



FACULTAD DE  
**ODONTOLOGÍA**  
UNIVERSIDAD DE CHILE

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

**“EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE COX-2 Y KI-67 EN  
TUMORES ODONTOGÉNICOS EPITELIALES LOCALMENTE  
AGRESIVOS”**

Adscrito a Proyecto FIOUCh- 13-003

**MARÍA LUISA ENCALADA BUENO**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Enrico Escobar L.**

**TUTORES ASOCIADOS  
Dra. Ana Ortega P.  
TM. Cristián Peñafiel E.**

**Santiago-Chile  
2014**

**DEDICATORIA**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
----------------------	---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
---------------------------	---

### **MARCO TEÓRICO**

- Inducción Epitelio- Mesénquima,  
Odontogénesis y Tumores Odontogénicos.....5
- Clasificación y Tipificación histológica de  
Tumores Odontogénicos según la OMS 2005.....6
- Epidemiología:
  - Ameloblastoma Sólido y Tumor Odontogénico Queratoquístico.....10
  - Quiste Dentífero.....11
- Características
  - Clínicas del Ameloblastoma Sólido.....13
  - Histológicas del Ameloblastoma Sólido.....15
  - Imagenológicas del Ameloblastoma Sólido.....16
  - Clínicas del Tumor Odontogénico Queratoquístico.....17
  - Histológicas del Tumor Odontogénico Queratoquístico.....19
  - Imagenológicas del Tumor Odontogénico Queratoquístico.....19
  - Clínicas, Histológicas y Imagenológicas del Quiste Dentífero.....20
  - Ciclooxigenasa - 2 y Progresión Tumoral .....21
  - COX-2 Inflamación e Inmunosupresión.....23
  - Proliferación Celular.....24

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

- Hipótesis.....26
- Objetivo general.....26
- Objetivos específicos.....26

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

- Tipo de estudio realizado.....27
- Aspectos éticos.....27
- Universo y selección de muestra.....27
  - Criterios de inclusión.....27

-Criterios de exclusión.....	27
• Variables de estudio.....	28
• Procedimientos.....	28
- Recoleccion de muestras.....	28
- Recopilación de datos clínicos.....	29
- Anonimación de la información y datos personales.....	29
- Muestra biológica codificada o reversiblemente disociada.....	29
- Procesamiento.....	30
- Análisis de la información.....	33
<b>RESULTADOS</b>	
• Caracterización de la muestra.....	34
• Características histopatológicas de TOQQ,- AS - QD y controles.....	37
• Resultados Inmunoquistoquímicos:	
• Cuantificación de la expresión de Ki-67, y COX-2 en AS.....	39
• Cuantificación de la expresión de Ki-67, y COX-2 en TOQQ.....	41
• Cuantificación de la expresión de Ki-67, y COX-2 en QD.....	43
• Comparación de la expresión de Ki-67 entre TOQQ - AS - QD.....	45
• Comparación de la expresión de COX-2 entre TOQQ - AS - QD.....	47
<b>DISCUSIÓN</b> .....	49
<b>CONCLUSIONES</b> .....	56
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	57
<b>ANEXOS</b>	
• Anexo 1.....	73
• Anexo 2.....	74
• Anexo 3.....	76

## **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. Otro tipo de lesiones de menor agresividad que se puede presentar en los huesos maxilares son los quistes del desarrollo, entre los cuales el más frecuente es el quiste dentígero, el cual puede presentar características clínicas y radiográficas similares a los tumores antes mencionados.

Los mecanismos de desarrollo de los tumores odontogénicos son poco claros y tal como en muchas neoplasias es probable que en la tumorigénesis de éstos participen múltiples procesos. Para una mayor comprensión del comportamiento clínico de estas lesiones es necesario entender los mecanismos biológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de ellas, es por esto que el objetivo del presente estudio es describir y comparar la expresión inmunohistoquímica de dos moléculas que podrían contribuir en los mecanismos del desarrollo de estas patologías: Ki-67 una molécula que se emplea como marcador de proliferación celular y COX-2, molécula que se sobreexpresa en varios tipos de tumores y cuyo rol en la tumorigénesis no se conoce claramente, sin embargo se ha demostrado que el uso de inhibidores de COX-2 retarda el desarrollo de algunas neoplasias.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio contó con la aprobación del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo N° 2, pág 81). Se recolectaron 10 muestras de ameloblastoma sólido (AS), 10 muestras de tumor odontogénico queratoquístico (TOQQ) y 8 muestras de quiste dentígero (QD), entre los años 1997-2010, en todas las cuales se realizó técnica inmunohistoquímica para COX-2 y Ki-67.

## **RESULTADOS**

Todas las muestras presentaron marcación positiva para Ki-67 y COX-2. El índice de proliferación para Ki-67 de TOQQ, AS y QD fue de 12,28%, 7,01% y 2,41% respectivamente. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para Ki-67, entre TOQQ v/s AS, AS v/s QD y también entre TOQQ v/s QD.

COX-2 expresó un índice de marcación de 43,11% en TOQQ, un 36,82% en AS y un 14,86% en QD. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de COX-2 para TOQQ v/s AS y AS v/s QD. A diferencia de TOQQ v/s QD donde existió una diferencia estadísticamente significativa.

## **CONCLUSIONES**

La expresión inmunohistoquímica para COX-2, fue mayor en TOQQ, lo cual podría estar indicando un rol, entre varios otros factores en el desarrollo de esta lesión y puede ser considerado un potencial blanco de tratamiento coadyuvante de los TOQQ. La proteína Ki-67, presentó una mayor expresión en TOQQ y AS lo cual indica que estos tumores presentan mayor índice de proliferación celular que el QD, sin embargo, para una mejor correlación con el comportamiento clínico se requiere analizar otros parámetros que participan en el crecimiento de los tumores como son las diferentes formas de muerte celular.

## INTRODUCCIÓN

En la Odontogénesis participan dos elementos fundamentales: un epitelio de origen ectodérmico y un mesénquima que proviene de la cresta neural (ectomesenquima). Las células ectodérmicas del estomodeo o boca primitiva, se invaginan para formar estructuras que junto con el ectomesénquima formarán los dientes. Este proceso comienza en la sexta semana en el embrión, posteriormente a la octava semana de vida intrauterina se forman los gérmenes dentarios de los dientes deciduos para finalmente culminar con la morfodiferenciación de los dientes permanentes (Abramovich, 1999).

Concluido este proceso, permanecen latentes, indefinidamente, células epiteliales y mesenquimáticas de manera residual en los maxilares que pueden generar quistes y tumores odontogénicos. Dentro de los TO podemos encontrar hamartomas, neoplasias benignas y malignas con potencial metastásico. Estos tumores se localizan exclusivamente en los huesos maxilares o en tejidos blandos (gingival y tejido de revestimiento) adyacentes a éstos, pudiéndose presentar en cualquier grupo etáreo (Barnes y cols, 2005). En varias poblaciones del mundo, incluido nuestro país, los tumores odontogénicos más frecuentes son los odontomas, tumores odontogénicos queratoquísticos y los ameloblastomas (Ochsenius y cols 2002; Luo y Li, 2009; Gaitán-Cepeda y cols 2010; Ramos y cols, 2014), presentando las dos últimas lesiones una importante capacidad de crecimiento y destrucción de los huesos maxilares.

El tumor odontogénico queratoquístico presenta morfología de quiste uni o multilocular, con o sin presencia de quistes satélites, crece desplazando las estructuras vecinas y puede tratarse exitosamente mediante descompresión con porcentajes bajos de recidivas (Wang y cols, 2013). Por otro lado, el ameloblastoma sólido aún cuando puede presentar áreas de quistificación, es una neoplasia de células epiteliales que infiltran entre las trabéculas de los huesos maxilares y su tratamiento requiere procedimientos más agresivos como la resección para

disminuir los altos porcentajes de recidivas que pueden llegar a 93% al intentar tratamientos muy conservadores (Carlson y Marx 2006).

Los restos epiteliales que permanecen en los maxilares también pueden dar lugar a quistes del desarrollo, entre los cuales, el quiste dentígero es uno de los más frecuentes. El QD es una lesión de crecimiento lento, no infiltrante que expande y desplaza estructuras, que requiere tratamientos quirúrgicos conservadores y que prácticamente no presenta recidivas (Regezi, 2002; Ochsenius y cols, 2007).

Para tener una mayor comprensión del comportamiento clínico de estas lesiones es necesario entender los mecanismos biológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de éstas. Respecto de los tumores odontogénicos queratoquísticos, se ha reportado que tanto aquellos asociados a síndrome como los esporádicos puede encontrarse mutaciones del gen supresor de tumores PTCH, sin embargo, se ha postulado también que existen otros procesos asociados a la tumorigénesis de esta lesión que autores como Mendes han llamado patrón “network addiction“, lo que se entiende como una red de mecanismos que contribuyen al desarrollo del TOQQ, entre los que se ha descrito participación de moléculas como p53, Bcl-2 y COX-2, entre otros (Mendes 2011; Wang y cols, 2013). La etiopatogénesis de los ameloblastomas es menos conocida, se ha sugerido que factores de crecimiento, metaloproteinasas e inhibidores de metaloproteinasas participan en la naturaleza invasiva de este tumor, también se ha detectado presencia de moléculas como COX-2 tanto en las células neoplásicas como en el estroma de este tumor, lo cual podría relacionarse con secreción de metaloproteinasas que influenciarían la proliferación e invasividad del Ameloblastoma (Cecim y cols, 2014).

Frente a estos antecedentes el objetivo de este estudio es determinar, analizar y comparar la expresión de las proteínas Ki-67 y COX-2, mediante inmunohistoquímica, lo que contribuye a la comprensión del comportamiento biológico, al pronóstico y también puede permitir el desarrollo de nuevos conceptos de manejo clínico- terapéutico de estos dos tumores odontogénicos.



## MARCO TEÓRICO

### **INDUCCIÓN EPITELIO- MESÉNQUIMA Y ODONTOGÉNESIS TUMORES ODONTOGÉNICOS**

Los fenómenos de inducción entre epitelio y mesénquima odontogénico dan lugar a la morfogénesis del diente. Las primeras señales que inician este proceso provienen del epitelio oral y de células derivadas de la cresta neural (Jernvall y Ugboko, 2000). De este modo la diferenciación de las células del epitelio oral en los ameloblastos dependerá de instrucciones inductoras del mesénquima. De forma recíproca, la diferenciación de células mesenquimáticas en odontoblastos depende de información proveniente del epitelio (Dawis, 1988). El patrón de morfogénesis dentario está determinado por la expresión regional de genes ectomesenquimales, sin embargo, esta expresión es producida en respuesta a las señales epiteliales (Jernvall y Ugboko, 2000). El origen, por lo tanto, de los diferentes tejidos dentarios está tanto en el mesodermo y la cresta neural dando lugar a la papila dental, consecuentemente a odontoblastos, cementoblastos y fibroblastos, como en el ectodermo que llevará a la formación del órgano del esmalte y a los ameloblastos (Thesleff y cols, 1990).

Estos tejidos odontogénicos pueden sufrir alteraciones en las reglas que controlan la multiplicación y diferenciación celular y originar los llamados tumores odontogénicos. La embriogénesis de las piezas dentarias, es un fenómeno altamente dinámico, en el cual los cambios inductivos que suceden en forma secuencial, aportan a la odontogénesis y también a la patogenia de los tumores odontogénicos, un matiz multifacético y de constante actividad (Stoeltinga, 1976).

Los tumores odontogénicos, constituyen un grupo de enfermedades heterogéneas que pueden corresponder desde proliferaciones de tejido hamartomatoso a neoplasias benignas localmente agresivas y tumores malignos con potencial metastásico. Los TO son derivados de elementos epiteliales, ectomesenquimáticos y/o mesenquimáticos que forman el aparato dentario. Estos tumores son infrecuentes, algunos incluso son extremadamente raros, pero pueden plantear un importante y significativo reto diagnóstico así como terapéutico (Barnes y cols, 2005;

Mosqueda, 2008). Por lo tanto, se encuentran exclusivamente dentro de los huesos maxilares (intraóseos) o periféricos, ya sea tejidos blandos adyacentes a áreas dentadas (mucosa adherida y gingival) o en áreas de mucosa alveolar en las zonas desdentadas. Estos tumores pueden originarse en cualquier etapa de la vida de un individuo (Barnes y cols, 2005; Mosqueda, 2008).

### **CLASIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE TUMORES ODONTOGÉNICOS SEGÚN LA OMS 2005**

Los tumores odontogénicos son lesiones de gran interés e importancia entre patólogos orales y cirujanos maxilofaciales, quienes por varias décadas han estudiado y clasificado estas lesiones, así como, proponiendo y desarrollando tratamientos más adecuados a los nuevos conocimientos. Es a partir de la primera edición publicada el año 1971 por la OMS: "Tipificación histológica de tumores odontogénicos, quistes de los maxilares y lesiones afines", que los tumores odontogénicos han atraído un mayor y creciente interés.

En la edición del año 1971 se introdujo una nueva terminología y clasificación para este grupo de lesiones (Pindborg y cols, 1971). Debido a la necesidad de reclasificación de algunas de estas patologías por los avances en el conocimiento de embriología oral y maxilofacial junto a la identificación de nuevas entidades durante los años posteriores, fue necesario actualizar esta clasificación, por lo que una segunda edición se publicó el año 1992 (Kramer y cols, 1992).

El marco teórico básico de la primera edición permaneció esencialmente sin cambios, sin embargo se añadieron algunos tumores recientemente reconocidos como el tumor odontogénico escamoso y el TO de células claras.

Desde entonces, el desarrollo de nuevas tecnologías en inmunohistoquímica, biología molecular y genética, así como la clínica y seguimiento epidemiológico de algunas de las lesiones incluidas en las ediciones anteriores, divulgó la necesidad de reclasificar a algunos de ellos de acuerdo con su probable histogénesis, o de acuerdo con su comportamiento biológico. El queratoquiste odontogénico comenzó a ser considerado como una neoplasia benigna localmente agresiva que ha sido renombrada como tumor odontogénico queratoquístico.

Estos y otros cambios importantes se han incluido en la última clasificación de tumores de cabeza y el cuello de la OMS publicado en 2005, que es una guía para el diagnóstico de estas lesiones (Barnes y cols, 2005).

Los tumores odontogénicos son lesiones infrecuentes que se presentan < 2-3% de todas las muestras orales enviadas para el diagnóstico de los servicios de patología oral y aproximadamente un 0,002-0,003% de todos los tumores en el cuerpo humano (Phillipsen y cols, 2006). El año 2005 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 (Barnes y cols, 2005).

La clasificación usada en la actualidad está basada primero, en el comportamiento de la lesiones, clasificándolas en benignas. A su vez las lesiones malignas están basadas en los tipos de los 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 odontogénico (Barnes y cols, 2005).

Probablemente el cambio más discutido y controvertido es la incorporación del queratoquiste odontogénico a la categoría de tumores odontogénicos benignos. El nuevo término asignado es “tumor odontogénico queratoquístico”. El cambio de terminología y clasificación se basa en que el queratoquiste odontogénico se comporta como una neoplasia y no como una lesión quística benigna convencional (Phillipsen y cols, 2006).

Según la tipificación histológica de tumores odontogénicos de la OMS del año 1992, el queratoquiste odontogénico (QO) se clasificaba como un quiste epitelial odontogénico del desarrollo y se describían las variedades paraqueratinizadas y ortoqueratinizadas (Barnes y cols, 2005).

El año 2005 la OMS publicó la última clasificación histológica para TO en la cual se realizaron cambios respecto a la clasificación anterior del año 1992, entre los cuales, el QO se considera una neoplasia odontogénica benigna epitelial y se le denominó tumor odontogénico queratoquístico, sin embargo, sólo se consideraron las lesiones revestidas por un epitelio paraqueratinizado (Phillipsen y Reichart, 2002). La OMS definió al TOQQ como un TO benigno, uni o múltiquístico, que presenta un epitelio plano estratificado paraqueratinizado. Puede presentarse solitario o múltiple, y en este caso, constituir uno de los signos asociados al Síndrome Nevo Basocelular (Kramer y cols, 1992).

También se han publicado casos de tumores odontogénicos queratoquísticos sólidos, lo que eventualmente reforzaría la naturaleza neoplásica del TOQQ (Lezzi y cols, 2011; Vered y cols, 2004).

El descubrimiento de anormalidades cromosomales y alteraciones genéticas como la mutación del gen supresor de tumores PCTH, confirman este concepto de neoplasia para el TOQQ (Shear "a", 2002; Shear "b", 2002).

A pesar de las evidencias genéticas, anatomopatológicas y el comportamiento biológico localmente agresivo en relación al TOQQ, aún existe controversia en la actualidad a aceptar esta lesión como una neoplasia (Nayak y cols, 2013).

Otro cambio importante de la clasificación de la OMS en el 2005, es con relación a los ameloblastomas, que se definen 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 metástasis (Barnes y cols, 2005).

En la clasificación anterior del año 1992, se reconocía la existencia de 3 variedades clínico-patológicas de ameloblastomas: sólido (AS), uniuístico (AU) y periférico (AP), con sus correspondientes patrones histológicos: folicular plexiforme, acantomatoso, desmoplástico, células basales y granular. Al pasar los años, se detectaron diferencias clínicas e imagenológicas entre los 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

AS, y se considera una variedad distintiva, 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 agresiva (Barnes y cols, 2005).

De particular importancia es el hecho de que la nueva clasificación, no se limita a clasificar al ameloblastoma como una sola entidad con variedades clínico patológicas. Más bien, se reconoce la existencia de diferentes variantes, utilizando el término en plural "ameloblastomas". Según estos criterios se consideran 4 tipos clínico-patológicos de ameloblastomas, el ameloblastoma sólido (AS), el ameloblastoma unicístico, el ameloblastoma periférico y el ameloblastoma desmoplástico, siendo, los AS y AU los más frecuentes (Sriar y cols, 2012). Los bioperfiles de estos ameloblastomas varían en función de, edad, distribución anatómica, características de imagen, y, en particular su pronóstico (Phillipsen y cols, 2006). Si bien las últimas clasificaciones de tumores odontogénicos han presentado una exposición relativamente corta, dependiendo de la persistencia de los conceptos clínicos, morfológicos y genéticos principalmente; que apoyan la existencia de una entidad determinada, se puede esperar que en el futuro algunos de las lesiones menos comunes conocidas en la actualidad o aquellos tumores odontogénicos no clasificados podrán ser adecuadamente definidos y categorizados en futuras ediciones de esta clasificación.

## ***EPIDEMIOLOGÍA DE AMELOBLASTOMA SOLIDO, TUMOR ODONTOGENICO QUERATOQUISTICO, QUISTE DENTIGERO***

### **Ameloblastoma sólido y tumor odontogénico queratoquístico**

Diversos estudios epidemiológicos basados en la clasificación OMS 2005 han descrito la frecuencia para este tipo de lesiones. Estos tumores son relativamente infrecuentes, constituyendo entre el 1,3% al 5,8% de todas las lesiones de la cavidad oral (Da Costa y cols, 2012; Varkhede y cols, 2011).

Estos mismos estudios basados en la clasificación OMS 2005 han reportado como los tumores odontogénicos más frecuentes al ameloblastoma (Avelar y cols, 2008; Gill y cols, 2011; Jing y cols, 2007; Lawal y cols 2013; Okada y cols 2007; Osterne y cols, 2011; Siriwardena, 2011; Tawfik y Zyada, 2010; Varkhede y cols, 2011) al TOQQ (Avelar y cols, 2009; Da Costa y cols, 2012; Gaitán-Cepeda y cols, 2010; El Gehani y cols, 2009; Luo y Li, 2009; Ramos y cols, 2014; Servato y cols, 2013) y al odontoma. (Ebenezer y Ramalingam, 2010; Ochsenius y cols, 2002) Todos tumores odontogénicos benignos y siendo los dos primeros de naturaleza epitelial (Barnes y cols, 2005).

Es importante reiterar que como resultado de su comportamiento biológico, la OMS redefinió el queratoquiste odontogénico como una neoplasia odontogénica benigna denominándose en la actualidad “tumor odontogénico queratoquístico”, tal situación generó diversos cambios, como un aumento, en los registros de frecuencia y prevalencia de los TO. Estas diferencias, surgen debido a los cambios, en la terminología y clasificación, sin perjuicio también, debido a las diferencias étnicas o genéticas humanas en la aparición de diversos tipos de TO. (Barnes y cols, 2005; Gaitán-Cepeda y cols 2010; Lawal y cols, 2013).

Estudios basados en la clasificación OMS 2005 han descrito la frecuencia para TOOQ y ameloblastoma en diferentes localizaciones geográficas. El TOOQ constituye la primera frecuencia en estudios, a nivel mundial como, Brasil 2008 (Avelar y cols, 2008), Libia 2009 (El-Gehani y cols, 2009), China 2009 (Luo y Li, 2009), Mexico 2010 (Gaitán-Cepeda, 2010), Brasil 2012 (Da-Costa y cols, 2012), Brasil 2013 (Ramos y cols, 2014), India 2013 (Taghavi y cols, 2013).

Estudios en Sri Lanka (Okada y cols, 2007), China (Jing y cols, 2007), India (Sriram y Shetty, 2008), Egipto (Tawfik y Zyada, 2010), India (Gill y cols, 2011; Varkhede y cols, 2011), Brasil (Osterne y cols, 2011), describen al ameloblastoma dentro del primer lugar de frecuencia, no obstante estas series no describen según tipo clínico, por lo que no discriminan dentro de las 4 variantes patológicas. Sin embargo, estudios como Sri Lanka (Siriwardena y cols, 2012) y Nigeria (Lawal y cols, 2013) consideran al ameloblastoma sólido como el tipo patológico más frecuente dentro de los ameloblastomas.

Autores tales como Gaitán-Cepeda y cols, 2010; Ebenezer y Ramalingam, 2010; Varkhede y cols 2011; Osterne y cols, 2011; Siriwardena y cols, 2012; Servato y cols, 2013; Da-Costa y cols, 2012; observaron que no hay una predilección por sexo tanto para el AS como para el TOQQ.

### **Quiste dentígero**

Por otro lado, los quistes odontogénicos son cavidades patológicas recubiertas por epitelio, originados a partir de componentes epiteliales del aparato odontogénico o de restos celulares que quedan atrapados en el proceso de fusión dentro del hueso o en los tejidos gingivales periféricos (Mosqueda y cols, 2002).

La prevalencia de los quistes odontogénicos varía según distribución geográfica, sexo y edad. Estudios internacionales han reportado una prevalencia general 7–13% dentro de las lesiones del territorio maxilofacial (Prockt y cols, 2008). En Sicilia, Italia, de un 10,4% (Tortorici y cols, 2008). En Brasil, reportaron prevalencias entre 6,6 - 9,9%, (Lima y cols, 2008), mientras que en México, describieron un 11,5% (Avelar y cols, 2009).

Dentro de las lesiones quísticas odontogénicas más prevalentes se encuentran el quiste radicular y en un segundo lugar el quiste dentígero (Kambalimath y cols, 2014; Demirkol y cols, 2014). El quiste dentígero se clasifica como un quiste del desarrollo odontogénico de los maxilares por la OMS 1992 (Barnes y cols, 2005).

Estudios como, Prockt y cols, 2008 avalan estos índices con un primer lugar para el quiste radicular con un 72,5% y un 22,20% para QD. En un estudio realizado en

Francia, el año 2006 (Meningaud y cols, 2006), se reportó una prevalencia de 22,3% para el QD, ubicándolo en segundo lugar después del quiste radicular, al igual que el estudio de Avelar y cols, 2009, quienes describieron un 30,7% de estas lesiones.

Mosqueda y colaboradores (Mosqueda y cols, 2002), reportaron una mayor prevalencia de QD en la población masculina, 56,9%, al igual que los resultados obtenidos en Chile por Ochsenius y cols, 2007; con un 54,9% para el sexo masculino.

En cuanto a la localización anatómica del QD, estos han sido principalmente reportados en el maxilar superior, en caninos superiores (Tortorici y cols, 2008; Peters y cols, 2012).

Respecto a la década de vida afectada, en la literatura internacional, se describe una mayor prevalencia en la segunda década de vida, lo que es atribuible al proceso eruptivo de caninos y terceros molares, piezas más frecuentemente afectadas por esta entidad patológica (Ochsenius y cols, 2007).

En Chile, según el estudio de Ochsenius y cols, 2007; los quistes epiteliales odontogénicos de los maxilares corresponderían al 1,86% del total de muestras biopsiadas del territorio maxilofacial. En esta serie, el QD representa el segundo lugar de frecuencia entre todos los quistes odontogénicos con un 18,5%, siendo más frecuente en el sexo masculino 63%, entre la primera y segunda década de vida. Las piezas dentarias más afectadas fueron los terceros molares inferiores con un 28,9%.



## ***CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS – HISTOLÓGICAS - IMAGENOLÓGICAS DEL AMELOBLASTOMA SÓLIDO Y DEL TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO***

### **Características clínicas del ameloblastoma sólido**

La OMS considera al AM como un tumor odontogénico epitelial de los huesos maxilares, como una lesión sólida, de crecimiento lento, localmente agresivo, con una alta tasa de recurrencia sino es removido quirúrgicamente de manera adecuada y sin tendencia a dar metástasis (Barnes y cols, 2005). La OMS en el año 2002, recomienda dividir los tumores en cuatro categorías: benignos, intermedios (localmente agresivos), intermedios (muy infrecuentemente metastatizan) y malignos. Las lesiones intermedias localmente agresivas frecuentemente presentan recurrencia local, se asocian con un crecimiento infiltrativo, localmente destructivas, sin evidente potencial de metastatizar y típicamente requieren una gran excisión con un margen de tejido sano para asegurar un control local (Fletcher y cols, 2002).

La OMS el año 2005 clasifica al ameloblastoma en 4 subtipos clínicos patológicos: ameloblastoma uniuístico (AU), ameloblastoma sólido(AS), ameloblastoma periférico (AP) y ameloblastoma desmoplástico (AD) (Barnes y cols, 2005).

Aunque es poco común dentro de las patologías intraóseas de los huesos maxilares, el AS se considera dentro de los tumores odontogénicos más frecuentes, dependiendo de la localización geográfica del estudio (Barnes y cols, 2005; Varkhede y cols, 2011; Jing y cols, 2007; Tawfik y Zyada, 2010; Osterne y cols, 2011; Siriwardena y cols, 2012). 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 (Tawfik y Zyada, 2010; Gill y cols, 2011; Servato y cols, 2013).

Varkhede y cols, 2011, observaron que el ameloblastoma es más frecuente en la 3era y 4ta década de vida. Mientras que Siriwardena y cols, 2012 y Da-Costa y cols, 2012, observaron que el AS se presentan principalmente en la 3era década de vida.

Autores como Gaitán-Cepeda y cols, 2010; Ebenezer y Ramalingam, 2010; Varkhede y cols, 2011; Osterne y cols, 2011; Siriwardena y cols, 2012; Servato y

cols, 2013; Da-Costa y cols, 2012, en sus series de casos respectivos no encontraron predilección por sexo tanto para el AS como para el TOQQ, sin embargo se han descrito marcadas diferencias geográficas y étnicas, 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 el maxilar, en la región posterior y raramente en cavidades sinusales. (Barnes y cols, 2005). Tawfik y Zyada, 2010, observaron que el 94,11% de los ameloblastomas se ubicaron en mandíbula, de este porcentaje, un 35,29% se ubicaron en zona molar, 29,41% en ángulo y 14,7% en rama. Servato y cols, 2013 estudiaron 431 casos en niños y adolescentes de Brasil, observando que el 74,6% de los ameloblastomas se ubica en mandíbula, principalmente en la zona de molar y rama (61,9%).

Los AS de volumen reducido pueden ser eventualmente asintomáticos, sin embargo, las lesiones de gran volumen pueden provocar expansión y abombamiento de las corticales óseas de los huesos maxilares, y en el caso de la zona maxilar posterior, pueden obliterar el seno maxilar y con posterioridad, extenderse a nivel intracraneal. A pesar de esto el dolor y la parestesia son síntomas raros (Barnes y cols, 2005).

Dientes incluidos pueden estar asociadas con el AS, 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 e indetectable clínicamente en las etapas iniciales del tumor (Barnes y cols, 2005).

Debido al comportamiento localmente agresivo, a la capacidad de infiltrar los espacios medulares y de extenderse a tejidos blandos vecinos, el tratamiento debe incluir la excisión con un adecuado margen de tejido sano lo cual contribuirá a disminuir las recurrencias.

### **Características histológicas del ameloblastoma sólido**

El AS presenta características basadas en la predominancia de dos 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 (Barnes y cols, 2005; Morgan, 2011).

Las células epiteliales recién descritas, que remedan ameloblastos, se continúan con un epitelio pluriestratificado con relativamente pocos contactos intercelulares y un sobresaliente espacio extracecular centralizado, a menudo formado por microquistes, estas células, recuerdan al retículo estrellado del órgano del esmalte. Las células epiteliales de los ameloblastomas carecen de variación cromática en la tinción nuclear. Las figuras mitóticas son escasas en la mayoría de los ameloblastomas, de acuerdo con su lenta tasa de crecimiento (Barnes y cols, 2005; Morgan, 2011). 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". Estos 2 parámetros son referidos como folicular y plexiforme, respectivamente, sin embargo no hay evidencia que ellos difieran en la respuesta al tratamiento. De hecho, muchos ameloblastomas muestran ambos patrones en varias proporciones (Morgan, 2011).

### **Características imagenológicas del ameloblastoma sólido**

Radiográficamente el ameloblastoma ofrece una imagen radiolúcida, pudiendo presentar patrones variables. El más frecuente es el multilocular, donde la apariencia se describe en “pompas de jabón”; los límites de la imagen pueden ser lisos o presentar ciertas irregularidades. Otras veces la imagen es unilocular o asociada a un diente incluido, teniendo un aspecto muy semejante a un quiste dentífero o a otras entidades similares, lo que explica que su imagen radiográfica no sea patognomónica (Sandra y cols, 2005).

Según recientes artículos, las imágenes unilocular o multilocular son posibles en ambos tipos de ameloblastoma, sólo que en los ameloblastomas unikuísticos es más frecuente encontrar una imagen unilocular y en el sólido es más frecuente la multilocular (Sandra y cols, 2005).

La expansión de tablas óseas tanto vestibular como lingual es más común en ameloblastomas que en TOQQ. La reabsorción radicular de piezas vecinas puede o no estar presente. El diagnóstico diferencial radiográfico incluye principalmente TOOQ, mixoma odontogénico y lesión central de células gigantes.

La tomografía axial computarizada y la resonancia nuclear magnética pueden ser útiles para establecer la extensión y naturaleza quística de la lesión, especialmente cuando se localizan en el maxilar superior (Voorsmit, 1984).

### **Características clínicas del tumor odontogénico queratoquístico**

El TOQQ se clasifica en la actualidad según la OMS (2005), 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 anomalías genéticas (Barnes y cols, 2005).

El TOQQ comprende entre el 13% a 38,9% de todos los tumores odontogénicos, describiéndose diferencias según la localización geográfica del estudio (Da-Costa y cols, 2012; Gaitán-Cepeda y cols, 2010; Luo y Li, 2009; El-Gehani y cols, 2009; Avelar y cols, 2008). En los estudios de Avelar y cols, 2008; El-Gehani y cols, 2009 y Luo y Li, 2009, el TOQQ es el tumor odontogénico más frecuente, con el 30%, 35,1% y 38,7% respectivamente, seguido por el ameloblastoma y odontoma. En tanto en México, con un 38,9%, también es el tumor odontogénico más frecuente, seguido por el odontoma y el ameloblastoma respectivamente (Gaitán-Cepeda, 2010).

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 dolor (Morgan, 2011).

En estudios epidemiológicos no se han observado diferencias según sexo (Gaitán-Cepeda y cols, 2010; Ebenezer y Ramalingam, 2010; Varkhede y cols, 2011; Osterne y cols, 2011; Siriwardena y cols, 2012; Servato y cols, 2013; Da-Costa y cols, 2012).

El TOQQ, se presenta frecuentemente entre la 3era y 4ta década de vida, según estudios de Avelar y cols, 2008; Ebenezer y Ramalingam, 2010; Jing y cols, 2007; existiendo variaciones como la observada por Da-Costa y cols, 2012, siendo su

mayor frecuencia entre la 5ta y 6ta década de vida. Estos estudios no mencionan si se excluyeron lesiones asociadas al SNBC, sin embargo, Luo y Li, 2009 en un estudio de 1309 casos destacan que 45 de 462, fueron asociados al síndrome Nevo baso celular (SNBC) o de Gorlin- Goltz, obteniendo una mayor frecuencia en la 3era década de vida.

Boffano y cols, 2010 y González-Alva y cols, 2008; estudiaron 261 y 183 casos de TOQQ, respectivamente. Describieron un rango etario de 7-87 años y 6-78 años, con un pick entre la tercera y cuarta 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% respectivamente. Según Boffano y cols, 2010, un 52,1% de estos se presentaron en el región molar, ángulo y rama mandibular del total de los casos y según González-Alva y cols, 2008, encontraron un 41% en el área molar. Según González-Alva y cols, 2008 un 66,6% de las recurrencias fueron mujeres y sólo en 33,3% hombres. El rango de recurrencia se presentó entre 1 y 23 años posterior a la cirugía. Este último estudio determinó una asociación con el SNBC en el 6% de los casos, en tanto un 21,8% del total de estas lesiones se encontraron en relación a una pieza incluida.

El TOQQ se puede asociar al SNBC, el cual fue descrito por primera vez por Gorlin y Goltz en 1960, 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-q3. En ocasiones puede no presentarse con historia familiar por lo que el síndrome podría ser esporádico y generarse por mutación espontánea (Ahn y cols, 2004; Cobourne y cols, 2009).

Aun cuando la OMS en el año 2005 define al TOQQ como una lesión potencialmente agresiva e infiltrativa, una diferencia importante de esta lesión con el ameloblastoma sólido, es que el TOQQ presenta morfología quística y responde en la mayoría de los casos en forma exitosa frente al tratamiento de descompresión, el cual es una terapia muchísimo más conservadora que la resección que requieren los ameloblastomas sólidos.

### **Características histológicas del tumor odontogénico queratoquístico**

El TOQQ está formado por un epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado depapilado 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 a menudo es intensamente basófilo y puede orientarse lejos de la membrana basal. Otra característica importante distintiva es la paraqueratinización en la superficie luminal del epitelio, la cual a menudo presenta una superficie corrugada. En presencia de una intensa inflamación, esta lesión pierde sus características celulares y arquitecturales morfológicas más características (Barnes y cols, 2005).

Las figuras mitóticas suprabasales, inusuales para los quistes odontogénicos y para la mayoría de los TO benignos, pueden ser frecuentes. La unión entre tejido conectivo y epitelio es a menudo plano y a veces se encuentra separado de la membrana basal, pero en algunos casos puede mostrar un 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 importante de los casos (Barnes y cols, 2005; Morgan, 2011).

### **Características imagenológicas del tumor odontogénico queratoquístico**

El TOQQ se evidencia como una imagen radiolúcida uni o multilocular. Las corticales abomban y pueden adelgazarse, pudiendo desplazar las raíces de las piezas dentarias aunque es raro observar reabsorción de las mismas. Las características radiográficas del TOQQ no difieren de otros quistes odontogénicos con los que debe hacerse diagnóstico diferencial, así como con algunas lesiones tumorales que cursan con radiolucidez mandibular como el ameloblastoma (Bagan, 2011).

### **Características clínicas - histológicas - imagenológicas del quiste dentígero**

El quiste dentígero o folicular es clasificado por la OMS en 1992 como un quiste odontogénico del desarrollo, cavidad patológica que rodea la corona de un diente no erupcionado, sin comprometer la superficie radicular de dicha estructura dentaria. Se origina por alteración del epitelio del órgano del esmalte después de la formación completa de la corona por la acumulación de líquido entre las capas del epitelio reducido del órgano del esmalte o entre este y la corona dental (Kramer y cols, 1992; Al-Talabani y Smith, 1980).

El QD está siempre asociado a la corona de un diente en evolución intraósea. Suelen descubrirse por hallazgo radiográfico, son de crecimiento lento, expansivo y asintomático. Pueden provocar abombamiento de las corticales óseas, asimetría facial, desplazamiento dentario y resorción radicular de los dientes adyacentes (Olson y cols, 2000; Saap y cols, 1997).

Suelen ocurrir en la mandíbula con mayor frecuencia respecto al maxilar superior, afectando más comúnmente los terceros molares y los caninos en ambos maxilares. En el maxilar inferior a consecuencia de este quiste, en la zona molar puede llegar a producirse una resorción parcial de la rama ascendente, con el desplazamiento del molar y se caracteriza por un crecimiento expansivo, pero no infiltrativo. En el maxilar superior, en la zona del canino produce expansión de la porción anterior y puede semejar una celulitis o una sinusitis, aunque puede producir una sinusitis por invasión del antro sinusal. Puede también progresar hacia las fosas nasales y a la fosa pterigomaxilar produciendo dolor, infección y en ocasiones supuración y fístulas al exterior.

Suele haber mayor predominio en el sexo masculino sobre el femenino y una mayor incidencia de los 20 a 40 años de edad. (Ochsenius y cols, 2007; Martínez-Perez y Varela-Morales, 2001; Clauser y cols, 1994; Gardner, 1981; Johnson y Sapp, 1994; Medina, 1993).



Radiográficamente se observa una zona radiolúcida redondeada y bien circunscrita asociada a la corona de un diente sin erupcionar. El tratamiento es la enucleación quirúrgica donde su tasa de recurrencia es muy baja. El diagnóstico diferencial se realiza con ameloblastoma unicístico, TOQQ y tumor odontogénico adenomatoide (Regezi, 2002; Concha, 2002).

### ***CICLOXIGENASA 2 (COX-2) Y PROGRESIÓN TUMORAL***

La ciclooxigenasa es una enzima reguladora clave implicada en la conversión de ácido araquidónico a las prostaglandinas, particularmente la prostaglandina H<sub>2</sub> que es precursora de los prostanoides (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub>, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>), los cuales juegan un papel clave en varios procesos fisiológicos importantes tales como oncogénesis, inflamación, reproducción celular, apoptosis y metabolismo óseo. Se han descrito 2 isoformas de la ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2, con una homología del 60% y una afinidad y una capacidad para convertir el ácido araquidónico a PGH<sub>2</sub> de rango similar (Gallo y cols, 2002; Famaey 1997; Hla y Neilson, 1992).

La isoforma COX-1 se expresa de manera constitutiva en prácticamente todos los tejidos del organismo y se le atribuye un papel regulador en la homeostasis fisiológica de los diferentes órganos o tejidos, que incluye la citoprotección gástrica, la vasodilatación renal y la producción de prostanoides proagregantes y tromboxano en las plaquetas (Dubois y cols, 1998).

Por otro lado, la isoforma COX-2 si bien es constitutiva en algunos tejidos como el cerebro, riñón u ovario, es inducible, lo que significa que sea prácticamente indetectable en la mayoría de tejidos en condiciones basales, mientras que su expresión aumenta en respuesta a las citoquinas, factores de crecimiento y mitógenos (Noguera y cols, 2006).

Se ha demostrado que existe una expresión de COX-2 en células epiteliales neoplásicas en una amplia variedad de diferentes tipos de tumores humanos (Mohan y Epstein, 2003), particularmente aquellos que involucran el esófago, estómago, mama, páncreas, pulmón, colon, piel, vejiga urinaria, próstata y tumores de cabeza y cuello (Abraham y cols, 2010; Greenhough y cols, 2009; Molinolo y cols, 2007).

Por lo tanto, la expresión de COX - 2 se inducirá en condiciones fisiopatológicas, tales como los estímulos inflamatorios y oncogenes, mediante la unión a un receptor de superficie acoplado a la proteína G que conduce a cambios de AMP cíclico intracelular y calcio (Mendes y cols, 2009; Mohan y Epstein, 2003; Feller y cols, 2013).

La literatura ha demostrado la evidencia que la sobreexpresión de la COX-2 juega un papel importante en el crecimiento tumoral y en la diseminación de éstos interfiriendo con diferentes procesos biológicos tales como la proliferación, adhesión celular, vigilancia inmunológica, apoptosis y angiogénesis (Mendes y cols, 2009).

La importancia de la COX-2 en la tumorigénesis se demostró primero en modelos de roedores con poliposis adenomatosa familiar, una enfermedad genética que conduce al cáncer gastrointestinal, en el que la pérdida de la actividad COX-2 por supresión genética o la inhibición enzimática selectiva suprimiría la formación de pólipos intestinales (Zweifel y cols, 2002).

La evidencia adicional para la importancia de la COX-2 en la tumorigénesis se informó por Liu y cols, 2001, quienes demostraron que la sobreexpresión de COX-2 en la glándula mamaria de ratones transgénicos condujo a la tumorigénesis.

La activación de COX-2 ha demostrado ser un evento temprano durante carcinogénesis, y el aumento de su expresión se ha asociado con el desarrollo de una inestabilidad genómica (Mohan y Epstein, 2003; Kutchera y cols, 1996; Hida y cols, 1998).

La acumulación de pruebas sugiere que la sobreexpresión de COX-2 está implicada en el crecimiento del tumor al interferir con diferentes procesos biológicos (Suyama y cols, 2008; Oshima y cols, 1996; Feller y cols, 2013). Incluso existen evidencias de que en los pacientes con adenomatosis poliposa familiar tratados con inhibidores de COX-2 como, Celecoxib, disminuyen el riesgo de transformación maligna (Reddy y cols, 2000).

La expresión de COX-2 podría entregar evidencia sobre la fisiopatología y el comportamiento clínico de los tumores de la cabeza y cuello, incluyendo neoplasias odontogénicas benignas de los maxilares con comportamiento agresivo, como el Ameloblastoma y el tumor odontogénico queratoquístico. En última instancia, la investigación de marcadores moleculares asociados con el comportamiento biológico de los tumores nos ayudará a entender los mecanismos moleculares subyacentes y así poder predecir el resultado clínico, para el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas y así una mejor adaptación del paciente al tratamiento (Mendes y cols, 2009).

Sin embargo, todavía siguen siendo poco conocidos los mecanismos tumorigénicos de la sobreexpresión de COX-2 y los mecanismos que pueden actuar en las diferentes etapas de la enfermedad.

### ***COX-2 INFLAMACIÓN E INMUNOSUPRESIÓN***

Los mediadores inflamatorios tales como citoquinas, eicosanoides y factores de crecimiento desempeñan un papel crítico en el mantenimiento, supervivencia y proliferación de células tumorales (Zweifel y cols, 2002; Lin y cols, 2002). La regulación de la expresión COX-2 es fisiológicamente vital para la síntesis de PGE2 (Suyama y cols, 2008; Ogata y cols, 2007). La síntesis incrementada de prostaglandinas, como consecuencia de la sobreexpresión de COX-2, puede aumentar la proliferación celular, la promoción de la angiogénesis y la inhibición de la vigilancia inmunológica anti tumoral (Zweifel y cols, 2002; Chan y cols, 1999; Sheng y cols, 1998; Tsuji y cols, 1998).

La interleucina-1a (IL-1 a) es un citoquina multifuncional pro-inflamatoria, se expresa fuertemente en las células epiteliales de tumores odontogénicos queratoquísticos.

IL-1 estimula la producción de prostaglandina E2 (PGE2) en células mesenquimales, incluyendo fibroblastos tumores odontogénicos queratoquísticos, que luego estimula la osteoclastogénesis mediante el aumento de la expresión de la activación del ligando de receptor activador para el factor nuclear Kappa B (RANKL) (Suyama y cols, 2008; Ogata y cols, 2007; Mifflin y cols, 2002; Oka y cols, 2005).

## **PROLIFERACIÓN CELULAR**

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) (Gerdes y cols, 1983).

Los métodos inmunohistoquímicos usados en la evaluación de proliferación celular 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 resultados (Shear "a", 2002; Shear "b", 2002).

La proteína Ki-67 o MIB-1 es un antígeno que se determina mediante el anticuerpo monoclonal desarrollado por Gerdes y colaboradores en 1983. Esta proteína nuclear no histónica se expresa en todas las fases del ciclo celular excepto en G<sub>0</sub>, 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 tejido. La expresión de Ki-67 ha sido descrita como un óptimo marcador de proliferación celular en lesiones premalignas y malignas epiteliales, siendo uno de los más confiables y utilizados en la actualidad. El anticuerpo monoclonal Ki-67 detecta un antígeno nuclear que se expresa exclusivamente en las células que entran al ciclo celular (fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y mitosis) pero no en G<sub>0</sub>, por lo es útil para evaluar la tasa de proliferación en tumores. Permite evaluar fácil y rápidamente la proporción de células que proliferan en un tumor, ya que determina la fracción de crecimiento de una población celular. Ha demostrado también ser un buen marcador de recidiva de lesiones tumorales y se ha correlacionado con estadios TNM más avanzado y metástasis. Migaldi y cols, 2008; Lothaire y cols, 2006; Kuroyanagi y cols, 2009).

Estudios anteriores al año 2005, han estudiado la expresión de Ki-67 en el epitelio de queratoquistes odontogénicos respecto a otros quistes odontogénicos (De Manzoni y cols, 1998; Bongers y cols, 1996; Lamaroon y cols, 2004; Sloomweg 1995; Kim y cols, 2003). Estudios comparativos entre queratoquistes odontogénicos y quistes dentígeros han demostrado un incrementado potencial proliferativo del revestimiento epitelial del queratoquiste odontogénico comparable al del ameloblastoma (Li y cols, 1995).

Suluk y cols, 2012, han comparado la expresión de Bax, Bcl-2 y Ki-67 en TOQQ, quiste radicular y ameloblastomas. En el caso de Ki-67, se observó una expresión mayor en TOQQ luego en ameloblastomas y por último quistes radiculares, a su vez, los AM mostraron una expresión 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 AM 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 recurrencia (Suluk y cols, 2012).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### ***HIPÓTESIS***

Existe una sobreexpresión de COX-2 y de la proteína Ki-67 en las células epiteliales de ameloblastoma sólido, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero.

### ***OBJETIVO GENERAL***

Determinar la expresión de COX-2 y Ki-67 en ameloblastoma sólido, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero de muestras obtenidas del Biobanco del departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile entre los años 1997 - 2010.

### ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

- Cuantificar, la expresión de COX-2 y Ki-67 mediante inmunohistoquímica en el epitelio de ameloblastoma sólido, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero.
- Comparar la expresión de COX-2 y Ki-67 mediante inmunohistoquímica en el epitelio de ameloblastoma sólido, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***TIPO DE ESTUDIO REALIZADO***

Estudio observacional descriptivo transversal

### ***ASPECTOS ÉTICOS***

Este proyecto de tesis está adscrito del Proyecto de Investigación FIOUCh 13-003 cuyo protocolo de estudio fue aprobado por el comité ético científico de la Facultad de Odontología (21/08/2013) y el comité institucional de bioseguridad campus norte (BID) (20/10/2013) (Ver Anexo N°2, pág 81).

### ***UNIVERSO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA***

Del Biobanco del departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile se seleccionaron 28 muestras entre los años 1997 y 2010 (10 muestras de AS, 10 muestras TOQQ y 8 muestras de QD), según criterios de inclusión y exclusión del estudio. El muestreo correspondió al tipo no probabilístico por conveniencia.

#### **A) Criterios de inclusión**

Muestras que correspondan a los siguientes diagnósticos histopatológicos definitivos: ameloblastoma sólido, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero según la OMS 2005.

#### **B) Criterios de exclusión**

- Muestras que dispongan información clínica incompleta en relación a edad, sexo y localización anatómica.
- Muestras de TOQQ asociadas al Síndrome Nevo Basocelular o Síndrome de Gorlin-Goltz.
- Muestras que correspondan a recurrencias y/o recidivas post-tratamiento quirúrgico, según la revisión de las fichas de las biopsias de los registros.

- Para las pruebas de Inmunohistoquímica, las muestras que dispongan de escaso epitelio y/o presenten inflamación moderada a severa, y/o muestras con sobreinfección y/o epitelio hiperplásico para los TOQQ,

## **VARIABLES DEL ESTUDIO**

Definiciones operacionales:

- I. Sexo: El sexo del paciente será determinado por el registro de la ficha de biopsia de cada individuo: femenino o masculino.
- 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: Corresponderá según los criterios diagnósticos histopatológicos para AS, TOQQ y QD, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud año 2005.

## **PROCEDIMIENTOS**

### **Recolección de muestras**

Se obtuvieron bloques de parafina de las muestras registradas en la base de datos digital del Biobanco del departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile entre los años 1997 y 2010 para las lesiones que presenten el diagnóstico histopatológico de AS, TOQQ y QD, luego se realizaron procedimientos de laboratorio correspondientes a la obtención de nuevas laminillas para tinción hematoxilina/eosina. Posteriormente, se reevaluaron según los criterios histopatológicos a microscopía óptica a distintos aumentos (objetivos: 10x, 40x y 100x). Estas observaciones microscópicas se realizaron en forma ciega, en un microscopio Olympus BX41. Del universo de muestras se seleccionaron 28 muestras (10 muestras AS, 10 muestras TOQQs y 8 muestras de QD) según criterios de inclusión y exclusión.



### **Recopilación 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 Biobanco del departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (*Microsoft®Access2003*). La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa Microsoft Office: Microsoft Excel 2007.

### **Anonimización de la información y datos personales**

La información disponible en las fichas clínicas de los pacientes, registradas en el Biobanco del departamento de Patología y Medicina Oral, asignadas a las muestras del estudio que comprendieron variables demográficas (edad, sexo, nacionalidad, fecha de nacimiento y estado civil) y datos personales (nombres, apellidos, registro único tributario (RUT), domicilio, número telefónico, profesión o actividad y previsión social) fueron anónimas, mantenidas en estricta confidencialidad y no fueron utilizadas con fines comerciales y/o divulgación a terceros. Solamente las variables edad y sexo del paciente fueron utilizadas en el estudio con fines estadísticos descriptivos de la investigación.

### **Muestra biológica codificada o reversiblemente disociada**

Las muestras biológicas fueron codificadas por personal externo al estudio mediante cegamiento simple (los miembros del estudio desconocieron la asignación de los códigos). Las muestras no podían asociarse por los investigadores a una persona identificada o identificable al sustituirse o desligarse la información que identificaba al paciente.

Los códigos fueron asignados a cada muestra de manera aleatoria mediante una clave alfanumérica, ejemplo: I.01; I.02; I.03, etc. Esta asignación de códigos la realizó personal externo al proyecto de investigación. En esta operación se registró de manera digital y escrita en un formulario, el código del registro de la muestra biológica del Biobanco del departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y la nueva clave que se asignó a este código en la codificación, de tal manera de revertir esta operación, con el

objetivo de devolver las muestras biológicas al Biobanco una vez finalizada la etapa experimental del estudio y preservar la asociación de estas con la base de datos del registro. La devolución y descodificación también fue realizada por personal externo al estudio.

## **Procesamiento**

### ***Inmunohistoquímica y Procedimiento de Laboratorio***

1. Se seleccionaron 10 bloques de parafina de biopsias de tumor odontogénico queratoquístico solitario, 10 bloques de parafina de ameloblastoma sólido y 8 bloques de parafina para QD. Estas muestras han sido fijadas en formalina al 10% y procesadas para técnica histológica convencional.
2. Se realizaron secciones de 4  $\mu\text{m}$  de espesor en un micrótopo de rotación Reichert-Jung, obteniendo 4 cortes de cada muestra, dos para cada uno de los anticuerpos utilizados, una para H/E y una para el control negativo, los que fueron montados en portaobjetos silanizados (3-Aminopropyltriethoxysilane, Polysciences, Inc., U.S.A.). Luego estas placas se llevaron a la estufa de secado por 1 hora a 60°C y se dejaron toda la noche a 37°C.
3. Las placas fueron desparafinadas e hidratadas mediante una batería consistente en 2 baños de xilol (15 minutos cada una), 2 inmersiones de alcohol de 99° (15 minutos cada una), otros 2 baños de alcohol de 95° (10 minutos cada una), 1 baño de agua corriente (5 minutos) y por último una inmersión de agua destilada. ( 5 minutos)
4. Las muestras se delimitan con lápiz hidrófobo, para luego someterlas a lavados con PBS (Buffer fosfato salino) PH 7.4 por 10 minutos en vaso coplin vertical. Posteriormente se realiza la recuperación de los sitios antigénicos a través de calor húmedo con vaporera (precalentada previamente 20 minutos) con buffer citrato a PH 6,0. Se exponen a vapor por 20 minutos para después dejar enfriar las muestras en frezeer (-4°) por 20 minutos o hasta llegar a los 20°C.

5. A continuación se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% (Metanol), por 20 minutos, para luego realizar lavado con buffer PBS PH 7,4 en vaso coplin vertical por 30 minutos.
6. 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 COX-2 monoclonal antibody (BSB 5842, Bio SB, Santa Barbara, California).
7. Se sometieron a lavados con PBS (30 minutos en vaso coplin vertical) entre cada etapa. Se realizó contra tinción con hematoxilina, hidratación en alcoholes ascendentes (96° y absoluto) y xilol para terminar con el montaje de la muestras.
8. Para la inmunodetección se utilizó el método Avidina-Biotina-Peroxidasa y revelado con DAB (BSB 0203, Bio SB, Santa Barbara, California).

**Descripción de los anticuerpos utilizados:**

ANTICUERPO	TIPO	CLON	ISOTIPO	CATAL.N°	TIPO ANTIC	DILUCIÓN	LOCALIZ
COX-2	Conejo monoclonal	RNT-COX-2	Ig G	BSB 5362	Concentrado	1:100	Citoplas.
KI-67	Conejo monoclonal	EP5	Ig G	BSB 5712	Concentrado	1:50	Nuclear

### **Controles positivos y negativos**

Se emplearon las siguientes muestras para los controles positivos:

- COX-2: Adenocarcinoma de colon
- Ki-67: Carcinoma de células escamosas de mucosa bucal

Para los controles negativos se omitió el anticuerpo primario y secundario en las muestras empleadas como controles positivos y fue reemplazado por solución PBS PH 7,4.

### **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.

Se evaluaron los siguientes estratos del revestimiento epitelial: basal, suprabasal, intermedio y superficial. El índice de Proliferación (IP) en el caso de Ki-67 o el índice de marcación (IM) para COX-2, se obtuvo a través de una microfotografía a 40X realizada en microscopía óptica convencional (Olympus BX41), en 5 campos por caso estudiado. Este método semi-cuantitativo se basó en el empleado por Dong y cols, 2010. El conteo de células marcadas de la zona seleccionada se realizó a través del programa Micrometrics SE Premiun donde se contabilizaron las células positivas en el epitelio para los anticuerpos respectivos para posteriormente dividir por el total de células contabilizadas por campo, para después multiplicar por 100 y así obtener el porcentaje. La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa Microsoft Office: *Microsoft Excel 2007*.

Este recuento se realizó en forma ciega por dos observadores. Para cuantificar el grado de concordancia de los examinadores se realizó el Test estadístico de Kappa, recomendado por Landis y Koch, 1977, el cual dio un coeficiente de 0,78 lo que permitió afirmar que existe una fuerza de concordancia “considerable” según la tabla de expresión cualitativa.

Para realizar el análisis de los resultados para COX-2, se categorizó en subgrupos según IM observado en 5 campos (40x) por cada muestra, ya que los rangos de IM eran muy distantes entre sí.

La categorización se realizó en 4 grupos:

- Nulo, cuando no existía expresión de COX-2.
- Leve, cuando se encontró 0,1- 20% de intensidad en el epitelio.
- Moderado, entre 20,1 - 50% de intensidad en la tinción.
- Severo, cuando la expresión de COX-2 era > al 50,1% en el epitelio.

La intensidad de marcación para considerar positiva la expresión de COX-2 es similar a la tinción de células inflamatorias correspondientes a macrófagos y linfocitos B activados (como patrón para valorar la positividad en la inmunomarcación citoplasmática de las células epiteliales de los TO).

Para el análisis de la expresión de Ki-67, no se categorizaron los resultados, solo se utilizó el IP como tal, el cual corresponde al igual que para COX-2 el IM que es el cociente entre las células positivas y el total de células.

### ***ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN***

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

A través del Test de Shapiro-Wilk se determinó la distribución no paramétrica para las variables índice de proliferación para Ki-67 e índice de marcación para COX-2 en TOQQ, AS y QD. Posteriormente se utilizó U-Mann Whitney-Wilcoxon para comparar las frecuencias de expresión de marcación existente entre los grupos TOQQ, AS y QD para células marcadas con inmunohistoquímica en los campos observados.

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

## RESULTADOS

### ***CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA***

Del universo de 145 casos registrados en el Biobanco del departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile entre los años 1997 y 2010, seleccionamos 10 muestras las cuales corresponden a diagnósticos histopatológicos de ameloblastoma sólido, también de un total de 356 biopsias de tumor odontogénico queratoquístico de tipo solitario, se seleccionaron 10 muestras y de un último universo de 155 casos para Quiste dentígero se seleccionaron 8 muestras, según criterios de inclusión y exclusión del estudio.

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 nos permitieron obtener 5 campos a 40X. Esto resultó en 10 muestras de AS, 10 de TOQQ y 8 de QD para el estudio inmunohistoquímico.

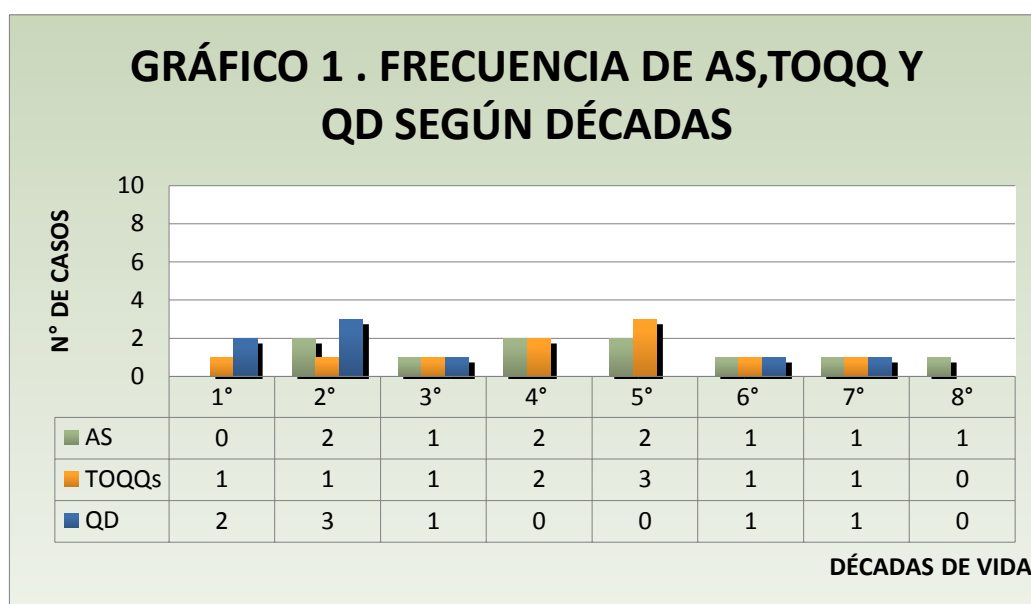
#### **Características Demográficas:**

La muestra quedó constituida por, 5 mujeres y 5 hombres en el caso de AS, 6 mujeres y 4 hombres en el caso de TOQQ, 3 mujeres y 5 hombres en el caso del QD. Ver Tabla 1.

El rango de edad para AS va de 16 a 75 años, distribuyéndose entre la 2da y 8va década, con un promedio de 41,5  $SD \pm 20$  y una mediana de 39,5 años. En el caso de TOQQ, se presentó entre los 9 y 67 años, encontrándose la mayoría de los pacientes entre la 4ta y 5ta década, con un promedio de 37,1  $SD \pm 18$  y una mediana de 38 años. El QD se presentó entre los 7 y 63 años, distribuyéndose mayoritariamente en la primera década, con un promedio de 24  $SD \pm 22,2$  años, y una mediana de 12,5 años.

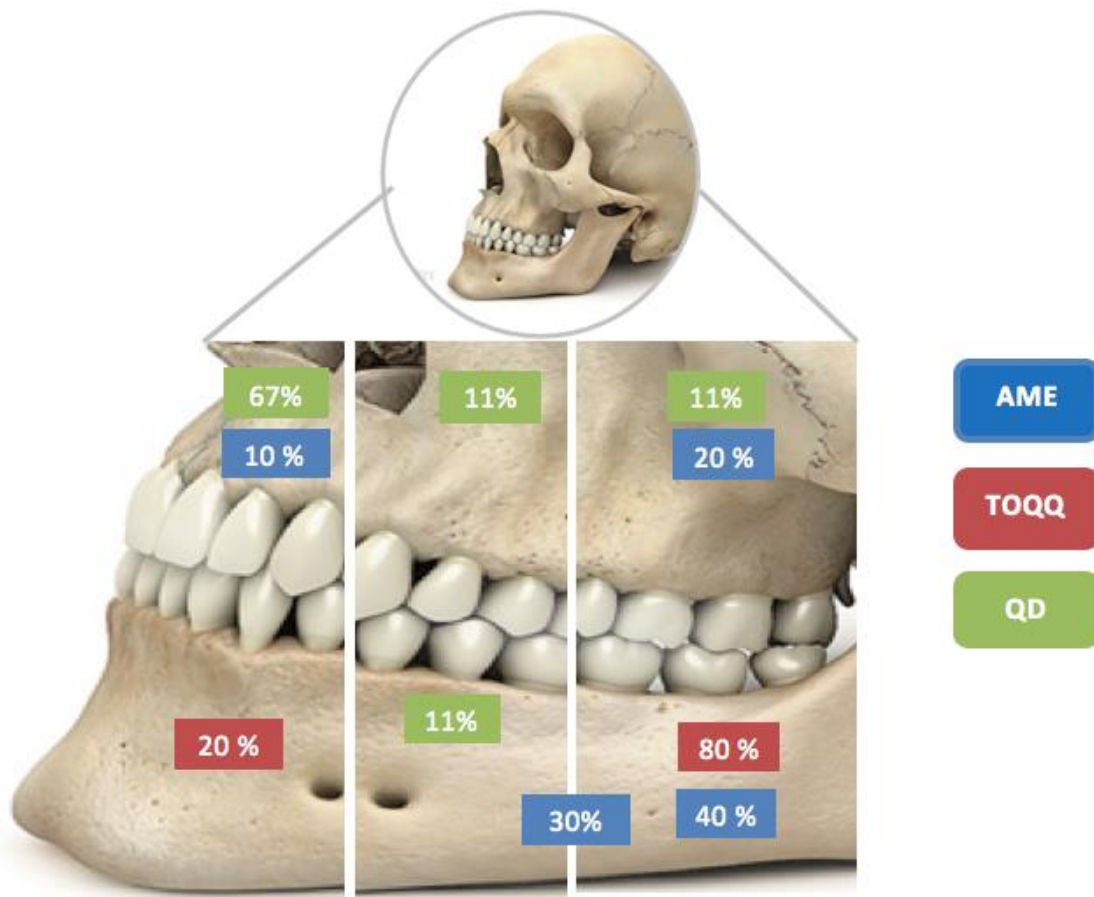
LESIÓN	RELACIÓN HOMBRE: MUJER	PROMEDIO Y RANGO DE EDAD (AÑOS)	MEDIANA (AÑOS)	RELACIÓN MAXILAR: MANDIB.
AS	1:1	41,5 SD±20 (16-75)	39,5	1:2,33
TOQQ	1:1,5	37,1 SD±18 (9-67)	38	0: 10
QD	1,66:1	24 SD±22,2 (7-63)	12,5	7:1

**Tabla 1.** Relación hombre: mujer; promedio, rango etario y mediana; y relación maxilar: mandibular para ameloblastoma sólido (AS), tumor odontogénico queratoquístico (TOQQ) y quiste dentígero (QD).



**Gráfico 1:** Frecuencia de AS, TOQQ y QD según décadas.

El AS se localizó principalmente en los siguientes sectores: sector posterior y premolar mandibular con un 70% en total, en el maxilar en la zona posterior un 20% y un 10% en la zona anterior. La región más frecuente en el caso del TOQQ fue la zona mandibular posterior con un 80% y un 20% en la zona anterior mandibular. El QD mayoritariamente se encontró en el maxilar asociados a canino e incisivo central en el sector anterior, luego en la zona de premolares y molares asociados a primer molar y primer premolar y en la zona mandibular solamente asociado a segundo premolar en la zona de pm. Ver Fig.1



**Figura 1.** Localización anatómica de ameloblastoma sólido, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentífero.



### ***CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE AS, TOQQ, QD Y CONTROLES***

Previo al estudio inmunohistoquímico se observó previamente las distintas muestras más sus respectivos controles positivos y negativos, con tinción hematoxilina-eosina. Ver Fig 2.

En todas estas muestras se encontraban zonas sin inflamación o inflamación muy escasa y ausencia de necrosis, lo que se explicita en los criterios de inclus y exclusión

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

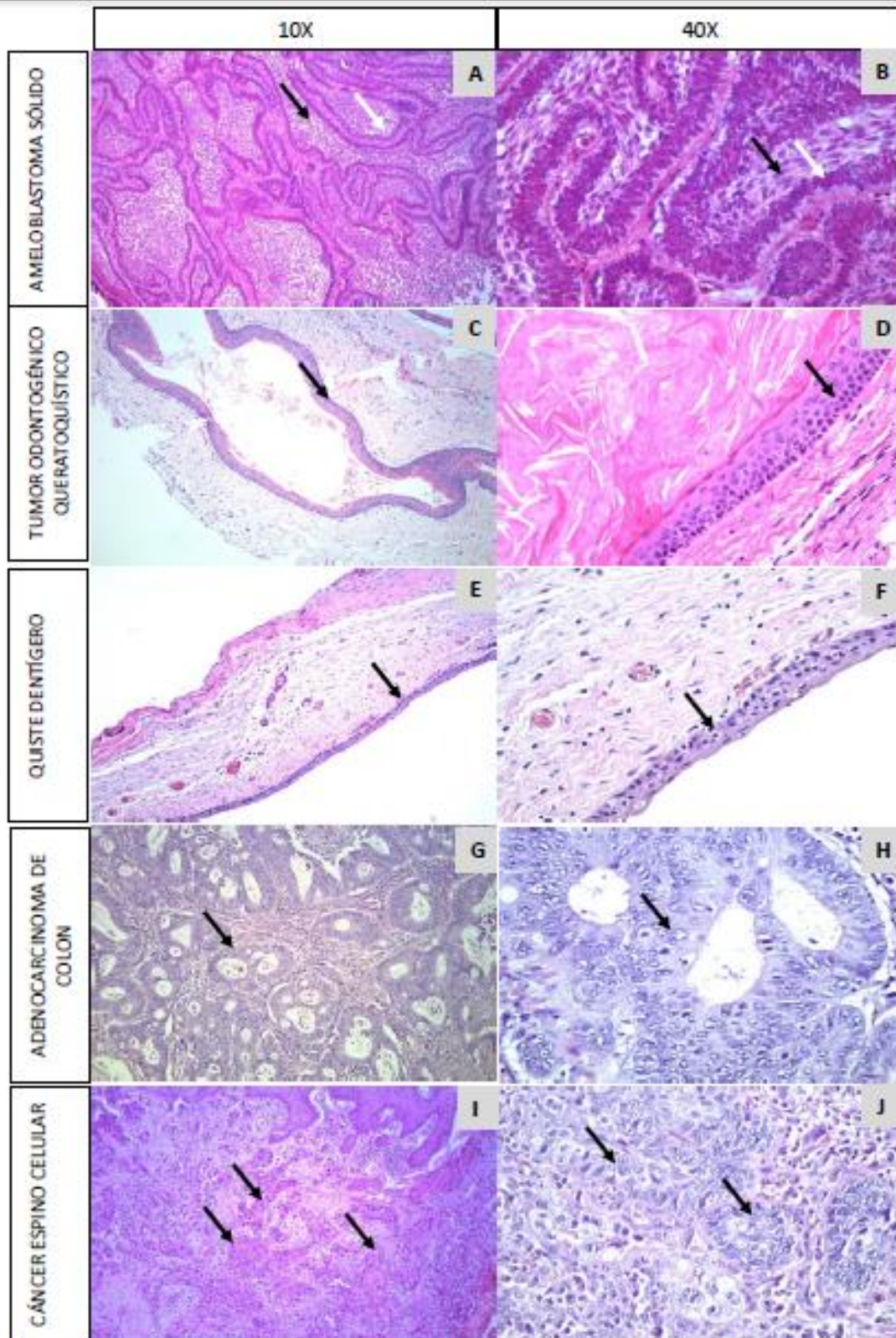


Figura 2. Ameloblastoma sólido, Tumor odontogénico queratoquístico, Quiste dentígero y controles con técnica histológica corriente, tinción hematoxilina-eosina.

### **CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE KI-67 Y COX-2 EN AMELOBLASTOMAS SÓLIDOS.**

Los 10 casos de AS presentaron marcación positiva para los 2 anticuerpos en estudio en el epitelio odontogénico neoplásico. Las proteínas Ki-67 se detectaron a nivel nuclear, mientras que COX-2 se observó a nivel citoplasmático. En los AS se observó marcación de Ki-67 predominantemente en las células columnares periféricas, en tanto, las células que asemejan el retículo estrellado presentaron menor marcación. Ver Fig.3

El promedio de marcación del total de células epiteliales evaluadas en 5 campos por caso, fue de un 7,012 %  $SD \pm 4,5$  para Ki-67 y para COX-2 fue de 36,82%,  $SD \pm 21$  junto con este IM se realizó una clasificación en diferentes categorías (Leve, Moderado, Severo) por su amplio rango de expresión. Ver Tabla.2

Casos AS	IP Ki-67 %	IM COX-2 %	Categorización COX-2
1	5,67	18,88	Leve
2	17,93	37,76	Moderado
3	6,27	15,74	Leve
4	9,18	17,94	Leve
5	3,45	67,02	Severo
6	4,63	11,9	Leve
7	10,6	48,46	Moderado
8	5,64	64,66	Severo
9	3,28	75,38	Severo
10	3,47	10,5	Leve
<b>Promedio</b>	<b>7,012 <math>SD \pm 4,5</math></b>	<b>36,82 <math>SD \pm 21</math></b>	<b>Moderado</b>

**Tabla 2.** Índice de proliferación y marcación para cada una de las lesiones de AS y promedios finales para Ki-67 y COX-2 (categorización)

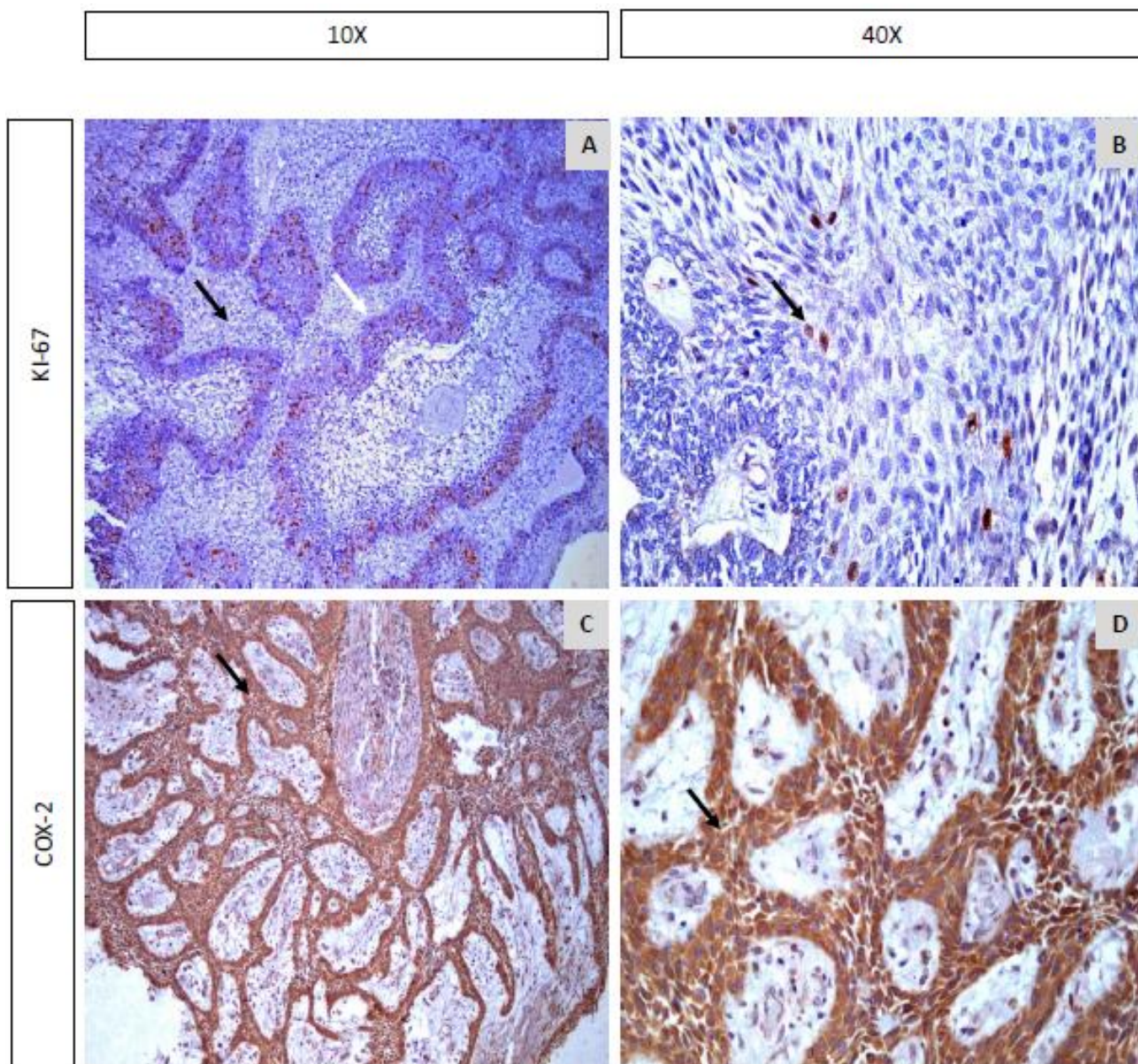


Figura 3. Marcación inmunohistoquímica de Ki-67 y COX-2 en Ameloblastoma Sólido (AS) a 10X y 40X.

### **CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE KI-67 Y COX-2 EN TOQQ**

Los 10 casos de TOQQ presentaron marcación positiva para el anticuerpo y la enzima en el epitelio odontogénico en los distintos campos evaluados. Ki-67 presentó distribución nuclear y COX-2 localización citoplasmática, al igual que en AS. En TOQQ la proteína Ki-67 fue observada principalmente en estratos suprabasales del epitelio. Ver Fig 4.

El índice de marcación promedio de células epiteliales positivas fue de un 12,28% SD± 3,0 para Ki-67, y para COX-2 de 43,11 % SD± 26 (Moderado). Ver Tabla 3

Casos TOQQ	IP Ki-67 %	IM COX-2 %	Categorización COX-2
1	13,18	18,88	Leve
2	7,59	12,52	Leve
3	8,74	26,14	Moderado
4	11,72	76,54	Severo
5	17,54	64,6	Severo
6	12,12	71,66	Severo
7	15,71	73,88	Severo
8	11,11	15,2	Leve
9	13,99	39,8	Moderado
10	11,1	31,9	Moderado
<b>Promedio</b>	<b>12,28 SD± 3,0</b>	<b>43,11 SD± 26</b>	<b>Moderado</b>

**Tabla 3.** Índice de proliferación y marcación de cada una de las lesiones de TOQQ y promedios para Ki-67 y COX-2 (Categorización)

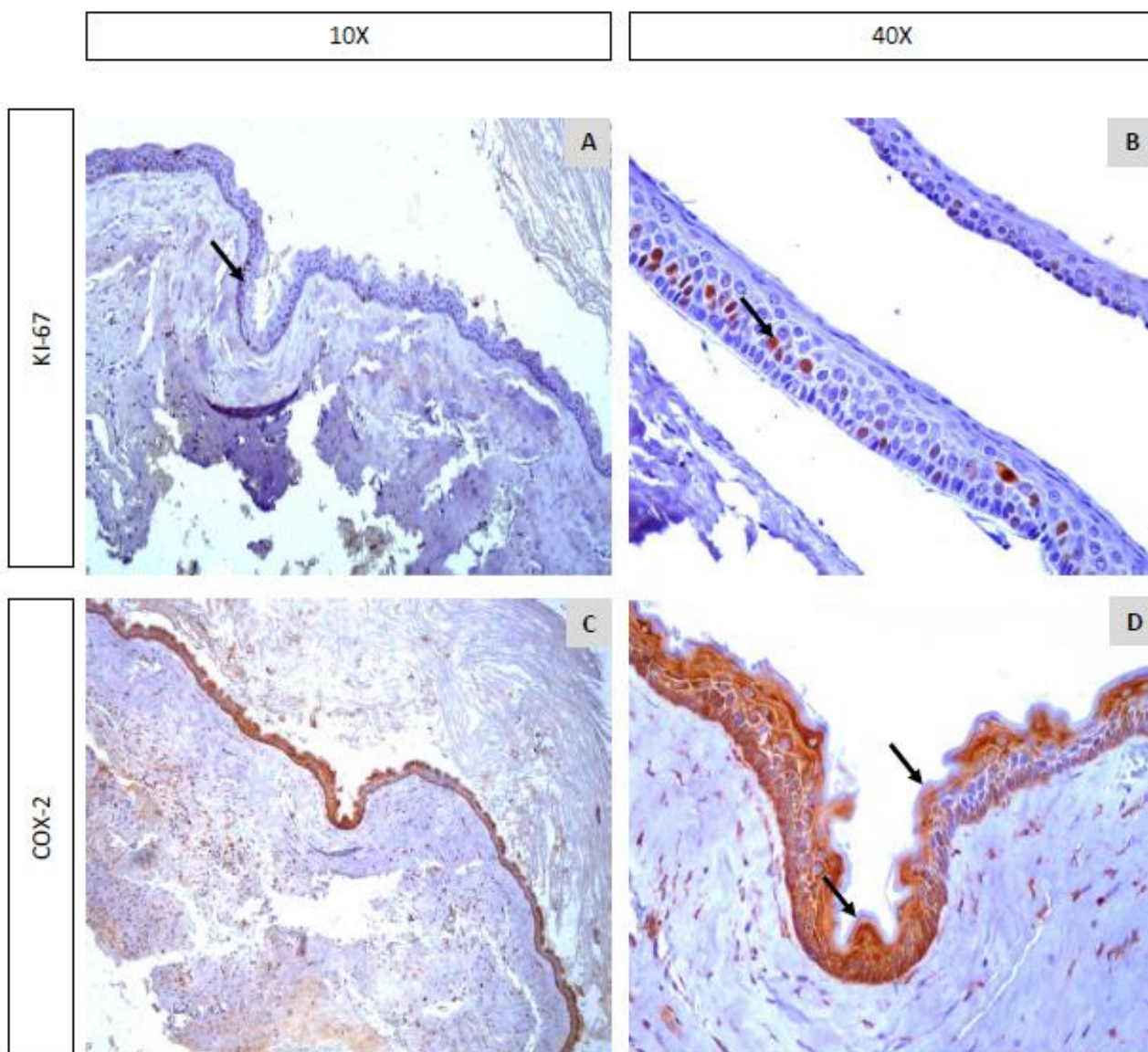


Figura 4. Marcación inmunohistoquímica de Ki-67 y COX-2 en Tumor Odontogénico Queratoquístico (TOQQ) a 10X y 40X.

### **CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE KI-67 Y COX-2 EN QD**

De los 8 casos de QD, 7 de éstos presentaron marcación positiva para Ki-67 con un IP promedio de 2,41% SD± 2,7 y para COX-2 que tiene una expresión citoplasmática tuvo un IM promedio de 14,86% SD± 6,3 (Leve). Ver Tabla 4.

Casos QD	IP Ki-67 %	IM COX-2 %	Categorización COX-2
1	6,31	9,32	Leve
2	0	18,22	Leve
3	0,5	39,7	Moderado
4	0,68	14,4	Leve
5	5,55	0	Nulo
6	0,5	7,6	Leve
7	4,87	16,36	Leve
8	0,87	13,35	Leve
<b>Promedio</b>	<b>2,41 SD± 2,7</b>	<b>14,86 SD±6,3</b>	<b>Leve</b>

**Tabla 4.** Índice de proliferación y marcación para cada una de las lesiones de QD y promedios finales para Ki-67 y COX-2

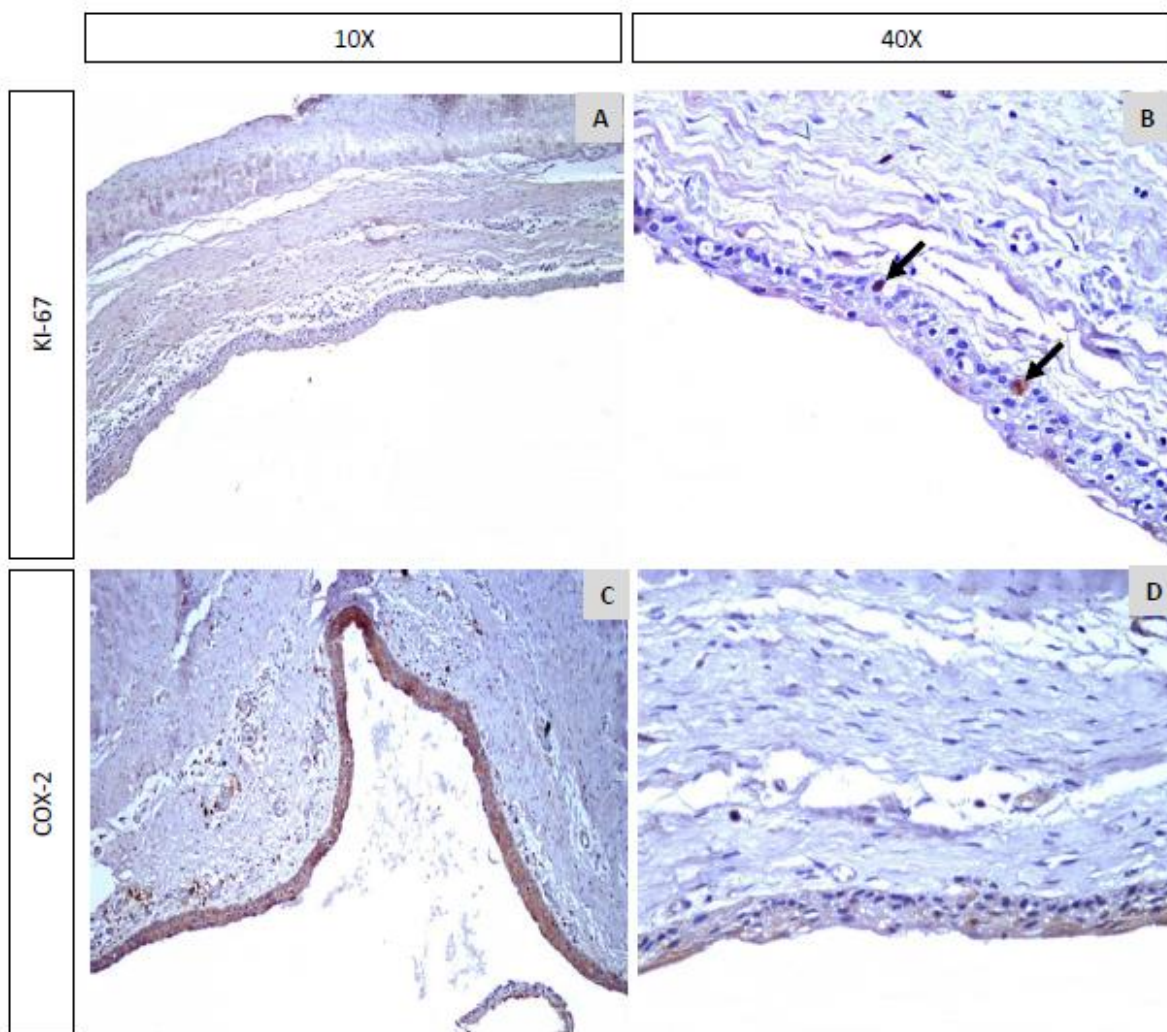


Figura 5. Marcación Inmunohistoquímica para KI-67 y COX-2 en Quiste Dentigero (QD) a 10X y 40X.



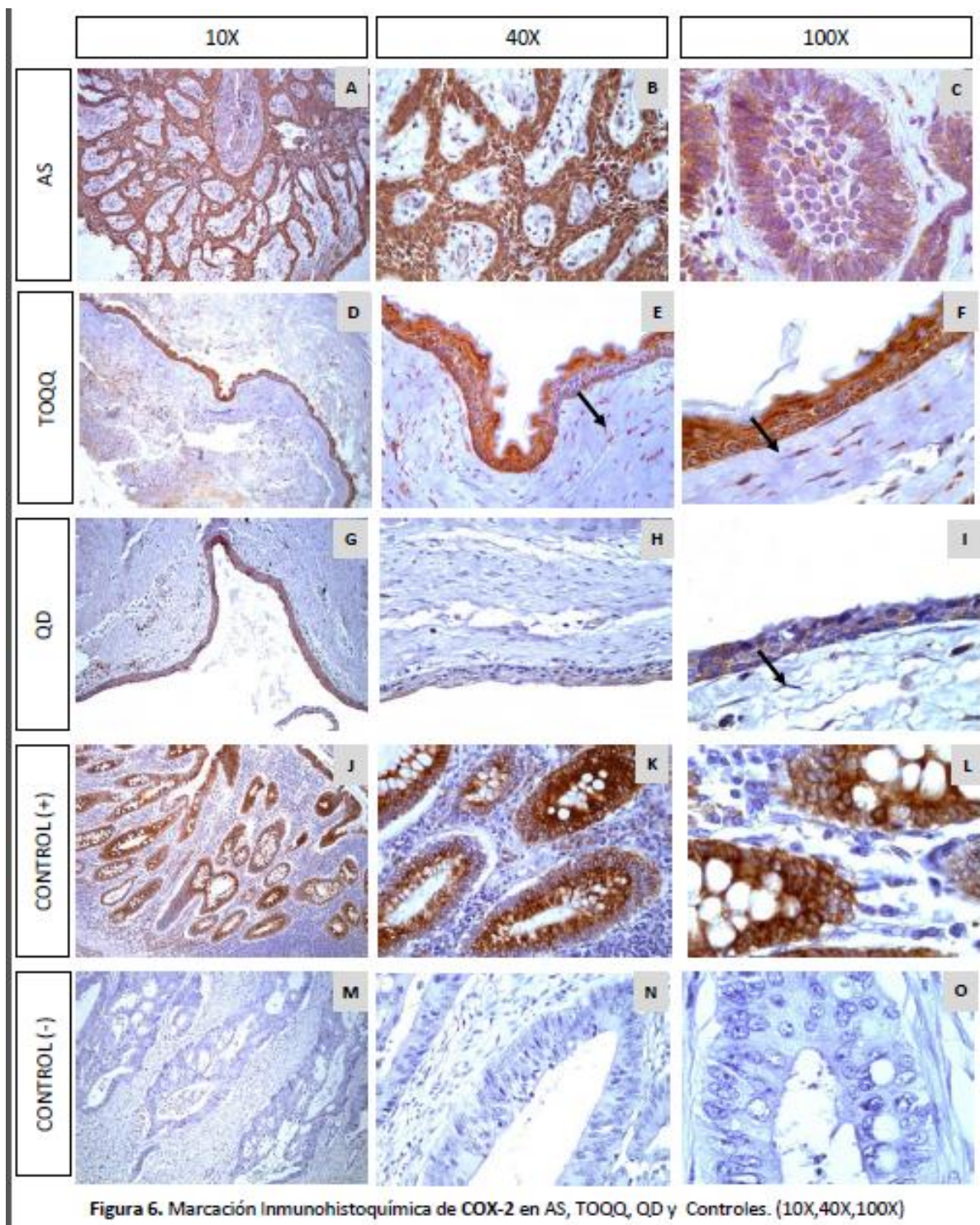


Figura 6. Marcación Inmunohistoquímica de COX-2 en AS, TOOQ, QD y Controles. (10X,40X,100X)

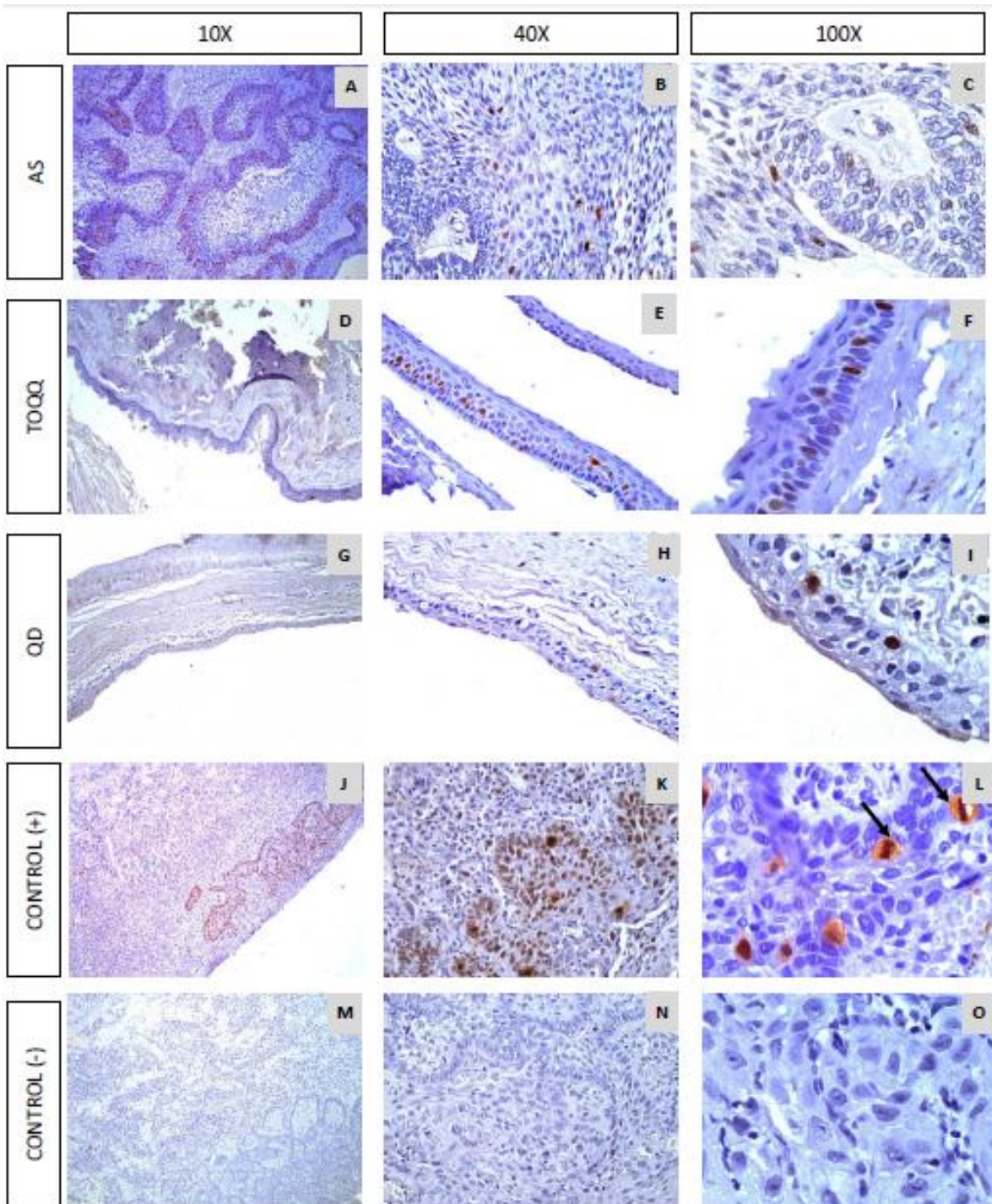


Figura 6. Marcación Inmunohistoquímica de Ki-67 en AS, TOQQ, QD y Controles. (10X,40X,100X)

### ***COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE KI-67 ENTRE TOQQ, AS Y QD***

Al comparar la expresión inmunohistoquímica de la proteína Ki-67 en AS, TOQQ y QD se observó una mayor expresión en TOQQ, con un porcentaje de células positivas de 12,28% SD± 3,0, un 7,01 % SD± 4,5 para AS y un 2,41% SD± 2,7 para QD.

Al aplicar el test de U Mann- Whitney (Wilcoxon) se obtiene que para el caso de TOQQ vs AS, TOQQ vs QD Y AS vs QD, la expresión de Ki-67 mostró diferencias estadísticamente significativas con un p-valor <0,05 para las 3 comparaciones de lesiones.

### ***COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 ENTRE TOQQ, AS Y QD***

Al comparar la expresión inmunohistoquímica de COX-2 en AS, TOQQ y QD se observó una mayor expresión en TOQQ, con un porcentaje de células positivas promedio de 43,11% SD± 26, un 36,82 % SD± 21 para AS, y un 14,86 % SD± 6,3 para QD.

Al aplicar el test de U Mann- Whitney (Wilcoxon) se obtiene que solo para el caso de TOQQ vs QD la expresión de COX-2 mostró una diferencia estadísticamente significativo, a diferencia de la comparación entre QD vs AS y AS vs TOQQ donde la expresión de COX-2 no mostró diferencias estadísticamente significativas con un p-valor <0,05.

CATEGORIZACIÓN COX-2						
LESIÓN	N°	NULO	LEVE	MODERADO	SEVERO	PROMEDIO IM
TOQQ	10	0	3	3	4	43,11%
AS	10	0	5	2	3	36,82%
QD	8	1	6	1	0	14,86%

**Tabla 5.**Tabla resumen de categorización y promedios finales para COX-2

	TOQQ	AS	QD
<b>IM (COX-2)</b>	43,11 SD± 26	36,82 SD± 21	14,86 SD± 6,3
	<b>β</b>		<b>β</b>
<b>IP (Ki-67)</b>	12,28 SD±3,0	7,012 SD±4,5	2,41 SD±2,7
	<b>α- β</b>	<b>α- γ</b>	<b>β- γ</b>

**Tabla 6.** Tabla resumen de índice de marcación y proliferación de TOQQ-AS-QD.

**α:** Si existe diferencia estadística significativa, ente TOQQ- AS con el Test de Mann- Whitney con un p-valor <0,05.

**β:** Si existe diferencia estadística significativa, ente TOQQ- QD con el Test de Mann- Whitney con un p-valor <0,05.

**γ:** Si existe diferencia estadística significativa, ente AS- QD con el Test de Mann- Whitney con un p-valor <0,05.

**IM:** Índice de marcación.

**IP:** Índice de proliferación.

## DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con el objetivo principal de determinar la expresión de COX-2 y Ki-67 en el epitelio de ameloblastomas sólidos, tumores odontogénicos queratoquísticos solitarios y quistes dentígeros, registrados en el Biobanco del departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile entre los años 1997 y 2010.

En nuestro estudio, se observó, una relación hombre: mujer para TOQQ de, 1:1,5; para AS, 1:1 y QD, 1,66:1, de acuerdo a la distribución por sexo. El rango etario para TOQQ, comprendió entre los 9 y 67 años, registrándose la mayoría de los pacientes entre la 4<sup>ta</sup> y 5<sup>ta</sup> década de vida, con un promedio de edad de 37,1 SD± 18 años (mediana: 38 años). El rango de edad para AS se presentó entre los 16 y 75 años, con una amplia distribución desde la 2<sup>da</sup> a la 8<sup>va</sup> década de vida, con un promedio de 41,5 SD± 20 años (mediana: 39,5 años). El rango de edad para QD fue entre los 7 y 63 años con un promedio de 24 SD± 22,2 años (mediana: 12,5 años), sin embargo, la distribución fue marcadamente mayor en la 2<sup>o</sup> década de vida con un 37,5% de frecuencia. En relación a la localización anatómica de las muestras, el 100% de los casos de TOQQ se localizaron en mandíbula. El AS se encontró mayoritariamente también en mandíbula, con una presencia del 70% y una relación maxilar: mandibular de 1:2,3. El QD se encontró principalmente asociado a caninos superiores, con una relación maxilar: mandibular de 7:1. En la epidemiología descrita en la literatura internacional para este tipo de lesiones, autores como Avelar y cols, 2008; Servato y cols, 2013 han descrito que no existe una predilección respecto a la distribución por sexo para TOQQ Y AS, con una relación h:m de 1:1,3 y 1,1:1 respectivamente. Para el QD, se describe una predilección por el sexo masculino en los estudios de Ochsenius y cols, 2002; Tortorici y cols, 2008 y Demirkol y cols, 2014, con una relación h: m de 1,7:1, 1,6:1; y 1,7:1; respectivamente.

Nuestros datos epidemiológicos, sobre edad, sexo y localización anatómica, no son comparables a series de estudios de prevalencia para TO reportados en la literatura, esto es debido al reducido número de casos de nuestra investigación.

En nuestro estudio, para el marcador celular Ki-67 se observó un índice de proliferación más alto para TOQQ, en comparación con AS y QD, siendo este de un 12,28%, 7,012% y 2,41 respectivamente. Este mayor índice de proliferación del TOQQ respecto al AS también fue descrito por Amaral y cols, 2012, en un estudio realizado con 11 casos de ameloblastomas sólidos y 11 casos de TOQQ, con índices de proliferación para TOQQ y AS de 9.8% y 3,4% respectivamente. Soluk y cols, 2012, en un estudio con 20 casos de AS y 20 casos de TOQQ, realizado en la Universidad de Estambul, describen un mayor índice de proliferación de Ki-67 para TOQQ respecto al AS. Mendes y cols, 2011”a”, con 20 casos de TOQQ; 2 de estos asociados al Síndrome Nevo Baso Celular, evaluaron y compararon la expresión inmunohistoquímica de Ki-67, p53 y COX-2 describiendo una marcación positiva de Ki-67 en 18 casos (90%) de los TOQQ, con un número idéntico de muestras con expresiones leves y fuertes (45% para cada intensidad de marcación) y solo 2 casos (10%) fueron negativos para un total de 20 TOQQ. Asimismo, Nadalin y cols, 2011; describieron inmunopositividad similar, para Ki-67 en 16 muestras (94,1%) de un total de 17 casos. Respecto a la expresión de Ki-67 en AS, Florescu y cols, 2012, demostraron una inmunopositividad en 14 casos de un total de 17. (82,3%). Similares resultados fueron los obtenidos por Bologna-Molina y cols, 2008, que señalan un promedio de índice de proliferación para Ki-67 de 12,8% para 45 casos de AS y de 15,1% para 75 casos de AU, la diferencia con nuestro estudio fue que evaluaron mas de un tipo clínico-patológico de ameloblastoma. Los resultados encontrados en estos estudios son similares a los encontrados en nuestra investigación, en cuanto a una mayor expresión de Ki-67 en TOQQ v/s AS, expresado a través de su índice de proliferación. Sin embargo, los resultados del presente estudio difieren de los de Gabdail y cols, 2012, en el cual incluyeron 14 y 32 casos para AS y TOQQ respectivamente, como resultado se obtuvo un índice de marcación para Ki-67 mayor en AS que para TOQQ, obteniendo un IP de 14,75% y 12,92% respectivamente, lo que es totalmente opuesto a lo encontrado en nuestro estudio donde el índice de proliferación para Ki-67 fue mayor para TOQQ que para AS.

Esta mayor detección de proliferación celular en TOQQ respecto de AS observada al evaluar la expresión de Ki-67 en nuestro trabajo y en las mencionadas investigaciones, no se correlaciona con la mayor agresividad que presenta el AS v/s el TOQQ. Esta aparente incoherencia entre los resultados moleculares y el comportamiento clínico de estas lesiones, podría explicarse por los mecanismos de crecimiento tumoral, los que ocurren por un desbalance entre la tasa de proliferación y muerte celular, mayor proliferación en comparación con la baja muerte celular.

Es importante mencionar que para la presente investigación solo se evaluó proliferación celular a través del marcador Ki-67, no tomando en cuenta la muerte celular, ya que cuyo estudio cuantitativo en muestras histopatológicas es más complejo que la cuantificación de proliferación celular. La muerte celular, debe haber estado presente en estos tejidos en cualquiera de sus formas de presentación, tales como, apoptosis, necrosis, autofagia u otras.

Por otra parte, dentro de nuestro estudio, también observamos la expresión de Ki-67 en quiste dentígero, la elección de esta patología se debe básicamente a la diferencia en el comportamiento clínico-patológico de esta lesión quística en comparación con los TO (TOQQ y AS). El QD, es una lesión que puede expandir pero no infiltrar, es una lesión que raramente recidiva y no es localmente agresiva, por lo que presenta un buen comportamiento, pero al igual que para TO existen estudios donde se realiza la inmunomarcación de Ki-67, para poder estudiar proliferación celular en este quiste. Autores como Güler y cols, 2012, describieron un índice de proliferación 7,43% para el QD. Gaiger de Oliveira y cols, 2011 señalaron que la inmunopositividad para Ki-67 fue mayor en las células basales (16,06%) que en las suprabasales (3,28%) del revestimiento epitelial del QD. Nafarzadeh y cols, 2013 señalan un promedio de IP de 5,33%, lo cual es similar a lo observado en nuestro estudio, en cuanto al bajo índice de proliferación para Ki-67 en esta lesión, lo que corrobora su buen comportamiento. Rahman y cols, 2013 describen un IP para QD de 23,81%, este resultado en particular difiere del nuestro, lo cual puede ser atribuible a diferentes variables, como por ejemplo, la falta de elaboración de un adecuado protocolo inmunohistoquímico o la poca rigurosidad de los criterios de inclusión no planteados específicamente por Rahman y cols, 2013 en su estudio. A pesar de esto, nuestro bajo índice de proliferación para Ki-67 (2,41%), al igual que

para COX-2 (14,86) es lo esperado en esta investigación. Es importante mencionar que la expresión de COX-2 en QD no ha sido publicada en la literatura internacional hasta el momento.

Junto con la expresión de Ki-67 se evaluó la expresión de COX-2 mediante inmunodetección. La actividad COX-2 esta relacionada con el desarrollo neoplásico en diferentes tipos de tumores, mediante mecanismos como la inhibición de la apoptosis en las células tumorales y el favorecimiento de la expansión tumoral al inducir la angiogénesis en el tumor. (Tsujiy cols, 1998; Stephen y cols, 2000). La expresión de COX-2 ha sido ampliamente estudiada en adenocarcinomas de colón (AC), como también se ha descrito su expresión en poliposis adenomatosa familiar (Chan y cols, 1998; Stephen y cols, 2000; Wasilewicz y cols, 2010). Asimismo se ha descrito su expresión en cáncer de mama y pulmón. (Soslow y cols, 2000). También existe evidencia de inmunopositividad de COX-2 en neoplasias de cavidad oral como, el carcinoma de células escamosas. (Gallo y cols, 2002; Chan y cols, 1999). El papel de la COX-2 en la tumorigénesis de colon ha sido bien establecido y ha servido como fundamento para el uso de los inhibidores selectivos de COX-2. Como se había mencionado anteriormente, se ha demostrado una sobreexpresión de COX-2 en adenocarcinomas de colon, como también se ha descrito una disminución en la expresión COX-2 cuando se administran inhibidores selectivos para esta enzima en estas patologías, detectándose, por lo tanto, una reducción en el epitelio y estroma de adenocarcinomas de colon pero no en mucosa normal. (Rigas y Kashfi, 2005)

La aspirina y otros AINES inhiben tanto COX-1 como COX-2, mientras que los Coxibs, como el Celecoxib, Valdecoxib y Etoricoxib, entre otros, inhiben selectivamente la isoforma COX-2. Estudios han demostrado que el Celecoxib proporciona una eficacia significativa quimiopreventiva contra el desarrollo de pólipos gastro-intestinales evitando el desarrollo de cáncer y por ende su acción es mucho más eficiente que la de los inhibidores de COX no selectivos, también se ha comprobado que tiene menos efectos adversos secundarios que otros inhidores de COX-2 (Reddy y cols, 2000). Sin embargo el requisito de dosis altas y el aumento de



incidencia de eventos cardiovasculares y ulceraciones gastrointestinales han sido elementos de disuasión para una amplia y mayor difusión de esta aplicación clínica y farmacológica. Observaciones a largo plazo sugieren que los inhibidores de COX-2 selectivos pueden contribuir al aumento de riesgo cardiovascular en individuos con condiciones protrombóticas, esto es de suma importancia a tener en cuenta para ser considerado como una reacción adversa medicamentosa en la administración de estos fármacos, como también es importante tener presente los posibles eventos tromboembólicos para estos pacientes. (Rao y cols, 2012; Solomon y cols, 2005; White y cols, 2003). Diversos estudios experimentales han demostrado que la administración de Celecoxib en modelos tumorales murinos disminuye la proliferación celular y aumenta la apoptosis, este efecto no se haya limitado a las células neoplásicas, puesto que se ha observado que este fármaco ocasiona una acción similar en las células endoteliales, lo que potencia su efecto antiangiogénico (Leahy y cols, 2002; Masferrer y cols, 2000).

No obstante, la expresión de COX-2 ha sido muy poco estudiada para tumores odontogénicos (TO). Existen solo 5 trabajos a la fecha, en la literatura que asocian estos marcadores con TOQQ y AS. Autores como Driemel y cols, 2007; Mendes y cols, 2011 "a" "b"; Wang y cols, 2013 y Cecim y cols, 2014 han estudiado su expresión en TOQQ y AME.

En nuestro estudio la expresión de COX-2 en TOQQ y AS no presentaron grandes diferencias entre sí, el promedio para el índice de marcación de COX-2 fue de 43,11%  $\pm$ 26 (Moderado) y 36,82% $\pm$ 21 (Moderado) respectivamente, siendo mayor para TOQQ. También se pudo constatar una marcación de COX-2 en todos los estratos del epitelio, sin embargo se observó un leve aumento de la expresión en células basales por sobre las de estratos suprabasales, tanto para TOQQ como para AS. Es importante mencionar que debido al tamaño pequeño de nuestra muestra, son necesarios estudios más amplios, para así mejorar nuestro conocimiento sobre el papel de la COX-2 en el mecanismo patogénico de estas neoplasias.

Mendes y cols, 2011”a”, estudiaron biopsias de pacientes que fueron tratados en el Centro Médico Universitario (Vumc) en Amsterdam, Holanda, tomando 20 muestras de TOQQ, las que fueron sometidas a inmunohistoquímica para COX-2, para luego clasificarlas basándose en la intensidad de la expresión del anticuerpo en las células epiteliales. Como resultado se obtuvo un 93,3% (14 muestras) de inmunopositividad para COX-2 en TOQQ. En otro estudio de este mismo autor, Mendes y cols, 2011 ”b” se señala que la expresión de COX-2 en TOQQ desempeña un papel importante en el crecimiento tumoral y la diseminación de éste al interferir con, proliferación celular, adhesión celular, vigilancia inmune, apoptosis y angiogénesis. De las 116 casos analizados en el estudio de Mendes y cols, 2011”b”, 33 (28,4%) fueron negativos para COX-2, 36 (31%) tuvieron expresión leve positividad y 47 (40,5%) fuerte positividad. Otro estudio es el de Cecim y cols, 2014, cuantificaron la expresión de COX-2 en 14 muestras de AS en 6 campos (40x), a través de la intensidad de expresión de la enzima, obteniendo una inmunopositividad para COX-2, pero sin reportar un índice de marcación específico. La investigación de Driemel y cols, 2007, corresponde al único estudio hasta a la fecha, donde analizaron tanto para TOQQ como para AS la expresión de COX-2, en el cual se observó que la mayoría de los casos de AM mostraban una inmunopositividad para COX-2. Se detectó COX-2 en 12 casos de un total de 15 (82%) de AM, pero solo 23 casos (33%) de un total de 70 TOOQ. Wang y cols, 2013, a través de un método semicuantitativo basaron su clasificación en la intensidad de expresión de COX-2 en TOQQ, utilizaron 16 casos, excluyendo los asociados a SNBC y los clasificaron en 2 grupos. Grupo I: TOQQ previo a la descompresión y Grupo II: TOQQ descomprimido + enucleación. En el Grupo I COX-2 se expresó en 15 de 16 casos (6 fuertes y 9 débiles). En el Grupo II, 4 de los 16 fueron leves o negativos y en los 12 casos restantes la expresión de COX-2 se redujo significativamente. Como resultado se obtuvo que la expresión de COX-2 en TOQQ con descompresión disminuyó significativamente en comparación con las muestras obtenidas previo al inicio del tratamiento, disminuyendo de un 93,8% a un 18,8% sus índices de marcación, se concluye que una reducción significativa de la expresión de COX-2, se asocia con el tratamiento descompresivo de los TOQQ, es decir con una disminución del desarrollo de la neoplasia.

Mendes y cols, 2011”b”, sugieren que la expresión de COX-2 puede ser un marcador importante involucrado en el comportamiento biológico del TOQQ, por lo que su presencia podría determinar la posibilidad de recidiva de esta patología, por lo que es fundamental tener un mejor y mayor manejo de las posibilidades terapéuticas a realizar. Es importante mencionar que debido al tamaño reducido de nuestra muestra, son necesarios estudios más amplios, para así mejorar el conocimiento sobre el papel de COX-2 en el mecanismo patogénico de estas neoplasias.

Los resultados reflejados en nuestro estudio en conjunto con la bibliografía analizada, sugieren que COX-2, podría ser un marcador importante implicado en el comportamiento biológico de TOQQ y AS. Así también debido a los múltiples estudios realizados en adenocarcinoma de colón esporádicos, como también en poliposis adenomatosa familiar, donde se observó que la administración de inhibidores de COX-2 jugarían un rol fundamental en la inhibición del crecimiento de estas neoplasias, en conjunto con los resultados de los trabajos antes mencionados respecto a la expresión de COX-2 en estos TO, es lo que nos invita a estudiar un posible rol terapéutico de estos AINES para los tumores odontogénicos, los cuales podrían retardar el desarrollo y/o las recurrencias tanto de AS como TOQQ, y/o disminuir los tiempos de descompresión de los TOQQ. Esta nueva perspectiva en el tratamiento de estos tumores odontogénicos podría proporcionar una mejora sustancial de la morbilidad de los pacientes afectados. Para esto es necesario diseñar nuevas investigaciones, como ensayos clínicos, los cuales nos permitirían aportar al desarrollo de nuevas terapias, para contribuir con un plan de tratamiento adecuado y efectivo, que entregue al paciente una mejor calidad de vida.

## CONCLUSIONES

- El índice de expresión inmunohistoquímica para el marcador de proliferación celular KI-67, fue **más alto para TOQQ** que para AS Y QD.
- El índice de Marcación para COX-2 fue **similar entre TOQQ y AS**.
- Solo para el caso de **TOQQ vs QD** la expresión de COX-2 mostró una diferencia estadísticamente significativa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abrahao AC, Castilho RM, Squarize CH, Molinolo AA, dos Santos-Pinto D Jr, Gutkind JS (2010). A role for COX2-derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. *Oral Oncol*; 46(12):880-7.
- Abramovich Abraham (1999). *Histología y embriología dentaria*. 2º edición.
- Adebisi KE, Ugboko VI, Omoniyi-Esan GO, Ndukwe KC, Oginni FO (2006). Clinicopathological analysis of histological variants of ameloblastoma in a suburban Nigerian population. *Head Face Med*, nov 24; 2:42.
- Ahn SG, Lim YS, Kim DK, Kim SG, Lee SH, Yoon JH (2004). Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a retrospective analysis of 33 affected Korean individuals. *Int J Oral Maxillofac Surg*. Jul; 33(5):458-62.
- Al-Talabani, Smith CJ (1980) Experimental dentigerous cysts and enamel hypoplasia: their possible significance in explaining the pathogenesis of human dentigerous cysts. *J Oral Pathol*. Mar; 9(2):82-91.
- Amaral F, Mateus G, Bonisson L, Andrade B, Mesquita R, Horta M y Marigo H(2012) Cell proliferation and apoptosis in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors (2012).*Braz Dent J* 23(2): 91-96.
- Avelar RL, Antunes AA, Santos T de S, Andrade ES, Dourado E (2008). Odontogenic tumors: clinical and pathology study of 238 cases. *Braz J Otorhinolaryngol*; 74: 668–73.
- Avelar RL, Antunes AA, Carvalho RW, Bezerra PG, Oliveira Neto PJ, Andrade ES (2009) Odontogenic cysts: a clinicopathological study of 507 cases. *J Oral Sci*. Dec;51(4):581-7
- Bagán JV (2011). *Medicina Bucal*. Valencia: Medicina Oral SL; .Ed 4 ISBN: 978-84-612-7381-2.

- Bakaeen G, Rajab LD, Sawair FA, Hamdan MA, Dallal ND (2004). Nevroid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature and a report of a case. *Int J Paediatr Dent.* Jul; 14(4):279-87.
- Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky D (2005). Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, p. 282- 328.
- Boffano P, Ruga E, Gallesio C (2010). 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.* Dec; 68(12):2994-9.
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor , Lopez-Corella E., Almeida O.P., Carrasco-Daza D, F. Garcia-Vazquez, J.E. Farfan-Morales , M.E. Irigoyen-Camacho , P. Damia ´n-Matsumura (2008) Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncology* 44, 805– 811.
- Bongers V, Snow GB, de Vries N, Braakhuis BJ (1996). Potential early markers of carcinogenesis in the mucosa of the head and neck using exfoliative cytology. *J Pathol*; 178:284-9.
- Cecim Rodolpho L, Hicso A. F. Carmo, Maria S. S. Kataoka, Vanessa M. Freitas, Sergio de Melo Alves Junior, Erick N. Pedreira, Ruy G. Jaeger, Joao J. V. Pinheiro.(2014) Expression of molecules related to AKT pathway as putative regulators of ameloblastoma local invasiveness. *J Oral Pathol Med.* Feb; 43(2):143-7.
- Carlson ER, Marx RE. (2006) The ameloblastoma: primary, curative surgical management. *J Oral Maxillofac Surg*; 64: 484-94.
- Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ (1999). Cyclooxygenase-

2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* Mar 1; 59(5):991-4.

- Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998). Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:681-6.
- Clauser C, Zuccati G, Barone R, Villano A.(1994). Simplified surgical orthodontic treatment of a dentigerous cyst. *J Clin Orthod.* Feb 28(2):103-6.
- Cobourne MT, Xavier GM, Depew M, Hagan L, Sealby J, Webster Z, Sharpe PT(2009).Sonic hedgehog signalling inhibits palatogenesis and arrests tooth development in a mouse model of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dev Biol.* Jul 1;331(1):38-49
- Concha G (2002). Radiología de quistes de los maxilares. *Rev. Hosp. Clínico Univ. Chile*; 13 (1):23-32.
- Da-Costa DO, Maurício AS, de-Faria PA, da-Silva LE, Mosqueda-Taylor A, Lourenço SD (2012) Odontogenic tumors: a retrospective study of four Brazilian diagnostic pathology centers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 17(3):e389-94.
- Dawis WL (1988). *Histología y Embriología Bucal.* 1era ed. México (DF): Interamericana-McGraw-Hill.
- De Manzoni G, Verlato G, Tomezzoli A, Guglielmi A, Pelosi G, Ricci F, Di Leo A, Cordiano C (1998). Study on Ki-67 immunoreactivity as a prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*; 28: 534-7.
- Demirkol M, Ege B, Yanik S, Aras MH, Ay S (2014). Clinicopathological study of jaw cysts in southeast region of Turkey. *Eur J Dent.* Jan;8(1):107-11.
- Díaz Fernández JM, Infante P, Belmonte R, Ruiz L, García A, Gutiérrez JL (2005). Basal cell nevus syndrome. Presentation of six cases and literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* Apr 1; 10 Suppl 1:E57-66.

- Dong Q, Pan S, Sun LS, Li TJ. (2010). Orthokeratinized odontogenic cyst: a clinicopathologic study of 61 cases. *Arch Pathol Lab Med.* Feb;134(2):271-5
- Driemel O, Rieder J, Morsczeck C, Schwarz S, Hakm SG, Müller-Richter U, Reichert TE, Kosmehl H (2007). Comparison of clinical immunohistochemical findings in keratocystic odontogenic tumours and ameloblastomas considering their risk of recurrence. *Mund Kiefer Gesichtschir.* Sep; 11(4):221-31.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12:1063-73
- Ebenezer V, Ramalingam B (2010). A cross-sectional survey of prevalence of odontogenic tumours. *J Maxillofac Oral Surg.* Dec; 9(4):369-74.
- El-Gehani R, Orafi M, Elarbi M, Subhashraj K (2009). Benign tumours of orofacial region at Benghazi, Libya: a study of 405 cases. *J Craniomaxillofac Surg;* 37:370–5.
- Evans DGR, Ladusan EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA (1993). Complications of the nevoid basal cell carcinoma syndrome: results of the population based study. *J Med Genet;* 30:460-4.
- Falaki F, Delavarian Z, Salehinejad J, Saghafi S (2009). Squamous cell carcinoma arising from an odontogenic keratocyst: a case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal;* 14 (4):E171-4.
- Famaey JP (1997). In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: and overview. *Inflamm Res;* 46:437-46.
- Feller L, Altini M, Lemmer J (2013). Inflammation in the context of oral cancer. *Oral Oncol.* Sep; 49(9):887-92.
- Fletcher C, Krishnan Unni, Fredrik Mertens (2002). *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.* WHO IARC Press Lyon, 2002.
- Florescu A., Simionescu C, Ciurea R, Pitru A (2012). P53, Bcl-2 and Ki67 immunoexpression in follicular solid ameloblastomas. *Rom J Morphol Embryol,* 53(1):105–109



- Gadbail AR, Patil R, Chaudhary M (2012). Co-expression of Ki-67 and p53 protein in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Acta Odontol Scand.* Dec;70(6):529
- Gaiger de Oliveira M, Da Silva I, Moraes AC, Varvaki P, Sant'Ana M (2011). Odontogenic Epithelium: Immunolabeling of Ki-67, EGFR and Survivin in Pericoronal Follicles, Dentigerous Cysts and Keratocystic Odontogenic Tumors *Head and Neck Pathol* 5:1–7
- Gaitán-Cepeda LA, Quezada-Rivera D, Tenorio-Rocha F, Leyva-Huerta ER (2010) Reclassification of odontogenic keratocyst as tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. *Oral Dis*; 16:185 7.
- Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M and Franchi A (2002). Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 33: 708-714.
- Gardner DG(1981). Plexiform unicystic ameloblastoma a diagnostic problem in dentigerous cysts. *Cancer* 15 47(6):1358-63.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983).Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.*Jan 15;31(1):13-20
- Gill S, Chawda J, Jani (2011). Odontogenic tumors in Western India (Gujarat): Analysis of 209 cases. *Oral Medicine and Pathology.* 2011; 3(2):e78-83.
- González-Alva P, Tanaka A, Oku Y, Yoshizawa D, Itoh S, Sakashita H, Ide F, Tajima Y, Kusama K (2008). Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective study of 183 cases. *J Oral Sci.* 2008 Jun; 50(2):205-12.
- Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A (2009) The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*;30(3):377–86.

- Güler N, Comunoğlu N, Cabbar F (2012). Ki-67 and MCM-2 in Dental Follicle and Odontogenic Cysts: The Effects of Inflammation on Proliferative Markers. *Scientific World Journal*.
- He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999). PARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*; 99:335-45.
- Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T (1998). Increased expression of cyclooxygenase-2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58: 3761–4
- Hla T, Neilson K (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Cancer Inst*. 1992; 89: 7384- 8.
- Jernvall J, Thesleff I (2000). Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*. Mar 15;92(1):19-29.
- Jing W, Xuan M, Lin Y, Wu L, Liu L, Zheng X, Tang W, Qiao J, Tian W. (2007). Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg*; 36:20–5.
- Johnson L, Sapp JP, McIntire DN (1994). Squamous cell carcinoma arising in dentigerous cyst. *J oral Maxillofac Surg*; 52:987-90.
- Kambalimath DH, Kambalimath HV, Agrawal SM, Singh M, Jain N, Anurag B, Michael P (2014). Prevalence and distribution of odontogenic cyst in Indian population: a 10 year retrospective study. *J Maxillofac Oral Surg*. Mar;13(1):10-5.
- Kim DK, Ahn SG, Kim J, Yoon JH (2003). 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*; 44:841-6.

- Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, Yang ML, Kase R, DiGiovanna JJ, Bale AE, Bale SJ (1997) Clinical manifestation in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet*; 69:299-308.
- Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M (1992). Histological typing of odontogenic tumours. In: *International histological classification of tumours 2nd ed.* World Health Organization. Springer-verlag; Berlin. 1992: 36.
- Kuroyanagi N, Sakuma H, Miyabe S, Machida J, Kaetsu A, Yokoi M et al. (2009). Prognostic factors for keratocystic odontogenic tumor (Odontogenic keratocyst): Analysis of clinico-pathologic and immunohistochemical findings in cysts treated by enucleation. *J Oral Pathol Med*, Apr; 38(4): 386-392.
- Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL, Prescott SM (1996). Prostaglandin H synthase-2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence of transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 14; 93(10):4816-20.
- Lamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J.(2004). Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. Jan; 33(1):30-6.
- Landis JR, Koch GG (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*; 33:19-174.
- Lawal AO, Adisa AO, Olusanya AA (2013). Odontogenic tumours: a review of 266 cases. *J Clin Exp Dent*. Feb 1;5(1):e13-7.
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL (2002). Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res*; 62:625-31.
- Lezzi G, Rubini C, Zizzi A, Aspriello SD, Fioroni M, Piattelli A (2011). Solid variant of keratocystic odontogenic tumour: report of a case. *Minerva Stomatol*. Mar;60(3):133-8.

- Li TJ, Browne RM, Matthews JB (1995). 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.* May; 24(5):221-6.
- Lima Gda S, Fontes ST, de Araujo LM, Etges A, Tarquinio SB, Gomes AP (2008). A survey of oral and maxillofacial biopsies in children: a single-center retrospective study of 20 years in Pelotas-Brazil. *J Appl Oral Sci.* Nov-Dec;16(6): 397-402
- Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO (2002). Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck* 2002; 24:792–9.
- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF and Hla T (2001). Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*; 276:18563-9.
- Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, Castro G Jr, Awada A (2006). Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: Promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck*, Mar; 28(3): 256-269.
- Luo HY, Li TJ (2009). Odontogenic tumors: a study of 1309 cases in a 16. Chinese population. *Oral Oncol.*;45:706-11.
- Martínez Pérez D, Varela-Morales M (2001). Conservative treatment of dentigerous cyst in children: a report of 4 cases. *J Oral Maxillofac Surg*;59: 331-4.
- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. (2000) Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res*; 60:1306-11.
- Maxymiw WG, Wood RE(1991) Carcinoma arising in a dentigerous cyst: a case report and review of the literature. *J. Oral Maxillofac Surg.*; 49: 639-43.

- Medina R (2003). Comportamiento Epidemiológico de los quistes maxilares. Estudio de 10 años. May; 95(5):632-5.
- Mendes RA, Carvalho JF and van der Waal I (2009). An overview on the expression of cyclooxygenase-2 in tumours of the head and neck. Oral Oncol 45: e124-e128.
- Mendes RA, Carvalho JF, van der Wall "a" (2011). Potential relevance of cyclooxygenase-2 expression in keratocystic odontogenic tumours – an immunohistochemical study. J Oral Pathol Med 40: 497–503.
- Mendes RA, Carvalho JF, van der Wall "b" (2011). 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.; 111(3):333-9.
- Meningaud JP, Oprean N, Pitak-Arnop P, Bertrand JC (2006) Odontogenic cysts: a clinical study of 695 cases. J Oral Sci. Jun;48(2):59-62.
- Mifflin RC, Saada JI, Mari JF, Adegboyega PA, Valentich JD, Powell DW (2002). Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. Am J Physiol Cell Physiol; 282:824–34.
- Migaldi M, Sartori G, Rossi G, Cittadini A, Sgambato A (2008). Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma. Oral Oncol, Jan; 44(1): 50-60.
- Mohan S, Epstein JB (2003). Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer. Oral Oncol; 39:537-46.
- Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, Keelawat S, Rangdaeng S, Meneses García A, Raimondi AR, Jufe R, Itoiz M, Gao Y, Saranath D, Kaleebi GS, Yoo GH, Leak L, Myers EM, Shintani S, Wong D, Massey HD, Yeudall WA, Lonardo F, Ensley J, Gutkind JS (2007). Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin

signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin Cancer Res*; 13(17):4964–73.

- Morgan P (2011). Odontogenic tumor: a review. *Periodontology 2000*, vol 57,160-176.
- Mosqueda TA, Irigoyen ME, Diaz MA, Torres MA (2002). Odontogenic cysts. Analysis of 856 cases. *Med Oral*. Mar-Apr7 (2):89-96.
- Mosqueda-Taylor (2008). A new findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Sep 1; 13 (9) Nadalin MR, Fregnani E, Silva-Sousa Y, Perez D (2011) Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 Expression in Odontogenic Cystic Lesions. *Braz Dent J* 22(3): 223-229.
- Nafarzadeh S, Seyedmajidi M, Jafari S, Bijani A, Rostami-Sarokolaei A.(2013) A Comparative Study of PCNA and Ki-67 Expression in Dental Follicle, Dentigerous Cyst, Unicystic Ameloblastoma and Ameloblastoma. *Int J Mol Cell Med Winter*; Vol 2 No 1
- Nayak MT, Singh A, Singhvi A, Sharma R (2013). Odontogenic Keratocyst: What is in the name? *Journal of Natural Science*. Jul- Dec;4(2): 282-285
- Noguera Aguilar JF, Amengual A, Ibarra de la Rosa J, Plaza Martinez A y Tortajada C (2006). Determinación de la expresión de cicloxigenasa-2 en el colon de la rata. *Rev Española enfermedades Digestivas (Madrid)* Vol.9, N°3, pp219-227.
- Ochsenius G, Escobar E, Godoy L, Peñafiel C (2007.) Odontogenic cysts: analysis of 2,944 cases in Chile. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Mar 1;12(2):e85-91.
- Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Peñafiel C, Escobar E (2002). Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. *J Oral Pathol Med*. Aug;31 (7):415-20.

- Ogata S, Kubota Y, Yamashiro T, Takeuchi H, Ninomiya T, Suyama Y, Shirasuna K (2007). Signaling pathways regulating IL-1alpha-induced COX-2 expression. *J Dent Res*; 86:186–91.
- Oka S, Kubota Y, Yamashiro T, Ogata S, Ninomiya T, Ito S, Shirasuna K.(2005). Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. *J Dent Res*; 84:913–8.
- Okada H, Yamamoto H, Tilakaratne WM. (2007).Odontogenic tumors in Sri Lanka: analysis of 226 cases. *J Oral Maxillofac Surg*; 65:875–82.
- Olson JW, Miller R, Krushner G, Vest TM (2000). Odontogenic carcinoma occurring in dentigerous cyst: A case report and clinical management. *J Periodontal*; 71:1365-70.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*; 87(5):803–9.
- Osterne RL, Brito RG, Alves AP, Cavalcante RB, Sousa FB (2011). 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.*111 (4) 474–481.
- Peters FI, López GP, Preisler EG, Sotomayor CC, Donoso ZM, Hernández VS (2012). Prevalencia de quistes odontogénicos, Hospital Regional Valdivia entre los años 1990 y 2010. *Rev. Avances en Odontoestomatología* Vol. 28 - Núm. 6.
- Philipsen HP, Peter A, Reichart PA (2006). Classification of odontogenic tumours. A historical review, Department of Oral Surgery and Dental Radiology, Berlin, Germany. *J Oral Pathol Med* Oct,35(9): 525–9
- Philipsen HP, Reichart PA (2002). Revision of the 1992-edition of the WHO histological typing of odontogenic tumours. A suggestion. *J Oral Pathol Med*: May; 31(5):253-8.

- Pindborg JJ, Kramer JR, Torloni H (1971). Histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts and allied lesions. 1th ed. Geneva: World Health Organization
- Prockt AP, Schebela CR, Maito FD, Sant' Ana- Filho M, Rados PV (2008). Odontogenic cysts: analysis of 680 cases in Brazil. *Head Neck Pathol Sep*;2(3):150-6.
- Rahman F, Bhargava A, Tippu SR, Kalra M, Bhargava N, Kaur I, Srivastava S. (2013) Analysis of the immunoexpression of Ki-67 and Bcl-2 in the pericoronal tissues of impacted teeth, dentigerous cysts and gingiva using software image analysis. *Dent Res J (Isfahan)*.
- Ramos GO, Porto JC, Vieira DSC, Siqueira FM, Rivero ERC (2014). Odontogenic tumors: a 14 year retrospective study in Santa Catarina, Brazil. *Oral Research*; Jan-Feb;28(1):33-8
- Rao CV, Janakiram NB, Mohammed A (2012). Lipoxygenase and Cyclooxygenase Pathways and Colorectal Cancer Prevention. *Curr Colorectal Cancer Rep December*; 8(4): 316–324.
- Regezi JA (2002). Odontogenic Cysts, Odontogenic Tumors, Fibroosseous, and Giant Cell Lesions of the Jaws. *Mod Pathol. Mar*;15(3):331-41.
- Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Paulson S, Seibert K, Rao CV (2000). Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res. Jan 15*; 60(2):293-7.
- Rigas B, Kashfi K (2005). Cancer Prevention: A New Era beyond Cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther. Jul*;314(1):1-8
- Sandra F, Hendarmin L, Kukita T, Nakao Y, Nakamura N, Nakamura S (2005). Ameloblastoma induces osteoclastogenesis: a possible role of ameloblastoma in expanding in the bone. *Oral Oncology*; 41(6):637-44.
- Sapp JP, Eversole LR and Wysocki GP (1997). Cysts of the oral region, in Sapp Eversole Wysocki: *Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology*, St. Louis, Mosby,



- Servato JPS, Prieto-Oliveira P, de Faria PR, Loyola AM, Cardoso SV (2013). Odontogenic tumours: 240 cases diagnosed over 31 years at a Brazilian university and a review of international literature. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*; 42: 288– 293.
- Seyedmajidi M, Nafarzadeh S, Siadati S, Shafae S, Bijani A, Keshmiri N.(2013). p53 and PCNA Expression in Keratocystic Odontogenic Tumors Compared with Selected Odontogenic Cysts. *Int J Mol Cell Med. Fall*; 2(4):185-93.
- Shear M. “a” (2002). 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*; 38: 219-26.
- Shear M. ” b” (2002). 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*; 38:407-15.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN (1998). Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*; 58:362-6.
- Siar CH, Lau SH, Ng KH (2012). Ameloblastoma of the jaws: a retrospective analysis of 340 cases in a Malaysian population. *J Oral Maxillofac Surg Mar*; 70(3):608-15.
- Siriwardena BS, Tennakoon TM, Tilakaratne WM (2012) Relative frequency of odontogenic tumors in Sri Lanka: Analysis of 1677 cases. *Pathology – Research and Practice* 208, 225– 230.
- Slootweg PJ (1995). p53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med. Oct*; 24(9):393-7.
- Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, Anderson WF, Zauber A, Hawk E, Bertagnoli M; Adenoma Prevention with Celecoxib (APC)

Study Investigators. (2005). Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med.*; 352:1071–80.

- Soluk Tekkeşin M, Mutlu S, Olgaç V (2012). Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg*; 28(1):49-55.
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT (2000). COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*. Dec 15;89(12):2637-45.
- Sriram G, Shetty RP (2008). Odontogenic tumors: a study of 250 cases in an Indian teaching hospital. Mumbai India. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; Jun 105(6):e14-21.
- Stoelinga D. (1976) “studies on the dental lamina as related to its rol in the etiology of cysts and Tumours” *J. Oral Pathol.*; 52(2):65-73.
- Stephen M. Prescott, F.A. Fitzpatrick. (2000) Cyclooxygenase-2 and carcinogénesis. *Biochim Biophys Acta*. Mar 27 1470(2):M69-M78.
- Suyama Y, Kubota Y, Ninomiya T and Shirasuna K (2008) Immunohistochemical analysis of interleukin-1 $\alpha$ , its type I receptor and antagonist in keratocystic odontogenic tumours. *J Oral Pathol Med* 37: 560-564.
- Taghavi N, Rajabi M, Mehrdad L, Sajjadi S.(2013). A 10-year retrospective study on odontogenic tumors in Iran. *Indian J Dent Res*. Mar-Apr;24(2):220-4
- Takahashi H, Fujita S, Yamabe S, Moriishi T, Okabe H, Tajima Y, Mizuno A (1998). Comparison of proliferating cell nuclear antigen expression in odontogenic keratocyst and ameloblastoma: an immunihistochemical study. *Anal Cell Pathol*; 16: 185-192.
- Tawfik MA, Zyada MM (2010) Odontogenic tumors in Dakahlia, Egypt: analysis of 82 cases, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*. Feb 109(2) e 67–73.

- Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S (1990). Molecular changes during determination and differentiation of the dental mesenchymal cell lineage. *J Biol Buccale*; 18:179-88.
- Thosaporn W, Lamaroon A, Pongsiriwet S, Ng KH (2004). A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, and ameloblastoma. *Oral Dis*. Jan; 10(1):22-6.
- Tortorici S, Amodio E, Massenti MF, Buzzanca ML, Burrugno F, Vitale F(2008). Prevalence and distribution of odontogenic cysts in Sicily: 1986- 2005. *J Oral Sci*. Mar;50(1):15-8
- Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori H, DuBois RN (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*; 93:705–16.
- Varkhede A, Tupkari JV, Sardar M (2011) Odontogenic tumors: a study of 120 cases in an Indian teaching hospital. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Nov 1; 16(7):e895-9.
- Vered M, Buchner A, Dayan D, Shteif M, Laurian A (2004). Solid variant of odontogenic keratocyst. *J Oral Pathol Med*; 33 :125-8.
- Voorsmit RACA (1984). The incredible keratocyst: a retrospective and prospective study. Academic Dissertation, University of Nijmegen.
- Wang J, Zhang X, Ding X, Xing S, Li H, Zhang W, Wang L, Wu H. (2013). Cyclooxygenase-2 Expression In Keratocystic Odontogenic Tumour Decreased Following Decompression. *Molecular and Clinical Oncology* 1: 982-986.
- Wasilewicz MP, Kołodziej B, Bojułko T, Kaczmarczyk M, Sulzyc-Bielicka V, Bielicki D.(2010). Expression of cyclooxygenase-2 in colonic polyps. *Pol Arch Med Wewn*. 2010 Sep; 120 (9): 313-20.
- White WB, Faich G, Borer JS, Makuch RW (2003). Cardiovascular thrombotic events in arthritis trials o the celecoxib. *Am J Cardiol.*; 92:411–418.

- Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB (1999). Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *Biol Chem*; 274: 27307-14.
- Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*; 290:989-92.
- Zweifel BS, Davis TW, Ornberg RL, Masferrer JL (2002). Direct evidence for a role of cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 in human head and neck xenograft tumors. *Cancer Res*; 62:6706-11.

## ANEXOS

### ANEXO 1



Santiago, octubre 24 de 2013

DIFO N° 0143/2013  
Mat. Aprobación y asignación código  
FIOUCh

Señor  
Dr. Enrico Escobar  
Departamento de Patología  
Facultad de Odontología  
PRESENTE

Estimado doctor Escobar:

Me permito informar a usted que su proyecto "Expresión Inmunohistoquímica de Ciclooxygenasa-2 y su relación con el ciclo y proliferación celular en tumores odontogénicos epiteliales localmente agresivos y carcinomas espino celulares de mucosa bucal" fue aprobado en el Concurso de Proyectos de Investigación en Odontología FIOUCh 2013.

Dicho proyecto ha recibido el siguiente código de inscripción en la Dirección de Investigación: **FIOUCh 13-003**. La fecha de inicio es octubre de 2013 y cuenta con una duración máxima de dos años (fecha de término: octubre de 2015).

Recuerdo a usted que, según información entregada el 30 de agosto, todas las compras serán realizadas con el centro de costo de la Dirección de Investigación y las solicitudes de adquisiciones y de salida de bodega, deberán ser firmadas por el Director de Investigación; la Dirección Económica y Administrativa **NO** recibirá solicitudes de compras para proyectos FIOUCh que no provengan de la Dirección de Investigación.

Por lo señalado anteriormente, solicito a usted hacer llegar a esta Dirección el Formulario de Adquisición completo (se adjunta), cotizaciones en caso de ser necesario e indicar la fecha en que requiere los productos se encuentren en la Facultad.

Para formalizar el inicio del proyecto, solicitamos a usted firmar la carta de compromiso adjunta.

Sin otro particular, se despide cordialmente de usted,



Dr. GONZALO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
Director de Investigación

GRM - cmg

## ANEXO 2



21/08/2013

### ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

---

ACTA N°: 2013/11

1. Acta de Aprobación de Protocolo de Estudio N° 2013/20.
2. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

**Dra. María Angélica Torres**  
Presidente del CEC

**Dra. Claudia Lefimil Punte**  
Secretaría del CEC

**Dr. Eduardo Rodríguez**  
Miembro permanente del CEC

**Srta. Karin Lagos**  
Miembro permanente del CEC

**Dra. Blanca Urzúa**  
Miembro permanente del CEC

**Dra. Ximena Lee**  
Miembro permanente del CEC

3. Fecha de Aprobación: 14/08/2013
4. Título completo del proyecto: "Expresión inmunohistoquímica de ciclooxigenasa-2 y su relación con el ciclo celular y proliferación en tumores odontogénicos epiteliales localmente agresivos y carcinomas espinos celulares de mucosa bucal". Proyecto Fiouch. Versión 30/07/2013.
5. Investigador responsable: Dr. Enrico Escobar López.
6. Institución: Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
7. Documentación Revisada:
  - CV del Investigador principal y del Investigador Alterno.
  - Autorización del Director del Departamento de Patología y Medicina Oral para el uso de material biológico almacenado en el Biobanco del Departamento.

#### 8. Fundamentación de la aprobación:

Marcadores moleculares, como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), se encuentran aumentados en diversas neoplasias, especialmente en aquellas malignas, cumpliendo un papel importante en el crecimiento y diseminación tumoral. Sin embargo, no existen estudios acabados al respecto. En el presente estudio se propone evaluar la expresión inmunohistoquímica de COX-2, ki-67 (un marcador de proliferación celular) y ciclina D-1 (un regulador de división celular) en tumores odontogénicos benignos epiteliales y carcinomas espino celulares de mucosa bucal. El análisis de la expresión de COX-2, y de otros marcadores moleculares, en asociación al comportamiento clínico de los tumores, puede entregar nuevos conocimientos acerca de la fisiopatología de tumores malignos de cabeza y cuello, y de neoplasias odontogénicas benignas de los maxilares que presentan un comportamiento agresivo; y eventualmente ayudaría a predecir la progresión tumoral y el pronóstico clínico, alentando al desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas.

Las muestras a utilizar corresponden a biopsias mantenidas en el Biobanco del Departamento de Patología y Medicina Oral. El estudio tiene validez científica, es de interés y los investigadores tienen experiencia en el tema.

Este comité ha emitido una evaluación de este proyecto basado en la capacidad de los comités éticos científicos de decidir la legitimidad ética de una investigación que usa muestras y datos de ficha clínica anonimizados sin consentimiento informado, cuando la investigación no es de riesgo. De otro modo, sería impracticable y no se podría responder a una pregunta importante de investigación de acuerdo a pautas éticas internacionales (Pautas CIOMS 2008 de Estudios Epidemiológicos) en ausencia de legislación específica en Chile, ya que el artículo 13 de la ley 20.584 no hace referencia a investigación retrospectiva en fichas clínicas y bases de datos y se refiere más bien a temas de salud poblacional y ensayos clínicos.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba el estudio "Expresión inmunohistoquímica de ciclooxigenasa-2 y su relación con el ciclo celular y proliferación en tumores odontogénicos epiteliales localmente agresivos y carcinomas espino celulares de mucosa bucal", Proyecto Fiouch, Versión 30/07/2013, bajo la conducción del Dr. Enrico Escobar López, del Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si lo considera necesario y el investigador deberá, bajo mutuo acuerdo, presentar los antecedentes solicitados.



*Escobar*  
**Dra. María Angélica Torres V.**

Presidente C.E.C.

c/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.

## ANEXO 3



Comité Institucional de Bioseguridad  
Administración Conjunta Campus Norte  
FDO N°15

Santiago, 20 de Octubre de 2013.

### **C E R T I F I C A D O**

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación presentado al Concurso FIOUCH 2013, titulado **“Expresión Inmunoquímica de Ciclooxigenasa-2 y su relación con el ciclo y proliferación celular en tumores odontogénicos epiteliales localmente agresivos y carcinomas espino celulares de mucosa bucal”**. El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. Enrico Alejandro Escobar López, Académico del Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Los procedimientos experimentales, que involucran el uso de agentes químicos de riesgo, como azida sódica y varios reactivos con alto potencial inflamable, se realizarán en el laboratorio IREPO dirigido por el Prof. Cristian Peñafiel Ekdhaldel en la Facultad de Odontología. El investigador no declaró la utilización de compuestos con potencial carcinogénico o teratogénico.

El CIB certifica que el laboratorio y la Facultad mencionada anteriormente, cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Enrico Escobar para ser presentado a Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

**Dr. Mario Chiong**  
**Presidente**

**Dra. Andrea Paula-Lima**  
**Secretaria**



**Figura 2. Ameloblastoma sólido, tumor odontogénico queratoquístico, quiste dentífero y controles con técnica histológica corriente, tinción hematoxilina-eosina.**

**2.A-B:** Ameloblastoma Sólido de variedad plexiforme. Se observa el estrato basal en empalizada con polarización reversa (flecha negra) y a continuación una estructura que remeda al retículo estrellado (flecha negra).

**2.C-D:** Tumor odontogénico queratoquístico (paraqueratinizado) en el cual se aprecia el clásico epitelio delgado, sin papilas, con estrato basal hipercromático y en empalizada (estrella negra).

**2.E-F:** Quiste dentífero que presenta un epitelio delgado cúbico con aproximadamente 3 capas de células de grosor (flecha negra).

**2.G-H:** Adenocarcinoma de colon (control + de COX-2) en el cual se observa las células neoplásicas formando estructuras tubulares (flecha negra).

**Figura 3. Marcación inmunohistoquímica de Ki-67 y COX-2 en Ameloblastoma Sólido (AS) a 10X y 40X.**

**3.A-B:** Ameloblastoma sólido de tipo folicular en el cual se observa marcación nuclear de Ki-67 en células epiteliales tanto en el estrato columnar (flecha blanca) como en zonas de tipo retículo estrellado (flecha negra).

**3.C-D:** Ameloblastoma sólido de tipo plexiforme en el cual se observa un alto porcentaje de células epiteliales neoplásicas con marcación citoplasmática positiva para COX-2 (flecha negra).

**Figura 4. Marcación inmunohistoquímica de Ki-67 y COX-2 en Tumor odontogénico queratoquístico (TOQQ) a 10X y 40X.**

4.A-B: Tumor odontogénico queratoquístico en el cual se observa células epiteliales con marcación nuclear positiva para Ki-67 predominantemente en estratos parabasales (flecha negra).

4.C-D: Tumor odontogénico queratoquístico en el que se observa marcación positiva citoplasmática para COX-2, prácticamente en todos los estratos, excepto el estrato superficial paraqueratinizado (flecha negra).

**Figura 5. Marcación inmunohistoquímica de Ki-67 y COX-2 en Quiste dentífero (QD) a 10x y 40x.**

**5.A-B:** Quiste dentífero en el cual se observa muy escasas células epiteliales del estrato basal con marcación positiva para Ki-67 (flechas negras).

**5.CD:** Quiste dentífero en el cual se observa marcación débil de COX-2 en el citoplasma de células epiteliales.

**Figura 6. Marcación inmunohistoquímica de COX-2 en AS, TOQQ, QD y controles. (10x,40x,100x)**

**6.A-B-C:** Ameloblastoma sólido donde se observa intensa marcación positiva en el citoplasma de las células epiteliales neoplásicas tanto para el tipo plexiforme (A-B) como para el folicular (C).

**6.D-E-F:** Tumor odontogénico queratoquístico con intensa marcación positiva predominante en el citoplasma de células epiteliales neoplásicas. También se observa marcación positiva en algunos fibroblastos de la pared de la lesión (flechas negras)

**6.G-H-I:** Quiste dentígero en el cual se observa marcación débil de COX-2 en el citoplasma de células epiteliales del quiste. Escasos fibroblastos de la pared presentan marcación para COX-2 (flecha negra).

**6.J-K-L:** Adenocarcinoma de colon (control + de COX-2) en el cual se observa una muy intensa marcación en el citoplasma de un alto porcentaje de las células epiteliales neoplásicas..

**6.M-N-O:** Adenocarcinoma de colon (control - de COX-2) en el que se omitió el anticuerpo primario. No se observa marcación parda en las células neoplásicas epiteliales ni en el estroma.

**Figura 7. Marcación inmunohistoquímica de Ki-67 en AS, TOQQ, QD y controles. (10x,40x,100x)**

**7.A-B-C:** : Ameloblastoma sólido donde se observa marcación positiva en el núcleo de algunas células epiteliales neoplásicas, tanto basales como las del tipo retículo estrellado.

**7.D-E-F:**Tumor odontogénico queratoquístico marcación positiva para Ki-67 en el núcleo de algunas células epiteliales, tanto del estrato basal como parabasal.

**7.G-H-I:** Quiste dentígero con marcación de Ki-67 en el núcleo de escasas células epiteliales del estrato basal.

**7.J-K-L:**Carcinoma de células escamosas (control + para Ki-67) en el cual se observa un alto porcentaje de células neoplásicas con marcación nuclear. En la figura L (100x), destaca la presencia de 2 células en mitosis (flecha negra).

**7.M-N-O:** Carcinoma de células escamosas (control - para Ki-67) en el cual se omitió el anticuerpo primario. No se observa marcación nuclear en células epiteliales neoplásicas, ni en el estroma.