

ARTICULO ORIGINAL

MIB-1 COMO MARCADOR DE PROLIFERACIÓN CELULAR DEL CARTÍLAGO ARTICULAR EN EL CÓNDILO MANDIBULAR, ARTICULACIÓN COSTOCONDRALE, EXTREMO ESTERNALE DE LA CLAVÍCULA Y CUARTO METATARSIANO

Andrés Mauricio Peña Quintero¹, Rodrigo León Restrepo Molina², Carlos Villegas Báteman³

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue probar el MIB-1 como método para la evaluación de la proliferación celular del cartílago articular del cóndilo mandibular, el extremo esternal de la clavícula, la unión costocondral y el cuarto metatarsiano y además corroborar y comparar los resultados histológicos de estudios anteriores.

El estudio se realizó en 6 cadáveres humanos con menos de 12 horas de fallecidos a los cuales se les extrajo un cóndilo, una clavícula, una quinta costilla y un cuarto metatarsiano.

Se encontró que el MIB-1 no es apto para el uso con tejido cartilaginoso ya que la técnica involucra el uso de horno microondas las cuales desprenden los especímenes de las placas utilizadas en inmunohistoquímica. Se corroboran resultados de otros estudios que muestran que macroscópicamente el metatarsiano es más parecido al cóndilo mandibular, pero la clavícula tiene una similitud mayor desde el punto de vista histológico.

Palabras claves:

Cóndilo mandibular, proliferación celular, MIB-1, clavícula, costilla, metatarsiano.

ABSTRACT

A study was done to evaluate the MIB-1 antibody as a cellular proliferation marker in the articular cartilage from the mandibular condyle, the clavicle, the fifth rib and the fourth metatarsal in cadaveric specimens from adult human cadavers. Additionally, the macro and microscopic characteristics from the four articulations were described in order to corroborate the findings of former studies. It was found that MIB-1 is not compatible with cartilage, since the technique involves the use of a microwave oven which displaces the specimens from the plates used in immunohistochemistry. Results corroborate those of other studies which show that macroscopically the metatarsian is more similar to the mandibular condyle, but that, the clavicle has a greater histological similarity.

Key words:

Mandibular condyle, cell proliferation, MIB-1, clavicle, rib, metatarsian.

¹ Odontólogo. Cirujano Maxilofacial CES

² Médico Patólogo. Jefe de Posgrados Clínicos de la Facultad de Medicina del CES

³ Odontólogo, Especialista en Ortodoncia y Cirugía Maxilofacial. Profesor pre y posgrado del CES

INTRODUCCIÓN

Durante años se ha tratado de reemplazar el cóndilo mandibular con varias estructuras vivas y protésicas. La utilización de injertos autólogos para la reconstrucción de la articulación temporomandibular data desde principios de siglo. Lexer en 1907 discutió la manera como se podían reemplazar las articulaciones. Posteriormente, en 1920 describió el uso de injertos costochondrales para este propósito.¹ Posteriormente, otro tipo de injertos han sido utilizados entre los cuales se encuentran: peroné, costilla, articulación esternoclavicular, cresta ilíaca y hueso metatarsiano.²⁻⁷

Las indicaciones más frecuentes para el reemplazo quirúrgico del cóndilo incluyen neoplasias, efectos de radiación, trauma, infecciones, anquilosis, enfermedades degenerativas, reacción a implantes aloplásticos y síndromes que comprenden el primer y segundo arco branquial como la microsomía hemifacial. A través de la literatura se ha evaluado cual podría ser el sustituto más adecuado desde el punto de vista macroscópico e histológico para el cóndilo mandibular.²⁻¹⁰

Ellis y Carlson en 1986 realizaron un estudio donde compararon histológicamente las articulaciones temporomandibular, costochondral y esternoclavicular de monos encontrando una gran similitud morfológica entre la porción clavicular de la articulación esternoclavicular y el cóndilo mandibular.⁸

Villegas en 1995 realizó una comparación anatómica, histológica y radiográfica entre las articulaciones costochondral, esternoclavicular y cuarto metatarsiano con el cóndilo mandibular en 12 cadáveres adultos humanos. Encontró, al igual que Ellis y Carlson, que radiográficamente y anatómicamente el cuarto metatarsiano es más similar al cóndilo pero histológicamente la clavícula es la más parecida al cóndilo mandibular.¹⁰

Algunos problemas han sido reportados con el uso de estos injertos dentro de los cuales el más importante es el sobrecrecimiento del injerto y asimetría de la mandíbula, no solo en niños sino

también en adultos, luego de la colocación del injerto.¹⁰⁻¹⁵

Debido a esto, el conocimiento del crecimiento de estos injertos es muy importante para empezar a comprender el comportamiento clínico de los mismos.

Varios métodos para cuantificar la proliferación celular han sido descritos tales como el conteo de mitosis, métodos de evaluación del contenido de DNA como la marcación de timidina y la incorporación de bromodeoxiuridina, la citometría de flujo y la inmunohistoquímica.¹⁶⁻²⁰

La ventaja de la inmunohistoquímica sobre los métodos anteriormente descritos es que permite la conservación y orientación espacial del tejido en estudio. El mejor anticuerpo que reconoce la proliferación celular es el Ki-67. Este anticuerpo identifica un antígeno nuclear asociado con células en ciclo activo celular, siendo expresado en todas las fases del ciclo celular excepto en la fase G0 (Fase en la cual las células no se encuentran en ciclo).¹⁶⁻²⁰

La mayor limitación del Ki-67 ha sido la necesidad de usar tejido fresco o material congelado para su marcación debido a que el antígeno es muy sensible a la fijación y puede ser deteriorado aún almacenado a -20 grados.^{18,19}

Recientemente se clonó el cDNA de Ki-67 y usando Western Blotting se ha demostrado que este nuevo anticuerpo llamado MIB-1 reconoce las mismas especies de proteínas. La ventaja del MIB-1 es que reconoce el antígeno en material fijado y embebido en cera.^{18, 19}

Hasta la fecha ningún estudio en la literatura ha documentado el uso de MIB-1 en tejido cartilaginoso.

El objetivo de este estudio fue probar el MIB-1 como método para la evaluación de la proliferación celular del cartílago articular del cóndilo mandibular, el extremo distal de la clavícula, la unión costochondral y el cuarto metatarsiano, y además corroborar y comparar los resultados histológicos de estudios anteriores en especímenes cadavéricos de humanos adultos.

MATERIALES Y METODOS

Estudio de tipo descriptivo en el cual se ensaya el MIB-1 como marcador de proliferación en el cartílago articular del cóndilo mandibular, unión esternoclavicular, unión costocondral y metatarsiano.

Los especímenes fueron obtenidos de 6 cadáveres con menos de 12 horas de fallecidos, todos de sexo masculino mayores de 21 y menores de 35 años. A cada cadáver se le extrajo un cóndilo mandibular, una clavícula, una quinta costilla y un cuarto metatarsiano. Cada espécimen fue observado macroscópicamente en su forma y textura y medido en su superficie articular el diámetro mayor y el diámetro menor.

En cada uno de los especímenes se eliminó el exceso de tejido blando presente alrededor de los mismos dejando solamente el periostio. Para favorecer y agilizar la fijación, los especímenes fueron cortados sagitalmente a la mitad mediante el uso de una segueta fina y sumergidos en formol tamponado neutro al 10 % durante 4 días. Para la descalcificación los especímenes se retiraron del formol y fueron puestos en una solución de ácido nítrico al 7% durante 5 días. Luego de la descalcificación los especímenes fueron colocados en una solución básica de bicarbonato sódico al 5 % durante 12 horas y cortados con un bisturí fino hasta obtener secciones de 3 mm de espesor. Los cortes fueron almacenados en cassettes de plástico y marcados para su correcta identificación. Posteriormente los especímenes fueron embebidos en parafina y mediante un micrótopo (American Optical 540), se realizaron cortes de 4 micras de espesor a los cuales se les realizó tinción con hematoxilina-eosina. Los cortes fueron analizados con microscopio de luz (Olympus CH2) y se realizó una descripción de las características microscópicas generales del cartílago articular se observó la interfase con el tejido óseo. Usando un marcador delgado fue delimitado el área correspondiente a la interfase hueso cartílago para la orientación de los cortes para la técnica inmunohistoquímica. Una vez corroborada las áreas demarcadas se realizaron cortes de 4 micras de los bloques de parafina y se dispusieron en placas con 3 diferentes superficies adherentes. Las superficies adherentes fueron polilisina-lisina, placas con carga electrostática negativa y placas con cubierta de

xileno. Para favorecer la adhesión del tejido a las placas, estas fueron además colocadas en un horno durante 48 horas a 50 grados centígrados.

Para la prueba inmunohistoquímica, se utilizó el anticuerpo Ki-67 clon MIB-1 de la casa comercial Dako.

Inmunohistoquímica

La peroxidasa endógena fue bloqueada usando peróxido de hidrógeno en metanol por 30 minutos y sumergidos en 500 mililitros de 0.01 molar de citrato de sodio bufer con ph de 6.0 en un recipiente resistente para microondas. Después de cubrir con una tapa con respiraderos, los cortes fueron horneados en microondas por 20 minutos a máximo poder (Panasonic de 850 vatios).

RESULTADOS

Morfología macroscópica

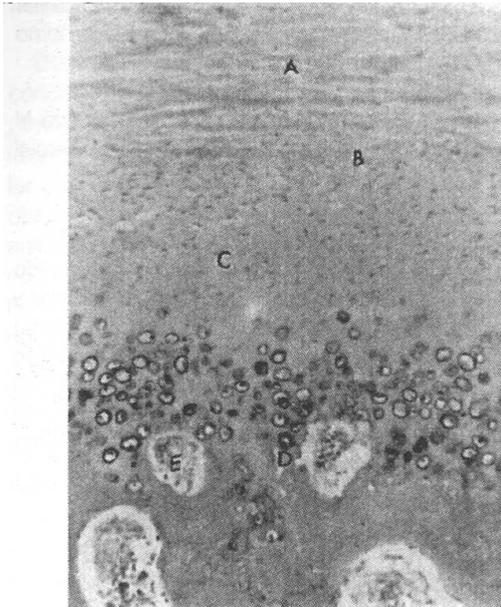
La textura de la superficie articular del cartílago se evidenció como lisa y brillante en el cóndilo mandibular y en el metatarsiano, siendo de aspecto oscuro en el cóndilo y blanco en el metatarsiano. En los tres especímenes de clavícula en los cuales el disco no estaba adherido también se evidenció una superficie articular lisa y blanca. La costilla presentó un cartílago costal blanco y sin superficie articular.

Morfología microscópica

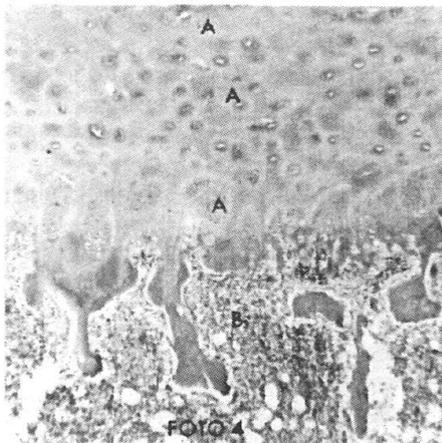
Bajo microscopio de luz se evidenció una capa de tejido fibroso que cubre la superficie articular del cóndilo mandibular y de la clavícula. Dicho tejido correspondió a una capa de tejido conectivo denso irregular. Luego de esta capa de tejido conectivo, continúa el cartílago hialino el cual termina en una interfase festoneada e irregular con el hueso (ver fotografía # 2).

En la costilla y en el metatarsiano se observó una superficie articular de cartílago hialino sin una capa de tejido fibroso (ver fotografías # 2 y 3).

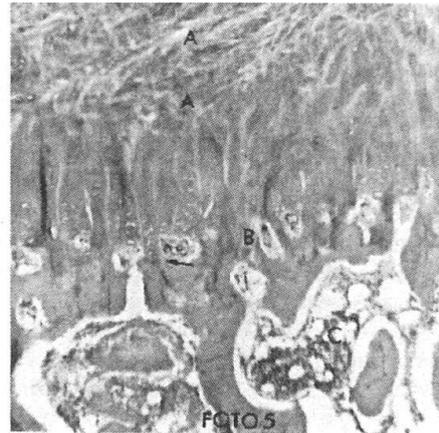
La medula ósea del metatarsiano correspondió a medula ósea amarilla a diferencia del cóndilo, clavícula y costilla en donde el predominio de médula ósea roja fue evidente, siendo más marcado en el cóndilo. Ver fotografías (ver fotografías # 2, 3,4 y 5).



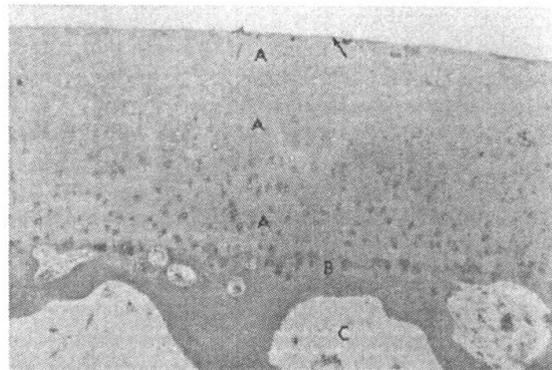
Fotografía # 1. Espécimen: Cóndilo Mandibular. Aumento 10 X Tinción: Hematoxilina-eosina. Se observa hacia la parte de la superficie articular una zona de tejido fibroso (A) que cubre el cartilago hialino. Zona celular con lagunas elípticas (B). Cartilago en reposo (C). Interfase con el tejido óseo (D). Espacios medulares con médula ósea roja en su mayoría (E)



Fotografía # 2. Espécimen: Costilla. Aumento 4 X. Tinción: Hematoxilina-eosina. Se observa una amplia zona de cartilago hialino (A). Lagunas dispersas y matriz territorial basófila (flecha). Se observa una medula ósea mixta con predominio de médula roja (B).



Fotografía #3. Espécimen: Clavícula. Aumento 4X. Tinción: Hematoxilina-eosina. Se observa el cartilago hialino (A) Interfase cartilago-hueso (B) Medula ósea roja y amarilla distribuidas en igual proporción (C). Interfase menos definida que en el cóndilo(flecha).



Fotografía 4. Espécimen Metatarsiano. Aumento 4X. Tinción: Hematoxilina-eosina. Se observa el cartilago hialino en su totalidad (A). No hay tejido fibroso cubriendo el cartilago (flecha). Interfase claramente definida por una cortical subcondral (B). Medula ósea amarilla en su totalidad (C).

Imunohistoquímica

Todos los especímenes durante la fase de microondas se desprendieron de los tres tipos de placas usadas. Los cortes para inmunohistoquímica quedaron disueltos en la solución 0.01 molar de citrato bufer, lo cual impidió continuar con la técnica en la cual los cortes deberían ser embebidos en una solución de fosfato salino buferizado y luego usando la detección de inmunoperoxidasa mediante sustrato de diamino-benzidina se deberían haber incubado los especímenes durante 18 horas a 4 grados

centígrados con una dilución del anticuerpo MIB-1 de 1:50.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que el anticuerpo monoclonal de proliferación MIB-1 no es apto para el uso con tejido cartilaginoso debido a que involucra una técnica en la cual la utilización de horno microondas por un período demasiado largo de tiempo desprende los cortes de todos los tipos de placas utilizadas en la actualidad, para el uso en inmunohistoquímica.

McCormick y col.¹⁸ demuestran el uso de MIB-1 como marcador de proliferación celular para ser usado en cortes obtenidos de especímenes fijados en parafina. Aunque muestran como es útil para usar en especímenes de tumores de tejidos blandos, no mencionan su uso en tejido cartilaginoso. También demuestran como el uso de horno microondas es fundamental para fragmentar el DNA y exponer los epítopes que reconoce el anticuerpo durante la inmunocoloración.

Langford¹⁹ y colaboradores en 1996 usando MIB-1 también demuestran la importancia del uso del horno microondas para la exposición de los epítopes que reconoce el anticuerpo. Sin embargo todas las muestras son de tejidos blandos y no describen el uso en tejido cartilaginoso. Brown y Gatter²⁰ han demostrado la efectividad del anticuerpo para ser usado en diferentes tipos de tumores, incluyendo tumores de tejidos duros. Sin embargo el anticuerpo usado correspondió a Ki-67 el cual requiere el uso de tejido fresco congelado y no es apto para el uso en especímenes fijados en parafina, por lo cual en el presente estudio no tiene ninguna aplicación.

Jaramillo⁹ en su estudio descriptivo anatómico y microscópico de las cuatro articulaciones en niños, menciona que algunos especímenes fueron sometidos a Ki-67 para ser evaluada la proliferación celular. Sin embargo no menciona cual fue específicamente el anticuerpo utilizado (MIB-1 o Ki-67) y la técnica inmunohistoquímica no es descrita. Tampoco menciona si utilizó microondas en la manipulación de los especímenes.

Las placas impregnadas de xileno como también las placas con carga electrostática negativa representan la última generación de placas para uso como adherente tisular en inmunohistoquímica. Sin

embargo todos los cortes histológicos en el presente estudio se desprendieron completamente de las placas durante el proceso con horno microondas. Hasta la fecha la única manera fiable de exponer los epítopes de ADN para usar con MIB-1 es el tratamiento con horno microondas.

Debido a la dificultad que tiene el cartílago para mantenerse fijado durante este proceso, se deberá esperar el desarrollo de técnicas en las cuales el uso de microondas pueda ser evitado.

La observación macroscópica y microscópica de los especímenes corroboran los hallazgos de Ellis y col. (1986) y de Villegas (1995) en los cuales se demuestra que macroscópicamente el metatarsiano se parece más al cóndilo mandibular, pero que el espécimen más parecido desde el punto de vista histológico es la clavícula en adultos.

CONCLUSIONES

1. El MIB-1 no es un anticuerpo apto para la evaluación de la proliferación celular debido a que el tratamiento con horno microondas desprende los especímenes de las placas usadas en inmunohistoquímica.
2. Se corrobora que el espécimen más parecido al cóndilo mandibular desde el punto de vista macroscópico es el metatarsiano.
3. Se corrobora que la clavícula es el espécimen más parecido al cóndilo mandibular en el aspecto histológico.

BIBLIOGRAFIA

1. Raustia A., Clinical and Computed Tomographic Findings in Costochondral Grafts Replacing the Mandibular Condyle. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*. 54: 1393-1400, 1996.
2. Guyuron B, Lasa C.I., Unpredictable growth pattern of costocondral graft in adult. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 90: 880-886. 1992.
3. Macintosh R.B., Sternoclavicular Grafts for Temporomandibular Joint Reconstruction. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 52:128-129. 1994.
4. Peltomaki T., Rönning O., Costochondral graft as replacement of a dysplastic mandibular condyle, *Plastic and Reconstructive Surgery*. 92: 981-983. 1993.
5. Snyder C.C., Levine G.A., Dingman D.L., Trial of sternoclavicular whole

joint graft as a substitute for the temporomandibular joint. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 48:447-452. 1971.

6. Korula P, Ramchandra N.E., Dhanaraj P, Temporomandibular arthroplasty by pedicled transfer of the sternoclavicular joint - a simplified technique. *British Journal of Plastic Surgery*. 44:410-414. 1991.
7. Politics C., Fossion E., Bossuyt M., The use of costochondral grafts in arthroplasty of the temporomandibular joint. *Journal Cranio-Maxillo-Facial joint*. 15: 345-354, 1987.
8. Ellis E, Carlson D.S., Histologic comparison of costochondral, sternoclavicular and temporomandibular joints during growth in macaca mulatta. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 44:312-321.1986.
9. Jaramillo S.P., Estudio Descriptivo Macro-microscopico del Condilo Mandibular, Articulación Costocondral, Extremo Esternal de la Clavícula y Metatarsiano en Niños. Trabajo de grado Cirugía Oral y maxilofacial, escuela Colombiana de Medicina, 1997.
10. Villegas C.A., Estudio descriptivo macro-microscópico y radiográfico del cóndilo mandibular, articulación costocondral, extremo esternal de la clavícula y metatarsiano en humanos. trabajo de grado Cirugía Oral y Maxilofacial, Escuela Colombiana de Medicina, 1995.
11. Pensler J.M., Cristopher R.D., Bewyer D.C., Correction of Micrognathia with ankylosis of the temporomandibular joint in childhood. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 91: 799-805, 1993.
12. Posnick J.C., Godstein J.A., Surgical management of temporomandibular joint ankylosis in the pediatric population. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 91: 791-798. 1993.
13. Wolford L.M. Cotrell D.A., Henry C., Sternoclavicular grafts for the temporomandibular joint reconstruction. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 52: 119-128. 1994.
14. Daniels S., Ellis III E., Carlson D.S., Histologic analysis of costochondral and sternoclavicular grafts in the TMJ of juvenile monkey. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 45:675-682, 1987.
15. Samman N., Cheung L.K., Tideman H., Overgrowth of costochondral graft in an adult male. *Int. methods and their applications. Histochemical Journal*. 24:121-131, 1992.
16. McCormick D., Detection of the antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopatology*. 22: 355-360, 1993.
17. Langford, Comparison of MIB-1 (Ki-67) Antigen and Bromodeoxyuridine Proliferation Indices in Meningiomas. *Human Pathology*. 27: (4), April 1996.
18. Brown, D and Gatter, K. Monoclonal antibody its use in histopatology. *Histopatology*. 17: 489-503, 1990.

Correspondencia:
Andrés Mauricio Peña Quintero
Calle 12 A No.30-185 Tel:268 31 76
Consultorio: Calle 11 No.30-21 Tel: 268 31 76
e-mail:mdampena@md.impsat.net.co