

Estudio comparativo de la expresión inmunohistoquímica del Ki-67 en los ameloblastomas uniuíquístico y sólido

Comparison of the Immunohistochemical Expression of Ki-67 in Unicystic and Solid Ameloblastoma

67

Univ Odontol. 2009 Jul-Dic; 28(61): 67-73 ISSN 0120-4319

CIENCIAS BÁSICAS, BIOTECNOLOGÍA Y BIOINFORMÁTICA

Libia Sofía Ochoa Gómez

Odontóloga cirujana oral y maxilofacial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Edna Margarita Martínez O.

Médica patóloga, Hospital Universitario San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Directora del trabajo.

Jairo Alberto Bustillo Rojas

Odontólogo, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia. Abogado, Universidad Católica de Colombia, Bogotá, Colombia. Especialista en Patología y Cirugía Bucal. Docente de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Director del trabajo.

RESUMEN

Antecedentes: El ameloblastoma ha sido una de las neoplasias más controvertidas en el área maxilofacial desde que fue descrita por primera vez por Broca, en 1868. En la actualidad aún no hay claridad sobre su etiología, comportamiento biológico y tipos de tratamiento de acuerdo con su localización y clasificación histológica, ni sobre sus mecanismos de oncogénesis, citodiferenciación, proliferación celular y apoptosis. **Objetivo:** Comparar el índice de proliferación celular de los ameloblastomas uniuíquístico y sólido por medio de la inmunoeexpresión del marcador de proliferación Ki-67, con el fin de proveer evidencia sobre el comportamiento biológico de estos dos subtipos histológicos de la patología. **Métodos:** Se realizó un estudio comparativo de diseño no experimental en el que se evaluó el índice de inmunoeexpresión del antígeno Ki-67, mediante conteo celular en 10 placas de ameloblastoma uniuíquístico y 10 de ameloblastoma sólido. **Resultados:** Las diez placas de ameloblastoma uniuíquístico fueron negativas para la inmunotinción con Ki-67, mientras que las diez placas de ameloblastoma sólido fueron positivas con una media de 3,7%, ninguna por encima del 10% de expresión. **Conclusiones:** La actividad proliferativa varía entre los ameloblastomas uniuíquístico y sólido con respecto a la inmunoeexpresión de Ki-67 y es negativa para el primero y positiva para el segundo.

PALABRAS CLAVE

Ameloblastoma uniuíquístico, ameloblastoma sólido, antígeno Ki-67, ciclo celular, inmunohistoquímica.

AREA TEMÁTICA

Patología oral

ABSTRACT

Background: Ameloblastoma has been one of the most controversial tumors in the maxillofacial field since it was first described by Broca, in 1868. Currently, etiology, biological behavior and treatment of ameloblastoma depending on its localization and histological type are still unclear; mechanisms such as oncogenesis, cytodifferentiation, cell proliferation and apoptosis are not well known. **Purpose:** Compare the proliferative cellular activity of solid and unicystic ameloblastomas through immunoeexpression of cellular proliferation marker Ki-67 in order to provide evidence about the biological behavior of these two histological types of pathology. **Methods:** A non-experimental comparative study was carried out. Immunoeexpression of the antigen Ki-67 was evaluated by cell counts in 10 tissue sections of unicystic ameloblastoma and 10 of solid ameloblastoma. **Results:** All the 10 tissue sections of unicystic ameloblastoma were negative with the immunostaining with Ki-67. On the contrary, all the 10 tissue sections of solid ameloblastoma were positive for Ki-67 with an average score of 3.7%; none of the counts in this group had a score higher than 10%. **Conclusions:** Cell proliferative activity varied between the unicystic and solid ameloblastomas regarding Ki-67 immunoeexpression, being negative for the first and positive for the second.

KEY WORDS

Unicystic ameloblastoma, solid ameloblastoma, Ki-67 antigen, cell cycle, immunohistochemistry.

THEMATIC FIELDS

Oral pathology

Trabajo de grado del primer autor para optar al título de cirujano oral y maxilofacial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Ochoa Gómez LS, Martínez EM, Bustillo Rojas JA. Estudio comparativo de la expresión inmunohistoquímica del Ki-67 en los ameloblastomas uniuíquístico y sólido. Univ Odontol. 2009 Ene-Dic; 28(60): 67-73.

Recibido para evaluación 22-12-2008
Aceptado para publicación 5-9-2009

Disponible en
<http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/>

INTRODUCCIÓN

De los tumores que se originan del epitelio odontogénico, el ameloblastoma es el que se presenta con mayor frecuencia. Se estima que representa el 1% de todos los tumores de la cavidad oral.¹⁻² Histológicamente, exhibe una considerable variación y es clasificado en varias entidades benignas y malignas. Se caracteriza por un comportamiento localmente invasivo con una alta tasa de recurrencia.³ Epidemiológicamente, afecta sobre todo la mandíbula y se puede desarrollar a cualquier edad, con un pico de prevalencia entre la tercera y cuarta décadas de la vida. No hay predilección racial ni de géneros; sin embargo, autores como Adebiji y colaboradores reportan una predilección por el género masculino.⁴

El ameloblastoma ha sido probablemente una de las neoplasias más controvertidas en el área de la cirugía maxilofacial desde 1868, cuando Broca describió por primera vez este tumor. Hasta el momento se han planteado diferentes clasificaciones, hipótesis sobre su etiología, comportamiento biológico y tipos de tratamientos según su localización y clasificación histológica; no obstante, aún no son claros los mecanismos de oncogenia, citodiferenciación y proliferación celular, y los procesos apoptóticos relacionados con este tumor. Por ello sigue siendo necesaria la investigación en biología celular y molecular, para esclarecer las variedades, factores relacionados y mecanismos del ameloblastoma.

Hasta el 2005, los ameloblastomas se clasificaban macroscópicamente en tres tipos: uniuístico, sólido o multiuístico y periférico.⁵ En 2005, la Organización Mundial de la Salud lanzó una nueva clasificación, que incluye cuatro tipos de ameloblastomas: sólido o multiuístico, extraóseo o periférico, desmoplástico y uniuístico.^{6,7} El ameloblastoma uniuístico es esencialmente una lesión local similar a un quiste; no obstante, se puede manifestar de diferentes formas como el intramural, el intraluminal y el de revestimiento simple.⁵ En una revisión de la literatura existente publicada en 1995, Reichart y colaboradores describen la variante sólida o multiuística como la más común, de acuerdo con la mayor revisión de casos (3.677) publicada por Small y Waldron, en 1955. Esta variante se presentó en el 92% de los casos, mientras el uniuístico y la variante periférica estuvieron entre el 6% y el 2%, respectivamente.⁵

Es ampliamente aceptado que el ameloblastoma tipo uniuístico difiere en su comportamiento biológico del de tipo sólido multiuístico, ya que clínicamente presenta una considerable tasa más baja de recurrencia, con rangos que oscilan entre el 6,7% y el 35,7%. Las tasas de recurrencia de los ameloblastomas sólidos multiuísticos oscilan entre 17,7% y 27,3%, cuando se han realizado tratamientos radicales, y entre 20% y 90%, cuando los tratamientos han sido más conservadores.

Li y colaboradores encontraron en una serie de 33 casos que la recurrencia de los ameloblastomas uniuís-

ticos se presentó usualmente después de siete años, lo que indica un índice lento de crecimiento tumoral.⁸ Sin embargo, en apariencia existe un pronóstico y un comportamiento biológico diferente entre los grupos de los ameloblastomas uniuísticos, de los cuales el más agresivo es el caracterizado por una proliferación del tejido neoplásico intramural, al ser comparado con el ameloblastoma uniuístico intraluminal, el cual muestra un crecimiento epitelial plexiforme intrauístico.⁹ Teniendo en cuenta estas diferencias, se ha sugerido como tratamiento para los ameloblastomas uniuísticos intramurales, sólidos o multiuísticos, la resección quirúrgica; en tanto que se plantea como opción de tratamiento para los ameloblastomas uniuísticos simples y uniuísticos intraluminales la enucleación.

Teniendo en cuenta que la determinación de la actividad proliferativa epitelial es una fuente útil para investigar las diferencias en el comportamiento biológico, algunos investigadores han evaluado la proliferación celular con el fin de proveer mejor evidencia respecto del comportamiento biológico de los diferentes tipos de ameloblastomas.¹⁰ El anticuerpo monoclonal Ki-67 se obtuvo por primera vez para el estudio de la línea celular de linfomas de Hodgkin (línea L428) por Gerdes y colaboradores, en 1983, tratando de conseguir un anticuerpo específico contra las células de Reed-Sternberg.

Ellos encontraron que este anticuerpo se expresa en el núcleo de las células proliferantes.¹¹ La naturaleza del antígeno no era muy conocida y sólo hasta 1991 se aportaron los primeros datos acerca de su caracterización por parte del mismo grupo de trabajo. La evidencia es discrepante entre los diferentes autores. Algunos reportan mayor índice de proliferación celular en los ameloblastomas sólidos o multiuísticos que en los uniuísticos. Otros han hallado lo contrario. Por esto el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión del antígeno Ki-67 en los ameloblastomas sólido y uniuístico, para determinar si existe diferente actividad de proliferación celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación se utilizó un diseño descriptivo comparativo, no experimental. La muestra consistió en bloques incluidos en parafina con diagnóstico de ameloblastoma uniuístico y sólido (multiuístico), obtenidos de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana y de la práctica de algunos patólogos orales. Los bloques de parafina incluidos en el estudio correspondían a biopsias o bloques quirúrgicos. No se incluyeron bloques de parafina de ameloblastoma periférico, aquellos que no cumplieran con los parámetros de calidad necesarios para el estudio o estuvieran deteriorados.

Para la tinción de las 20 muestras con hematoxilina eosina se realizaron cortes de 4 micras (μm) con el

micrótopo y las muestras fueron puestas al baño María a 34 grados centígrados (°C). Obtenidos los cortes con láminas portaobjeto, se llevaron al horno a 60°C durante 25 minutos, con el fin de fijar el tejido al portaobjeto y hacer líquida la parafina. Posteriormente se llevaron las láminas con los tejidos a una serie de tres xiloles durante 5 minutos cada uno, para eliminar el exceso de parafina. Después se pasaron los tejidos por una serie de cubetas que contenían alcohol etílico en diferentes concentraciones (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 60%), hasta llegar al 50% por un tiempo de cinco minutos en cada cubeta, con el fin de hidratar el tejido.

A continuación se lavaron las muestras con agua corriente, con el fin de eliminar los excesos de químicos e iniciar la coloración. Los tejidos se introdujeron en hematoxilina (colorante nuclear) durante 5 minutos y en agua amoniacal al 1% durante 5 segundos, para darles transparencia, y se lavaron de nuevo con agua corriente. Finalmente, se llevaron a alcohol ácido al 1% para eliminar los excesos de hematoxilina. Luego se pasaron durante tres minutos por eosina (colorante citoplasmático y de elementos extracelulares) y se lavaron con agua corriente. Los tejidos se deshidrataron mediante alcoholes de concentración ascendente (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%) durante 5 minutos cada uno, para eliminar el agua. Acto seguido, se aclararon mediante el xilol, pasándolos 5 minutos por cada cubeta. Se montaron en un portaobjeto y se fijaron con resina sintética para su posterior visualización en el microscopio.

Para el estudio de la inmunotinción de las células se utilizó el sistema Super Sensitive Polymer-HRP Detection System A Biotin-Free Detection System (Laboratorio BioGenex). Se realizaron cortes de 4 µm a las 20 muestras, los cuales se pusieron sobre una lámina portaobjeto previamente tratada con un adhesivo tisular (Histogrip). Luego se llevaron al horno a 60°C durante 30 minutos para la desparafinización, la cual se completa con el paso por 3 baños de xilol al 100%, cada uno durante 5 minutos. A continuación, se deshidrataron al aire por 5 minutos y se hizo un círculo alrededor de cada muestra con lápiz de diamante para evitar la dispersión del inmunomarcador.

Las muestras se hidrataron con agua destilada durante 5 minutos y se llevaron a una solución de citrato amortiguador en un recipiente cerrado a 97°C en la vaporera, durante 45 minutos, para la recuperación antigénica. Se dejó enfriar la solución 10 minutos. Luego, se lavaron con agua destilada por 5 minutos, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 10% durante 10 minutos, se volvieron a lavar con agua destilada, y se secó alrededor del tejido para dar inicio a la inmunomarcación.

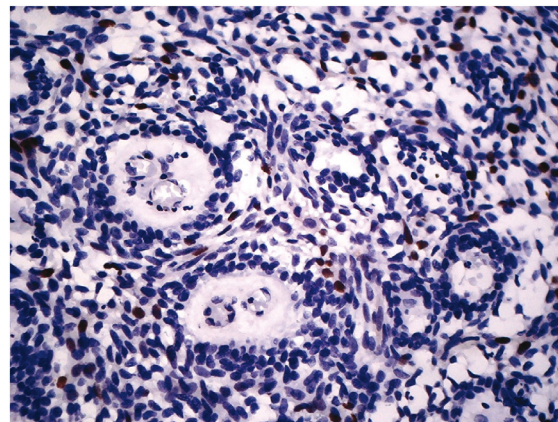
Se aplicó el anticuerpo monoclonal primario que detecta el Ki-67 (MIB-1) (Clon MM1, laboratorio Novocastra, dilución 1:150) y se dejó actuar durante 45 minutos a

temperatura ambiente. Se lavaron las muestras con *Tris Buffer Saline* (TBS) durante 3 minutos, se secó alrededor del tejido, se aplicó el Super Enhancer durante 20 minutos, se volvió a lavar con TBS por 3 minutos; luego se secó alrededor del tejido, se aplicó el anticuerpo secundario conjugado con el polímero HRP (Poly HRP-Reagent) y se dejó actuar durante 25 minutos y se lavó con TBS por 3 minutos, para dar lugar al revelado con la solución de sustrato cromógeno bajo el microscopio de luz. Finalmente, se contrastó con hematoxilina.

Como control positivo se utilizaron dos muestras de biopsia de linfoma gástrico con alta expresión de Ki-67 mediante la misma técnica de inmunohistoquímica descrita para las muestras de ameloblastomas (complejo biotina/estreptavidina, de Biogenex). El anticuerpo primario para detectar la proteína Ki-67 fue el mismo utilizado en los ameloblastomas e igual fue la dilución (MIB-1 Clon MM1, laboratorio Novocastra). No se incluyó un control negativo.

Para valorar la técnica inmunohistoquímica con Ki-67 dos observadores independientes realizaron un estudio semicuantitativo. Se interpretaron como positivos los núcleos teñidos de color café intenso y se registró la inmunomarcación en porcentajes (figura 1). Se consideró negativa cuando hubo ausencia total de tinción. Los grados de tinción se valoraron así: positividad baja, cuando menos del 10% de los núcleos celulares tiñeron; moderada, entre 10% y 50%; alta, más del 50%. La observación se hizo en campo de alto poder (40X) bajo microscopio de luz (Nikon, referencia Eclipse 50i. Nikon THO Japan 9V=0,5ª). La lectura de las láminas histológicas e interpretación de la expresión del antígeno Ki-67 fue realizada por un patólogo experto.

Figura 1
Fotografía de la inmunotinción del Ki-67 con positividad leve del ameloblastoma sólido con un aumento de 40X



RESULTADOS

De las 10 placas con diagnóstico de ameloblastoma unicuístico, 8 se clasificaron como ameloblastoma unicuístico con proliferación intraluminal de patrón

arquitectónico plexiforme; una, como ameloblastoma uniuístico con proliferación intramural e intraluminal, y una, como ameloblastoma uniuístico de revestimiento simple (figuras 2 y 3). Todas las placas fueron negativas para la inmunotinción con el Ki-67 (figura 4).

Figura 2

Fotografía de placa con tinción de hematoxilina-eosina con diagnóstico de ameloblastoma uniuístico con proliferación intraluminal de patrón arquitectónico plexiforme

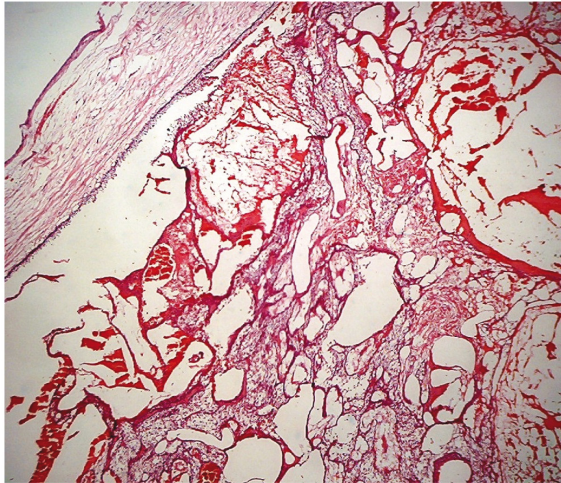
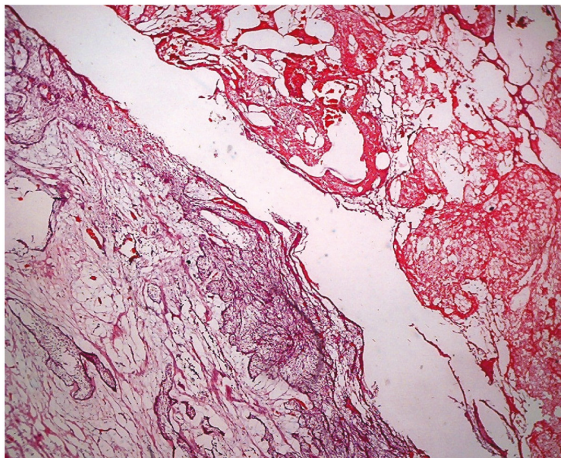


Figura 3

Fotografía de placa de ameloblastoma uniuístico de patrón arquitectónico intramural teñido con hematoxilina-eosina



De las 10 placas con diagnóstico de ameloblastoma sólido (figura 5), 5 se clasificaron como ameloblastoma sólido de patrón folicular; una, como ameloblastoma sólido de patrón folicular, acantomatoso y de células granulares; 3, como ameloblastoma sólido de patrón folicular y plexiforme; una, como ameloblastoma sólido folicular y acantomatoso, y una, como ameloblastoma de patrón plexiforme. Todas las placas fueron positivas para la inmunotinción con el Ki-67.

Figura 4

Fotografía panorámica de placa de ameloblastoma uniuístico de patrón arquitectónico plexiforme negativo para la inmunotinción con Ki-67

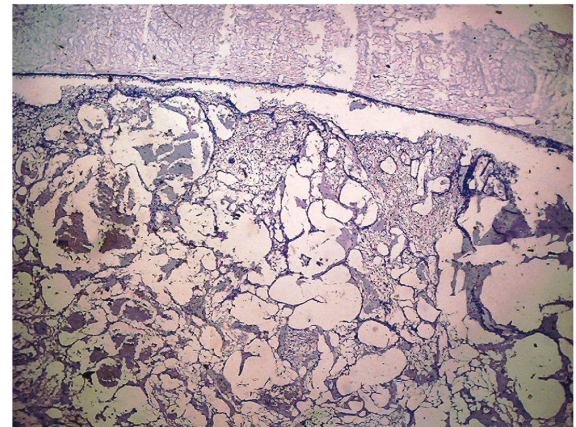
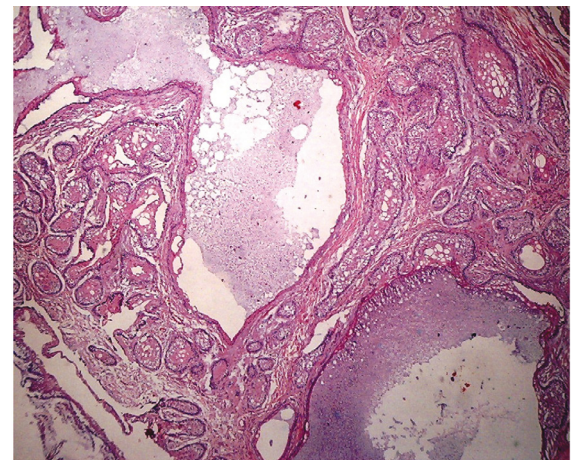


Figura 5

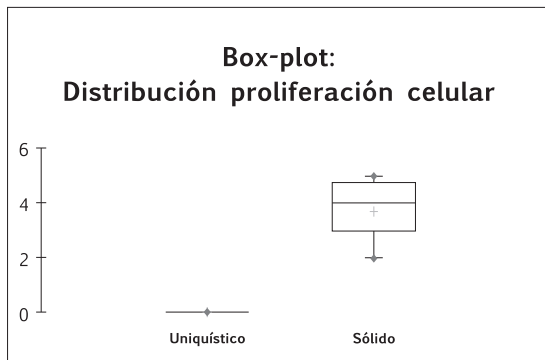
Fotografía de ameloblastoma sólido folicular teñido con hematoxilina-eosina



El mayor índice de proliferación celular fue de 5% en dos placas clasificadas como ameloblastoma sólido folicular y en una placa de ameloblastoma sólido folicular, plexiforme y acantomatoso; en tanto que el menor fue 2%, hallado en la placa clasificada como ameloblastoma sólido acantomatoso. El promedio fue de 3,7%. En este estudio, las células que tuvieron mayor índice de inmunotinción fueron las células basales y parabasales del epitelio en los ameloblastomas de tipo sólido.

Se aplicó una prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon ($p < 0,05$) y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de ameloblastoma, aunque la positividad en los ameloblastomas sólidos fue menor al 10% en todos los casos (figura 6).

Figura 6
Barras y bigotes que comparan los conteos de proliferación celular entre las placas de ameloblastoma uniuquístico y sólido



DISCUSIÓN

Los estudios sobre la proliferación celular en varios tipos de ameloblastoma, que usan marcadores como el Ki-67, el PCNA y el MIB-1, muestran evidencia discrepante. Por ejemplo, Li y colaboradores¹⁰ mostraron que el ameloblastoma uniuquístico, que presenta islas tumorales que invaden la pared quística, exhibe un índice significativamente más alto de proliferación celular que los ameloblastomas uniuquísticos con los nódulos o excrecencias intraluminales. Ellos encontraron índices de inmunotinción similares en el ameloblastoma con invasión intramural y el ameloblastoma sólido de patrón folicular, lo que respalda un similar comportamiento biológico. Asimismo, reportaron que el ameloblastoma folicular tuvo un índice de inmunotinción, tanto con PCNA como con Ki-67, mayor que el ameloblastoma plexiforme.

Por otro lado, Kim y Yook,¹² Piatelli y colaboradores¹³ y Takahashi y colaboradores¹⁴ encontraron que el índice del PCNA en el ameloblastoma plexiforme fue mayor que en el ameloblastoma folicular. Ellos no pudieron demostrar discrepancias relevantes en la actividad proliferativa entre los diferentes subtipos histológicos del ameloblastoma uniuquístico, ni diferencias estadísticamente significativas en la actividad del PCNA entre el epitelio proliferante (con cambios ameloblásticos o sin éstos) y el no proliferante de los ameloblastomas uniuquísticos de revestimiento plano. Asimismo, Sandra y colaboradores hallaron que el ameloblastoma folicular tuvo un índice más alto, tanto para el Ki-67 como para el PCNA, al ser comparado con el ameloblastoma plexiforme, aunque no hubo diferencias estadísticamente representativas.²

Takahashi y colaboradores¹⁴ reportaron que el ameloblastoma acantomatoso no mostró inmunorreactividad para el PCNA, a diferencia de Kim y Yook¹² y Piatelli y colaboradores,¹³ quienes obtuvieron índices altos en el ameloblastoma acantomatoso. Sandra y colaboradores² observaron positividad para la inmunotinción del PCNA y el Ki-67 con índices más altos en

el ameloblastoma acantomatoso, al confrontarlo con los ameloblastomas desmoplásicos y uniuquísticos. Sin embargo, las capas internas del componente epitelial acantomatoso fueron negativas y solamente la capa externa presentó una tinción positiva. Ello sugeriría que las células de la capa interna estaban en un estadio maduro sin actividad proliferativa.

Con base en el patrón histológico, se asume que las células de la capa externa (células basales) son las más inmaduras de los diferentes tipos de células y retienen las características de las células progenitoras odontogénicas.¹⁵ Hallazgos confirmados por Sandra y colaboradores en su estudio, donde las células basales expresaron el mayor índice de inmunotinción con el PCNA y el Ki-67, las células cuboidales tuvieron el menor índice de todas, y las células columnares estaban en el medio. Asumieron que las células basales tienen la mayor actividad proliferativa, debido a la inmadurez de las células ameloblásticas, y consideraron que éstas son la entidad de valoración operativa en estos tipos de estudios. Ellos concluyeron que el patrón histológico, el patrón citológico, la apariencia clínica y la edad del paciente se relacionaron con la actividad proliferativa; por el contrario, no pudieron estimar la actividad proliferativa del ameloblastoma con la apariencia radiográfica y la localización del tumor. Igualmente, sugirieron que se deben usar el PCNA y el Ki-67 como marcadores de proliferación, usando los dos para confirmar los resultados.²

Piatelli y colaboradores¹³ mostraron que los ameloblastomas tienen un conteo celular positivo mayor que las células del queratoquiste odontogénico con el PCNA; además, afirmaron que los ameloblastomas recurrentes presentan un índice mayor con el PCNA que cualquier otro ameloblastoma y que los ameloblastomas uniuquísticos presentan valores más bajos que los ameloblastomas acantomatoso, plexiforme y folicular.

Por su parte, Rosenstein y colaboradores¹⁶ presentaron una serie de casos de ameloblastomas quísticos, en los que observaron una inesperada capacidad destructiva del hueso y recurrencia tumoral alta. Evaluaron los índices de proliferación con el anticuerpo Ki-67 para ver si existía correlación con el comportamiento biológico y encontraron que los promedios de proliferación fueron del 4,3% para el ameloblastoma uniuquístico, del 2,8% para sólido y del 6,6% para el quiste dentífero.

Meer y colaboradores⁹ corroboraron lo obtenido por Rosenstein y colaboradores, al concluir que la actividad proliferativa celular valorada con PCNA y Ki-67 varía según el tipo de ameloblastoma investigado. Los investigadores hallaron índices mayores en el ameloblastoma uniuquístico del subtipo de revestimiento simple e intramural, lo que dio como posible explicación la diferencia en la metodología, especialmente en el protocolo de conteo usado. Infortunadamente, es difícil comparar estos parámetros, ya que los reportes publicados fallan

al proveer insuficiente detalle sobre las técnicas de conteo de las muestras.

Otra posible explicación es la diferencia en la morfología tumoral, ya que las lesiones sólidas proveen largos folículos y sábanas plexiformes, mientras que los ameloblastomas unicuésticos muestran una delgada capa de epitelio ameloblástico, lo cual resulta en una inclusión de un gran número de células basales y suprabasales en el grupo de ameloblastomas unicuésticos, y que da como resultado un mayor índice de inmunotinción.⁹

A diferencia de los estudios mencionados, en el presente estudio no se encontró variabilidad en la expresión del índice de proliferación celular con el antígeno Ki-67, entre los subtipos histológicos, luminal, de revestimiento simple y mural en los ameloblastomas del tipo unicuéstico, ya que todas las placas fueron negativas para la inmunotinción. No obstante, existe diferencia en la inmunexpresión de Ki-67 para el ameloblastoma sólido, en el que se halló un 100% de positividad menor al 10%.

No se encontró variabilidad en la expresión del índice de proliferación celular con Ki-67 entre los subtipos histológicos, luminal, de revestimiento simple y mural del ameloblastoma de tipo unicuéstico. Sin embargo, como sólo se obtuvo un caso del subtipo mural unicuéstico, no se puede determinar si su actividad proliferativa es diferente a la de los sólidos; tampoco se puede comparar con los resultados de otros estudios que muestran proliferación similar. Igualmente, no se encontró variabilidad en la expresión del índice de proliferación celular con Ki-67 entre los subtipos histológicos, folicular, plexiforme, acantomatoso y de células granulares del ameloblastoma de tipo sólido. Debido al limitado número de muestras de los ameloblastomas de tipo sólido, no se puede establecer si existen diferencias significativas en la proliferación celular entre los diferentes subtipos.

Las posibles explicaciones para la ausencia de inmunotinción con Ki-67 en los ameloblastomas de tipo unicuéstico son: (1) pérdida de la antigenicidad, por una inadecuada fijación o preservación de los tejidos; la fijación en formaldehído no debe ser menor de 8 horas ni mayor a 24, se debe utilizar formol al 10% amortiguado en una relación de 3 partes de formol por una de tejido, y el tejido debe permanecer incluido totalmente en parafina para su preservación y adecuado almacenamiento. (2) Si se asume que la técnica estaba bien ejecutada (sustentando esto con la positividad de los controles) y la antigenicidad del tejido estaba preservada, otra posible explicación es que las células neoplásicas podían haberse encontrado en los estados, quiescente o fase G0 de ciclo celular, fase G1 temprana y fase S del ciclo celular.

En este estudio, las células que tuvieron mayor índice de inmunotinción fueron las células basales y parabasales del epitelio en los ameloblastomas de tipo sólido. Ello

corroboró lo obtenido por Sandra y colaboradores,² quienes concluyeron que las células basales tienen la mayor actividad proliferativa, debido a la inmadurez de las células ameloblásticas.

En los últimos años, se han identificado numerosos antígenos proteicos que desempeñan importantes funciones en la regulación de la proliferación celular. Algunas de estas proteínas están presentes exclusivamente en las células en proliferación y su identificación por medio de técnicas inmunohistoquímicas ofrece la posibilidad de estudiar de modo detallado la proliferación celular normal y patológica. Éste es el caso del antígeno Ki-67, que puede ser reconocido por el anticuerpo Ki-67. Este último requiere ser utilizado en cortes de tejido por congelación, pero actualmente este problema está subsanado gracias al anticuerpo MIB-1, que reconoce igualmente el epítipo Ki-67 y tiene la ventaja de poder usarse en cortes de tejido fijados en formol e incluidos en parafina.¹⁷

Las técnicas inmunohistoquímicas han proporcionado diversos marcadores de proliferación celular ampliamente empleados en la actualidad en patología quirúrgica, como son Ki-67, PCNA y MIB-1. Sin embargo, el antígeno Ki-67 tiene una expresión más restringida durante el desarrollo del ciclo celular, pues alcanza una mayor precisión que la que comúnmente se obtiene con PCNA, aun cuando éste también marca el ADN en reparación de células que no se encuentran en división; por lo tanto, no se considera el método más óptimo para valorar la proliferación. Además, el PCNA se detecta en las fases G0, G1, S y M del ciclo celular. El antígeno Ki-67 es una proteína no histónica con una doble banda de 345 y 395 kD. Se detecta en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular. Sin embargo, no existe acuerdo en la literatura respecto de su distribución en la fase G1, ya que algunos autores afirman que Ki-67 aparece al final,¹⁸ mientras otros dicen que las concentraciones de Ki-67 disminuyen a lo largo de G1 y desaparecen al final de G1.¹⁹⁻²¹

Teniendo en cuenta que el PCNA tiñe el ADN reparativo de células no proliferantes, además de teñir todas las fases del ciclo celular, se deberían correlacionar con otros marcadores como la oncoproteína bcl-215 y el gen supresor tumoral p53.

CONCLUSIONES

La actividad proliferativa de los ameloblastomas varió según el tipo histológico, sólido o unicuéstico. Hubo una marcada diferencia en la inmunexpresión de Ki-67, porque se observó positividad en el 100% de las muestras de ameloblastoma sólido, mientras que en los ameloblastomas unicuésticos hubo una total negatividad. Esta diferencia es estadísticamente significativa, a pesar de que la positividad en todos los casos de los ameloblastomas sólidos fue menor al 10%.

RECOMENDACIONES

Al contemplar únicamente el tipo histológico y no otras variables, como género y edad del paciente, clasificación radiológica y tomográfica, tamaño tumoral, localización de la lesión, extensión, compromiso de las estructuras anatómicas por la lesión tumoral, lesión primaria o recidiva, patrón de crecimiento expansivo o infiltrativo, evolución del paciente y manejo quirúrgico dado a los pacientes, no se puede correlacionar el índice de proliferación celular de los tipos de ameloblastomas con la conducta biológica del tumor (recidiva tumoral). Por esto se sugiere continuar con la línea de investigación, incluyendo estas variables en los estudios.

Otros aspectos que se sugieren para futuros estudios incluyen: estandarizar el protocolo de fijación del espécimen quirúrgico; tomar las muestras de especímenes quirúrgicos, preferiblemente, y no de biopsia para realizar varios cortes y tomar la muestra más representativa; estudiar un mayor número de muestras de cada subtipo histológico, para poder comparar la proliferación celular entre el mismo subtipo y con los demás, y comparar con otros tipos de marcadores celulares, como la oncoproteína bcl-2 y el gen supresor p53.

BIBLIOGRAFÍA

- Gortzak RA, Latief BS, Lekkas C, Slootweg PJ. Growth characteristics of large mandibular ameloblastomas: report of 5 cases with implications for the approach to surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Aug; 35(8): 691-5.
- Sandra F, Mitsuyasu T, Nakamura N, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2001 Feb; 37(2): 193-8.
- Kumamoto H, Ooya K. Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Dis.* 2006 Mar; 12(2): 163-70.
- Adebiyi KE, Odukoya O, Taiwo EO. Ectodermal odontogenic tumours: analysis of 197 Nigerian cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Dec; 33(8): 766-70.
- Reichart PA, Philipsen HP, Sonner P. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995 Mar; 31B(2): 86-99.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
- Reichart PA, Philipsen HP, Sciubba JJ. The new classification of head and neck tumours (WHO)—any changes? [Editorial]. *Oral Oncology.* 2006; 42: 757-8.
- Li TJ, Wu YT, Yu SF, Yu GY. Unicystic ameloblastoma: a clinicopathologic study of 33 Chinese patients. *Am J Surg Pathol.* 2000 Oct; 24(10): 1385-92.
- Meer S, Galpin JS, Altini M, Ali H. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Feb; 95(2): 213-21.
- Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in unicystic ameloblastoma. *Histopathology.* 1995 Mar; 26(3): 219-28.

- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with proliferation. *Int J Cancer.* 1983 Jan 15; 31(1): 13-20.
- Kim J, Yook JI. Immunohistochemical study on proliferating cell nuclear antigen expression in ameloblastomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994; 30B(2): 126-31.
- Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts. *Oral Oncol.* 1998 Sep; 34(5): 408-12.
- Takahashi H, Fujita S, Yamabe S, Moriishi T, Okabe H, Tarima Y, Mizuno A. Comparison of proliferating cell nuclear antigen expression in odontogenic keratocyst and ameloblastoma: an immunohistochemical study. *Anal Cell Pathol.* 1998; 16(4): 185-92.
- Mitsuyasu T, Harada H, Higuchi Y, Kimura K, Nakamura N, Katsuki T, Kubota E, Toyoshima K, Ohishi M. Immunohistochemical demonstration of bcl-2 protein in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 1997 Sep; 26(8): 345-8.
- Rosenstein T, Pogrel MA, Smith RA, Regezi JA. Cystic ameloblastoma-behavior and treatment of 21 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Nov; 59(11): 1311-6.
- Key G, Becker MH, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest.* 1993 Jun; 6(6)8: 629-36.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984 Oct; 133(4): 1710-5.
- López F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau MR. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry.* 1991; 12(1): 42-9.
- Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992 Jan; 25(1): 31-40.
- López F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau MR. The labelling of proliferating cells by Ki67 and MIB-1 antibodies depends on the binding of a nuclear protein to the DNA. *Exp Cell Res.* 1994 Feb; 210(2): 145-53.

CORRESPONDENCIA

Libia Sofía Ochoa Gómez
lsochoagomez@yahoo.com
sofiaochoagomez@hotmail.com

Edna Margarita Martínez O.
edna.martinez@javeriana.edu.co

Jairo Alberto Bustillo Rojas
Facultad de Odontología
Pontificia Universidad Javeriana
Carrera 7 # 40-62, edificio 26
Bogotá, Colombia
bustillo@javeriana.edu.co