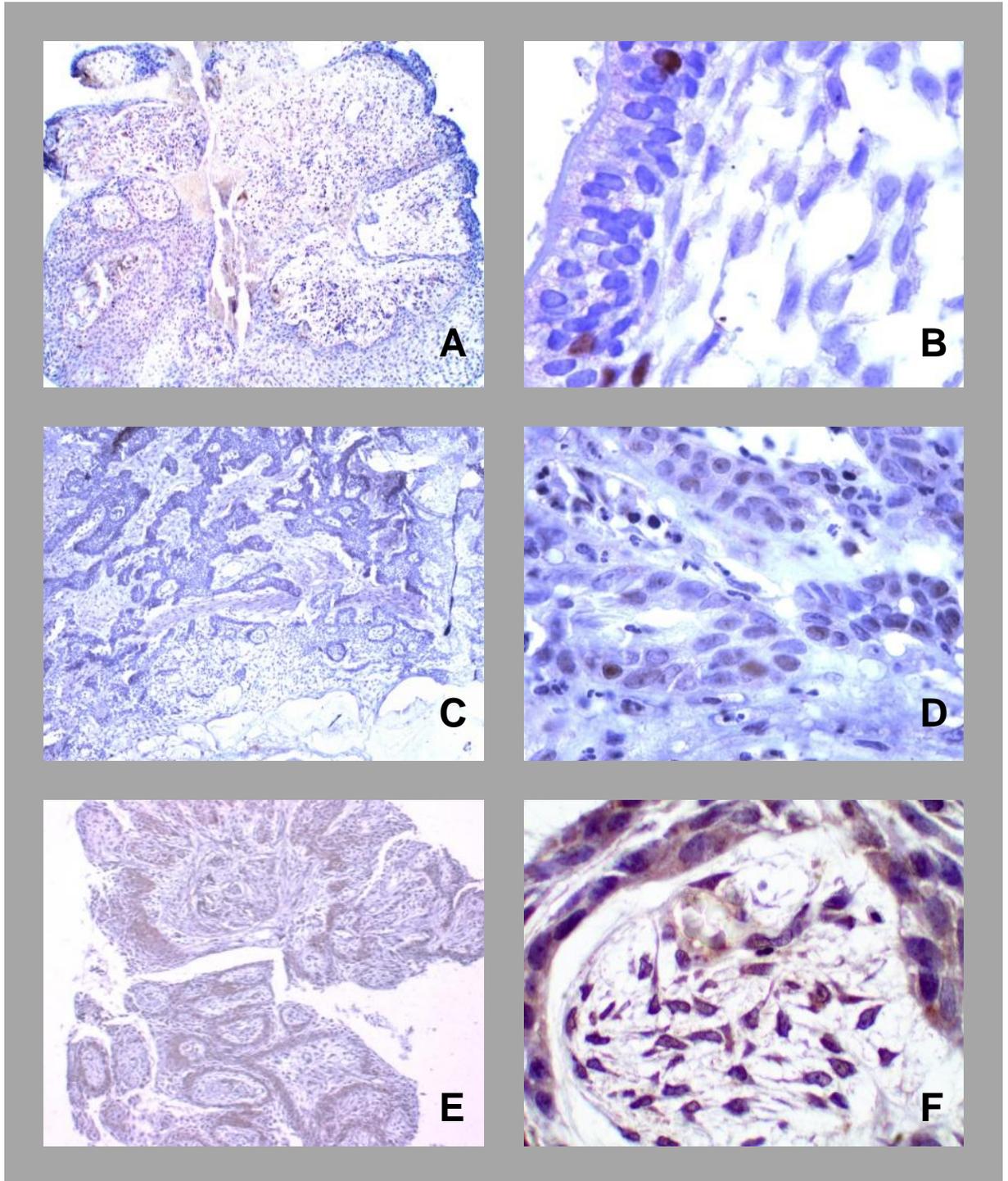


Figura 2. Inmunohistoquímica de AS. Columna izquierda, aumento de 10x. Columna derecha, 40x. Figuras 2A y 2B: marcación de ki67. Figuras 2C y 2D: marcación de p53. Figuras: 2E y 2F: marcación de bax.

Figura 3. Expresión de la proteínas ki-67, p53 y bax en Tumor Odontogénico Queratoquístico

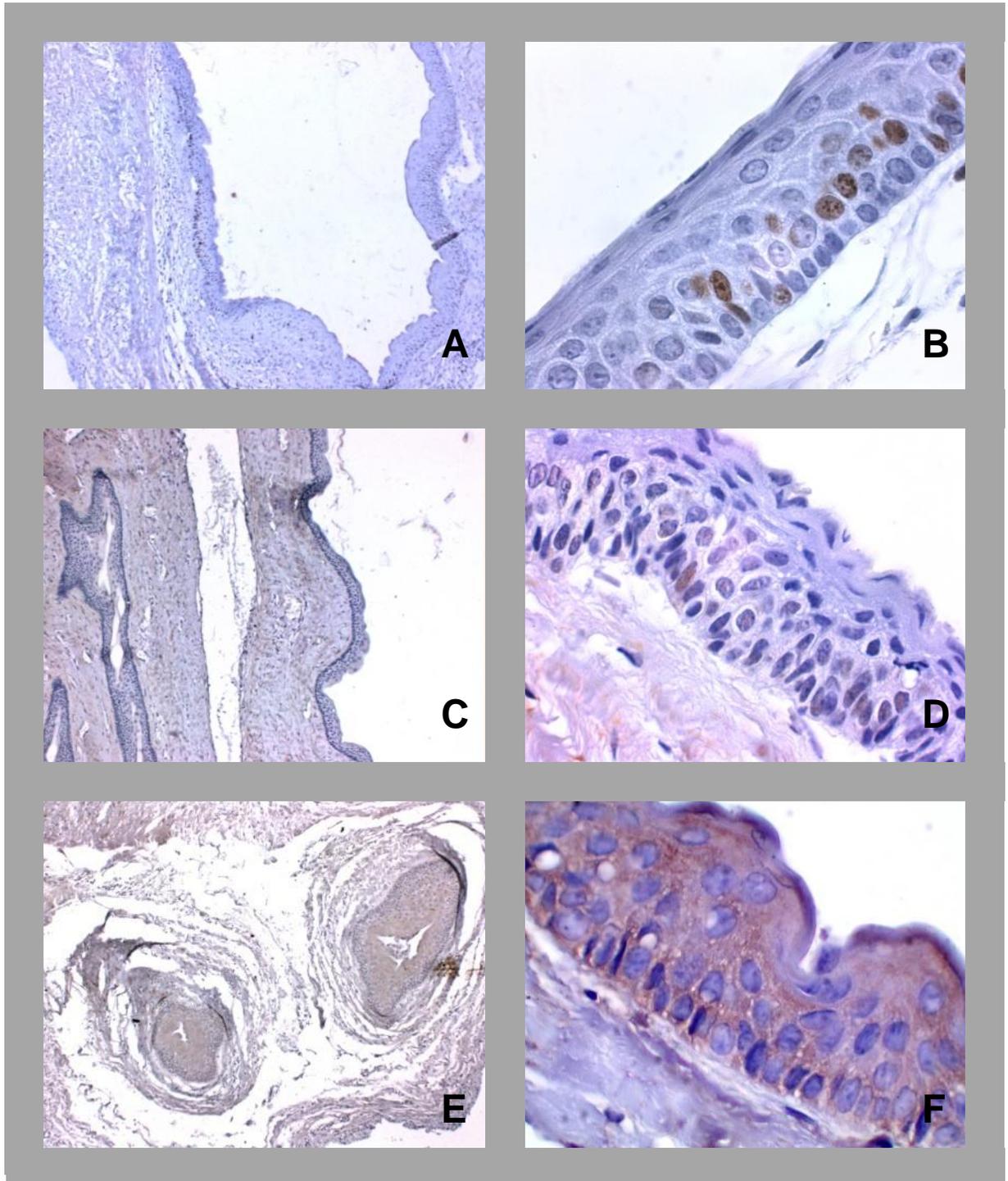


Figura 2. Inmunohistoquímica de TOQQ. Columna izquierda, aumento de 10x. Columna derecha, 40x. Figuras 3A y 2B. marcación de ki67. Figuras 3C y 23: marcación de p53. Figuras: 3E y 3F: marcación de bax.

Figura 4. Expresión de la proteína ki-67, en Ameloblastoma Sólido, Tumor Odontogénico Queratoquístico y controles.

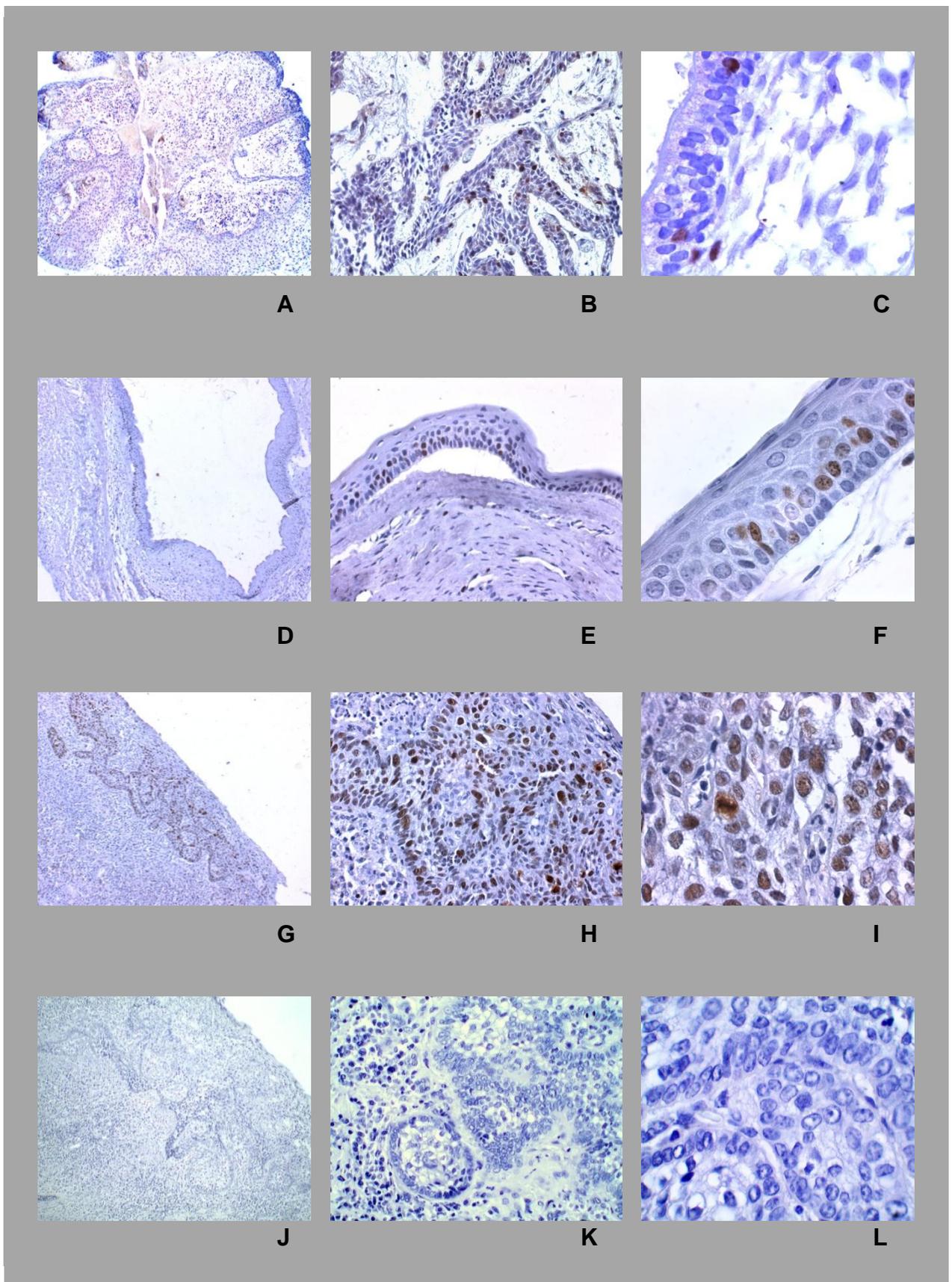


Figura 4. Inmunohistoquímica para ki-67. Columna izquierda, aumento de 10x. Columna central: 40x Columna derecha, 100x. Figuras 4A, 4B y 4C: AS. Figuras 4D, 4E y 4F: TOQQ. Figuras: 4G, 4H y 4I: CEC control positivo. Figuras: 4J, 4K y 4L: CEC control negativo.

Figura 5. Expresión de la proteína p53 en Ameloblastoma Sólido, Tumor Odontogénico Queratoquístico y controles

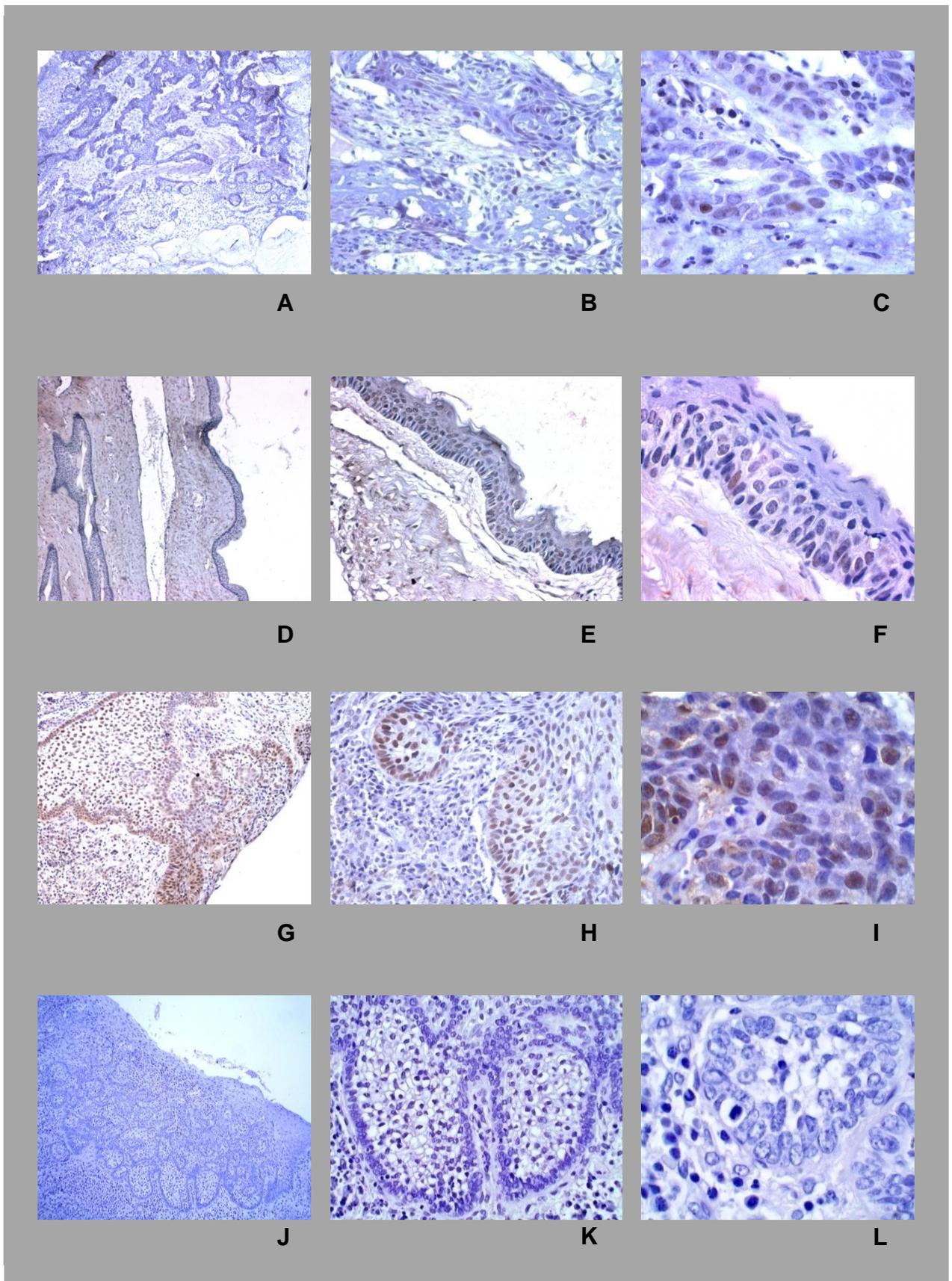


Figura 5. Inmunohistoquímica para p53. Columna izquierda, aumento de 10x. Columna central: 40x Columna derecha, 100x. Figuras 5A, 5B y 5C: AS . Figuras 5D, 5E y 5F: TOQQ. Figuras: 5G, 5H y 5I: CEC control positivo. Figuras: 5J, 5K y 5L: CEC control negativo.

Figura 6. Expresión de la proteína bax en Ameloblastoma Sólido, Tumor Odontogénico Queratoquístico y controles

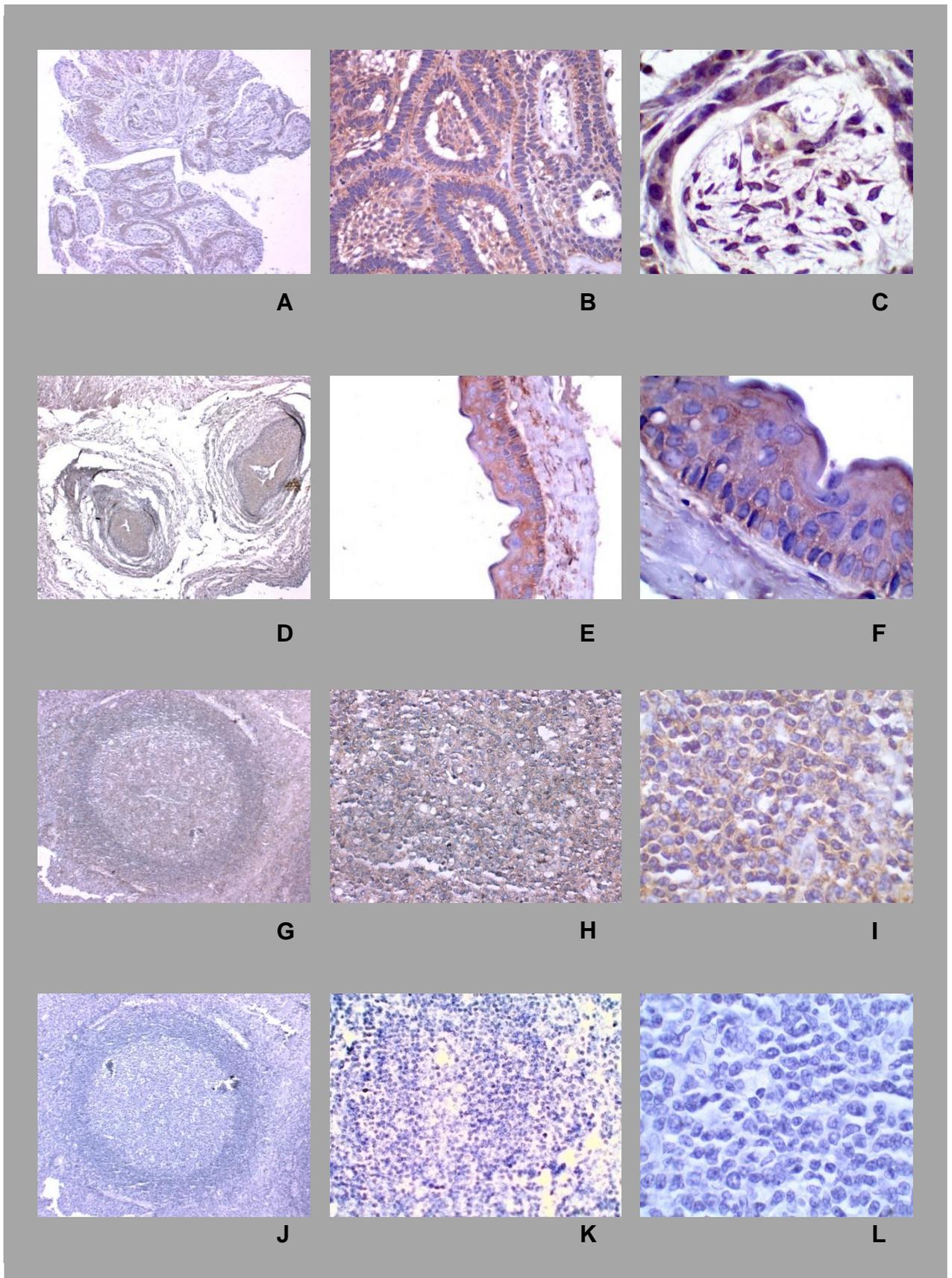


Figura 6. Inmunohistoquímica para bax. Columna izquierda, aumento de 10x. Columna central: 40x Columna derecha, 100x. Figuras 6A, 6B y 6C: AS . Figuras 6D, 6E y 6F: TOQQ. Figuras: 6G, 6H y 6I: Amígdala control positivo. Figuras: 6J, 6K y 6L: Amígdala control negativo.