



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE SOX2 EN QUISTES  
DENTÍGEROS CON DISPLASIA EPITELIAL.

**T E S I N A**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

MARIO ARANDA PLATA

TUTOR: Esp. EMILIANO JURADO CASTAÑEDA

ASESOR: C.D. OSCAR JONATHAN ORTEGA SAUCEDO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Al personal e instalaciones del laboratorio de Patología Clínica y Experimental DEPEI de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Dr. Javier Portilla Robertson, el Esp. Emiliano Jurado Castañeda y el **C.D. Oscar Jonathan Ortega Saucedo** por su gran apoyo en la realización del presente trabajo.*

*A mis padres, Cirilo Aranda Hernández y Juana Hilda Plata Colín por brindarme los elementos para llevar a término este proyecto. Gracias por ser un ejemplo de superación personal y enseñarme que un profesional de la salud debe ser humilde; por su amor condicionado e incondicional, soy consciente de todos los sacrificios que realizaron y quiero corresponderles pero sobretodo convertirme en una persona fuerte ante la vida como ustedes.*

*A mi hermano, Gibran Aranda Plata por conservar mi espíritu joven y contagiarme de sus ideas revolucionarias. Gracias por las experiencias que reforzaron nuestros lazos de hermandad y expreso que por ellas te guardo un gran sentimiento de complicidad.*

*A mis amigos y compañeros, por las vivencias que enriquecieron nuestra vida académica. Siempre me brindaron una mano para levantarme. Gracias por haberme permitido conocerlos porque en ustedes encontré ese amor fraternal, mi motivación para mejorar como persona.*

*A mis profesores, por contribuir a mi formación profesional mediante su conocimiento, opiniones y experiencias. Admiro la dedicación y el compromiso que supone su labor para el futuro de México.*

*Por último, pero no menos importante, a Winny Lorelei Meza Martínez por haber plantado la semilla de la incertidumbre científica en mí. Los conocimientos y experiencias que me dio viajan por los ríos de la memoria y desembocan en el subconsciente para perderse ahí por los siglos. Gracias por el amor, amistad, confianza, secretismo y paciencia brindadas.*

# ÍNDICE

## Introducción

<b>1. Marco teórico</b> .....	7
1.1 Quistes.....	7
1.1.1 Definición y generalidades.....	7
1.1.1.1 Histogénesis de los quistes odontogénicos.....	7
1.1.1.2 Clasificación de los quistes odontogénicos.....	9
1.1.2 Factores de expansión quística.....	10
1.2 Quiste dentífero.....	12
1.2.1 Definición y generalidades.....	12
1.2.2 Histogénesis.....	13
1.2.3 Clasificación.....	15
1.2.4 Epidemiología.....	16
1.2.5 Diagnósticos diferenciales.....	17
1.2.6 Tratamiento y pronóstico.....	17
1.3 Displasia epitelial.....	18
1.4 Inmunohistoquímica.....	21
1.4.1 Antecedentes.....	21
1.4.2 Relación anticuerpo-antígeno.....	21
1.4.2.1 Anticuerpo secundario.....	24
1.4.3 Inmunohistoquímica asociada a quiste dentífero.....	25
1.4.4 Marcador Sox-2.....	27
1.4.5 Técnica Inmunohistoquímica.....	28

<b>2. Marco metodológico</b> .....	34
2.1 Planteamiento del problema.....	34
2.2 Justificación.....	34
2.3 Hipótesis.....	34
2.4 Objetivo general.....	34
2.5 Objetivos específicos.....	35
2.6 Población y muestra del estudio.....	35
2.2.1 Criterios de inclusión.....	36
2.2.2 Criterios de exclusión.....	36
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	36
3.1 Materiales.....	36
3.1.1 Buffers, diluyentes y soluciones recuperadoras de antígeno... 36	
3.1.2 Sustratos, cromógenos y soluciones para contrateñir.....	37
3.1.3 Soluciones bloqueadoras de la actividad endógena.....	37
3.1.4 Sustratos para silanizar láminas.....	38
3.1.5 Instrumentos de laboratorio.....	38
3.2 Métodos.....	38
3.2.1 Silanizado de portaobjetos.....	38
3.2.2 Elaboración de diluyentes y soluciones.....	39
3.2.3 Técnica inmunohistoquímica por método indirecto.....	40

<b>4. Resultados</b> .....	42
<b>Discusión</b> .....	46
<b>Conclusiones</b> .....	47
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	48

## **Introducción**

El quiste dentígero (QD) es un quiste odontogénico de origen epitelial cuya característica principal es que envuelve a la corona de un diente no erupcionado hasta la unión amelocementaria. Es el segundo quiste odontogénico más común después del quiste radicular y por su naturaleza asintomática su descubrimiento es incidental. La ausencia de síntomas tempranos permite que el epitelio genere una respuesta adaptativa como hiperplasia, metaplasia y displasia. Cuando una célula pierde su capacidad adaptativa genera una lesión irreversible como necrosis y apoptosis. En el caso de un QD con displasia epitelial o un ameloblastoma derivado de un QD se consideran lesiones premalignas. El potencial de metástasis para definir la malignidad en ambos casos está condicionado a la integridad de la lámina basal, células sin cambio apoptótico y que no se infiltren en el tejido conectivo.

Por otra parte, el descubrimiento de la relación entre anticuerpos y antígenos hace más de medio siglo permitió el nacimiento de la inmunohistoquímica. Para esta técnica se utiliza un anticuerpo monoclonal que se incuba en una muestra epitelial para que mediante la unión antígeno-anticuerpo y un cromógeno sea visible la expresión del marcador por el que tiene afinidad. En el caso de Sox-2, se ha encontrado sobreexpresión en carcinomas de células escamosas de lengua y mucosa oral. Actualmente se ha identificado Sox-2 en las células basales en quistes dentígeros, no obstante, no se ha documentado su expresión en quistes dentígeros con displasia epitelial. El presente trabajo pretende analizar la expresión del marcador Sox-2 en muestras de quistes dentígeros displásicos para ver si puede ser un elemento de interés para el diagnóstico diferencial y la malignidad de esta lesión en particular.

## **1.1 QUISTES**

### **1.1.1 Definición y generalidades**

El término quiste proviene de la palabra griega *kistis* (vejiga) y se define como una lesión patológica con contenido fluido, semifluido o gaseoso que no es originado por acumulación de pus. <sup>1, 2</sup> Puede describirse como una bolsa que encierra un contenido líquido o semisólido, tapizada en su interior por epitelio y recubierta en su cara externa por tejido conectivo. <sup>3</sup> La cápsula puede tener tejido conectivo denso o laxo con o sin infiltrado inflamatorio; el epitelio es escamoso estratificado no queratinizado y la luz contiene células descamadas, células blancas, entre otros residuos. <sup>4</sup> En los quistes odontogénicos el revestimiento deriva del epitelio producido durante el desarrollo de los dientes. <sup>5</sup>

#### **1.1.1.1 Histogénesis de los quistes odontogénicos**

En la formación de los dientes participan el epitelio ectodérmico que origina el esmalte y el ectomesénquima, estas estructuras dan lugar al complejo dentinopulpar, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Las células basales del epitelio oral proliferan dando lugar a la lámina dental que será la estructura primordial de la porción ectodérmica de los dientes deciduos. <sup>5</sup> El patrón de desarrollo coronario está compuesto por cuatro estadios; brote o yema dentaria, casquete, campana y terminal o fólculo dentario. En la etapa de campana son más evidentes los cambios de morfo e histodiferenciación por lo cual se divide en una fase inicial y avanzada. Por otra parte, la regresión de la vaina epitelial de Hertwig y la diferenciación de los cementoblastos inducen a la formación del patrón de desarrollo radicular. <sup>6</sup> Los quistes odontogénicos derivan de los restos de Mallassez, el epitelio reducido del esmalte y los restos de la lámina dental o restos de Serres.

<sup>7</sup> Figura 1

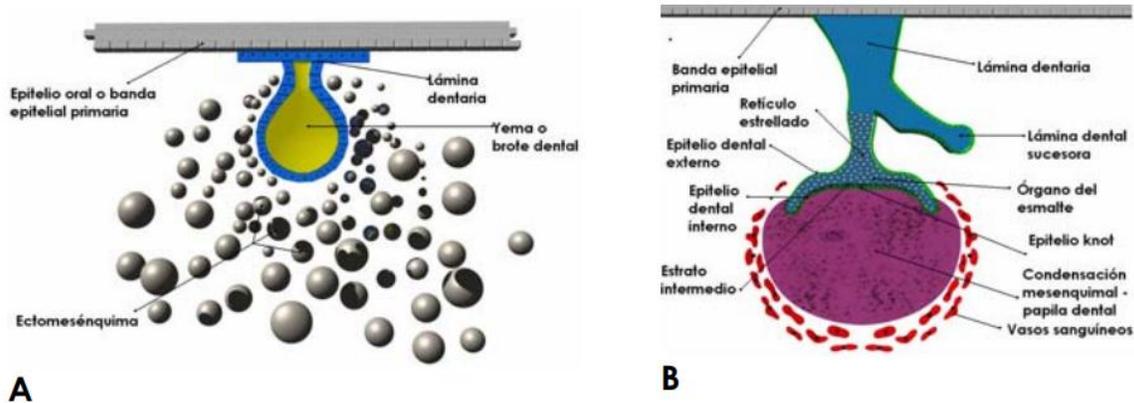


Figura 1 Etapa de brote con ectomesénquima condensado y proliferando debajo de la proliferación de células epiteliales (A). Etapa de casquete en donde se ha definido el órgano del esmalte y la papila dental (B).<sup>8</sup>

Cuando la vaina epitelial de Hertwig se fragmenta forma los restos de Mallassez. El efecto proliferativo sobre las células epiteliales estimulado por interleucina (IL-1) puede desempeñar un papel en la evocación de respuesta inflamatoria y estimular a los restos de Mallassez para proliferar y formar un quiste radicular. También se ha sugerido que la interacción entre odontoblastos y restos de Mallassez con el gen *Smad4* podría llevar a la formación de un queratoquiste.<sup>9</sup>

En la fase secretora de la amelogénesis, los ameloblastos remueven las proteínas del esmalte maduro para completar la mineralización. Posteriormente se contraen de células columnares a cuboidales para formar el epitelio reducido del esmalte. Dicha estructura está compuesta de dos capas celulares, una interna donde los ameloblastos están en contacto con el esmalte y una externa de células del estrato intermedio. A medida que el diente erupciona, el epitelio reducido del esmalte es destruido mientras que el que se encuentra cervicalmente interactúa con el epitelio oral para formar el epitelio de unión.<sup>10</sup> El diente que no erupciona corre el riesgo de generar un quiste por acumulación de líquido entre el epitelio reducido del esmalte y la superficie del esmalte.<sup>11</sup>

La lámina dental se desintegra en su periodo pos-funcional generando pequeños islotes y bandas de epitelio acumuladoras de glucógeno, esto les confiere un

citoplasma con aspecto transparente, estos residuos de células claras de la lámina dental se denominan restos de Serres y pueden permanecer en la mucosa adulta como grupos de células en reposo con queratina y estar implicados en la etiología de ciertos quistes. <sup>10, 12</sup>

### 1.1.1.2 Clasificación

En 1839 se publicó el primer informe de revista acerca de las lesiones odontogénicas con una lesión de hueso duro en el maxilar cuya terminología actual corresponde a un cementoblastoma. El profesor francés Pierre Paul Broca en el año de 1869 realizó una monografía con una clasificación de tumores que incluían lesiones odontogénicas. <sup>13</sup> A lo largo de las décadas la clasificación de los quistes de origen odontogénico ha sufrido diversas modificaciones, por ejemplo la de Shafer que además de categorizar a las lesiones en inflamatorias y de desarrollo, también las clasificaba por su tejido de origen. (Tabla 1) <sup>7</sup>

Clasificación de los quistes odontogénicos por su patogenia y tejido de origen (2009)		
Etiología	<i>Del desarrollo</i>	Quiste dentífero
		Quiste de erupción
		Queratoquiste odontogénico
		Quiste gingival (alveolar) del recién nacido
		Quiste gingival del adulto
		Quiste periodontal lateral
		Quiste odontogénico calcificante
		Quiste odontogénico glandular
	<i>Inflamatorio</i>	Quiste periapical
		Quiste residual periapical (radicular)
Quiste paradental		
Tejido de origen	<i>Derivado de los restos de Malassez</i>	Quiste periapical
		Quiste residual
	<i>Derivado del epitelio reducido del esmalte</i>	Quiste dentífero
		Quiste de erupción
		Queratoquiste odontogénico

	<i>Derivado de la lámina dental (restos de Serres)</i>	Quiste gingival (alveolar) del recién nacido
		Quiste gingival del adulto
		Quiste periodontal lateral
		Quiste odontogénico calcificante
		Quiste odontogénico glandular

Tabla 1 Clasificación de Shaffer de los quistes odontogénicos por su patogenia y tejido de origen.

Sin embargo, la clasificación más práctica y reciente de quistes odontogénicos es la publicada por la Organización Mundial de la Salud. (Tabla 2) <sup>4</sup>

<b>Fragmento de la clasificación de tumores óseos odontogénicos y maxilofaciales OMS, 2017</b>	
<b>Quistes odontogénicos de origen inflamatorio</b>	Quiste radicular
	Quiste inflamatorio colateral
<b>Quistes odontogénicos y no odontogénicos del desarrollo</b>	Quiste dentífero
	Queratoquiste odontogénico
	Quiste lateral periodontal y quiste botriode odontogénico
	Quiste gingival
	Quiste odontogénico glandular
	Quiste odontogénico calcificante
	Quiste odontogénico ortoqueratinizado
Quiste del conducto nasopalatino	

Tabla 2 Clasificación de tumores odontogénicos y maxilofaciales.

### 1.1.2 Factores de expansión quística

El crecimiento de un quiste está determinado por una serie de cambios hidrostáticos, por ejemplo, la presencia de células mucosecretoras en el epitelio de revestimiento de ciertos quistes. Mosqueda señala el proceso de trasudación y exudación como factor de expansión quística; en el primero es el resultado de la obstrucción de las venas intrafoliculares en quistes dentíferos y el segundo de una inflamación aguda, tal es el caso del quiste radicular. <sup>14</sup> Figura 2

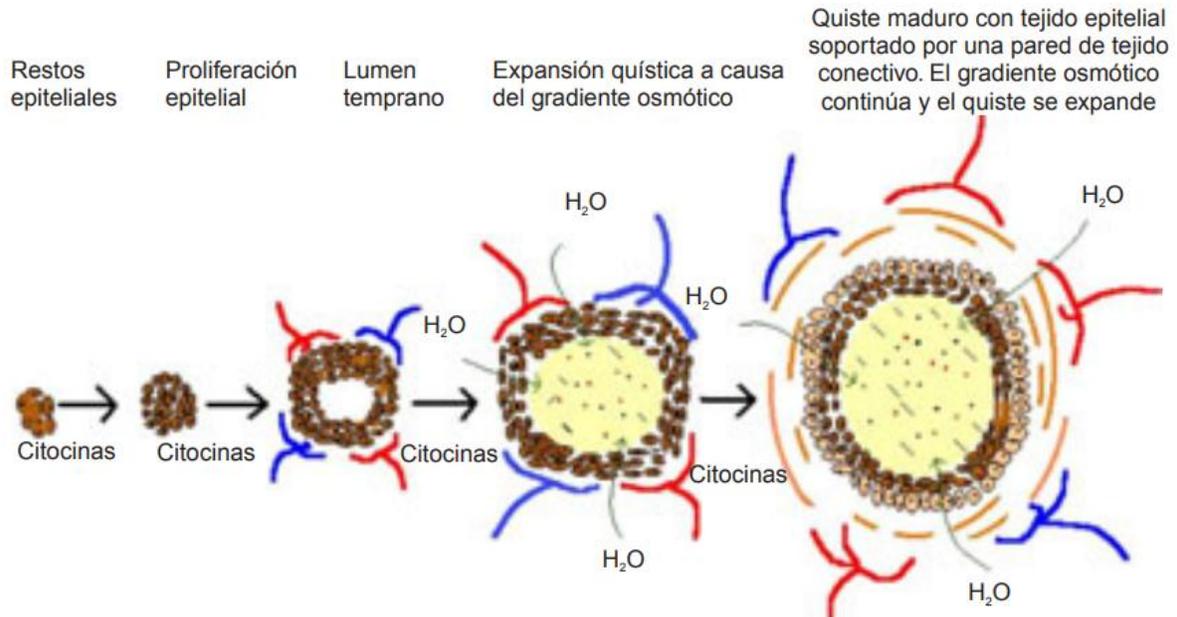


Figura 2 El contenido central crea una solución hipertónica intraluminal con trasudación y expansión quística. <sup>15</sup>

Aunado a la expansión hidrostática se suman la proliferación epitelial, la acumulación de contenidos celulares y el factor de reabsorción ósea. En la proliferación epitelial el factor queratinocítico (KGF) es sintetizado por los fibroblastos del estroma y estimula el crecimiento quístico además de inducir a cambios locales en el pH. Se teoriza que un quiste también aumenta de volumen por la constante producción y acumulación de queratina. La reabsorción ósea es consecuencia de la expansión quística y contribuye a que siga creciendo la lesión. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), implícito en la reabsorción, estimula la actividad osteoclástica favoreciendo la reabsorción e incrementado la respuesta vascular local. Asimismo están implicadas en dicho proceso interleucinas, interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), prostaglandinas PGE2 y PGI2, leucotrienos y colagenasas. <sup>16</sup>

## 1.2 QUISTE DENTÍGERO

### 1.2.1 Definición y generalidades

Un quiste dentígero o folicular (QF) es un quiste del desarrollo epitelial formado por acumulación de fluido entre el epitelio reducido del esmalte y la corona de un diente no erupcionado. Se presenta radiográficamente como una lesión unilocular en la mayoría de los casos.<sup>17, 18</sup> Es asintomático y no existe disconformidad a menos que se infecte secundariamente. A la exploración clínica la lesión presenta un color normal, es suave a la palpación y dura en consistencia. En un periodo de evolución más largo produce una sensación de pergamino (signo de Dupuytren).<sup>11</sup> Figura 3



Figura 3 Espécimen de un quiste dentígero donde se observa al epitelio envolver la corona y llegar al cuello del diente.<sup>2</sup>

Radiográficamente se ve una zona bien delimitada radiolúcida, con un margen cortical que rodea la corona de un diente no erupcionado hasta la unión amelocementaria.<sup>4, 19</sup> Histológicamente se aprecia una pared sin inflamación o pérdida de tejido fibroso, con una ligera apariencia mixoide, forrado por un epitelio regular delgado de un grosor de 2-4 capas de células. Su luz contiene proteínas, albúmina; los niveles de globulina e inmunoglobulina son similares a los del suero.

<sup>2</sup> Los quistes dentígeros bilaterales y múltiples se asocian a un gran número de

síndromes como la displasia cleidocranial y el síndrome de Maroteaux-Lamy. <sup>11, 17</sup>  
Figuras 4 y 5

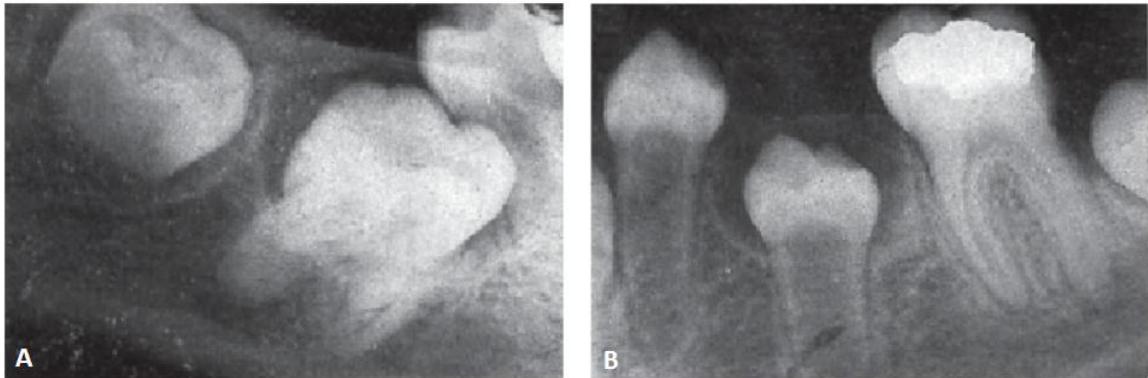


Figura 4 Imagen radiográfica de un saco pericoronario y de un QD del molar más anterior (A). Imagen radiográfica de un QD que a pesar de estar cercano a la encía su cortical ósea lo cubre (B). <sup>20</sup>

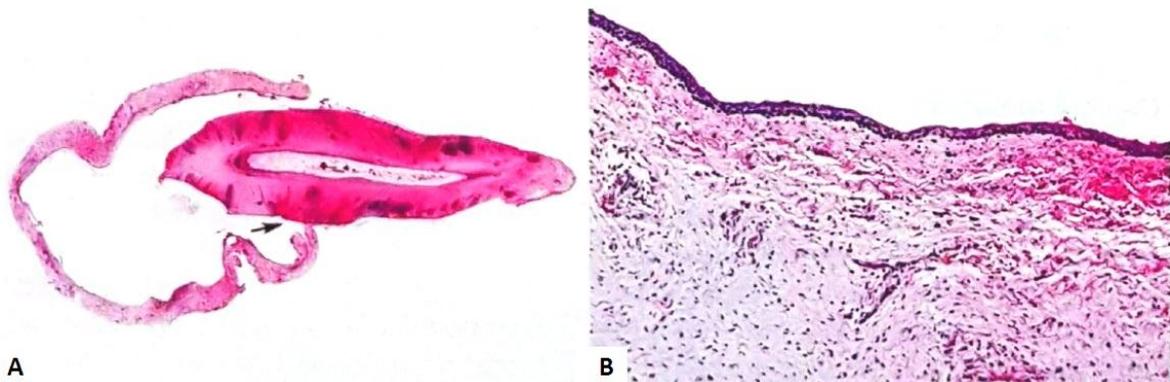


Figura 5 La histología de potencia menor muestra un delgado forro regular. Este quiste está adjunto a un diente en la región de la unión cemento-esmalte (A). El quiste no muestra inflamación y tiene una pobre apariencia mixoide (B). <sup>4</sup>

### 1.2.2 Histogénesis

De acuerdo a Al-Talabani hay dos clases de QD de acuerdo a su patogénesis, el primero donde la causa es la degeneración del retículo estrellado en una etapa temprana del desarrollo (asociado con hipoplasia del esmalte); el segundo por acumulación de fluido entre las capas del epitelio reducido del esmalte y el esmalte

cuando existe una corona. <sup>21</sup> No obstante, las proyecciones parecidas a los procesos de Tomes descubiertas en los revestimientos de los quistes dentígeros sugiere que las capas superficiales derivan de los ameloblastos anulando la teoría de la degeneración del retículo estrellado. Otra teoría dice que la presencia de focos de hipoplasia en el esmalte disminuye la adherencia del epitelio reducido del esmalte a la corona favoreciendo el desarrollo del quiste. <sup>2</sup>

La presencia o no de hipoplasia del esmalte en un diente no erupcionado depende del comienzo de la lesión, por ejemplo, se ha observado cuando se origina en etapas tempranas del folículo dental mientras que en los casos donde el quiste nace después de terminar el desarrollo del diente, la hipoplasia dental no es un factor significativo. <sup>22</sup>

Retomando la teoría de origen quístico por acumulación de fluido, Main (1970) sugirió que la presión ejercida por un diente en erupción sobre un folículo impactado obstruye el flujo venoso e induce a la rápida trasudación de suero a través de las paredes capilares. La presión hidrostática incrementada de este fluido separa al folículo de la corona. <sup>2</sup>

Benn y Altini describieron tres mecanismos de origen inflamatorio para la histogénesis del quiste. Ellos propusieron que un QD podría formar un folículo dental secundario que pudiese inflamarse secundariamente por una fuente como un diente no vital. El segundo mecanismo sugerido fue la formación de un quiste radicular en el ápex de un diente no vital deciduo seguido de la erupción de su sucesor permanente encapsulándose en un QD de origen extrafolicular. La última teoría dice que un folículo de un sucesor permanente podría infectarse secundariamente desde cualquier inflamación periapical de un predecesor no vital. <sup>22</sup> El seguimiento de distintos casos clínicos corroboran que el cambio inflamatorio en el ápice de un diente deciduo puede ser el responsable de originar un QD del sucesor permanente.

<sup>22, 19</sup> Figura 6

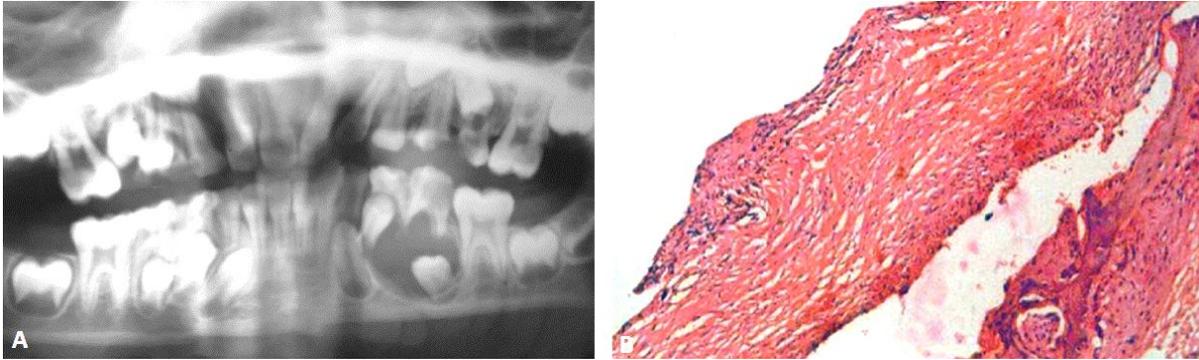


Figura 6 Radiografía panorámica que sugiere la formación de un QD por infección del predecesor (A). Sección microscópica (tinción HE) del revestimiento quístico que muestra infiltración de células inflamatorias (B).<sup>23</sup>

Un actual estudio respalda la teoría de que los mastocitos desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio de quistes no queratinizados. Además, los productos de degranulación de los mastocitos pueden correlacionarse con el aumento de destrucción de la matriz extracelular en la pared quística mediante estimulación de la producción citoquina y, por tanto, puede facilitar la expansión de la lesión.<sup>24</sup>

### 1.2.3 Clasificación

La forma en que el folículo dental se expande y rodea al diente no erupcionado determina el tipo de QF. En el QD central el folículo rodea al diente proporcionalmente por encima de la corona anatómica, en el QD lateral se recarga sobre un lado y en el QD circunferencial se expande hacia abajo dando la impresión de incluir al diente dentro del mismo. Es importante resaltar que en los tres casos el epitelio del QF no excede la unión cemento-esmalte. (Figura 7)<sup>2</sup>

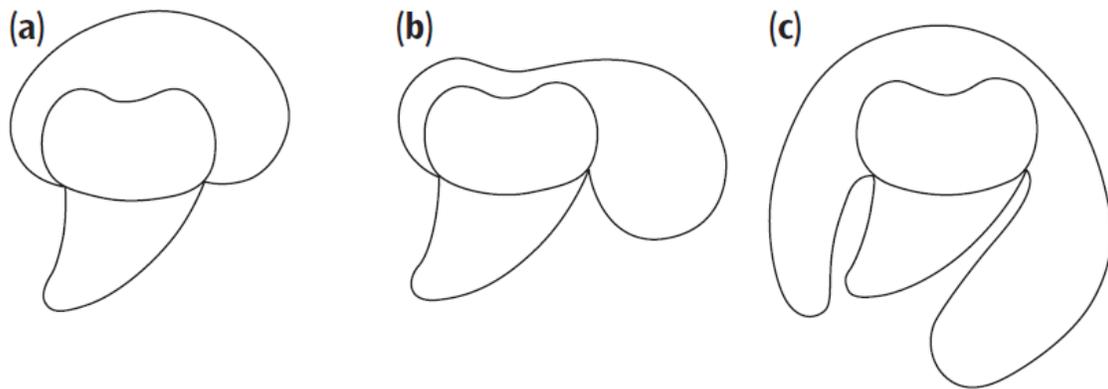


Figura 7 Diagrama que ilustra la manera en la cual el folículo dental se expande y produce diferentes apariencias radiográficas de quistes dentígeros. Los tipos son central (A), lateral (B) y circunferencial (C).

### 1.2.4 Epidemiología

Los quistes dentígeros representan el 20-24% de los quistes odontogénicos siendo los segundos más comunes después del quiste radicular. Su incidencia en hombre y mujer corresponde a una relación 3:2 respectivamente y ocurren con mayor frecuencia de la segunda a la cuarta década de vida.<sup>4, 17</sup> Raghavendra indica que la incidencia de quistes dentígeros reportada es 1,44 de cada 100 dientes sin erupcionar.<sup>22</sup>

En México se realizó un estudio donde se analizaron 4,410 muestras histopatológicas del laboratorio de histopatología bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco y un servicio privado de diagnóstico en patología bucal. El 11,4% (856 muestras) correspondieron a quistes odontogénicos de las cuales 283 casos fueron por QD siendo como la literatura lo indica el segundo más frecuente después del quiste radicular con 342 casos.<sup>25</sup>

### **1.2.5 Diagnósticos diferenciales**

Los diagnósticos diferenciales del QD son el quiste radicular, quiste inflamatorio paradental, queratoquiste odontogénico, ameloblastoma, fibroma ameloblástico, fibroma odontogénico, tumor odontogénico adenomatoide, entre otros. <sup>18</sup> La pauta que diferencia al QF de otras lesiones es su perfil histológico, por ejemplo; en el quiste inflamatorio paradental (de origen inflamatorio) hay en alguna sección del epitelio pérdida de continuidad con infiltrado inflamatorio, en el queratoquiste existe un revestimiento epitelial paraqueratinizado con un patrón de superficie ondulado de células basales empalizadas y prominentes. <sup>26</sup> En los queratoquistes odontogénicos la tinción de los revestimientos epiteliales y las paredes mesenquimales es mayor que en los quistes dentígeros. <sup>2</sup>

Shear sugiere que es incorrecto asumir que un ameloblastoma deriva del epitelio de un QD y que esta confusión se debe a: 1) involucran un diente no erupcionado, particularmente un tercer molar en el ángulo de la mandíbula, 2) la biopsia muestra un epitelio de un grosor delgado y 3) la presencia de folículos epiteliales a cierta distancia del revestimiento epitelial. <sup>2</sup> Sin embargo, algunos autores concuerdan con que al menos 20% de los ameloblastomas unicísticos derivan del epitelio de los quistes foliculares. Citológicamente el ameloblastoma se diferencia por el patrón plexiforme de su bicapa donde cada filamento está unido periféricamente por células columnares altas. <sup>27</sup>

### **1.2.6 Tratamiento y pronóstico**

Los quistes dentígeros son tratados frecuentemente por enucleación (extrayendo el diente involucrado en el proceso) o por marsupialización. <sup>4, 28</sup> En la primera opción se remueve todo el contenido patológico y se rellena la cavidad con sustancias que favorezcan la cicatrización (bismuto, yodoformo, pasta de parafina). En la marsupialización se realiza una ventana en la pared cística para evacuar el contenido y el revestimiento del quiste se sutura en continuidad con la mucosa oral.

<sup>17</sup> El siguiente cuadro muestra las ventajas y desventajas de ambas opciones terapéuticas. (Tabla 3) <sup>3</sup>

<b>Ventajas e inconvenientes de las diferentes opciones terapéuticas</b>		
<b>Tipo de tratamiento</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>
<b>Enucleación (cistectomía)</b>	-Técnica simple y habitual	-Alta tasa de recurrencias
<b>Descompresión/marsupialización</b>	-Permite disminuir el tamaño de la lesión -Permite proteger estructuras anatómicas vecinas al quiste -En dentición temporal y gérmenes no interfiere en la erupción de dientes incluidos a causa del quiste	-Requiere que el paciente sea colaborador -Muchas visitas de control -Tratamiento de larga duración

Tabla 3 Ventajas y desventajas de la enucleación y marsupialización de quistes dentígeros.

Los criterios que indicarán la modalidad de tratamiento con el tamaño y la localización de la lesión, la edad del paciente, la dentición que presenta y la posible afectación con las estructuras anatómicas importantes. <sup>29</sup> De acuerdo a la OMS los quistes dentígeros tratados no suelen recurrir. <sup>4</sup>

### **1.3 DISPLASIA EPITELIAL**

La adaptación celular es un conjunto de cambios que presenta una célula ante un estímulo fisiológico, patológico, funcional y/o estructural para sobrevivir. Dentro de estos cambios la hipertrofia se traduce como un aumento de tamaño de células y órganos, la hiperplasia a un incremento de número de células manteniendo su tamaño y forma, la atrofia a la disminución de tamaño de células y órganos. La metaplasia corresponde a un cambio en el fenotipo de las células diferenciadas, a menudo como respuesta a irritación crónica para soportar mejor las agresiones. La displasia se caracteriza por pérdida de uniformidad de cada célula y desorientación arquitectónica, las células displásicas presentan pleomorfismo y contienen núcleos hiper cromáticos con un elevado índice nucleocitoplásmico. <sup>30</sup>

De acuerdo a la Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología publicada por la OMS, la displasia se divide en bajo y alto grado. (Tabla 4) <sup>4</sup> Figura 8

<b>Bajo grado de displasia</b>	
<b>Criterio arquitectónico</b>	<p>Se conserva la estratificación: transición de células basales o aumento de las capa de células basales/parabasales con orientación perpendicular a la membrana basal a células de Prickle orientadas horizontalmente en la parte superior.</p> <p>Capa espinosa: Espectro de cambios variados desde incremento de la capa espinosa en todo el espesor a cambios en la cual las células de Prickle son vistas sólo en la mitad del epitelio superior.</p> <p>Capa basal/parabasal: Espectro de cambios, desde 2-3 capas sin alterar a aumento de células basales y parabasales en la mitad inferior del epitelio.</p>
<b>Criterio citológico</b>	<p>La mínima atipia celular.</p> <p>Células parabasales: aumenta ligeramente el citoplasma comparado a las células basales, núcleo alargado, cromatina distribuida uniformemente, no hay puentes intercelulares.</p> <p>Mitosis regulares raras en o cerca de la capa basal.</p> <p>Algunas células disqueratóticas presentes.</p>
<b>Alto grado de displasia</b>	
<b>Criterio arquitectónico</b>	<p>Maduración anormal.</p> <p>Grados variables de estratificación desordenada y polaridad en tanto como todo el epitelio.</p> <p>Las células epiteliales alteradas usualmente ocupan desde la mitad hasta el entero espesor epitelial.</p> <p>Dos subtipos: Queratinizado (tipo célula espinosa) y no queratinizado (tipo célula basal). Grados variables de irregular formación (bulboso, se extiende hacia abajo), con una membrana basal intacta.</p>
<b>Criterio citológico</b>	<p>Fácilmente identificado a conspicua celular y atipia nuclear, incluyendo variación marcada en el tamaño y forma, marcada variación en intensidad de la tinción con frecuente hiperchromasia, nucléolo aumentado en número y tamaño.</p> <p>Radio N:C incrementado.</p> <p>Incremento de mitosis en o encima del nivel suprabasal, con o sin formas atípicas.</p>

	Células disqueratóticas y apoptóticas son frecuentes a través del epitelio.
--	---

Tabla 4 Criterios histológicos para definir una displasia de bajo o alto grado.

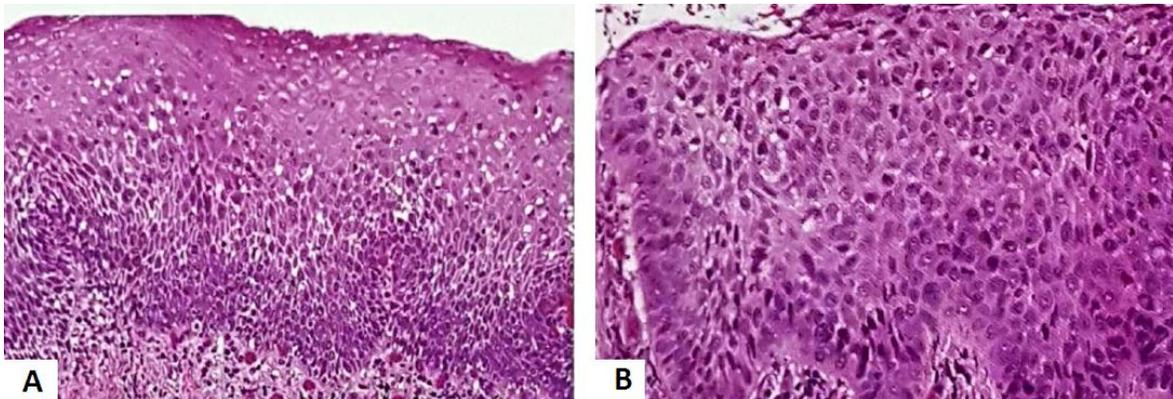


Figura 8 Bajo grado de displasia donde la mitad superior del epitelio no ha cambiado (A). Alto grado de displasia donde el epitelio hiperplásico está enteramente ocupado por células epiteliales moderadamente pleomórficas de tipo basaloide; es evidente la orientación perpendicular a la membrana basal (B).<sup>4</sup>

## **1.4 INMUNOHISTOQUÍMICA**

### **1.4.1 Antecedentes**

Los antecedentes de la inmunohistoquímica (IHQ) se remontan a los estudios realizados por Behring y Shibasaburo donde por medio de una toxina diftérica en un suero procedente de animales inmunizados establecieron el papel protector de las proteínas circulantes y demostró que la resistencia a enfermedades microbianas puede ocurrir a través del suero, esto sentó la base de la inmunidad pasiva.<sup>31, 32</sup> Paul Ehrlich es considerado el padre de la inmunohistoquímica por sus diferentes aportaciones en las que destaca su teoría de las cadenas laterales donde los anticuerpos son descritos como estructuras proteínicas membranales preformadas que, al ser seleccionadas por el antígeno aumentan su síntesis y se vierten en exceso en el suero. En 1951 Henry Kunkel realizó experimentos en pacientes con mieloma múltiple y mostró la relación entre la elevación de proteínas en el suero con las gammaglobulinas normales haciendo posible la identificación de clases de anticuerpos, sus regiones constantes y variables.<sup>32</sup>

La sobreexpresión o disminución de un marcador específico en un tejido que presenta adaptación celular es el fundamento de la inmunohistoquímica y puede determinarse a través de ella el grado de malignidad que expresa una lesión, su relación con el anticuerpo utilizado para proveer un diagnóstico presuntivo. No obstante, los marcadores son específicos a órganos con ciertas limitantes, por ejemplo, la proteína S100 se expresa en tumores de la vaina nerviosa periférica como melanoma y carcinoma de células claras.<sup>33</sup> Por esta razón debe interpretarse la técnica inmunohistoquímica en conjunto con la morfología de las células y conociendo el contexto clínico de la lesión.

### **1.4.2 Relación antígeno-anticuerpo**

Los anticuerpos son glucoproteínas solubles que reconocen y se unen específicamente a los antígenos. Están presentes en el suero, los líquidos tisulares y las membranas celulares.<sup>34</sup> Son los responsables de la respuesta inmune junto

con los receptores para linfocito T y las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. Sus funciones principales son reconocimiento y unión a antígenos; las inmunoglobulinas neutralizan microbios o sus productos activando el sistema de complemento, por opsonización o mediante citotoxicidad celular. <sup>31</sup>

El anticuerpo está formado de cuatro cadenas peptídicas: dos pesadas (H) idénticas entre sí, de unos 440 aminoácidos de longitud y 50 kDa de peso molecular, y dos cadenas livianas o ligeras (L) idénticas entre sí, de unos 220 aminoácidos de longitud y 25 kDa de peso molecular; unidas por puentes disulfuro que forman una estructura similar a una Y. <sup>35, 36</sup> La cadena pesada cuenta con una región constante (Fc) y otra variable (Fab), esta última tiene la zona de unión al antígeno. Las cadenas se pliegan independientemente en una estructura globular que se llama dominio Ig, el cual contiene dos capas de láminas plegadas en B (beta), cada una compuesta de tres a cinco hélices de cadenas polipeptídicas antiparalelas. (Figura 9) <sup>31</sup>

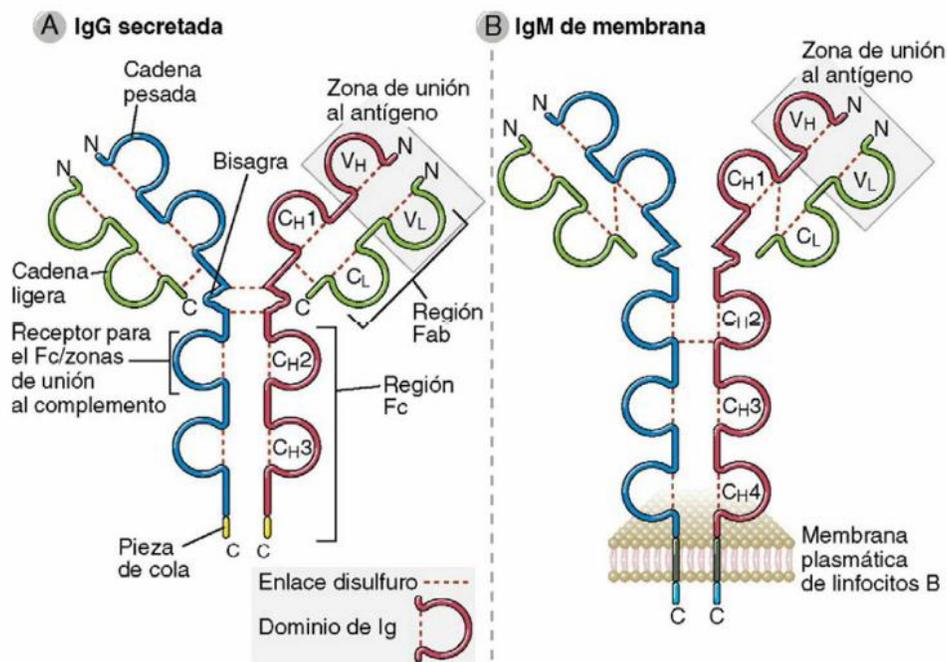


Figura 9 Diagrama esquemático de una molécula IgG secretada (A). Diagrama esquemático de una molécula IgM unida a la membrana de superficie de un linfocito B (B).

En los seres humanos hay cuatro subclases de inmunoglobulina G (IgG) y dos de inmunoglobulina A (IgA) formando nueve isotipos de anticuerpos: IgM, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD e IgE. <sup>33</sup> A continuación las características de los isotipos encontrados en la mayoría de los mamíferos. (Tabla 5) <sup>31</sup>

Isotipo de anticuerpo	Concentración sérica (mg/ml)	Semivida en suero (días)	Forma secretada	Funciones
<b>IgA</b>	3,5	6	IgA (dímero) Monómero, dímero, trímero	Inmunidad de mucosas
<b>IgD</b>	Mínima	3	Ninguna	Receptor para el antígeno del linfocito B virgen
<b>IgE</b>	0,05	2	Monómero de IgE	Defensa contra parásitos helmintos, hipersensibilidad inmediata
<b>IgG</b>	13,5	23	Monómero de IgG1	Opsonización, activación del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, inmunidad neonatal, inhibición por retroalimentación de linfocitos B
<b>IgM</b>	1,5	5	Pentámero de IgM	Receptor para el antígeno del linfocito B virgen, activación del complemento

Tabla 5 Características de los cinco isotipos de anticuerpos en común de la mayoría de los mamíferos.

Un antígeno es cualquier molécula exógena o endógena que resulta extraña al organismo y no necesariamente desencadena una respuesta inmune; las moléculas que inducen dicha respuesta se les llaman inmunógenos. Las regiones hipervariables del anticuerpo que contactan con el antígeno se denominan parátomos. La región de un antígeno que puede unirse a un anticuerpo es llamada epítomo y existen dos tipos:

•**Lineal.** Formado por secuencias de aminoácidos continuos y contiguos.

•**Conformacional.** Constituido por secuencias de aminoácidos continuos o discontinuos y distantes, que se aproximan entre sí debido a la conformación tridimensional del antígeno.<sup>37</sup>

Generalmente un antígeno inferior a 4,000 Da (conocido como hapteno) se une a la hendidura/surco que está entre los dominios V de las cadenas pesadas y ligeras o al sitio de unión al antígeno a los largo de la superficie. Para esta interacción el anticuerpo se vale de fuerzas no covalentes como lo son las fuerzas electroestáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y fuerzas hidrófobas.<sup>38</sup> Las inmunoglobulinas que se encuentran secretadas en espacios extracelulares sólo reconocen antígenos desplegados sobre las superficies de las células propias del cuerpo. Esto por fragmentos peptídicos de las proteínas del antígeno mediante el complejo principal de histocompatibilidad.<sup>36</sup> Figura 10

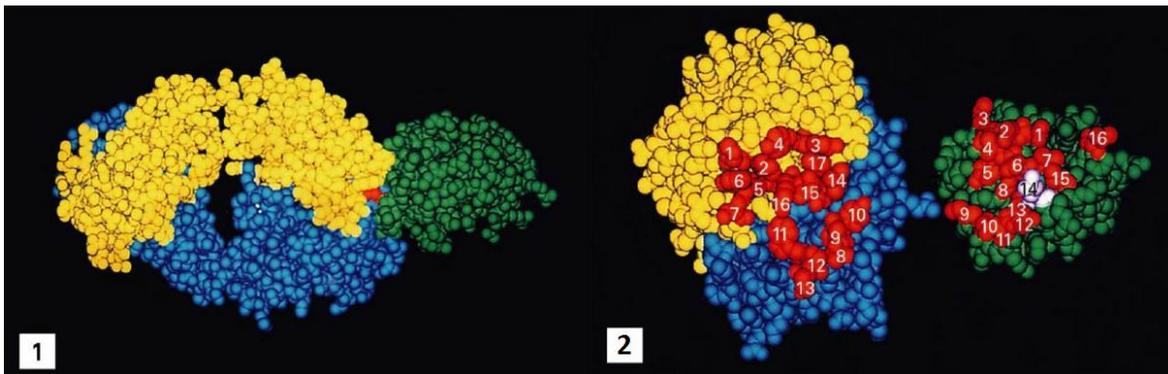


Figura 10 Lisozima (verde) unida a las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras (amarillo) del fragmento Fab del anticuerpo D1.3 (A). Complejo separado con Glu121 visible (rojo) y girado 90° para mostrar los aminoácidos responsables de los enlaces de hidrógeno.<sup>34</sup>

#### 1.4.2.1 Anticuerpo secundario

Un anticuerpo secundario es una molécula dirigida contra el anticuerpo inmunoglobulina. Este anticuerpo se une específicamente al isotipo del anticuerpo primario (Ig) en un inmunoensayo y no se enlaza directamente al epítipo de la proteína y, por lo tanto, no le confiere especificidad al epítipo objetivo. Estos

anticuerpos tienen una estructura similar a las inmunoglobulinas, no obstante, para propósitos de tinción en inmunohistoquímica se seccionan con pepsina en una porción divalente **F(ab')<sub>2</sub>** sin la región Fc o mediante papaína en una única región monovalente **F(ab)**.<sup>39, 40</sup>

Los anticuerpos secundarios monovalentes sólo tienen un sitio de unión al antígeno por lo que no pueden unirse a otra molécula después de su incubación. Por otra parte, los anticuerpos secundarios divalentes presentan el problema de unirse al anticuerpo primario y dejar un enlace desocupado donde puede unirse otro anticuerpo secundario dando lugar a un error falso-positivo. Tienen especificidad de unión a ciertas regiones de la cadena del anticuerpo y pueden ser conjugados para diferentes cromógenos dependiendo la técnica (inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, ELISA, etcétera). (Figura 11)<sup>40</sup>

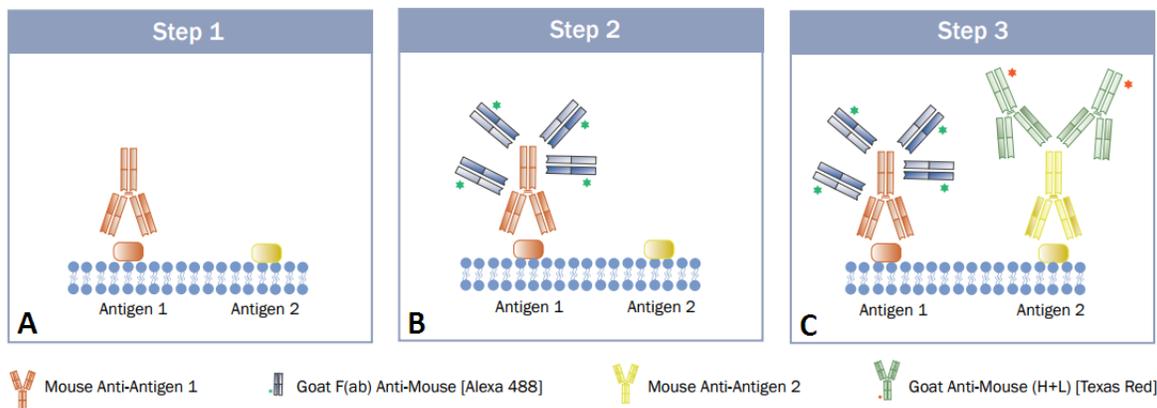


Figura 11 Ejemplos de incubación con un anticuerpo primario / antígeno (A), anticuerpo secundario monovalente / anticuerpo primario / antígeno (B) y, anticuerpo secundario divalente / anticuerpo primario / antígeno (C).

### 1.4.3 Inmunohistoquímica asociada a quiste dentífero

Muzio y colaboradores (2005) encontraron que en la mayoría de los quistes dentíferos p63 está confinado a la capa basal y parabasal del revestimiento epitelial. La diferenciación anormal epitelial ha sido vinculada a la expresión de la proteína de hueso morfogénico-4 (BMP-4) cuyo marcador primario es el anticuerpo

policlonal BMP-4 y puede estar relacionado con la morfogénesis epitelial y el crecimiento invasivo.<sup>2</sup>

Los vasos sanguíneos presentes en el estroma conectivo de los quistes dentígeros ayudan al crecimiento epitelial del mismo aportando oxígeno y nutrientes. Partiendo de esa premisa Jamshidi describió la relevancia de las glicoproteínas CD34 y CD105 en la angiogénesis durante la inflamación en queratoquistes y quistes dentígeros. Al ver los anticuerpos cultivados al microscopio concluyó que la primera muestra tuvo mayor sobreexpresión de dichos marcadores por la densidad vascular entre una y otra lesión. Además de que la diferencia en esta respuesta regenerativa de los vasos podría estar vinculada a las metaloproteinasas.<sup>41</sup> Estas últimas comprenden una larga familia de enzimas que actúan en proteólisis asociadas a condiciones patológicas y son producidas por la mayoría de las células inflamatorias. Se asocian con quistes odontogénicos agresivos como el queratoquiste y en el caso del QF las metaloproteinasas (MMP-8, MMP-9, MMP-25, MMP-26) no se expresan mucho más que en los folículos dentales normales.<sup>42</sup>

Otros marcadores que se han asociado a los quistes odontogénicos son las citoqueratinas. En el caso de los quistes cuyo origen es el epitelio reducido del esmalte se ha encontrado una actividad positiva por parte de la citoqueratina 14 (CK14), incluyendo al QD en su capa basal o suprabasal. En cambio la vimentina (marcador mesenquimal) no se expresa en este tipo de lesión.<sup>43</sup> La citoqueratina 18 (CK18) se expresa en estructuras histogénicas como la lámina dental y el epitelio del esmalte, mientras que la citoqueratina 19 (CK19) es discernible en epitelios simples y células basales de epitelios escamosos estratificados no queratinizados. En el QF la expresión de CK18 siempre es mayor que el marcador CK19 y puede constituir un elemento para el diagnóstico diferencial con queratoquiste y quiste radicular.<sup>44</sup>

La proteína Ki-67 se expresa en la proliferación de células durante la síntesis de DNA y desaparece después de la mitosis. Por otra parte, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína reconocida por su papel en la síntesis

y reparación de DNA. Ambas moléculas son un auxiliar en el estudio comparativo entre lesiones quísticas. (Tabla 6) <sup>45</sup>

<b>Expresión de Ki-67 y PNCA en el folículo dental, quiste dentífero, ameloblastoma unicístico y ameloblastoma basado en la densidad de tinción</b>					
<b>Tipo</b>	<b>N° muestra</b>	<b>Marcador</b>	<b>Débil</b>	<b>Moderado</b>	<b>Intenso</b>
<b>Folículo dental</b>	15	Ki-67	12	3	0
		PCNA	12	3	0
<b>Quiste dentífero</b>	15	Ki-67	0	14	1
		PCNA	0	14	1
<b>Ameloblastoma unicístico</b>	15	Ki-67	0	10	5
		PCNA	0	12	3
<b>Ameloblastoma</b>	15	Ki-67	0	5	10
		PCNA	0	2	13

Tabla 6 Expresión del marcador Ki-67 y PCNA en lesiones odontogénicas para diagnóstico diferencial.

Existe evidencia de otros estudios de quistes dentíferos con expresión de diferentes marcadores como CD138, CD10, FHIT y P53 <sup>46, 47, 48</sup>, no obstante, hasta el momento hay poca información sobre la repercusión de Sox2 en el QD.

#### **1.4.4 Marcador Sox2**

Los factores de transcripción al unirse a secuencias particulares de DNA regulan la transcripción de genes individuales. Los factores de transcripción como Oct-4, Sox2 y Nanog forman una red de transcripción que mantiene las células en un estado pluripotencial, es decir, células madre que pueden diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinativas –endodermo, mesodermo y ectodermo-, así como el temprano desarrollo embrionario. Sox2 es un gen de codificación del factor de transcripción localizado en 3q26.3-27 con un peso molecular de 34.31 kDa. <sup>49</sup> Sin embargo, necesita de factores adicionales para desempeñar su actividad pluripotencial, en el caso de SOX2 son Klf4 y c-Myc. <sup>50</sup> Este factor está pensado para regular los objetivos de expresión génica indispensables para la supervivencia

y regeneración de algunos tejidos. Como se va expresar a nivel de la transcripción, histológicamente con ayuda de un anticuerpo secundario y un cromógeno podrá analizarse su sobreexpresión o inexpressión en el núcleo de la célula.

En un estudio realizado por Weiming y colaboradores donde analizaron la expresividad de SOX2 en lesiones cancerígenas de cabeza y cuello determinaron que entre mayor fuera la sobreexpresión de dicho marcador más pobre será el pronóstico, así como su papel en la invasión profunda y metástasis en nódulos linfáticos. <sup>48</sup> Por último, SOX2 es el primer de los cuatro genes de la plurepotencialidad en demostrarse su capacidad para generar células madre pluripotenciales y ser usado con combinaciones alternativas de factores para inducir a la formación de células unipotenciales como astrocitos y oligodendrocitos. <sup>51</sup>

La molécula SOX2 ha sido encontrada positivamente en quistes dentígeros (epitelio cercano a la lámina basal) y epitelio mucoso superficial. Desde esta perspectiva, no es indicativo de transformación de alto grado como se ha demostrado en lesiones neoplásicas ameloblásticas pero su estudio en conjunto con otros marcadores (como Ki67) podría servir para el diagnóstico diferencial y potencial de transformación maligna. <sup>52</sup>

#### **1.4.5 Técnica inmunohistoquímica**

El objetivo de la inmunohistoquímica es observar la expresividad de diferentes marcadores. Hay que entender que existen pasos dentro de la técnica que pueden modificarse dependiendo de los sustratos, procedimientos y antígenos a evaluar.

Según Clive R. Taylor la comparación entre los pasos de todos los métodos de IHQ con los protocolos inmunológicos reveló deficiencias en la realización de la técnica que siguen vigentes y por lo mismo se resumió la técnica para tener una IHQ correcta. (Tabla 7) <sup>53</sup>

<b>Elementos de la prueba</b>	<b>Asuntos para lograr calidad</b>	<b>Responsable</b>
Selección de test: la pregunta diagnóstica	Indicaciones de IHQ y selección de tinción	Patólogo quirúrgico; a veces clínico
Adquisición de espécimen y manejo	Recolección de espécimen, fijación, procesado y seccionado	Patólogo / tecnólogo
Técnica / metodología	Reactivos, anticuerpos, recuperación antigénica, protocolos, automatización (o métodos manuales)	Patólogo / tecnólogo
Ensayos analíticos	Sensibilidad y especificidad, cualificaciones del personal, prueba de aptitud	Patólogo / tecnólogo
Resultados: validación y reporte	Criterios para positivo / negatividad en relación con los controles	Patólogo / tecnólogo
Interpretación, significancia	Experiencia del patólogo Pruebas de aptitud de interpretación Diagnóstico, significado pronóstico Correlación con otros datos	Patólogo quirúrgico y / o clínico

Tabla 7 Indicaciones para lograr una inmunohistoquímica con calidad.

A continuación se enlistan los pasos de la técnica inmunohistoquímica por el método indirecto, es decir, con colocación de anticuerpo secundario y posteriormente se detalla cada paso:

1. Los bloques son enfriados en hielo, se seccionan en 4-6  $\mu\text{m}$  y montan sobre los portaobjetos revestidos con adhesivo inmediatamente antes de su uso.
2. Los cortes se desparafinan y rehidratan a través de alcoholes de diferente gradientes.
3. Se sumergen en agua del grifo.
4. Recuperación antigénica: por el método establecido o el recomendado por el fabricante.
5. Se sumergen en agua del grifo.
6. El bloqueador de la peroxidasa endógena puede ser peróxido de hidrógeno al 3% o algún otro reactivo recomendado.

7. Lavar en PBS (5 minutos, dos veces)
8. Añadir el bloqueador de la inmunoglobulina, suero normal de caballo\*
9. Lavar en PBS (5 minutos, dos veces)
10. Se añade el anticuerpo primario
11. Lavar con TBS (5 minutos, dos veces)
12. Agregar los reactivos del sistema de detección optimizados por valoración o suministro.
13. Lavar con TBS (5 minutos, dos veces)
14. DAB (cromógeno diaminobenzidina) por 5 minutos (recién preparada) o un suplente.
15. Aforar en agua del grifo.
16. Contrateñir con hematoxilina de Mayer.
17. Sumergir en agua del grifo.
18. Deshidratar para montar y colocar su cubreobjetos. <sup>53, 54</sup>

Primero se obtiene una muestra (preferentemente menor a 4 mm) y se fija en formaldehído o puede sumergirse en formalina neutra amortiguada al 10% por 1-2 días. Esto para impedir la autólisis de las células del tejido obtenido. Posteriormente se incrustan en parafina y se hacen cortes de 3-5  $\mu$  con ayuda de un micrótopo. Los cortes seccionales pasan a láminas previamente silanizadas (para mejor adhesión) y son secadas a una temperatura de 55-60°C por 30-60 minutos. Los agentes usados en la fijación de tejidos modifican la estructura terciaria y cuaternaria de muchos antígenos haciéndolos indetectables por los anticuerpos, por ello deben someterse a un proceso de recuperación antigénica. Para empezar se desparafinan las laminillas sumergiéndolas en xilol y alcohol en diferentes concentraciones. Después se afora con un detergente que imite el ambiente de la membrana fosfolipídica como Triton R-X 100, Tween 20, saponin, BRIJR y Nonidet P40. <sup>55</sup> Figura 12

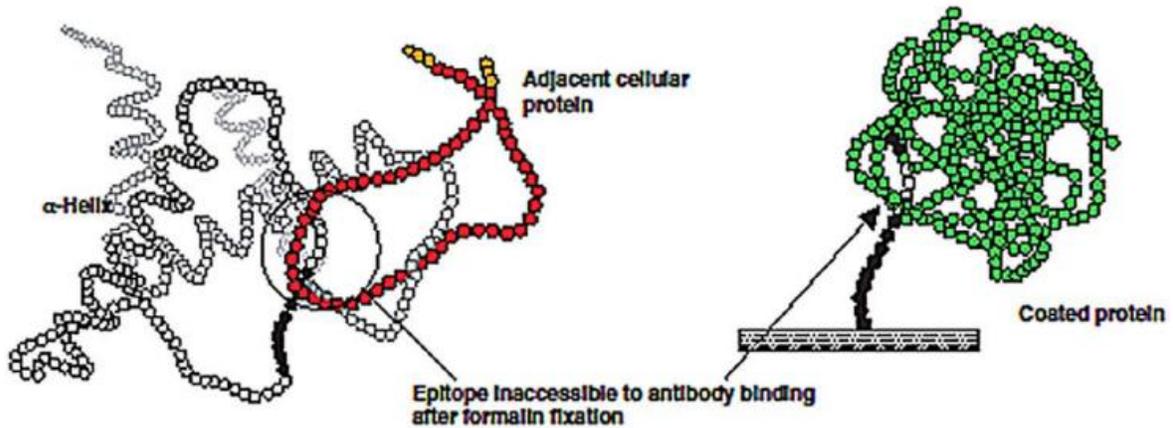


Figura 12 Pérdida de inmunoreactividad después de la fijación con formalina. <sup>56</sup>

La recuperación de epítipo inducida por proteasa (PIER) fue el método de recuperación antigénica más común antes de aquellos basados en calor pero no eran específicos y muchos antígenos eran afectados. La recuperación de epítipo inducida por calor (HIER) fue desarrollada por Fraenkel-Conrat y colaboradores, documentaron que la recuperación antigénica era posible gracias a altas temperaturas o una fuerte hidrólisis alcalina. Las soluciones para esta técnica varían de buffers (citrato, Tris, Tris-HCl) y pH (3-10). La solución buffer de citratos por su pH de 6.0 es el más utilizado en recuperación antigénica, se aforan las láminas con él en un vaso Koplring y se meten en un recipiente con agua al microondas (potencia 7 por 4 minutos). <sup>38</sup>

Una vez aclimatado el vaso según el método directo descrito por Ramos-Vera debería sumergirse en solución salina tamponada con fosfato al 10% (PBS 1X) 5 minutos antes de bloquear la peroxidasa endógena. No obstante aquí hay una modificación la cual consiste en lavar tres veces las laminillas con PBS 1X por 3 minutos cada lavado. Se bloquea la peroxidasa endógena colocando el reactivo de bloqueo de la fosfatasa alcalina y la biotina endógena con el sistema de bloqueo biotina (mouse/rabbit inmunodetector peroxidasa blocker- Bio SB) por 5 minutos, esto con el fin de inhibir la oxidación del epitelio y tener falsos reactivos. Mientras tanto en un Eppendorf con 1 ml de PBS 1X y 0.01 g de albumina (bloqueador del

marcage específico) se diluye el anticuerpo primario a la concentración correspondiente a la cantidad de solución final. Se lavan las laminillas tres veces con PBS 1X por tres minutos cada lavado y se coloca el anticuerpo. Es recomendable hacer todo este procedimiento en una cámara de agua pues el tejido debe mantenerse siempre en un ambiente hidratado. Se deja cultivar el anticuerpo primario mínimo 30 minutos. <sup>55</sup>

Posteriormente se elimina el anticuerpo primario y se lavan tres veces las laminillas con solución de buffer Tris al 10% (TBS 1X) por tres minutos cada lavado. Se coloca el anticuerpo secundario por 10 minutos (Inmunodetector el Biotin Link) y se repite el paso del lavado con TBS 1X. Posteriormente se coloca la peroxidasa exógena por 10 minutos (Inmunodetector HRP Label) y se lavan con agua desionizada las láminas. Se prepara la mezcla entre solución buffer de DAB y el cromógeno según el fabricante y se coloca al epitelio por 5 minutos. Se lava con agua corriente evitando que el chorro caiga directamente en las laminillas por otros cinco minutos, luego se dejan reposar en agua desionizada 5 minutos y se sumergen finalmente en un vaso Koplring –de preferencia de vidrio- con Hematoxilina por cinco minutos. Se vuelve a lavar con agua corriente entre cinco y diez minutos y se procede a llevar a las laminillas a deshidratación con los mismos reactivos con los que se desparafinó en el siguiente orden: alcohol al 90% (3 min.), alcohol al 90% (3 min.), alcohol al 100% (3 min.), alcohol al 100% (3 min.), xilol-alcohol (5 min.), xilol (5 min.) y xilol (5 min.). <sup>38</sup>

Sin embargo, varios de los problemas descritos por Clive R. Taylor que derivan en la obtención de resultados falsos positivos o falsos negativos radican en los pasos de la técnica inmunohistoquímica para lo que sugirió algunas posibles soluciones. (Tabla 8) <sup>57</sup>

<b>Sumario de factores que pueden dar tinciones falsas-positivas o falsas-negativas</b>		
<b>Resultado</b>	<b>Problema</b>	<b>Posible solución</b>
Falso (+)	Unión de proteínas inespecíficas Remoción incompleta de parafina	Utilizar el paso de bloqueo con suero no inmune de las mismas especies animales que el anticuerpo secundario Compruebe si hay reactivos frescos en los baños de procesamiento

	<p>Pobre fijación o tejido necrótico</p> <p>Preparación gruesa</p> <p>Anticuerpo muy concentrado;</p> <p>incubación larga</p> <p>Biotina endógena</p> <p>Enjuague incompleto de portaobjetos</p> <p>Tinción de cromógeno demasiado intensa</p> <p>Pigmentos endógenos como melanina</p> <p>Manchas o puntos a través de la sección</p>	<p>Asegúrese que el tejido esté propiamente fijado; evitar el muestreo de las áreas necróticas</p> <p>Corte secciones de 3-5 <math>\mu\text{m}</math></p> <p>Disminuya la concentración; disminuya el tiempo de incubación</p> <p>Utilizar el paso de bloqueo de avidina; mejor, cambiar a sistema de detección basado en polímeros</p> <p>Checar los pasos del enjuague; incluyendo la función de autoteñido</p> <p>Monitorear el tiempo de reacción del cromógeno; filtrar el cromógeno; disminuir la concentración de cromógeno</p> <p>Comparar con un control negativo; usar cromógeno de contraste</p> <p>Checar si hubo contaminación microbiológica de los reactivos; comprobar el uso de fijador mercurico (B5)</p>
Falso (-)	<p>Pobre fijación</p> <p>Deshidratación incompleta</p> <p>Parafina muy caliente</p> <p>Falta de recuperación antigénica</p> <p>Pasos para la tinción no seguidos</p> <p>Los reactivos no funcionan</p> <p>Anticuerpos muy diluidos; incubación muy corta</p> <p>Secado del tejido durante el proceso</p> <p>Cromógeno no funciona</p>	<p>Evitar retraso en la fijación (&gt;30 min.), fijación insuficiente (&lt;12 h.), o sobre-fijación (&gt;48 h.)</p> <p>Ver el protocolo para el procesamiento; asegurarse de tener reactivos frescos</p> <p>Monitorear la temperatura (&lt;60°C)</p> <p>Optimizar la temperatura y tiempo de recuperación antigénica</p> <p>Revisar el procedimiento en el manual; repetir. Comprobar la acción de la autotinción</p> <p>Comprobar fechas de expiración; parámetros de fábrica; compatibilidad con otros activos; y buffers</p> <p>Incrementar la concentración; alargar el tiempo de incubación; incrementar la temperatura de reacción</p> <p>Mantener el espécimen húmedo; prevenir la evaporación con una cámara húmeda</p> <p>Añadir cromógeno a los reactivos de detección, comprobar que el color cambia</p>

Tabla 8 Posibles causas de resultados falsos-positivos o falsos-negativos en la tinción con la técnica inmunohistoquímica y su solución.

## **2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El QD es una lesión recurrente que puede presentar displasia epitelial. Su naturaleza asintomática permite a la lesión expandirse y que estas alteraciones histológicas se presenten. La displasia representa una lesión premaligna lo que puede alterar el comportamiento del quiste.

## **2.2 JUSTIFICACIÓN**

La técnica inmunohistoquímica es utilizada para el diagnóstico diferencial de lesiones patológicas con características clínicas similares, permite ver la sobreexpresión de una molécula específica para determinar su papel en la patogénesis de alguna lesión. Sox-2, por otra parte, es un marcador cuya sobreexpresión ha sido documentada en lesiones neoplásicas malignas como en carcinoma de células escamosas de lengua o mucosa bucal. La displasia epitelial es considerada un estado adaptativo premaligno que se han encontrado en muestras de quistes dentígeros.

## **2.3 HIPÓTESIS**

Los quistes dentígeros con un epitelio normal presentarán expresión de Sox-2 en las células adyacentes a la lámina basal y aquellas con displasia epitelial mostrarán una sobreexpresión de Sox-2 que se extenderá a más estratos de células en el epitelio.

## **2.4 OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión del marcador Sox-2 en quistes dentígeros con epitelio normal y con displasia utilizando la técnica inmunohistoquímica por método indirecto.

## 2.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la estructura y citología de las displasias epiteliales en QD
2. Identificar por inmunohistoquímica la expresión de Sox-2 en el epitelio de los QD.
4. Comparar la expresión de Sox-2 de un QD con epitelio normal y otro con displasia.
5. Determinar la relación entre Sox-2 y presencia de displasia de quistes dentígeros mediante revisión bibliográfica.

## 2.6 POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO

Se tomó como base para esta tesina la línea de investigación sobre el análisis de cambios adaptativos en quistes dentígeros llevada a cabo por el estudiante de maestría Oscar Jonathan Ortega Saucedo. De una población de 543 quistes dentígeros perteneciente al archivo del laboratorio de Patología Clínica y Experimental DEPel de la Facultad de Odontología (UNAM), seleccionando una muestra a conveniencia de 7 elementos de QD con displasia y 7 sin cambios celulares, el cuál será el grupo control. Se solicitaron cortes en blanco de los elementos seleccionados con su respectivo corte teñido con hematoxilina y eosina. Se excluyeron 5 cortes por no cumplir con los criterios de inclusión. El tipo de estudio a realizar fue descriptivo observacional. A continuación se muestra el número de folio de los cortes utilizados. (Tabla 9)

Número de folio de las muestras de quistes dentígeros		
Control	Displasia	Metaplasia
853-03 B	441-91	326-07
149-90 A	163-08	123-03
149-90 B	853-03 A	
045-97 A	128-95	
318-92	045-97 B	
566-97	056-01	
359-02	068-97 B	

Tabla 9 Número de folio de los cortes solicitados al laboratorio de Patología Clínica y Experimental DEPel de la Facultad de Odontología para este estudio.

### 2.2.1 Criterios de inclusión

1. Muestras con suficiente epitelio de revestimiento para determinar presencia de displasia.
2. Muestras con su respectiva lámina con H & E.
3. Muestras mayores a 3 mm de diámetro.

### 2.2.2 Criterios de exclusión

1. Muestras sin epitelio de revestimiento.
2. Muestras con tejido de mucosa oral.
3. Muestras menores a 3 mm de diámetro.
4. Muestras sin cubo de parafina

## 3.1 MATERIALES

### 3.1.1 Buffers, diluyentes y soluciones recuperadoras de antígeno

1. Primera solución de enjuague: solución salina tamponada con Tris (TBS) 1x (pH de 8.4)
2. Segunda solución de enjuague: tampón fosfato salino (PBS) 1x (pH de 7.4).
3. Diluyente de anticuerpo: buffer de albúmina.
4. Solución recuperadora de antígeno: buffer de citratos. Figura 13



Figura 13 TBS 1x (A), PBS 1x (B), buffer de albúmina (C) y, solución de citratos (D). Fuente directa

### 3.1.2 Sustratos, cromógenos y soluciones para contrateñir

1. Cromógeno para métodos inmunohistoquímicos basados en la peroxidasa: inmunodetector DAB cromógeno (Bio SB).
2. Peroxidasa exógena: inmunodetector de ratón/conejo marcado con peroxidasa (Bio SB).
3. Anticuerpo monoclonal: Sox-2 (E-4) de ratón (Santa Cruz).
4. Solución para contrateñir: hematoxilina de Gills. Figura 14



Figura 14 Inmunodetector DAB cromógeno (A), inmunodetector de ratón/conejo marcado con peroxidasa (B) y, anticuerpo monoclonal Sox-2 (C). Fuente directa

### 3.1.3 Soluciones bloqueadoras de la actividad endógena

1. Reactivo bloqueador: inmunodetector de ratón/conejo bloqueador de la peroxidasa (Bio SB).
2. Sistema de detección de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina: inmunodetector de ratón/conejo Biotin Link (Bio SB). Figura 15

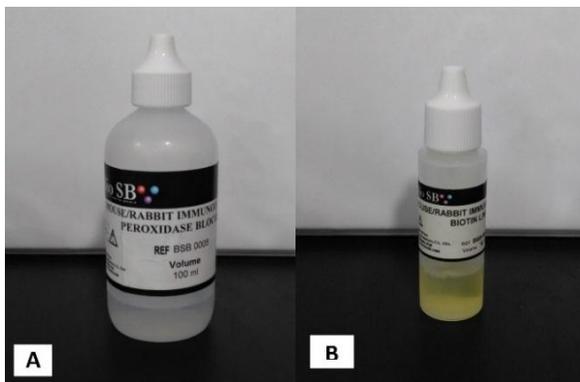


Figura 15 Inmunodetector de ratón/conejo bloqueador de la peroxidasa (A) e inmunodetector de ratón/conejo Biotin Link (B). Fuente directa

### 3.1.4 Sustratos para silanizar láminas

1. Acetona pura
2. Solución de silano.

### 3.1.5 Instrumentos de laboratorio

1. Portaobjetos y su respectivo cubreobjetos
2. Cristalería: vasos de precipitado, probetas graduadas, frascos, vasos Coplin, canastillas para láminas.
3. Desechables: tubos de seguridad Eppendorfs, puntas para micropipeta, guantes.
4. Otros: balanza de laboratorio, microondas, refrigerador de laboratorio, cámara de agua, gradillas, resina, marcador hidrófobo y pinzas de curación.

Figura 16



Figura 16 Kit de micropipetas (A), puntas de diferentes tamaños para micropipetas (B) y, tubos de seguridad Eppendorfs (C). Fuente directa

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Silanizado de laminillas**

Primero los portaobjetos se sometieron a un proceso de silanización mediante solución de silano (98% acetona y 2% silano) con el fin de que el tejido de las muestras se uniera mejor a su superficie. Los pasos para esta práctica son:

1. Colocar las laminillas en un vaso Coplin y se lavaron con agua desionizada.
2. Las laminillas limpias se sumergen en alcohol al 96% por cinco minutos.
3. Se aforan las láminas en solución de silano por cinco minutos. Se retiran y sacuden para eliminar excedente de la solución.
4. Los portaobjetos se lavan en agua destilada y se vuelven a sumergir en alcohol al 96%.
5. Se dejan secar los portaobjetos con la parte opaca hacia abajo en la campana de extracción del laboratorio.

### **3.2.2 Elaboración de reactivos**

Se procedió a elaborar los reactivos TBS 1x (500 ml), PBS 1x (500 ml), buffer de citratos (500 ml) y buffer de albúmina (4 ml). Se tomaron en cuenta las siguientes indicaciones:

1. Solución salina tamponada con Tris 1x. Usar el concentrado de TBS 10x y mezclarlo en agua desionizada en una concentración de 1-10. Por ejemplo, para producir 500 ml de TBS 1x corresponden 50 ml de TBS 10x y 450 ml de agua destilada. TBS 10x contiene 61 g de Tris, 90g de NaCl y 1L de agua bidestilada.
2. Tampón fosfato salino 1x. Usar el concentrado de PBS 10x y mezclarlo en agua desionizada en una concentración de 1-10. Por ejemplo, para producir 500 ml de PBS 1x corresponden 50 ml de PBS 10X y 450 ml de agua desionizada. PBS 10x contiene 8.01 g de NaCl, 0.19 g de KCl, 0.20 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.14 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 1L de agua bidestilada.

3. Buffer de citratos. Se utilizan dos soluciones; la solución A, su concentración es por cada 1.05 g de ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) aforar con 50 ml de agua desionizada y, la solución B, por cada 1.47 g de citrato de sodio ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) aforar con 50 ml de agua destilada. La concentración de la solución de trabajo es por cada 4.5 ml de solución A mezclar con 20.5 ml de solución B y 250 ml de agua desionizada.
4. Buffer de albúmina. Se mezcla PBS 1x con albúmina bovina en una concentración de 1ml por 0,01 g.

### **3.2.3 Técnica inmunohistoquímica por método indirecto**

Se colocaron las laminillas en las canastillas y sumergieron cinco minutos en xilol, cinco minutos en otro recipiente con xilol, cinco minutos en xilol-alcohol, tres minutos en alcohol al 100%, en otro recipiente tres minutos en alcohol al 100%, tres minutos en alcohol al 90% y, por último, en otro recipiente otros tres minutos en alcohol al 90%. Esto con la finalidad de desparafinar los tejidos sobre el portaobjetos. Después se colocaron en un vaso Coplin y lavaron por un minuto con agua del grifo sin que tocara directamente al epitelio puesto que corre el riesgo de desprenderse de la lámina.

Posteriormente se colocó la solución de citratos en los vasos Coplin para la recuperación antigénica. Se taparon los vasos y colocaron en una bandeja con agua para finalmente meterlos al microondas por 4 minutos a potencia 7. Al sacarlos se dejaron enfriar por 5 minutos antes de abrirlos y dejarlos reposar una hora. Una vez que baja la temperatura se elimina la solución de citratos y se aforó con PBS 1x por tres minutos en 3 tiempos. (Figura 17)



Figura 17 Los vasos Coplin sumergidos en una bandeja con agua y colocados en el microondas.  
Fuente directa

Se preparó la cámara de agua y colocaron las laminillas, sobre cada una de las muestras se colocó el bloqueador de la peroxidasa (inmunodetector de ratón/conejo marcado con peroxidasa de la casa Bio SB) por cinco minutos para inhibir la oxidación del epitelio. Se preparó en un tubo de seguridad Eppendorf el buffer de albúmina contemplando la relación 1 ml de PBS 1x por cada 0.01 g de albúmina bovina. Este reactivo servirá para diluir el anticuerpo y no colocar directamente el concentrado de Sox-2 en el epitelio. La relación fue de 1  $\mu$ l de anticuerpo para 100  $\mu$ l de buffer de albúmina. Se lavaron las láminas con PBS 1x por tres tiempos durante 3 minutos cada uno y se colocaron de nuevo en la cámara de agua. Como en cada laminilla había dos muestras de quistes foliculares se procedió a depositar el anticuerpo primario en una y buffer de albúmina en otra (control) con ayuda de una micropipeta. Se dejó cultivar por 24 horas. (Figura 18)



Figura 18 Muestras de quistes dentígeros con anticuerpo Sox-2 y buffer de albúmina. Fuente directa

Posteriormente se eliminó el anticuerpo y sumergieron los portaobjetos en TBS 1x por tres minutos y en tres ocasiones. Se colocaron las laminillas en la cámara de agua y con la micropipeta se depositó el anticuerpo secundario (inmunodetector de ratón/conejo Biotin Link de la casa Bio SB) por 10 minutos. Se lavaron con TBS 1x tres veces por 3 minutos cada una. Nuevamente se pasaron los portaobjetos con las muestras a la cámara de agua y se depositó la peroxidasa exógena (inmunodetector de ratón/conejo marcado con peroxidasa de la casa Bio SB) por 10 minutos. Se colocaron en un vaso Coplin y lavaron con agua del grifo de manera indirecta y después cinco lavados con agua desionizada.

Se mezcló la solución de DAB buffer con el cromógeno (inmunodetector DAB cromógeno de la casa Bio SB) en una relación 1 ml por 1 gota y, se procedió a colocar la mezcla en el epitelio con una micropipeta por cinco minutos. Se colocaron las láminas en un vaso Coplin de vidrio y se procedió a lavar con agua corriente por cinco minutos, después se aforó con agua bidestilada por 5 minutos. Después se eliminó el agua y aforó con Hematoxilina de Gills por cinco minutos para volver a colocarlas en agua del grifo por 5 minutos.

Las laminillas se dispusieron en la canastilla y sometieron a proceso de deshidratación sumergiéndolas por tres minutos en alcohol al 90%, en otro recipiente otra vez tres minutos en alcohol del 90%, tres minutos en alcohol al 100%, nuevamente tres minutos en alcohol al 100%, cinco minutos en alcohol-xilol, cinco minutos en xilol y, cinco minutos en otro recipiente con xilol. Finalmente, se dejaron secar los portaobjetos y se les colocaron su respectivo cubreobjetos con resina.

#### **4. RESULTADOS**

Sox-2 se expresó en seis de las siete muestras de QD sin cambios adaptativos en el epitelio. Esto quiere decir que el 85.7 % de las muestras mostró expresión del anticuerpo tiñéndose los núcleos de la células basales de color café. No hubo expresión del marcador en las muestras análogas con buffer de albúmina y sin anticuerpo lo que sugiere que la técnica inmunohistoquímica se realizó con éxito.

Por otra parte, Sox-2 se expresó de igual manera en seis de las siete muestras de QD con displasia epitelial, lo que representa el 85.7% de las muestras. En todas las muestras con Sox-2 + la coloración de los núcleos fue tanto en las células basales como en otras capas celulares. Se incluyeron en el estudio dos metaplasias que carecen de valor analítico pero que se consideró importante señalar que mostraron expresión de Sox-2 en las células basales e igualmente Sox-2 – en las muestras análogas con buffer de albúmina y sin anticuerpo. Figuras 19, 20, 21 y 22



Figura 19 Muestra de QD teñida con hematoxilina y eosina (H&E) con epitelio sin cambios adaptativos (A); los núcleos con expresión de Sox-2 se tiñen de color café a un lado de la lámina basal (B); en el control con buffer de albumina y sin anticuerpo no se expresa el marcador (C). Fuente directa

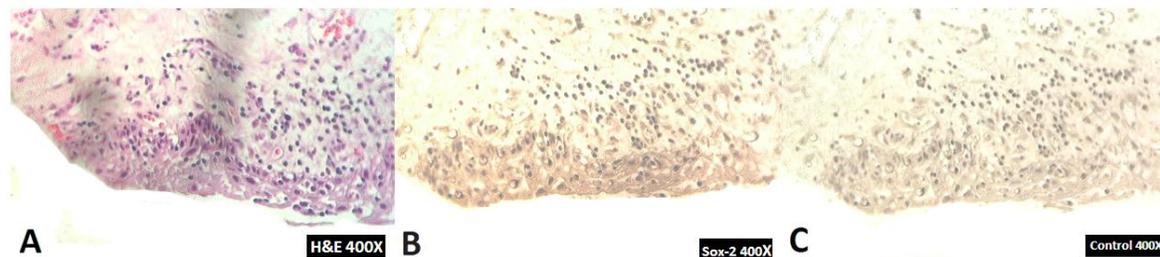


Figura 20 Muestra de QD teñida con H&E con displasia epitelial (A); los núcleos con expresión de Sox-2 se tiñen de color café en las células basales y otras capas (B); en el control con buffer de albumina y sin anticuerpo no se expresa el marcador (C). Fuente directa

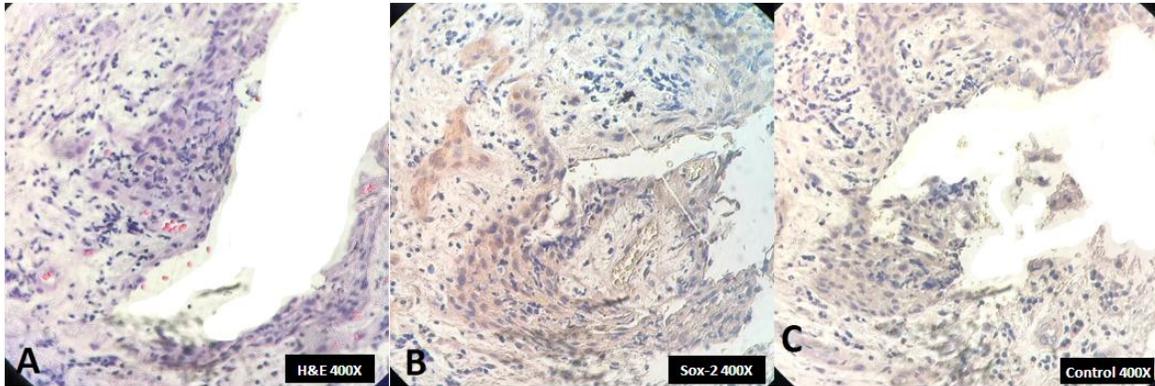


Figura 21 Nótese que el QD pierde epitelio a través de los cortes con el micrótopo. Muestra de QD teñida con H&E con displasia epitelial (A); los núcleos con expresión de Sox-2 se tiñen de color café en las células basales y otras capas (B); en el control con buffer de albúmina y sin anticuerpo no se expresa el marcador (C). Fuente directa



Figura 22 Muestra de QD teñida con H&E con metaplasia (A); los núcleos con expresión de Sox-2 se tiñen de color café a un lado de la lámina basal (B); en el control con buffer de albumina y sin anticuerpo no se expresa el marcador (C). Fuente directa

A continuación los resultados respecto a expresividad de Sox-2 con los diferentes especímenes de quistes dentígeros. Tabla 10

H & E	Folio de la muestra	Sox-2 + (Anticuerpo)	Sox-2 - (Albúmina)
Epitelio normal	853-03 B	+	-
	149-90 A	+	-
	149-90 B	+	-
	045-97 A	+	-
	318-92	+	-

	566-97	-	-
	359-02	+	-
Displasia epitelial	441-91	++	-
	163-08	++	-
	853-03 A	++	-
	128-95	++	-
	045-97 B	++	-
	056-01	++	-
	068-97 B	-	-
Metaplasia	326-07	+	-
	123-03	+	-
+ Expresión positiva en las células basales ++ Expresión positiva en las células basales y más capas celulares - Expresión negativa			

Tabla 10 Los resultados sobre la expresividad de Sox-2 en los diferentes tipos de epitelio encontrados en la muestra. Fuente directa

Las láminas con las displasias contrateñidas con hematoxilina y eosina permitieron comprobar en los siete casos displasias de bajo grado de acuerdo a la clasificación de la OMS, aunque algunas displasias pueden presentar una arquitectura alargada por cortes seccionales en diagonal con el micróscopio. En un QD con indicios de metaplasia se observaron células mucosecretoras las cuales se les atribuye como una razón por la cual se da la expansión de los quistes en general. (Figuras 23 y 24)

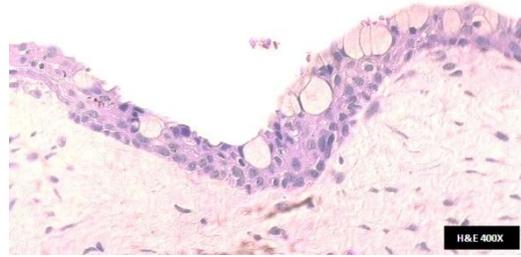
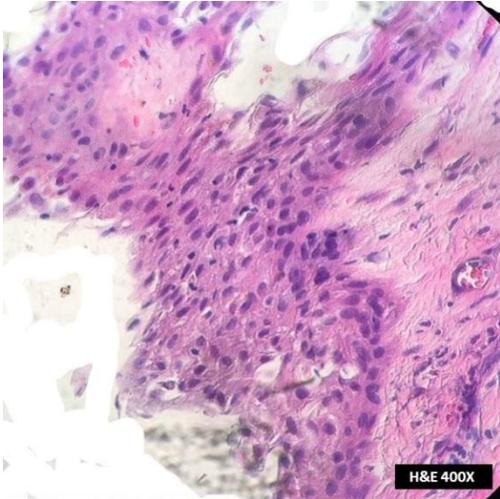


Figura 24 Muestra de QD contrateñida con hematoxilina y eosina. Se puede apreciar una metaplasia, así como la presencia de células mucosecretoras. Fuente directa

Figura 23 Displasia que aparenta ser de alto grado pero por la disposición celular se intuye un mal corte con el micrótomo a la hora de procesar la muestra. Fuente directa

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó una pequeña muestra (<10) de quistes dentígeros con displasia epitelial. La literatura dice que esta lesión se asocia con el origen del ameloblastoma, tumor odontogénico adenomatoide y carcinoma de células escamosas intraóseo primario; pero también sugiere que generalmente no maligniza. Aunque el tamaño de la muestra no permite hacer conjeturas estadísticas, es un referente para futuras investigaciones de que las displasias de bajo grado están presentes en el epitelio de algunos quistes dentígeros. Una razón por la que pudieron haberse perdido muestras con displasia pudo ser la pérdida de epitelio a la hora de someter las biopsias a cortes histológicos con el micrótomo, así como la mala manipulación de la micropipeta sobre el tejido a la hora de realizar la técnica inmunohistoquímica.

Previamente Yu Lei y colaboradores observaron la presencia de Sox-2 en las células basales de los quistes dentígeros. Las muestras control simpatizaron con sus resultados mostrando un margen de error de sólo 18,2% lo cual no es significativo para el tamaño de la muestra. Por otra parte, la expresión de Sox-2 en

epitelio con displasia no se limitó a las células basales sino que se continuó a las demás capas celulares. Como se había mencionado con anterioridad el anticuerpo Sox-2 se sobreexpresa en lesiones malignas lo que sugiere que su variabilidad entre un tejido control y otro con displasia está íntimamente relacionado con el grado de adaptación celular.

Por otra parte, Sox-2 puede servir para el diagnóstico diferencial entre una lesión benigna y maligna pero resulta menos laborioso y más económico hacer esta diferenciación mediante una interpretación clínica e histológica. La presencia de células mucosecretoras en una de las muestras observadas aporta evidencia como un posible factor de expansión quística. Finalmente, las muestras con buffer de albúmina dieron en su totalidad resultados negativos confirmando que la técnica por inmunohistoquímica se realizó con éxito.

## **CONCLUSIONES**

La expresión de Sox-2 en quistes dentígeros con epitelio normal y con displasia varía en el número de capas celulares. Por lo tanto, el marcador utilizado para esta investigación puede ayudar como elemento de pronóstico sobre el potencial de transformación maligna de los quistes foliculares. La cantidad de Sox-2 en un epitelio está sujeta al cambio adaptativo de las células; existe una mayor sobreexpresión en aquellas donde se presenta displasia. Por lo que es importante la exploración clínica y radiográfica en los pacientes para la detección de estos quistes, así mismo la realización de estudios histopatológicos debido a la importancia de detectar la presencia de algún cambio celular en los QD.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García A, Bujaldón AL, Rodríguez A. Lesiones periapicales: diagnóstico y tratamiento. *Avances en Odontoestomatología*. 2015;31(1):31-42.
2. Mervyn S, Paul MS. *Cysts of the oral and maxillofacial regions*. 4<sup>th</sup> ed. Singapur: Blackwell Munksgaard; 2007.
3. Vega A, Ayuso R, Teixidor I, Salas J, Mari A, López J. Opciones terapéuticas en quistes odontogénicos: revisión. *Avances en Odontoestomatología*. 2013, 29(2):81-93.
4. Ei-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T, Slootweg P. *WHO Classification of head and neck tumors*. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
5. Philipsen P, Reichart S. The development and fate of epithelial residues after completion of the human odontogenesis with special reference to the origins of epithelial odontogenic neoplasms, hamartomas and cysts. *Oral Biosciences & Medicine*. 2004;1(3):171-179.
6. Gómez M, Campos A. *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. 3<sup>rd</sup> ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2009.113-137p.
7. Sumbh B, Gangotri S, Jain P, Pagare J. Classification of odontogenic cysts: a review. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 2017;16(4):79-82.
8. Infante C. *Fundamentos para la Evaluación del Crecimiento, Desarrollo y Función Craneofacial*; Universidad de Colombia: 2009.
9. Keinan D, Cohen RE. The significance of epithelial rest of malassez in the periodontal ligament. *Journal of Endodontics*. 2013;39(5):582-587.
10. Nagpal B, Hegde H, Srinivasyaiah A. Recent concepts of odontogenesis with applied aspects. Mysuru: LAMBERT Academic Publishing; 2016.72-80p.

11. Monserat E, Gudiño J, Seijas A, Ghanem A, Cedeño JA, Martínez J, et al. Quiste dentígero: presentación de un caso. *Acta Odontológica Venezolana*. 2002;40(2):165-168.
12. Sapp J, Eversole L, Wysocki G. *Patología oral y maxilofacial contemporánea*. 2<sup>nd</sup> ed. España: Elsevier; 2005.
13. Imran A, Jayanthi P, Gobu SC. Classification of odontogenic cysts and tumors: antecedents. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2016;20(2):269-271.
14. Mosqueda A, Deister A. Los factores de expansión en quistes odontogénicos. *Práctica Odontológica*. 2006;6(7):13-20.
15. Marx RE, Stern D. *Oral and Maxillofacial Pathology: A Rationale for Diagnosis and Treatment*. 2nd ed. United Kingdom: Quintessence; 2012.
16. Leyva ER, Tapia JL, Quezada D, Ortiz E. Factores involucrados en el desarrollo y expansión del quiste periapical. *Revista Odontológica Mexicana*. 2006;10(1):36-41.
17. Aher V, Mohan P, Mukram F. Dentigerous cysts in four quadrants: a rare and first reported case. *Journal of Surgical Technique and Case Report*. 2013;5(1):22-26.
18. Parul B, Purv P. Recurrent dentigerous cyst with malignant transformation of cyst lining: a case report. *Journal of Pierre Fauchard Academy*. 2012;26(June):59-63.
19. Shibata Y, Asaumi J, Yanagi Y, Kawai N, Hisatomi M, Matsuzaki H, et al. Radiographic examination of dentigerous cysts in the transitional dentition. *Dentomaxillofacial Radiology*. 2004;33(1):17-20.
20. Santana JC y cols. (2010) *Atlas de Patología del Complejo Bucal*. 3rd ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2010.
21. Al-Talabani N, Smith C. Experimental dentigerous cysts and enamel hypoplasia: their possible significance in explaining the pathogenesis of human dentigerous cysts. *Journal of Oral Pathology*. 1980;9(2):82-91.

22. Raghavendra M, Uma D. Dentigerous cyst of inflammatory origin. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2010;3(3):195-198.
23. Benn A, Altini M. Dentigerous cysts of inflammatory origin: a clinicopathologic study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. 1996;81(2):203-9.
24. Farhadi S, Shahsavari F, Davardan M. The possible role of mast cells in the odontogenic cyst's pathogenesis: a comparative study between dentigerous cyst and keratocystic odontogenic tumor. *Pathology Research International*. 2016;2016(1):1-4.
25. Mosqueda A, Irigoyen ME, Díaz MA, Torres MA. Quistes odontogénicos: análisis de 856 casos. *Medicina Oral*. 2002;7(2):89-96.
26. Lisette M, Paul M. Odontogenic cysts. *Diagnostic Histopathology*. 2015;7(5):1-11.
27. Satya NVV, Malleswar N, Kiran B. Ameloblastoma arising from a dentigerous cyst: a case report. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014;8(5):23-25.
28. Parashar K, Tripathi G, Chibber N, Chauhan D. Impacted tooth a sequel to dentigerous cyst: review and case report. 2015;2(4):5-6.
29. Motamedi M, Talesh T. Management of extensive dentigerous cysts. *British Dental Journal*. 2005;198(4):203-206.
30. Kumar V, Abbas K, Aster C. Robbins y Cotran Patología estructural y funcional. 9<sup>th</sup> ed. Barcelona: Elsevier; 2015.
31. Abbas K, Lichtman H, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 7<sup>th</sup> ed. Barcelona: Elsevier; 2012.
32. Ramos-Bello D, Llorente L. Cincuentenario del descubrimiento de la estructura de los anticuerpos. *Reumatología clínica*. 2009;5(6):280-284.
33. McCourt CM, Boyle D, James J, Salto-Tellez M. Immunohistochemistry in the era of personalised medicine. *Journal of Clinical Pathology*. 2013;66(1):58-61.

34. Male D, Brostoff J, Roth B, Roitt M. Inmunología. 8<sup>th</sup> ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
35. Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 6<sup>th</sup> ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2011.
36. García A. Anticuerpos monoclonales: aspectos básicos. Neurología. 2011;26(5):301-306.
37. Vega A. Antígenos e inmunógenos. Revista de la Facultad de Medicina UNAM. 2009;52(1):41-42.
38. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry, the red, brown, and blue technique. Veterinary Pathology. 2014;51(1):42-87.
39. Murphy K, Travers P, Walport M. Inmunobiología de Janeway. 7 ed. México: McGraw Hill; 2009.
40. Secondary Antibody Handbook [Internet]. NOVUS Biologicals a biotechne brand [citado 2017 Sep 29]. Disponible en: <https://images.novusbio.com/design/secondaryHandbook.pdf>
41. Jamshidi S, Zargar M, Dehghani A. Immunohistochemical comparison of the expression of CD34 and CD105 in odontogenic keratocyst and dentigerous cyst. Journal of Dentistry. 2017;18(1):43-49.
42. Suojanen J, et al. Common matrix metalloproteinases (MMP-8, -9, -25, and -26) cannot explain dentigerous cyst expansion. Journal of Clinical and Diagnosis Research. 2014;8(9):82-85.
43. Sudhakara M, Rudrayya SP, Vanaki SS, Bhullar RK, Shivakumar MS, Hosur M. Expression of CK14 and vimentin in adenomatoid odontogenic tumor and dentigerous cyst. Journal of Oral & Maxillofacial Pathology. 2016;20(3):369-376.

44. Parshottam V, Sandip V, Javahir N. A comparative analysis of cytokeratin 18 and 19 expressions in odontogenic keratocyst, dentigerous cyst and radicular cyst with a review of literature. 2016;10(7):85-89.
45. Nafarzadeh S, Seyedmajidi M, Rostami-Sarokolaei A. A comparative study of PNCA and Ki-67 expression in dental follicle, dentigerous cyst, unicystic ameloblastoma and ameloblastoma. International Journal of Molecular and Cellular Medicine. 2013;2(1):27-33.
46. Al-Otaibi O, Khounganian R, Rajendran R. Syndecan-1 (CD 138) surface expression marks cell type and differentiation in ameloblastoma, keratocystic odontogenic tumor, and dentigerous cyst. Journal of Oral Pathology & Medicine. 2013;42(2):186-193.
47. Masloub S, Abdel-Azim A, Elhamid E. CD10 and osteopontin expression in dentigerous cyst and ameloblastoma. Diagnostic Pathology. 2011;6(44):1-8.
48. Malcic A, Jukic S, Anic I, Pavelic B, Kapitanovic S, Kruslin B, et al. Alterations of FHIT and P53 genes in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous and radicular cyst. Journal of Oral Pathology & Medicine. 2008;37(5):294-301.
49. Li W, Li B, Wang R, Huang D, Jin W, Yang S. SOX2 as prognostic factor in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. Acta Oto-Laryngologica. 2014;134(11):1101-1108.
50. Sox2 Antibody [Internet]. Cell Signaling Technology [citado el 2017 Sep 29]. Disponible en: <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/sox2-antibody/2748?N=4294956287&Ntt=sox2&fromPage=plp>
51. Maucksch C, Jones K, Connor B. Concise review: the involvement of SOX2 in direct reprogramming of induced neural stem/precursor cells. Stem Cells Journals. 2013;2(8):579-583.
52. Lei Y, Jaradat JM, Owosho A, Adebisi KE, Lybrand KS, Neville BW, et al. Evaluation of SOX2 as a potential marker for ameloblastic carcinoma. Oral and Maxillofacial Pathology. 2014;117(5):608-616.

53. Clive R. Immunohistochemistry in surgical pathology: principles and practice. *Histopathology: Methods and Protocols*. 2014;1180(1):81-109.
54. Mouse/Rabbit Immunodetector HRP/DAB Detection System. Bio SB [citado el 2017 Sep 27]. Disponible en: <http://www.biosb.com/biosb-products/mouserabbit-immunodetector-hrp-with-dab/>
55. Jean-Charles G. Drug Safety Evaluation Methods and Protocols. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Humana Press; 2017.
56. Sompuram R, Vani K, Bogen A. A Molecular Model of Antigen Retrieval Using a Peptide Array. *American Society for Clinical Pathology*. 2006;125(1):91-98.
57. David J, Taylor C, et al. Diagnostic immunohistochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Filadelfia: Elsevier; 2006.