



**Caracterización de los perfiles protéicos del
mixoma odontogénico y de tejidos sanos.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A (N)

Mariana Rodríguez Vázquez

Director

C.D.

Ricardo Augusto Rivas Muñoz

Dictaminadores

C.D.

Rogelio Reyes Sánchez

Dr.

Mario Alberto Rodríguez Rodríguez





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Tabla de contenido

Resumen.....	2
Introducción.....	4
Mixoma odontogénico	4
Antecedentes del origen de los tumores odontogénicos	14
Odontogénesis	15
Folículo dental.....	18
Ligamento periodontal.....	20
Pulpa dental	24
.....	25
Proteómica	26
Justificación.....	28
Hipótesis.....	29
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares	30
Estrategia Exterimental.....	31
Materiales y métodos	31
Obtención de las muestras.....	32
Preparación del tejido.....	32
Tinción con hematoxilina- eosina	32

Extracción de proteínas	33
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en una dimensión	33
Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones.....	34
Western blot	34
Resultados	36
Muestras obtenidas	36
Tinciones con hematoxilina y eosina	39
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en una dimensión	41
.....	42
Perfiles proteómicos en dos dimensiones del mixoma odontogénico y los tejidos dentales sanos.	43
Análisis comparativo de los perfiles de proteínas del tejido tumoral y los tejidos dentales sanos	49
.....	53
Comprobación de la expresión diferencial de la proteína 14-3-3.....	55
Discusión	57
Conclusión	63
Bibliografía	64

Resumen

Los tumores odontogénicos (TO's) son lesiones que derivan de las células formadoras de los órganos dentarios o sus remanentes celulares. Estas neoplasias pueden ser benignas o malignas con variación en su agresividad y su potencial para desarrollar metástasis.

El mixoma odontogénico (MO) es una neoplasia interósea benigna, asintomática, poco frecuente de crecimiento lento e infiltrativo que produce una extensa expansión de corticales y destrucción ósea. Ocupa el tercer lugar en frecuencia, después del odontoma y el ameloblastoma. Histológicamente se caracteriza por presentar células estrelladas y en forma de huso, orientadas al azar, y con un citoplasma alargado, con abundante sustancia mucosa intercelular de tejido conectivo laxo eosinófilo inmerso en su estroma.

La tendencia del MO a permanecer en los espacios de la médula ósea hace efectivo el tratamiento de lesiones pequeñas con enucleación y curetaje pero en lesiones de mayor tamaño se recomienda la resección de la lesión con márgenes de seguridad.

Debido a la similitud histomorfológica con el componente ectomesenquimal del desarrollo dental, varios autores han propuesto que el mixoma odontogénico puede originarse del folículo dental (FD), el ligamento periodontal (LP), la pulpa dental (PD) o su precursora la papila dental (PD/PAD).

Hasta ahora hay pocos estudios sobre las proteínas implicadas en el comportamiento biológico del MO haciendo que el diagnóstico se base principalmente en consideraciones anatómicas, su relación con órganos dentarios o en las similitudes histológicas entre algunos tumores odontogénicos con las estructuras antes mencionados

Es por esto que este trabajo comparó los perfiles de proteínas del mixoma odontogénico con los tejidos mesenquimales que se han propuesto como el origen de este tumor. Además se comparó la expresión de la proteína 14-3-3 la cual se ha sugerido como un oncogen ya que interactúa con muchas proteínas clave implicadas en el desarrollo y progresión de diversos tumores tales como gástrico, hepatocelular, carcinomas de pulmón de células pequeñas, carcinomas de células escamosas vulvares y orales (SCC) y carcinoma basocelular. Se ha sugerido una relación entre la proteína 14-3-3 ζ con la tumorigénesis oral ya que se ha observado un incremento en la expresión de la 14-3-3 ζ en lesiones premalignas y en carcinoma oral de células escamosas.

Cuatro OM y 15 muestras de los terceros molares extraídos quirúrgicamente (14-25 años de edad) de los cuales se obtuvieron DF, DP, PL y DAP fueron adquiridos por el Departamento de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México. Las proteínas obtenidas a partir de estos tejidos se analizaron mediante electroforesis en una y dos dimensiones y por ensayos de Western blot utilizando anticuerpos contra la proteína 14-3-3.

Aunque estos resultados no son concluyentes se encontró que el perfil de proteínas de OM y del DF son similares lo que apoya la hipótesis de que esta lesión puede provenir del FD. También se encontró que la proteína 14-3-3 se sobreexpresa en OM en comparación con el folículo dental y más ensayos deben de ser realizados para conocer la función de esta proteína en este tipo de tumores.

Introducción

Mixoma odontogénico

Los tumores odontogénicos son lesiones derivadas de las células formadoras de órganos dentarios, en particular de células epiteliales, ectomesenquimales, mesenquimales o mixtos, y que son o han sido parte del aparato de formación del diente [1]

El mixoma odontogénico (MO) es una neoplasia interósea benigna poco frecuente de crecimiento lento e infiltrativo que produce una extensa expansión de corticales y destrucción ósea (Fig. 1) [1], usualmente asintomática. Según la clasificación de los tumores odontogénicos del 2005 de la OMS, el mixoma odontogénico es considerado un tumor de origen mesenquimal, con o sin la presencia de epitelio odontogénico [1,3], caracterizado por escasas células fusiformes o estrelladas y en forma de huso, con abundante estroma mixoide [1,2] y con un índice de recidiva de alrededor del 25% [1,3]. El MO fue mencionado por primera vez en la literatura por Thoma y Goldman en 1947 [3]. Hoy en día, en muchos estudios se ha identificado como el tumor odontogénico que ocupa el tercer lugar en frecuencia, después del odontoma y el ameloblastoma [1,4]. Sin embargo, esta distribución cambió radicalmente por la reclasificación de tumores odontogénicos de la OMS, cuando el tumor quístico queratinizante se incluyó como tumor odontogénico, siendo ahora éste el tumor odontogénico más frecuente, desplazando al odontoma al segundo lugar. [4].

El MO puede ocurrir a cualquier edad, sin embargo es más común en la segunda y tercera décadas de vida [1]. A pesar de que estudios afirman que no hay predilección por sexo, la OMS menciona una leve predilección por el sexo femenino [1]. Así mismo, dos terceras partes de los mixomas odontogénicos se localizan en la mandíbula, siendo más comunes en la región de los molares [1]. Por otra parte, no hay un consenso en la literatura donde se diga que haya predilección de alguna raza.



Figura 1 Paciente que presenta lesión intraoral con ligera asimetría facial. Imagen facilitada por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

En un estudio realizado a nivel Latinoamérica se encontraron las siguientes estadísticas: el MO se encontró en un gran rango de edades que van de los 9 a los 71 años, con una proporción entre hombres y mujeres de 1:2.2, el 59.6 % de los casos que se investigaron ocurrieron en la mandíbula y 61.3% en la región posterior, 62.9% fueron multiloculares y con una media del tamaño de 5.2 cm [4].

Clínicamente, el MO se puede observar como una masa blanca o gris con una apariencia típica de mucosa translúcida (Fig. 2). La consistencia de la lesión puede variar de gelatinosa a firme, dependiendo de la cantidad de colágeno que presente y pueden llegar a ser visibles unas bandas blancas pequeñas [1].

Su comportamiento clínico es asintomático, hasta que la lesión llega a tener un tamaño considerable, lo que puede causar una expansión dolorosa de las corticales [1], parestesia y/o asimetrías [3]. El MO es localmente agresivo causando resorción radicular (rizólisis) y desplazamiento de las raíces de los dientes en el área donde se localiza la lesión [3].

Radiográficamente, el MO presenta una imagen radiolúcida (Fig. 3) muy variable: unilocular o multilocular de tamaños variados, dando un aspecto de pompas de jabón, panal de abejas o raqueta de tenis y han sido reportados aspectos de rayos de sol cuando la lesión perfora la cortical ósea [1-3], ocasionalmente con un fino trabeculado óseo curvo o recto [2], dándole a la lesión bordes usualmente bien definidos [1]. Las características radiográficas más comúnmente encontradas son las lesiones multiloculares [3].



Figura 2 . Aspecto intraoral del mixoma odontogénico. Se puede observar como una masa blanca con una apariencia típica de mucosa translúcida. La consistencia de la lesión puede variar de gelatinosa a firme, dependiendo de la cantidad de colágeno que presente y pueden llegar a ser visibles unas bandas blancas pequeñas. Imagen facilitada por el



Figura 3. Aspecto radiográfico del Mixoma odontogénico. Imagen radiolúcida multilocular que abarca desde el ángulo mandibular izquierdo hasta centrales inferiores. Imagen facilitada por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

El mixoma odontogénico, como muchas otras lesiones neoplásicas, presenta una abundante matriz extracelular rica en sulfato de condroitina y ácido hialurónico [5], la cual contribuye a la apariencia edematosa de esta lesión, facilitando la difusión de metabolitos y permitiendo la migración y el crecimiento celular [6].

Histológicamente el MO se caracteriza por presentar células estrelladas y en forma de huso, orientadas al azar [1], y con un citoplasma alargado, con abundante sustancia mucosa intercelular de tejido conectivo laxo eosinofilo inmerso en su estroma (Fig. 4) [3]. En ocasiones se encuentra epitelio de origen odontogénico y células cebadas [4].

Dado a su aspecto gelatinoso y el no ser una lesión encapsulada hace de suma importancia la eficacia del tratamiento inicial [3]. La tendencia del MO a permanecer en los espacios de la médula ósea hace efectivo el tratamiento de lesiones pequeñas con enucleación y curetaje [1], en cambio, las lesiones de mayor tamaño, debido a su comportamiento infiltrante, se recomienda la resección de la lesión con márgenes de seguridad (0.5 cm) (Fig. 5). Son también citadas la aplicación de sustancias criogénicas con el objetivo de anular el posible comprometimiento del margen de la lesión [2,7,8], donde el nitrógeno líquido es el más utilizado para cirugía criogénica en hueso, después de la resección de la lesión.

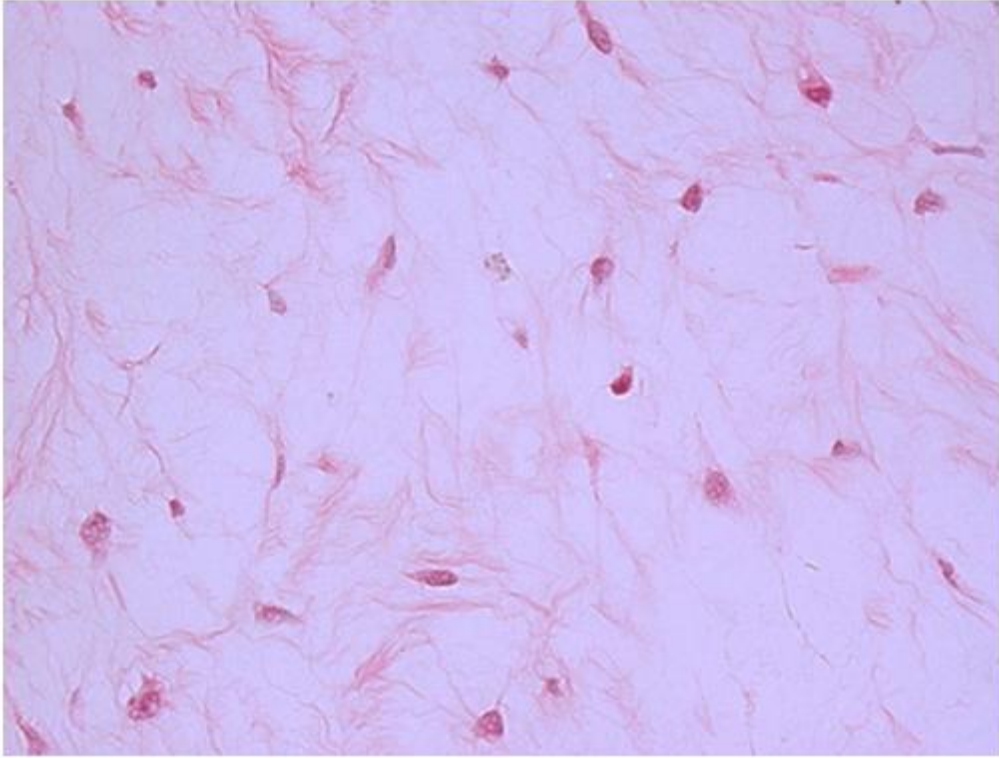


Figura 4. Aspecto histológico del Mixoma odontogénico.

Basados en la presencia ocasional de pequeñas islas de epitelio odontogénico, su recurrencia casi exclusiva en los maxilares y la similitud histomorfológica con el componente ectomesenquimal del desarrollo dental, varios autores han propuesto que el mixoma odontogénico puede originarse del folículo dental [1].

También se ha postulado que el origen del MO pudiera ser el ectomesenquima odontogénico de un diente en desarrollo o de células mesenquimales indiferenciadas del ligamento periodontal [6,9,10]. Por otra parte, también las células de la pulpa dental podrían ser consideradas como candidatas a ser precursoras de las células del MO, por que comparten el mismo origen embriológico: la papila dental [5]. Además, la papila dental y el folículo dental son histológicamente similares al MO [11-13]. Así, a pesar de que varios estudios se han realizado con el fin de definir el origen exacto del MO, hasta el momento no hay una teoría universalmente aceptada sobre su probable histogénesis [4].

La falta de marcadores específicos para confirmar el origen de todas las lesiones odontogénicas, incluida la clasificación actual de la OMS, hace que el diagnóstico se base principalmente en consideraciones anatómicas, su relación con órganos dentarios o en las similitudes histológicas entre algunos tumores odontogénicos con las estructuras antes mencionados [14].

Hasta ahora, hay pocos estudios sobre las proteínas implicadas en el comportamiento biológico del MO. Por ejemplo, se ha demostrado un incremento en la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X en comparación con folículo dental y la pulpa dental [6,15]. Por otra parte, en un estudios mediante inmunohistoquímica se encontró que 90% de las células del MO tiñeron positivamente para la detección de la metaloproteinasas 2 (MMP-2) en comparación con el 10% encontrado en el tejido folicular dental y en pulpa dental [15], pero ninguna de las muestras de papila dental

estudiadas fue inmunorreactiva para el anticuerpo contra MMP-2 [16]. También se ha detectado a la metaloproteinasa 9 (MMP-9) en células tumorales del MO, lo que sugiere que esta metaloproteinasa es importante para el comportamiento invasivo del MO [6]. Por otro lado, la inmunoreactividad a la metaloproteinasa 1 (MMP-1) se detectó en la matriz extracelular del 66,67% de los casos de mixoma odontogénico, y en 75% de los especímenes papila dental [16]. También se ha descrito que la concentración de ácido hialurónico en el MO es cuatro veces mayor que otros glicosaminoglicanos, tales como el sulfato de condroitina, que se encontró en los tejidos mesenquimales de la pulpa dental, ligamento periodontal y gingival, pero no en el folículo dental [14]. Recientemente, mediante estudios de proteómica se encontró que la orosomucoide-1, así como GRP94, 14-3-3 zeta /delta y la proteína apolipoproteína-A se sobreexpresan en la OM en comparación con el folículo dental [17].

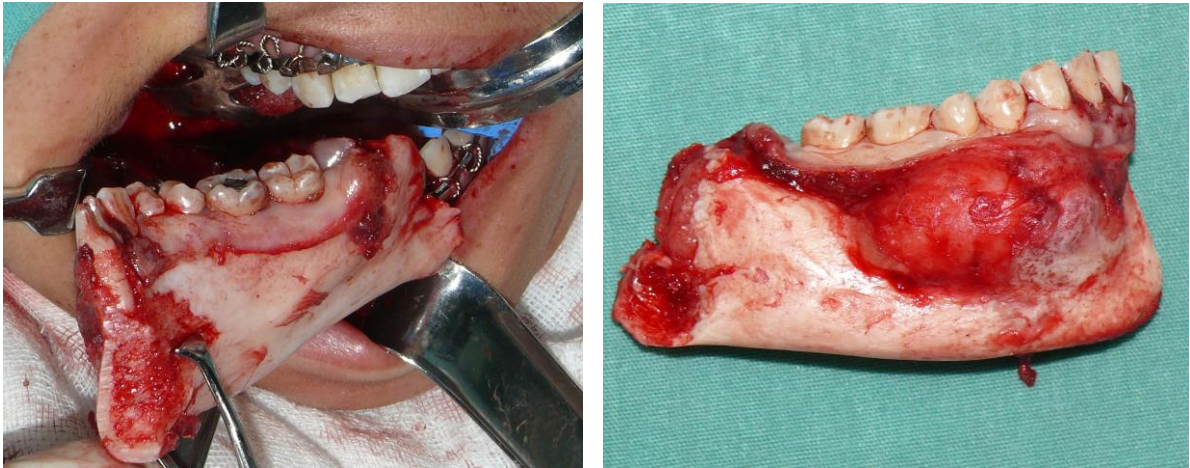


Figura 5. Aspecto macroscópico postquirúrgico del mixoma odontogénico. En la imagen se observa el aspecto gelatinoso de la lesión. Foto facilitada por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

Antecedentes del origen de los tumores odontogénicos

En la actualidad se sabe que las fuentes potenciales para el desarrollo de un tumor odontogénico son varias, donde se incluyen los siguientes [14]:

- a) La lámina dental pre-funcional (epitelio odontogénico con capacidad para producir un diente), que es más abundante en los terceros molares inferiores.
- b) La lámina dental post-funcional, un concepto que cubre los restos epiteliales como los de Serre, ubicados dentro del tejido gingival fibroso, las células epiteliales de Malassez, que descansan en el ligamento periodontal, y el epitelio reducido del órgano del esmalte, que cubre la superficie del esmalte hasta la erupción del diente.
- c) La capa de células basales del epitelio gingival, que originalmente dan lugar a la lámina dental.
- d) La papila dental, el origen de la pulpa dental, que tiene el potencial de ser inducidas a producir odontoblastos y sintetizar la dentina y/o material dentinoide
- e) El folículo dental.
- f) El ligamento periodontal, el cual tiene el potencial de inducir la producción de fibras y material mineralizado.

Odontogénesis

Debido a que los tumores odontogénicos son lesiones derivadas de elementos epiteliales, ectomesenquimales, mesenquimales o mixtos que son o han sido parte del aparato de formación del diente [1] es de gran importancia conocer el proceso de desarrollo dental.

El inicio del desarrollo dental comienza al final de la quinta semana de gestación embrionaria [18], en donde se encuentran en contacto tejido epitelial y tejido del ectomesenquima (Fig. 6A). Entonces, la lámina dental comienza la proliferación de manera intensa y localizada dentro del ectomesénquima (Fig. 6B). A esta fase se le conoce como “etapa de iniciación” [18], en la cual los procesos moleculares y celulares que se llevan a cabo determinan el tipo y la posición exacta de cada diente en las mandíbula y maxila en desarrollo [18]. Desde este punto, el desarrollo dental se realiza en los siguientes tres estadios o etapas las cuales son: brote o yema, casquete y campana (Fig. 6C-E).

La etapa de brote (Fig. 6C) es un estado proliferativo de las células epiteliales orales inducido por el tejido mesenquimatoso, dando origen a la lámina dental, cuyas células proliferan dentro del ectomesénquima de los maxilares y adquiere una forma redondeada [18]. Gracias a esta formación cóncava dentro del ectomesénquima, la densidad celular aumenta, así como la concentración de varios factores de crecimiento [18], lo que lleva a la formación epitelial que semeja un casquete (Fig. 6D) sobre una esfera de ectomesénquima condensado, lo cual es denominado papila dental. El ectomesenquima que limita la papila dental y que encapsula el órgano dentario es llamado folículo o saco dental, siendo ésta la estructura que da origen a los cementoblastos, osteoblastos y fibroblastos [18,19]. Aquí ocurre la transformación de la

forma semiesférica del casquete a una estructura semi-piramidal que se continúa con la lámina dental en la punta del cono. Este evento inicia la morfogénesis dental, donde la base del cono será en el futuro la corona del diente [18]. El epitelio dentro del casquete se caracteriza como el epitelio del esmalte interno, la parte exterior de la tapa está cubierta por el epitelio del esmalte externo [18].

La formación del primer nudo marca el inicio de la fase de campana del desarrollo dentario, ya que se desplaza el retículo estrellado y adquiere la forma de una campana (Fig. 6E). Los nudos, se colocan en las puntas de las invaginaciones epiteliales, para coordinar la formación y determinar la posición y la altura de las cúspides correspondientes a la corona [20], y el órgano del esmalte está claramente separado de la papila dental [18]. Durante esta etapa, las células se diferencian *in situ*, y la corona toma su forma final [18]. Las células mesenquimales en la frontera de la pulpa dental se unen a la membrana basal del epitelio interno del esmalte, adoptan una forma cilíndrica y se transforman en odontoblastos que producen y secretan colágena tipo I, la cual es el mayor componente de la predentina, la cual a su vez es calcificada por la hidroxiapatita y forma la dentina, esto en presencia de altas concentraciones de tenascina y fosfatasa alcalina [18]. Inmediatamente después de la deposición predentina, las células del epitelio interno del esmalte toman una forma columnar y se diferencian en ameloblastos que comienzan a sintetizar y depositar prismas de pre-esmalte [21]. Las células de la capa intermedia ayudan considerablemente al proceso de formación del esmalte y, después de la erupción dentaria, se transforman en la capa basal del epitelio de unión. En esta etapa, se desintegra lámina dental, dejando el diente "libre" de epitelio.

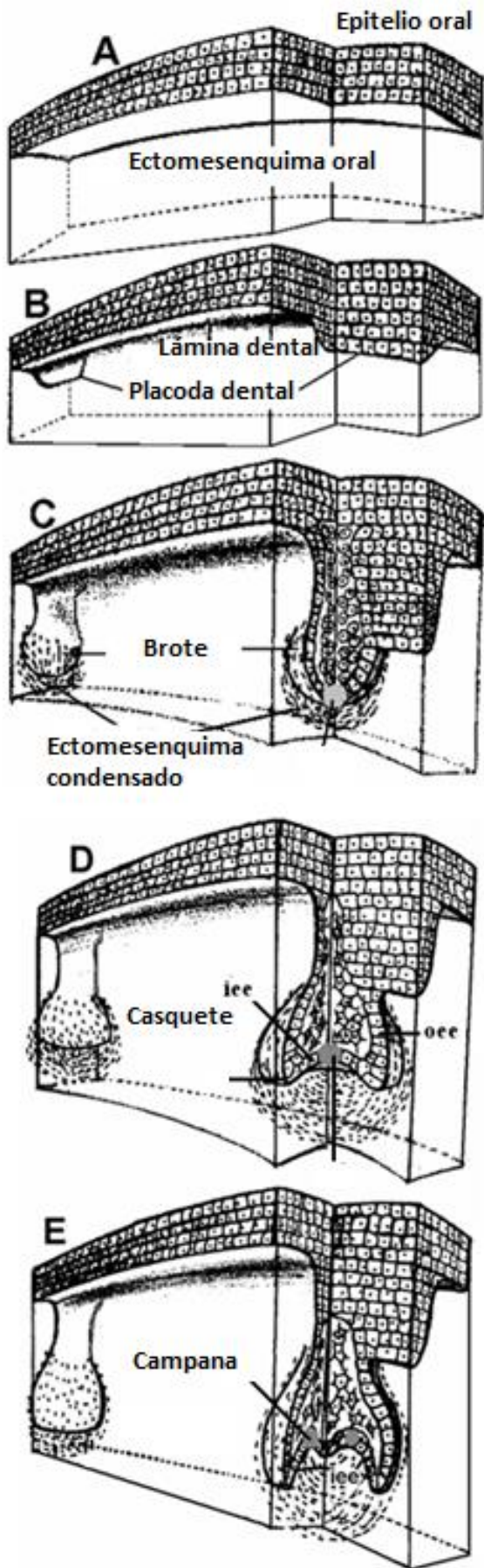


Figura 6. Ilustración que muestra las etapas de la odontogénesis.

Folículo dental

Como se mencionó anteriormente, el folículo dental (FD) es un tejido ectomesenquimal que rodea al órgano del esmalte y a la papila dental del germen dental en desarrollo [22]. El folículo dental se distingue claramente de la papila dental, ya que hay mucho más fibrillas de colágena ocupando espacios extracelulares entre los fibroblastos foliculares, los cuales están orientados radialmente alrededor del órgano dental y de la papila dental [23]. Tenemos entonces que las células mesenquimatosas que rodean al diente (folículo dental) se localizan adyacentes al órgano del esmalte (Fig. 7) migrando periféricamente en los estadios de casquete y de campana desde el órgano del esmalte hacia el folículo para desarrollar cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal [24].

Los folículos dentales se caracterizan histológicamente por ser tejido conectivo fibroso, con cantidades variables de epitelio, restos epiteliales, cambio mixoide y calcificación. Como punto diferencial histológico, los mixomas odontogénicos carecen de revestimiento epitelial. Radiográficamente, los folículos dentales están bien delimitados, se notan como zonas radiolucidas delgadas y semicirculares alrededor de los dientes no erupcionados, suelen ser simétricos y de menos de 3 mm de espesor [25].

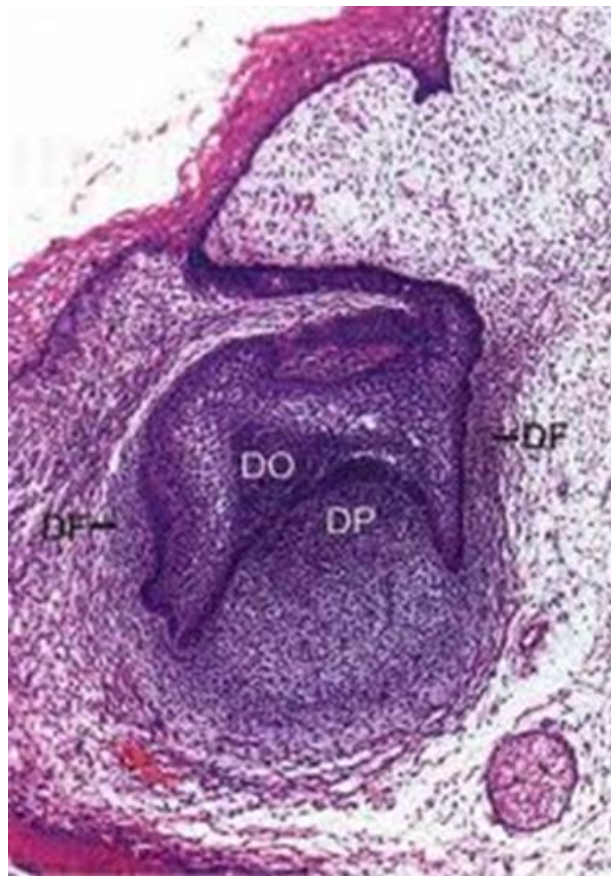


Figura 7. Histología del Folículo o saco dental (DF). Papila (DP) dental, órgano dental (DO).

Ligamento periodontal

El ligamento periodontal es una delgada capa de tejido conectivo muy vascularizado que rodea al diente uniendo al cemento con la lámina dura del hueso alveolar. El ligamento periodontal, como todo tejido conectivo denso, está constituido por células, fibras, y sustancia fundamental amorfa, además posee vasos y nervios.[26,27]. El ligamento periodontal, si bien es un tejido conjuntivo fibrilar, presenta una alta densidad celular (Fig. 8). Los elementos celulares que lo forman son muy heterogéneos, aunque predominan los fibroblastos que representan el 20% del total [28]. Desde el punto de vista funcional podemos distinguir varias clases de células: formadoras, resortivas y defensivas, además de células epiteliales de Malassez y células madre ectomesenquimáticas (Fig. 8) [28]. Entre las células formadoras podemos encontrar fibroblastos, osteoblastos y cementoblastos; dentro de las células resortivas están osteoclastos y cementoclastos y en las defensivas se encuentran macrófagos, mastocitos y eosinófilos [28].

El ligamento periodontal tiene capacidad de regeneración tras un daño. La regeneración periodontal es un proceso complejo que requiere la coordinación entre la proliferación, diferenciación y desarrollo de varios tipos de células [29]. Durante el desarrollo del diente, las células madre periodontales, originadas de las células del folículo dental, son capaces de diferenciarse para formar cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar [29]. Algunas de estas células madre permanecen en el ligamento periodontal después que el diente acabó su desarrollo. Durante la curación de la herida periodontal estas células madre junto con aquellas localizadas en la región perivascular del hueso alveolar, son estimuladas a proliferar, migrar dentro del defecto y diferenciarse para formar nuevos cementoblastos, fibroblastos del ligamento periodontal y osteoblastos. Si

este proceso se realiza de forma sincronizada el resultado es un nuevo aparato de soporte periodontal [29]

Algunas teorías sostienen que la histogénesis del mixoma odontogénico está relacionada con el ectomesenquima odontogénico de un diente en desarrollo o a las células no diferenciadas del ligamento periodontal [6]. En un estudio realizado en el 2011 por Choi y colaboradores en Corea [26] remarcó que las células mesenquimales no diferenciadas en el ligamento periodontal son esenciales para la osteogénesis y cementogénesis de los tejidos periodontales y se pueden diferenciar en osteoblastos y cementoblastos. El objetivo de esta investigación fue observar la expresión de genes en proliferación y mineralización *in vitro* del ligamento periodontal, en el que encontraron la expresión de varios genes (Tabla 1).

Cabe mencionar que el patrón de expresión genética global de las células del ligamento periodontal durante la formación de la matriz ósea y maduración debe ser aclarada, debido a que los genes reportados hasta el momento sólo se observan en la etapa de mineralización [26].



Figura 8. Imagen representativa de la histología del Ligamento Periodontal (morado)

Tabla 1. Expresión de genes en el ligamento periodontal

Gen	Actividad
C-myc	Protooncogen regulador del crecimiento, codifica proteínas del núcleo que se unen al ADN y facilitan su transcripción.
ALP (Fosfatasa alcalina)	Marcador temprano de la diferenciación de osteoblastos. Muestra el inicio de la diferenciación celular del ligamento periodontal.
BMPs (Proteínas morfológicas óseas)	Promueven la regeneración ósea y de tejidos periodontales. BMP-2 y BMP-4 son expresadas por el RNAm del ligamento periodontal y los fibroblastos gingivales durante la diferenciación celular.
OC (osteocalcína)	Marcador de la etapa de mineralización
C-fos	Regulador de crecimiento. Parece preceder a la diferenciación terminal, la muerte celular y la diferenciación de osteoblastos.

Pulpa dental

Como se mencionó anteriormente, durante la odontogénesis el mesénquima dental se condensa alrededor del brote o yema formando dos columnas, la papila dental que posteriormente es rodeada de epitelio dental y da origen a la pulpa dental (Fig. 9) [1]

La pulpa dental es una fuente rica en células madre mesenquimales, las cuales son muy proliferativas y tienen el potencial de diferenciarse en múltiples tipos celulares como odontoblastos, osteoblastos, progenitoras neurales, condrocitos, y adipocitos, entre otros [30].

Desde el punto de vista estructural, la pulpa dental es un tejido conectivo de la variedad laxa ricamente vascularizado e innervado. En su periferia (unión pulpa-predentina) se ubican los odontoblastos (Fig. 9), que son células especializadas que se encargan de sintetizar los distintos tipos de dentina. La pulpa está formada por un 75% de agua y por un 25% de materia orgánica. Esta última está constituida por células y matriz extracelular representada por fibras y sustancia fundamental [28]. Las células que podemos encontrar en este tejido son fibroblastos, odontoblastos, células ectomesenquimales, macrófagos y células dendríticas, así como otros tipos de células como linfocitos, células plasmáticas y en ocasiones eosinófilos y mastocitos [28].

Hay teorías que sugieren el origen del MO a partir de la pulpa dental basadas en la similitud histológica entre el MO y el ectomesenquima de la pulpa dental [6].

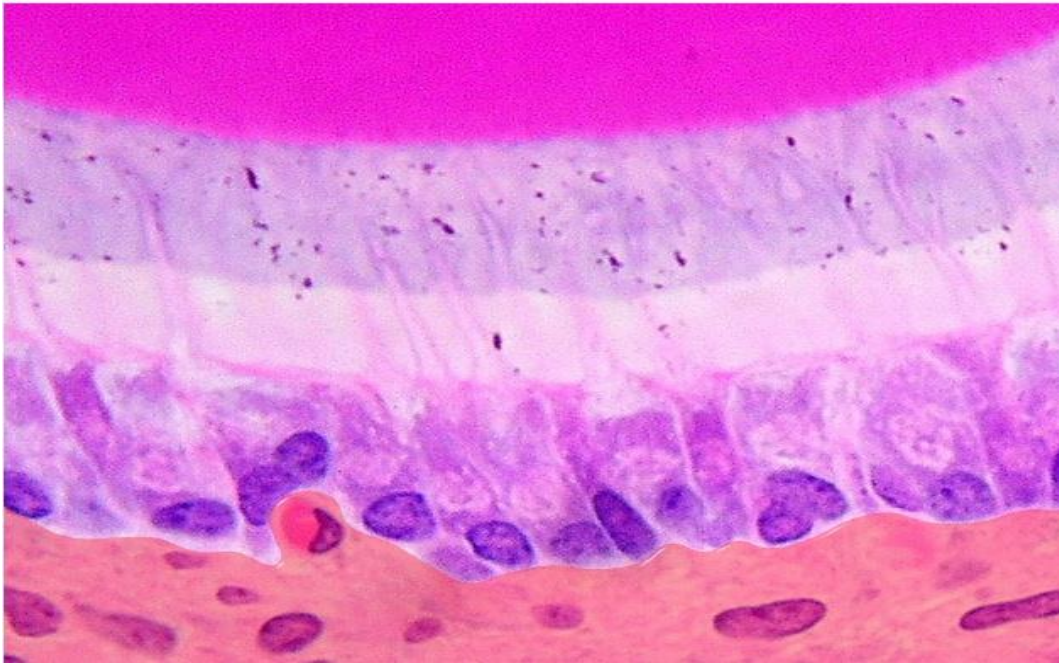


Figura 9. Representación histológica de la Pulpa Dental.

Proteómica

La proteómica es el conjunto de técnicas que permiten analizar el conjunto de proteínas presentes en las células o tejidos en determinado momento, o sea, el proteoma. Estas técnicas incluyen la electroforesis en geles de poliacrilamida de dos dimensiones (2D-PAGE) y la espectrometría de masas (MS). La manera más fácil de hacer un estudio proteómico es comparar los proteomas de dos condiciones y observar sus diferencias. La detección y cuantificación de proteínas diferenciales de células o tejidos nos permite tratar de resolver preguntas como: ¿Qué función tienen las proteínas?, ¿Qué tipo de modificaciones postraduccionales sufren las proteínas y cuál es su función?, ¿Cómo varían las proteínas de una célula o tejido enfrentados a sus similares, pero en distintas condiciones ambientales? [31].

En la actualidad el análisis proteómico permite el estudio de las proteínas en tiempo y espacio, ya que se ha desarrollado a un grado de poder analizar redes moleculares, y por lo tanto, se pueden explicar fenómenos muy complejos como el cáncer [32].

Este tipo de análisis permite conocer cuando las proteínas cambian su patrón de expresión dependiendo de las circunstancias del medio ambiente y, por lo tanto, del estado fisiológico en que se encuentre el organismo, esta información está siendo aplicada a varios campos de la biología y la medicina. De esta forma, dos o más condiciones diferentes de una célula, tejido u organismo (por ejemplo, un tejido sano y otro enfermo) pueden ser comparadas y así, identificar cambios en el patrón de expresión proteico, estos cambios pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos.

El análisis de los proteomas, permite la identificación de las funciones de las proteínas involucradas en la patogénesis o en el envejecimiento celular, entre otros procesos [33]. Este tipo de análisis sirve para proponer modelos de interacción molecular que

expliquen la biogénesis de padecimientos y esta técnica también se utiliza para la identificación de marcadores para el diagnóstico y predicción de enfermedades [34,35], así como blancos para drogas o blancos terapéuticos [36].

Las aplicaciones de la proteómica en el cáncer son muy diversas, esta herramienta ha abierto el campo para hacer detecciones tempranas del cáncer, para conocer el estatus de cualquier célula o tejido en un proceso de enfermedad, para observar mutaciones de un gen, alteraciones en la transcripción y traducción de un gen y la alteración de los productos proteicos de un gen, todos estos usos pueden servir como biomarcadores de enfermedad [37]. Un ejemplo es que este tipo de estudios han servido para encontrar biomarcadores en el carcinoma de células escamosas de glándulas salivales al comparar la saliva de pacientes sanos con pacientes con ese tipo de tumor [38]. También se ha empleado para descifrar las moléculas que se expresan en la progresión del epitelio benigno a epitelio metastásico en el cáncer de mama [39].

Justificación

Hasta el momento no se conoce cuál es el tejido que da origen al mixoma odontogénico, sin embargo algunos autores asocian las características histológicas del folículo dental, pulpa y ligamento con su posible origen [4,10], ignorando completamente las diferencias moleculares entre estos tejidos y aún menos sus similitudes moleculares con el mixoma odontogénico. Por lo cual, en este trabajo se propuso realizar análisis de proteómica de esos tejidos y así poder analizar sus similitudes y diferencias moleculares.

Hipótesis

La comparación de los perfiles de proteínas de los tejidos odontogénicos de origen mesenquimal y el mixoma odontogénico podría dar información adicional sobre el origen histológico de la lesión tumoral y posiblemente se puedan identificar proteínas que pudieran involucradas con cualquier etapa de la tumurogénesis del mixoma odontogénico.

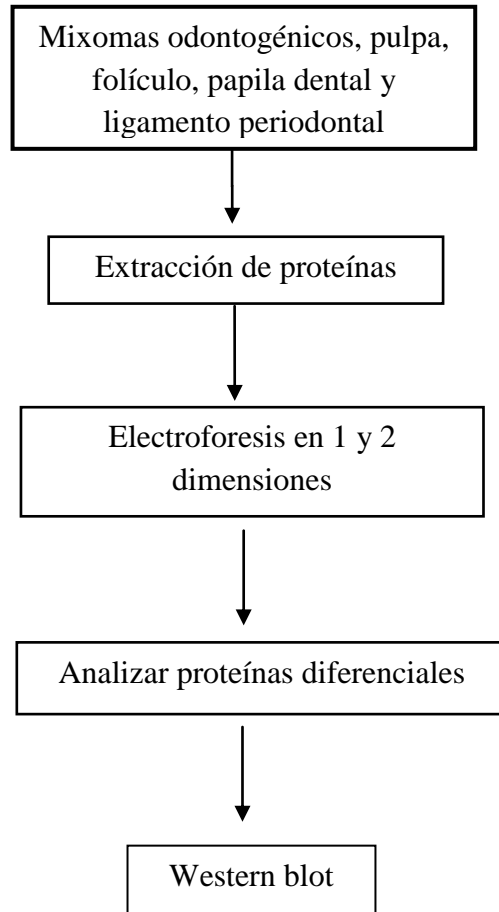
Objetivo general

Obtener los perfiles de proteínas de los tejidos odontogénicos de origen mesenquimal y del mixoma odontogénico y analizar la expresión diferencial de alguna molécula con el fin de sugerir el origen histológico del MO.

Objetivos particulares

1. Obtener los perfiles de proteínas del mixoma odontogénico, el ligamento periodontal, la pulpa dental y el folículo dental.
2. Analizar los perfiles de proteínas y determinar que proteínas se expresan diferencialmente en los tejidos analizados.
3. Caracterizar mediante anticuerpos la expresión y localización de alguna proteína con expresión diferencial.

Estrategia Exterimental



Materiales y métodos

Obtención de las muestras

Las muestras fueron proporcionadas por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

Preparación del tejido

Se obtuvieron muestras de folículos dentales y dientes para extraer las proteínas de pulpas dentales, papilas dentales y ligamentos periodontales, los cuales provinieron de pacientes a los cuales se les realizó la extracción de uno o varios terceros molares. El tejido se separó del diente mineralizado o del hueso alveolar. Esos tejidos se lavaron utilizando solución fisiológica y después se introdujeron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C para realizar análisis electroforéticos o de Western blot.

Tinción con hematoxilina- eosina

Para el análisis microscópico, las muestras de tejido se fijaron en formol al 10%, se procesaron por la técnica convencional de la parafina y se realizaron cortes de aproximadamente $2\ \mu\text{m}$ de grosor con un micrótopo RM2145 (Leica Microsystems AG). Posteriormente se realizó el desparafinado de las muestras mediante su incubación durante 20 min a 60°C . Entonces, las muestras se sumergieron en xilol durante 10 o 15 min. Posteriormente, se hidrataron incubando 5 min consecutivamente con alcohol absoluto, alcohol al 96% y alcohol al 70%. Seguido de ello, las muestras se lavaron con agua destilada, y se introdujeron en hematoxilina (Vector Laboratories) durante 5 min, enseguida se lavaron con agua destilada durante 2 min y finalmente se tiñeron con eosina alcohólica (Vector Laboratories) durante 1 min. Posteriormente, se continuó con deshidrataciones utilizando alcohol al 70%, alcohol al 96% y alcohol absoluto. Por

último, las muestras se montaron con resina sintética (Medio rápido de montaje, Vector Laboratories) y los cortes se analizaron mediante un microscopio óptico (Olympus).

Extracción de proteínas

La preparación de las muestras se basó en la extracción selectiva de proteínas [40,41] como se describe de forma breve. Las muestras se lavaron en solución fisiológica comercial, se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron mecánicamente. Después, los tejidos se homogenizaron en amortiguador de muestra para isoelectroenfoque (urea 7M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, amortiguador IPG 2%, DTT 40 mM y agua MQ) en presencia de inhibidores de proteasas (CompleteTM Roche Germany). Posteriormente, las muestras se homogenizaron utilizando un sonicador. El material insoluble fue removido mediante centrifugación (20,000 xg por 5 min a 4 °C), en donde el sobrenadante se conservó. Adicionalmente, las proteínas se precipitaron con acetona-ácido tricloroacético (TCA).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en una dimensión

La separación de proteínas con base en su peso molecular se realizó mediante electroforesis en una dimensión utilizando geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS). Para ello, el gel separador se preparó con los siguientes reactivos: acrilamida 12.5%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, SDS al 0.1%, persulfato de amonio(PSA) 0.1% y 0.15% de TEMED; mientras que el gel concentrador se preparó con acrilamida 29%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS al 0.1%, PSA 0.1% y 0.15% de TEMED; como amortiguador de corrida se utilizó una solución Tris 0.25 M, Glicina 1.9 M y 0.1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 110 V (25 miliamperios) por 140 min.

Después de la separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida, éstos se tiñeron durante 1 hora con azul de Coomassie al 0.05% en etanol al 50% y ácido acético al 10% a temperatura ambiente y en agitación. Para desteñir los geles, éstos se incubaron en agitación en una solución de etanol al 5% y ácido acético al 7% hasta que las bandas de las proteínas aparecieron azules sobre el fondo transparente. En ese momento, los geles se transfirieron a un recipiente que contenía agua destilada y se realizó un registro fotográfico de la imagen.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones

Para analizar las proteínas en dos dimensiones, en primer lugar se llevó a cabo su separación con base en su punto isoeléctrico, esta separación se realizó en las tiras pre-elaboradas para electroforesis ya hidratadas (GE Healthcare) con la muestra utilizando el aparato IPGphor 3(GE) (BIORAD). Posteriormente, se procedió a separar las proteínas por su peso molecular mediante PAGE-SDS (12%), los cuales se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250). Para comparar el tejido tumoral con respecto al tejido sano, los geles de proteínas se analizaron con el software *Image Master* (Amersham).

Western blot

Para el ensayo de Western blot, las proteínas se separaron mediante PAGE-SDS (10%) como se mencionó anteriormente. Después, el gel se equilibró con el amortiguador de transferencia (Tris 0.25M, Glicina 1.9M y 20% de metanol) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por otra parte, también se equilibró un papel de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) del tamaño del gel a transferir. Para la transferencia se utilizó el sistema miniprotein 2 (Bio-Rad). Primeramente se formó un emparedado sujeto por un folder de plástico con la parte oscura hacia abajo, con los siguientes elementos: una fibra Scotch, luego un papel filtro previamente equilibrado en el amortiguador de

transferencia sobre el cual se colocará el gel y luego la membrana de nitrocelulosa. A continuación se agregaron dos papeles filtro, otra fibra Scotch y el folder se cerró, y éste se colocó en la cámara de electroforesis, orientando la parte oscura del folder hacia el polo negativo y el papel de nitrocelulosa hacia el polo positivo. Las proteínas del gel se transfirieron al papel de nitrocelulosa a 150 V (400 mA) durante 30-45min (o bien toda la noche a 30 mA) utilizando un baño de hielo. Posteriormente, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau por dos minutos para visualizar la proteínas transferidas, después se desteñó y se bloqueó con PBS-Tween y leche descremada al 5% durante 1 h a 37 °C ó bien toda la noche a 4 °C. Enseguida, la membrana se lavó cuatro veces durante 10 min con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y detergente (Tween) al 0.1%, se incubó con el anticuerpo primario contra la proteína 14-3-3 (1:2000) (Abcam, UK) en PBS-Tween al 0.05% durante toda la noche a 4 °C en movimiento. Entonces, la membrana se lavó cuatro veces durante 5 min con PBS-Tween al 0.1% y se incubó con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa (1:10,000) (Invitrogen, USA) durante 1-2 h a 37 °C en movimiento. La membrana de nitrocelulosa se lavó cinco veces durante 5 minutos con PBS-Tween al 0.1% y la unión antígeno-anticuerpo se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL plus (Amersham), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Resultados

Muestras obtenidas

Como se ha explicado previamente, hasta el momento el análisis de los perfiles proteicos de tumores odontogénicos son escasos, solo se han realizado más comúnmente en otro tipo de tumores, como de mama y colon, entre otros. Por otra parte, no se conoce con certeza cuál es el tejido odontogénico que puede dar lugar al MO. Por esos motivos, en este trabajo se analizó el perfil de proteínas del mixoma odontogénico y de algunos tejidos dentales sanos, de los cuales se cree este tumor tiene su origen.

Para lo cual se analizaron cuatro tejidos previamente diagnosticados con MO de pacientes cuyas edades oscilaron entre los 15 y 35 años. Las lesiones presentaron un tamaño que iba entre los 5 y 2 cms en el momento del acto quirúrgico. Sin embargo solo se utilizaron para este estudio secciones de 1 cm cuadrado (Tabla 2.1).

Cinco folículos dentales, cinco pulpas dentales, cinco ligamentos periodontales y cinco papilas apicales de pacientes entre 14 y 25 años de edad (tabla 2.2) a los cuales se les realizó cirugía de extracción del tercer molar en el servicio de cirugía maxilofacial del Hospital Juárez de México.

Tabla 2.1

Características clínicas de los pacientes con MO que participaron en este estudio.

No. Caso	Género	Edad	Tiempo de evolución	Localización	Tratamiento	Tamaño
4	Femenino	35	8 meses	Mandibular derecha	Resección en bloque	50 x 40 x 15
7	Femenino	25	12 meses	Mandibular derecha	Resección en bloque	22 x 17 x 13
12	Femenino	16	-----	Maxilar izquierdo	Resección en bloque	20x15x10
45	Masculino	15	7 meses	Mandibular derecho	Resección en bloque	25 x 15x 10
46	Femenino	-----	-----	Rama mandibular derecha	Enucleación y curetaje	30 x 25 x 8

Tabla 2.2

Tejidos dentales obtenidos de pacientes de cirugía de tercer molar

Género	Edad	PD	FD	PA	LP
Femenino	22	x	x	x	X
Masculino	10	x	x	x	X
Masculino	14	x	x	x	X
Femenino	17	x	x	x	X
Femenino	17	x	x	x	X
Masculino	15	x	x	x	X

Tinciones con hematoxilina y eosina

Para iniciar este estudio, lo primero que realizamos fue el análisis histológico de las diferentes muestras obtenidas mediante la tinción con hematoxilina y eosina de cortes de los tejidos de estudio. La Fig. 10 muestra la vista macroscópica y microscópica de todos los tejidos dentales sanos que se utilizaron para comparar con el mixoma odontogénico. El folículo dental se observó como un tejido conectivo fibroso con cantidades variables de epitelio de revestimiento, restos epiteliales, y con cambios mixoides (Fig. 10 C, G), lo cual es la razón más probable por la cual se puede malinterpretan como mixoma odontogénico o como fibromixoma, según lo reportado por Kim J, Ellis GL [25]. Por su parte, la papila apical (Fig. 10 D, H) consiste en piezas de tejido mesenquimal inmaduro elíptico y bien circunscrito con una apariencia mixoide uniforme. Microscópicamente se observan odontoblastos cuboidales o alargados y matriz de dentina depositada por estos [25]. La pulpa dental (Fig. 10 A, E) es un tejido conectivo laxo ricamente vascularizado e innervado. Nosotros observamos células con matriz extracelular representada por fibras y sustancia fundamental. Las células que se pueden encontrar en este tejido son fibroblastos, odontoblastos, células ectomesenquimales y otras [11]. En el caso del ligamento periodontal (Fig. 10 B, F) se puede observar tejido fibrilar el cual tiene una alta densidad celular. Los elementos celulares que lo conforman son heterogéneos pero predominantemente tienen fibroblastos con núcleos alargados y circulares [25].

En resumen, el análisis histológico mostró una estructuración similar en los tejidos analizados, donde las células están inmersas en una abundante matriz extracelular, similar a lo observado en el mixoma odontogénico.

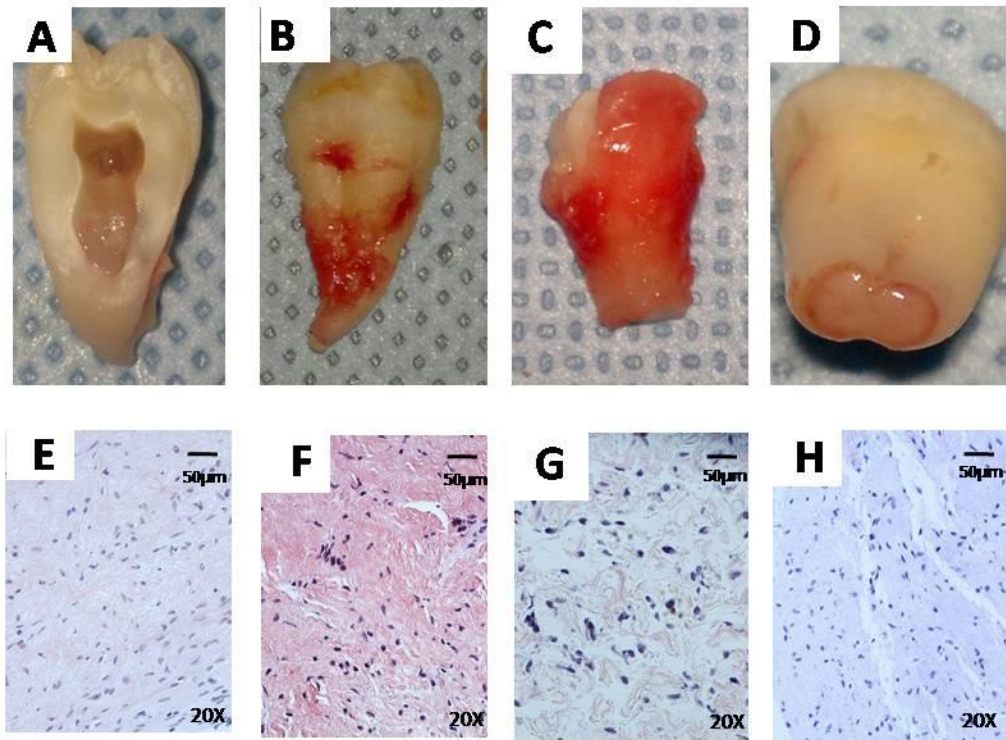


Figura 10. Aspecto macroscópico (A-D) y microscópico (E-H) de los tejidos dentales sanos.: pulpa dental (A,E), Ligamento periodontal (B,F), Folículo dental (C,G) y papila apical (D,H). Tinciones con hematoxilina y eosina 20X (E-H)

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en una dimensión

Con el fin de poder observar similitudes y diferencias entre el MO y los tejidos sanos a nivel molecular, se analizaron sus perfiles proteicos. Inicialmente se analizó la integridad de las proteínas extraídas de cada tejido mediante el corrimiento electroforético en geles unidimensionales en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS). En la Fig. 11 se puede observar un gel de poliacrilamida-SDS al 10%, que contiene el patrón proteico en una dimensión, por duplicado, del MO, el folículo dental (FD), la pulpa dental (PD) el ligamento periodontal (LP) y la papila dental apical (PA). En dicho gel se aprecia en cada una de las muestras la presencia de bandas con un rango de <14a >220 kDa, además de la ausencia de algún barrido que sugiera degradación protéica, indicando una buena integridad de las diferentes muestras. Además, con excepción de la papila apical, se observa un patrón similar entre las muestras del mismo tipo de tejido, indicando la reproducibilidad de los patrones. Por otra parte, desde estos ensayos podemos observar algunas proteínas que están siendo expresadas de manera diferencial entre las muestras (Fig. 11). Interesantemente, se puede apreciar algunas bandas, por ejemplo las de X y Y kDa que están siendo expresadas en mayor cantidad en MO y FD con respecto a los demás tejidos (Fig 11, cabezas de flecha). Del mismo modo otras bandas, por ejemplo las de X y Y kDa, se aprecian con mayor intensidad en otros tejidos con respecto a MO y FD (Fig. 11, flechas). Esos resultados mostraron que el patrón proteico en una dimensión de MO y FD son más similares entre si y ligeramente diferentes con respecto a los patrones de los otros tejidos, sugiriendo que el FD pudiera ser el tejido que puede dar origen al MO.

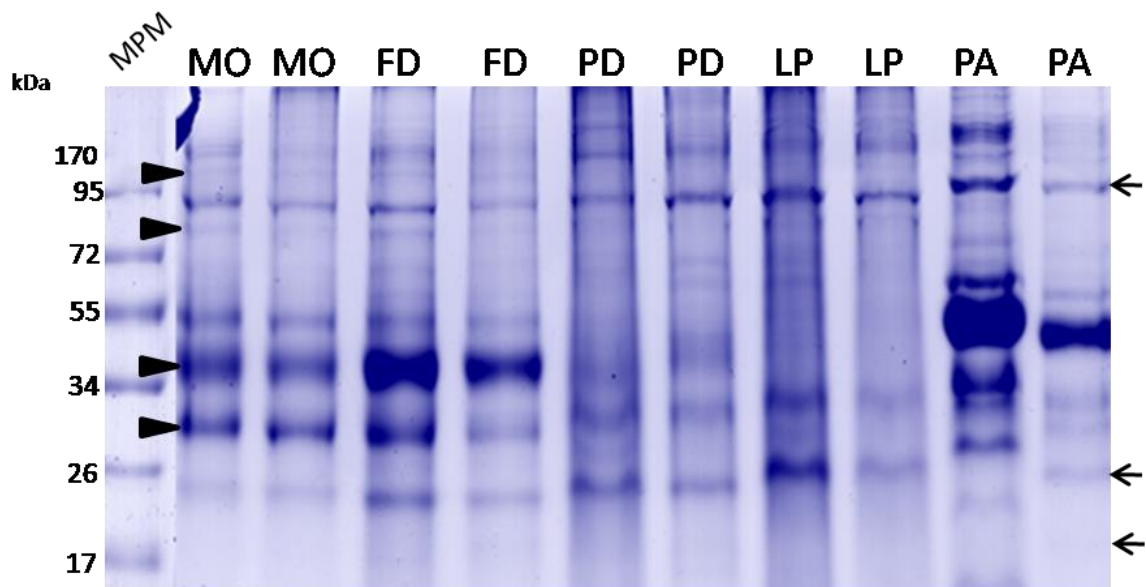


Figura 11 Electroforesis unidimensional de los tejidos analizados. Los geles SDS-PAGE muestran la integridad de los extractos proteicos totales obtenidos de las biopsias. Mixoma odontogénico (MO), folículo dental (FD), pulpa dental (PD), ligamento periodontal (LP) y papila apical (PA). Las cabezas de flecha indican algunas bandas que son compartidas entre MO y FD, que no están presentes o que están en menor cantidad en los demás tejidos. Las flechas indican bandas proteicas ausentes o disminuidas en MO y FD, pero presentes en otros tejidos.

Perfiles proteómicos en dos dimensiones del mixoma odontogénico y los tejidos dentales sanos.

Una vez calculada la cantidad total de proteínas de cada una de las muestras, se continuó con la obtención del proteoma de las mismas. Los extractos proteicos de muestras de los tejidos sanos y del tumor se analizaron mediante electroforesis en geles bidimensionales (Fig. 12) . Para ello, primero se realizó el isoelectroenfoco de las proteínas utilizando tiras pre-elaboradas de poliacrilamida (GE Healthcare) con un gradiente de pH de 3 a 10. Posteriormente, las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250). Se realizaron geles en dos dimensiones para cada uno de los tejidos analizados, junto con su duplicado.

Se observa una adecuada resolución y enfoque de los puntos, además de patrones similares y reproducibles. Se aprecian una gran cantidad de puntos en los pesos de 70 a 15 kDa y poca abundancia de puntos por arriba de 70 KDa.

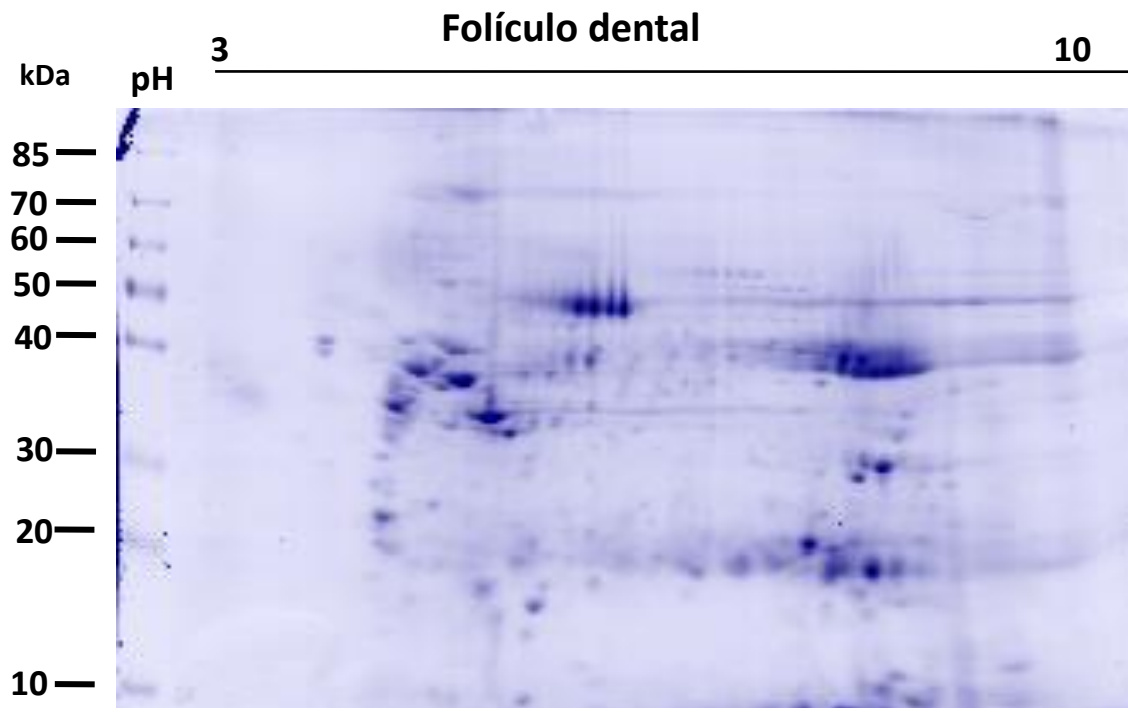


Figura 12.1 Perfil proteómico en 2D obtenido del folículo dental. Los extractos proteicos de muestras de FD se analizaron mediante electroforesis en geles bidimensionales. Para ello, primero se realizó el isoelectroenfoque de las proteínas utilizando tiras pre-elaboradas de poliacrilamida (GE Healthcare) con un gradiente de pH de 3 a 10. Posteriormente, las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250). En el cual se observa una mayor concentración de proteínas en los pesos que van de 15 kDa hasta 55 kDa y con un pH aproximado de 4 a 9.

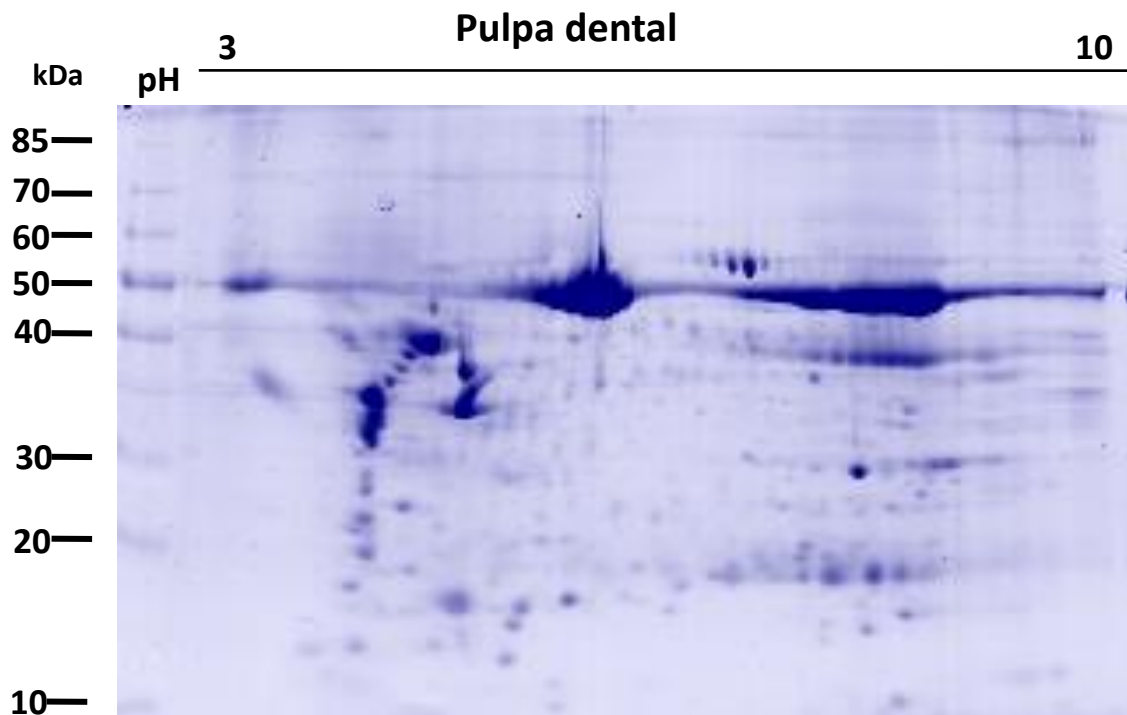


Figura 12.2 Perfil proteómico en 2D obtenido de la pulpa dental apical. Los extractos proteicos de muestras de PD se analizaron mediante electroforesis en geles bidimensionales. Para ello, primero se realizó el isoelectroenfoque de las proteínas utilizando tiras pre-elaboradas de poliacrilamida (GE Healthcare) con un gradiente de pH de 3 a 10. Posteriormente, las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250). En el cual se observa una mayor concentración de proteínas en los pesos que van de 15 kDa hasta 55 kDa y con un pH aproximado de 4 a 9.

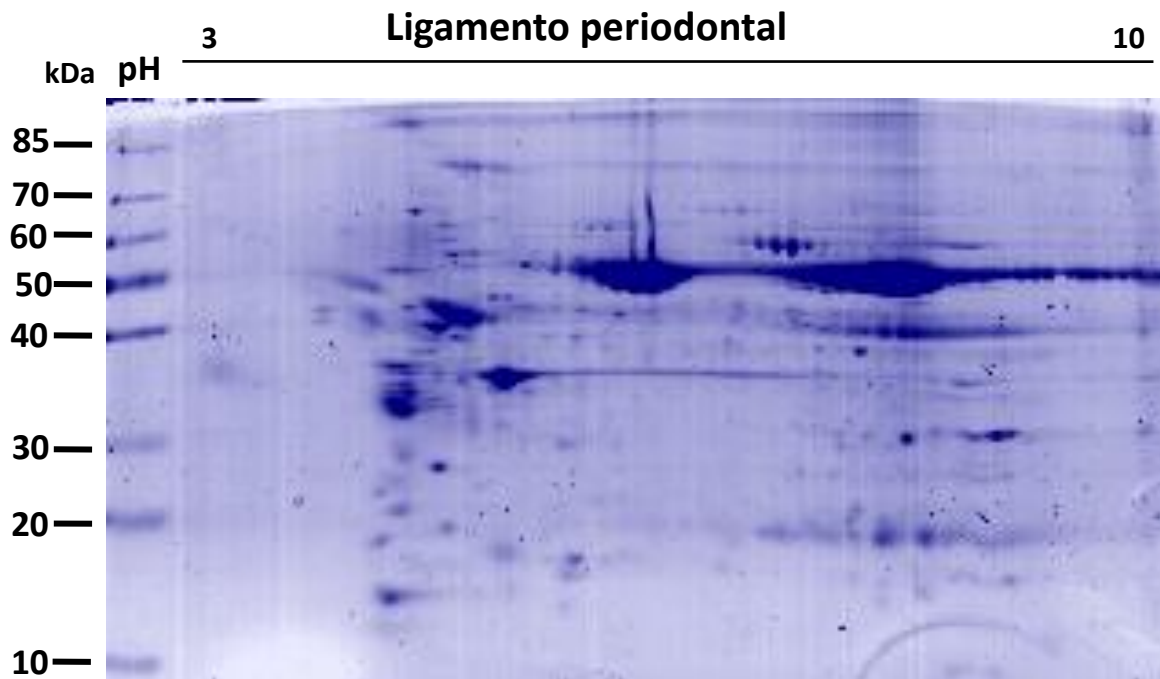


Figura 12.3 Perfil proteómico en 2D obtenido del ligamento periodontal. Los extractos proteicos de muestras de LP se analizaron mediante electroforesis en geles bidimensionales. Para ello, primero se realizó el isoelectroenfoque de las proteínas utilizando tiras pre-elaboradas de poliacrilamida (GE Healthcare) con un gradiente de pH de 3 a 10. Posteriormente, las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250). En el cual se observa una mayor concentración de proteínas en los pesos que van de 15 kDa hasta 55 kDa y con un pH aproximado de 4 a 9 y una acumulación importante de proteínas en los pesos de 30 a 55 kDa.

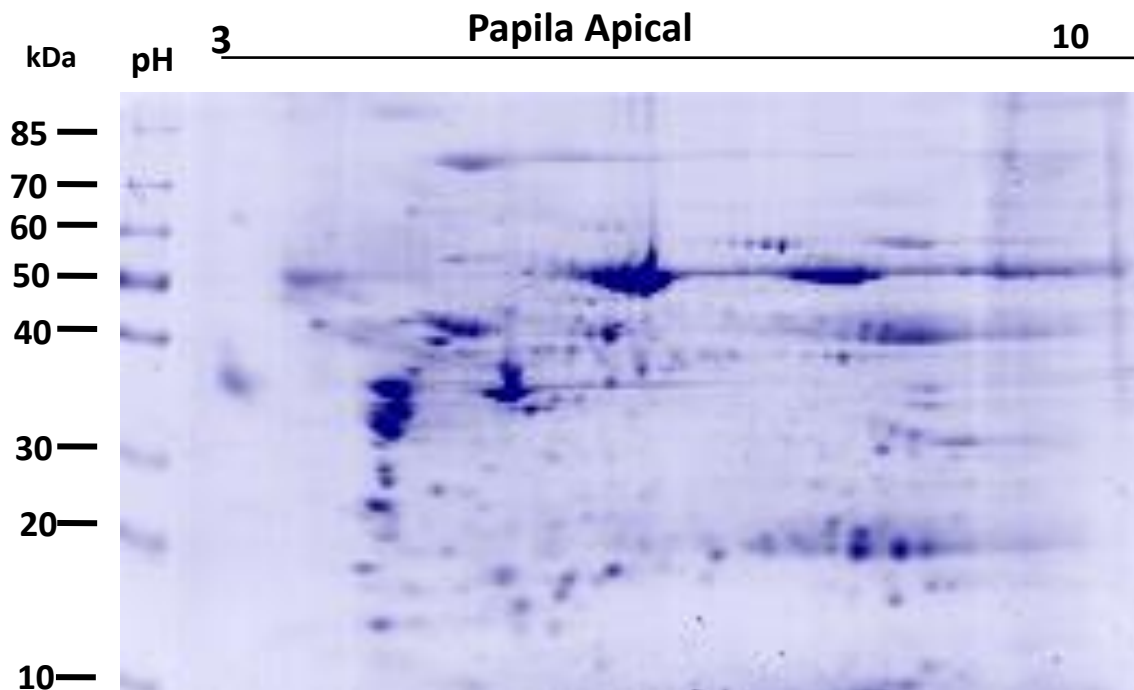


Figura 12.4 Perfil proteómico en 2D obtenido de la papila dental apical. Los extractos proteicos de muestras de PA se analizaron mediante electroforesis en geles bidimensionales. Para ello, primero se realizó el isoelectroenfoque de las proteínas utilizando tiras pre-elaboradas de poliacrilamida (GE Healthcare) con un gradiente de pH de 3 a 10. Posteriormente, las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250). En el cual se observa una mayor concentración de proteínas en los pesos que van de 15 kDa hasta 55 kDa y con un pH aproximado de 4 a 9.

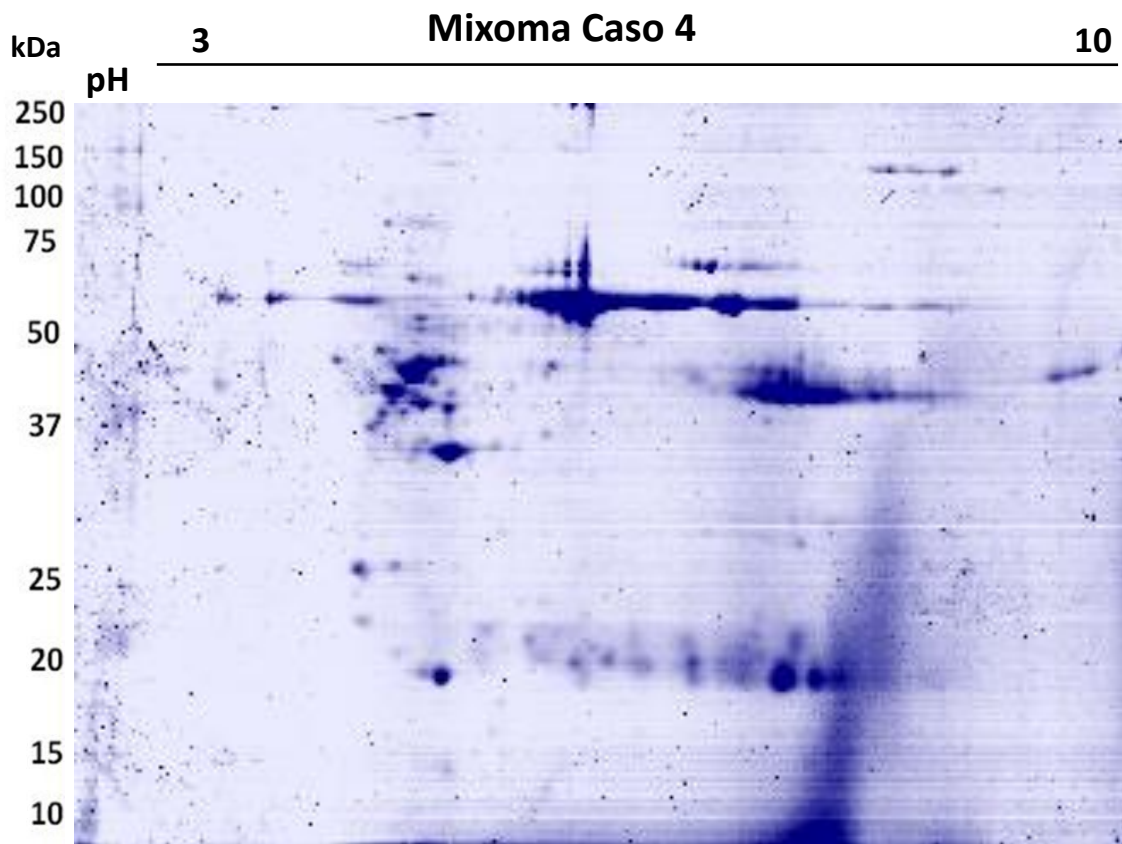


Figura 12.5 Perfil proteómico en 2D obtenido del mixoma odontogénico. Los extractos proteicos de muestras de MO se analizaron mediante electroforesis en geles bidimensionales. Para ello, primero se realizó el isoelectroenfoque de las proteínas utilizando tiras pre-elaboradas de poliacrilamida (GE Healthcare) con un gradiente de pH de 3 a 10. Posteriormente, las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G250). En el cual se observa una mayor concentración de proteínas en los pesos que van de 20 kDa hasta 55 kDa y con un pH aproximado de 3 a 8.

Análisis comparativo de los perfiles de proteínas del tejido tumoral y los tejidos dentales sanos

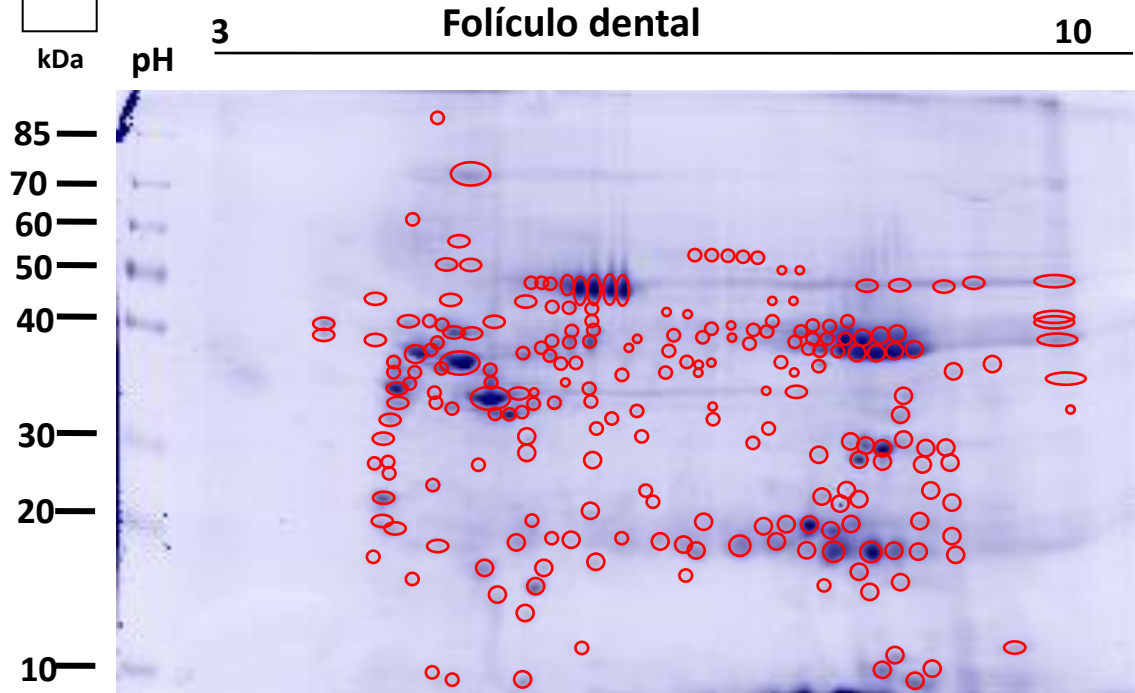
Con los perfiles proteómicos obtenidos se procedió a realizar el análisis comparativo de los tejidos dentales sanos contra el tejido obtenido de los mixomas odontogénicos para ello primero se realizó un conteo de las proteínas en todos los tejidos (Tabla 3) , en donde pudimos observar que el tejido que presentaba más proteínas expresadas era el tejido tumoral con 336 puntos , seguido de la pulpa dental con 288 (Fig. 13 C), el ligamento periodontal con 250 puntos (Fig. 13 B), la papila apical presentó 222 puntos (Fig. 13 D) y el tejido con la menor cantidad de proteínas expresadas fue el folículo dental con 220 proteínas expresadas (Fig. 13.A).

Con los perfiles proteómicos obtenidos se procedió a realizar el análisis para identificar los puntos que contaran con variabilidad en la expresión de las proteínas presentes en las biopsias. Debido a que estudios previos han mostrado la similitud que existe entre el mixoma odontogénico y el folículo dental este trabajo se enfocó en sólo realizar el análisis comparativo entre estos dos tejidos. Se obtuvieron 21 puntos que presentaron diferencias consistentes en tamaño y número de píxeles por área, 6 de ellos se encontraron sobreexpresados en el folículo dental y 15 con sobreexpresión en el mixoma odontogénico(Fig. 14).

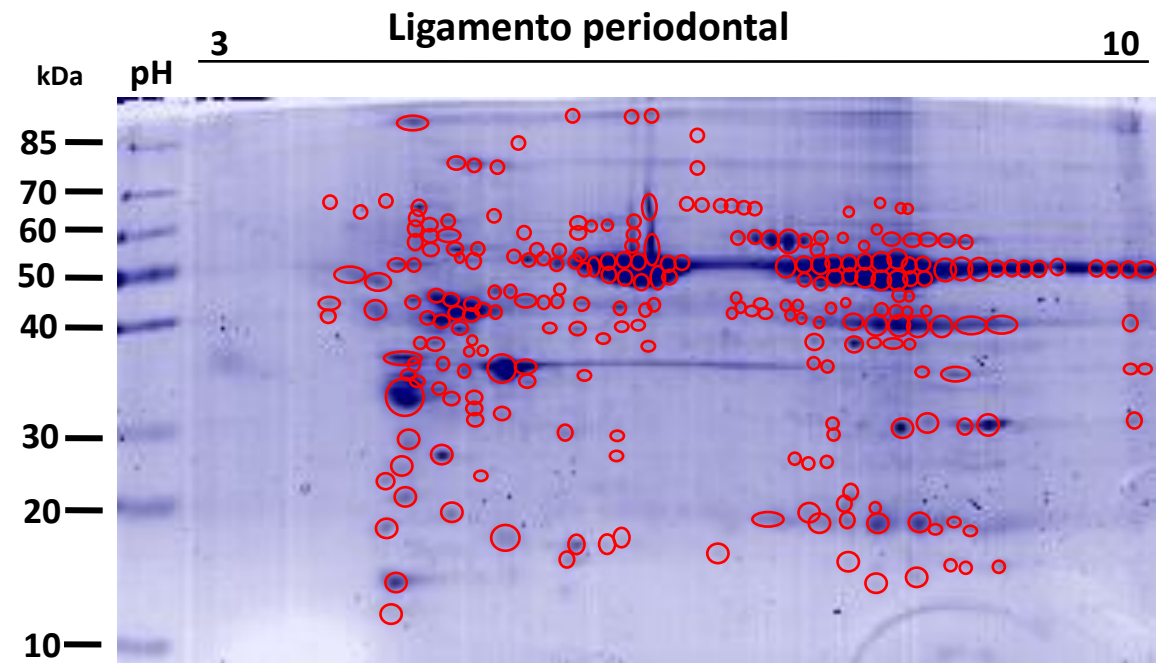
Tabla 3

Muestra	No. de puntos
Folículo dental	220
Papila Apical	222
Ligamento Periodontal	250
Pulpa Dental	288
Mixoma	336

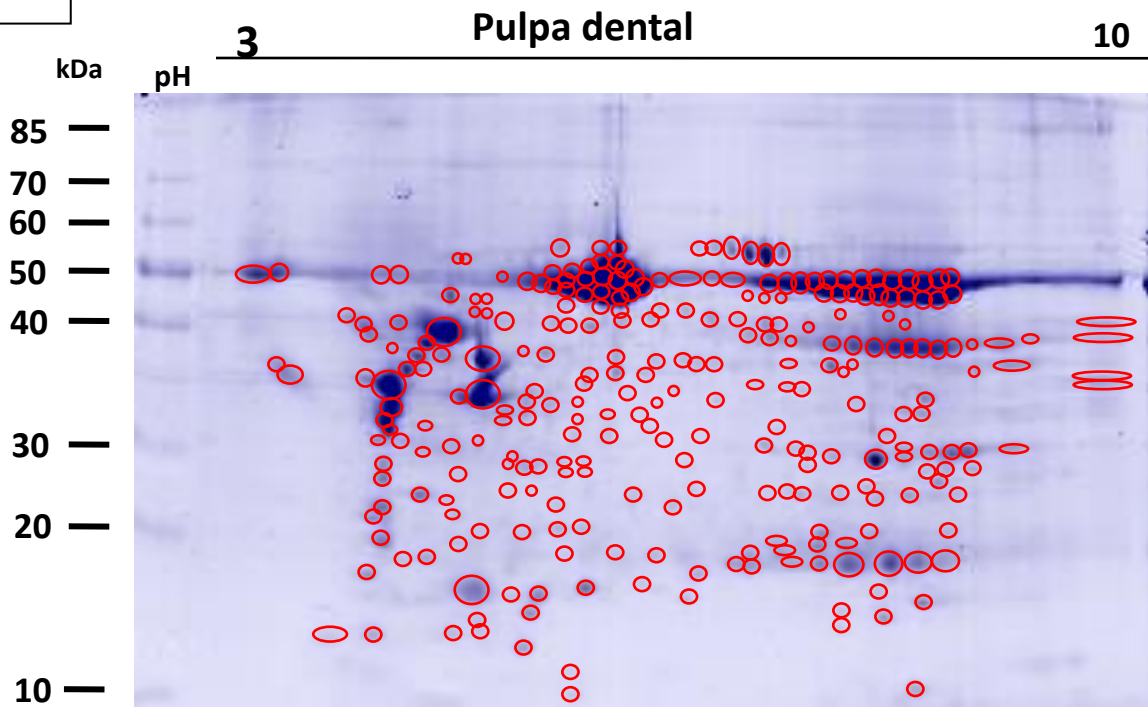
A



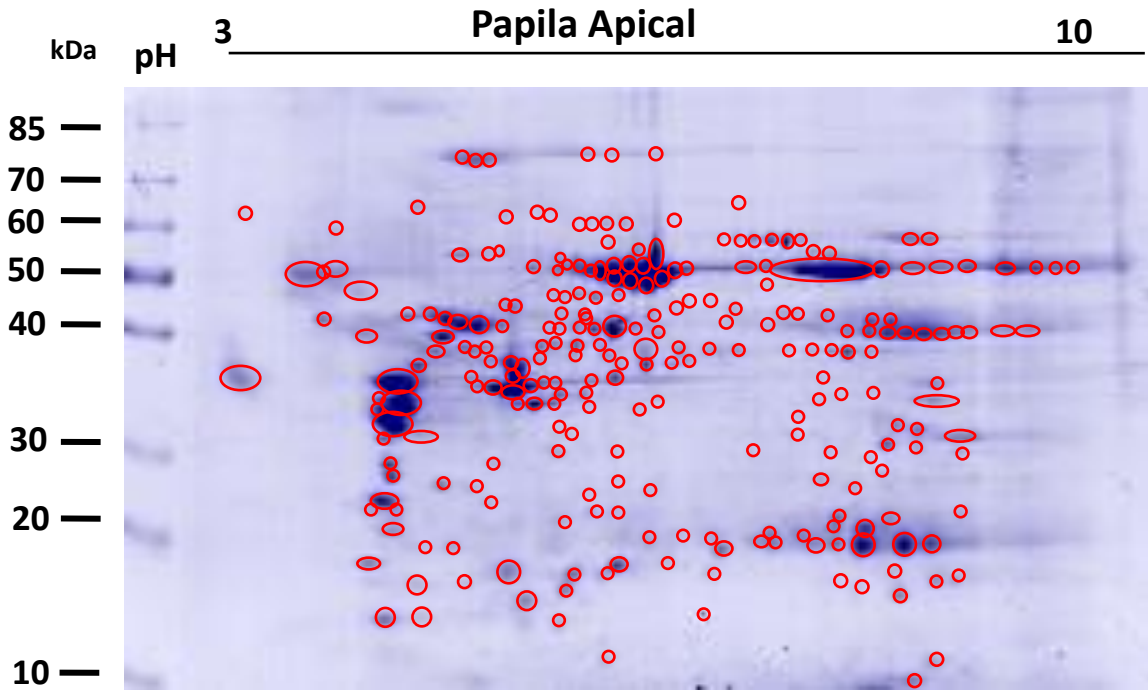
B



A



D



E

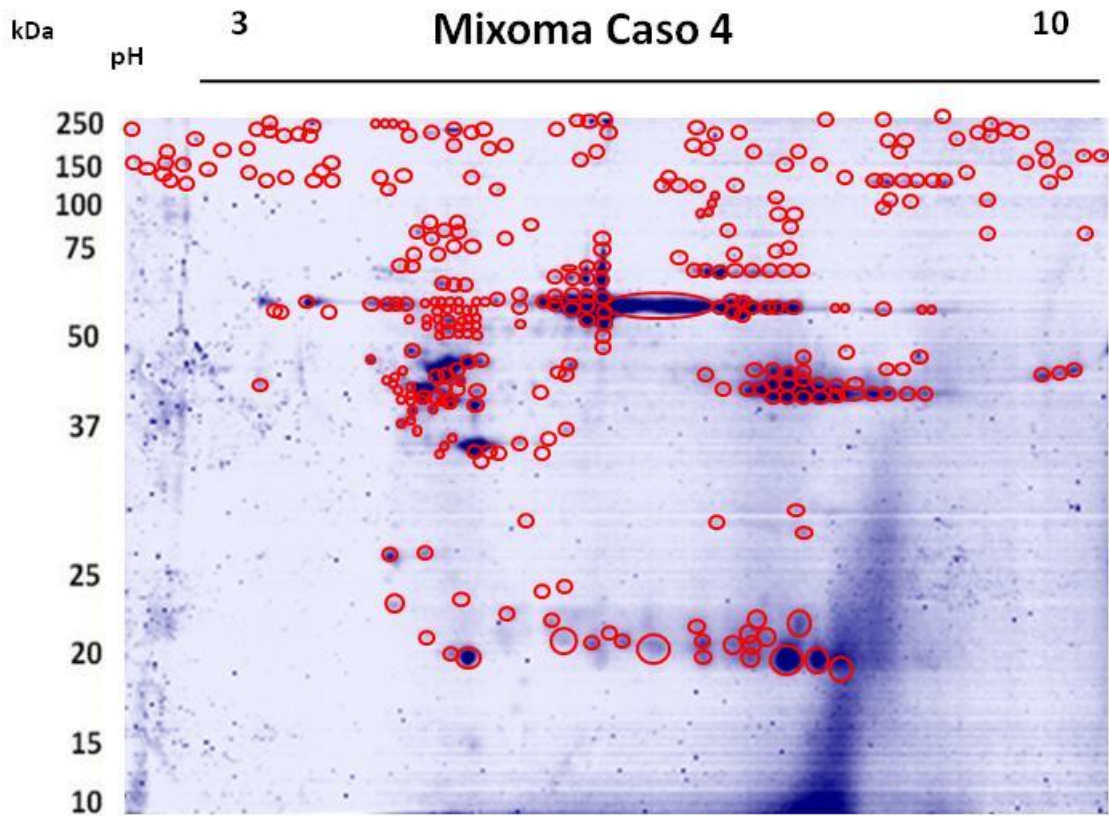


Figura 13 Conteo de proteínas encontradas en los perfiles de proteínas en geles bidimensionales las cuales se muestran en círculos rojos donde se puede observar que el tejido que presentaba más proteínas expresadas era el tejido tumoral con 336 puntos , seguido de la pulpa dental con 288 (Fig. 13 C), el ligamento periodontal con 250 puntos (Fig. 13 B), la papila apical presentó 222 puntos (Fig. 13 D) y el tejido con la menor cantidad de proteínas expresadas fue el folículo dental con 220 proteínas expresadas (Fig. 13.A).

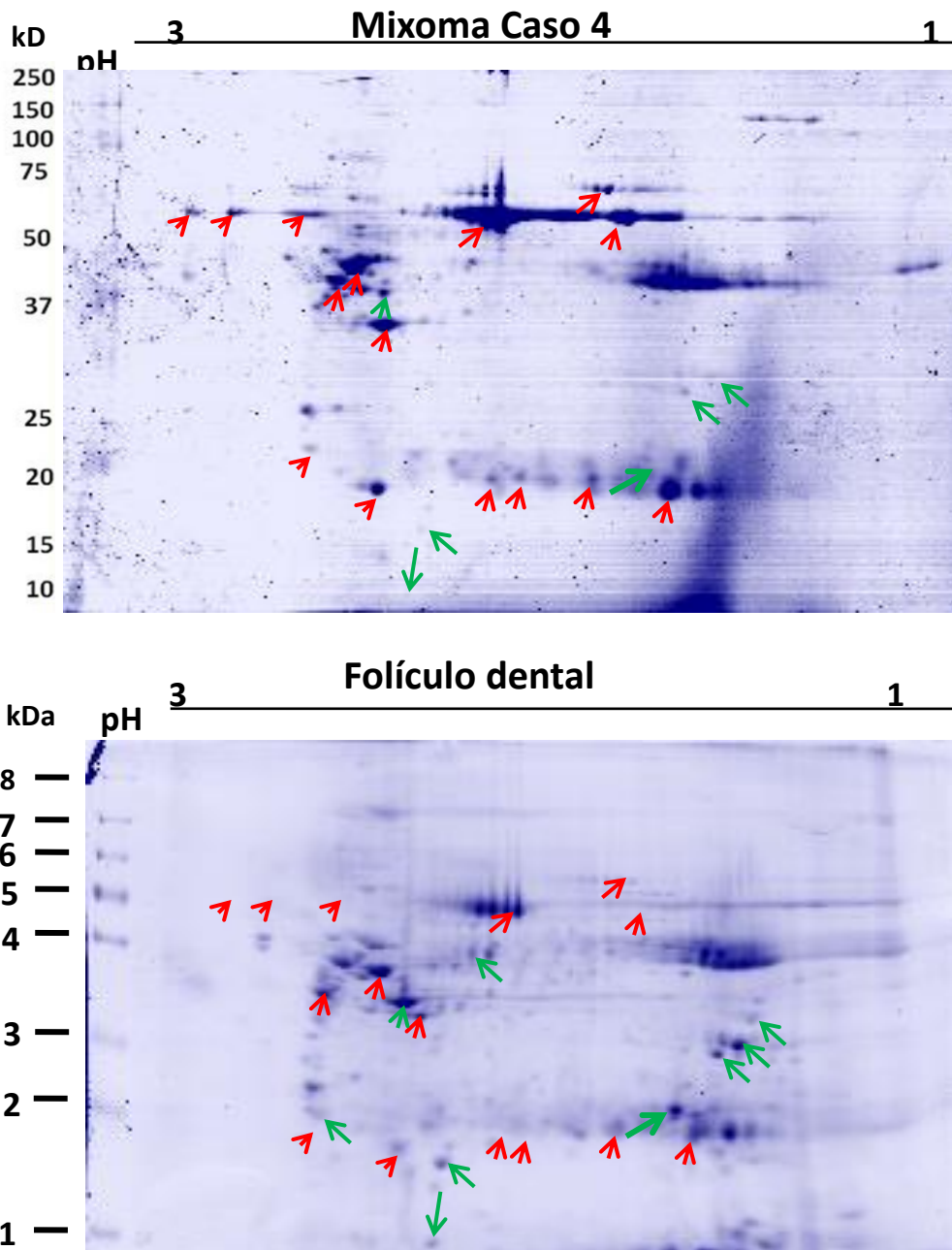


Figura 14 Puntos identificados en el análisis comparativo de los proteomas del mixoma odontogénico y el folículo dental en los cuales se obtuvieron 21 puntos que presentaron diferencias consistentes en tamaño y número de píxeles por área. 6 de ellos sobreexpresados en el tejido dental sano (flechas verdes) y 15 sobreexpresados en el tejido tumoral (flechas rojas). En círculo naranja se indica la posible localización de la proteína 14-3-3 en el mixoma odontogénico la cual aparentemente no se encuentra en el perfil del folículo dental.

Comprobación de la expresión diferencial de la proteína 14-3-3.

En un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo, se encontró que una proteína con expresión diferencial entre MO y FD es la proteína conocida con 14-3-3 [17], la cual podría estar jugando un papel importante en el comportamiento biológico del MO. Para analizar la expresión de esta proteína en los diferentes tejidos de estudio, se realizaron ensayos de Western blot sobre diferentes muestras de MO, FD, PD, LP y PA usando un anticuerpo policlonal específico contra esa proteína. En estos ensayos, el anticuerpo reconoció en las muestras de MO una banda de 26 kDa (Fig. 15), aproximadamente el peso molecular reportado para esta proteína [17]. Sin embargo, esta banda no fue reconocida en ninguno de los tejidos dentales sanos (Fig. 15). Para descartar que la ausencia de reconocimiento de la proteína 14-3-3 en los tejidos sanos fuera debido a que esas muestras contenían una menor cantidad de extracto, como control interno se realizaron ensayos de Western blot con un anticuerpo anti-actina. Este anticuerpo reconoció una banda de aproximadamente 42 kDa con similar intensidad en todas las muestras, indicando que en todos los carriles se colocó aproximadamente la misma cantidad de proteínas totales y que la proteína 14-3-3 está sobre expresada por el tejido.

Al realizar un análisis comparativo entre los proteomas del mixoma odontogénico y del folículo dental, encontrada sólo en el mixoma odontogénico con un pH aproximado de 4.73 como lo marca la literatura (Uniprot) y con un peso de aproximadamente 24 kDa. (Fig. 14 círculo naranja)

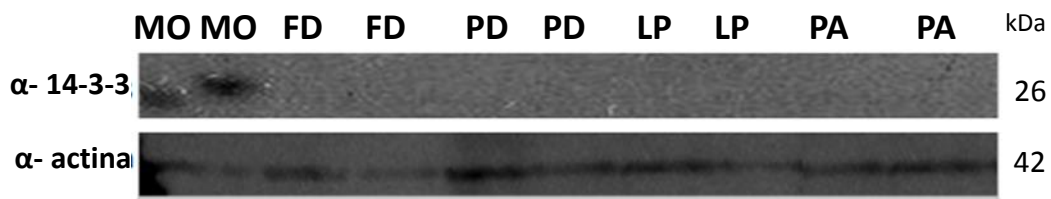


Figura 15. Western blot de la proteína 14-3-3 en todos los tejidos estudiados donde se puede observar su expresión en ambas muestras de mixoma odontogénico (MO) y su aparente falta de expresión en los tejidos dentales sanos folículo dental (FD), pulpa dental (PD) , ligamento periodontal (LP) y papila dental apical (PA)

Discusión

Los tumores odontogénicos son lesiones que derivan de los tejidos formadores de dientes o sus remanentes, los cuales quedan dentro de los tejidos mandibulares o dentro de los tejidos blandos. Estas neoplasias pueden ser benignas o malignas con variación en su agresividad y su potencial para desarrollar metástasis [14]

La última edición sobre la clasificación de los tumores odontogénicos fue realizada tomando en cuenta el diagnóstico por inmunohistoquímica, biología molecular, estudios genéticos y fue publicada en el año 2005 por la OMS [1]

Los tumores odontogénicos varían su presentación clínica e histopatológica y basándonos en ello, algunos son agresivos y otros no [42]. Entre los tumores odontogénicos benignos se encuentran el ameloblastoma, el tumor odontogénico quístico queratinizante y el mixoma odontogénico, entre otros: Estos tumores, a diferencia de los tumores odontogénicos malignos, no presentan atipia celular ni metástasis [1]. Sin embargo, a pesar de que los primeros son habitualmente asintomáticos, su crecimiento puede expandir la mandíbula y causar movilidad de los dientes, además de pérdida de hueso, por lo que se consideran localmente invasivos. A nivel microscópico, los tumores odontogénicos tienden a mostrar rasgos similares a los de las células o tejidos de origen y pueden ser de tejido epitelial, mesenquimatoso o ambos [1,43].

Para comprender y apreciar el origen de los tumores odontogénicos es necesario comprender la odontogénesis normal, lo que involucra el desarrollo del complejo de la lámina dental hasta la desintegración total de esta estructura epitelial. Hasta ahora se ha incrementado la evidencia que muestra que los residuos del proceso odontogénico juegan un papel en la histogénesis de los tumores odontogénicos y de quistes. Por

otra parte, el desarrollo de los dientes involucra diferentes estados como son la iniciación, morfogénesis y la citodiferenciación, los cuales son controlados por estados secuenciales y recíprocos entre la interacción de epitelio y mesenquima [44]. En este sentido, desde su primer descripción en 1947 por Thoma y Goldman la naturaleza del MO ha sido tema de controversia. Varios estudios han sido realizados para definir su origen preciso, pero hasta hoy no existe una teoría universalmente aceptada acerca su histogénesis [1]. Hasta ahora, las teorías sobre su origen han sido basadas en las similitudes histológicas entre esta neoplasia y tejidos como el folículo dental, la pulpa dental, el ligamento periodontal y la papila apical [5,6,9,10,11,12], pero no hay hasta el momento ninguna evidencia contundente para determinar cuál o cuáles de ellos pueden dar origen al MO.

Debido a las similitudes histológicas entre el MO y los tejidos mencionados, cada uno de ellos ha sido utilizado previamente para compararlos molecularmente con el MO, aunque cada uno por separado. Esos estudios han mostrado por ejemplo en el MO un incremento de algunas moléculas como Bcl-2 , Bcl-x [6,11,15] , metaloproteinasas [1,4,45], ácido hialurónico [5,14], la proteína 14-3-3, alipoproteína [17], vimentina, p53 y MIB-1 [11].

Sin embargo, los reportes anteriores solo indican la expresión diferencial de esas moléculas, pero no han dado información certera sobre el origen de este tumor. En este trabajo, para tratar de dilucidar el posible origen del MO nos propusimos hacer una comparación global de las proteínas expresadas por este tumor con respecto a las proteínas presentes en los diferentes tejidos que han sido propuestos como posible origen del MO. Esto debido a que la proteómica es una poderosa herramienta que nos permite analizar la expresión proteica global, incluyendo algunas modificaciones postraduccionales, de un tipo celular, tejido u organismo en un momento o condición

específica. De hecho, esta metodología, al comparar tejidos tumorales con su contraparte de tejido sano ha permitido descubrir diversas proteínas que pueden participar en los mecanismos moleculares involucrados en la génesis o desarrollo de células malignas. Esta información se ha utilizado para determinar las vías activas de señalización e identificar diversas moléculas con papel de biomarcador, blancos terapéuticos, o bien como posibles factores pronósticos [46]. En el caso del MO, para poder utilizar con confianza esta metodología, primero se debe determinar el o los tejidos sanos que pueden dar origen a esta neoplasia.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que el perfil proteico del MO presenta muchas diferencias con respecto a los tejidos sanos analizados. Sin embargo, el perfil del MO presentó mayor similitud con el perfil FD que al de los otros tejidos analizados. Este resultado pudiera sugerir que el MO posiblemente se origina del FD, aunque no se puede descartar que también pudiera originarse a partir de cualquiera de los otros tejidos. De cualquier manera, estos resultados avalan la comparación proteica realizada entre MO y FD por nuestro grupo de trabajo, donde se encontró la expresión diferencial de la proteína 14-3-3, orosomucoide 1 y apolipoproteína [17].

Debido a que no se puede descartar completamente que el MO puede originarse de otros tejidos sanos, en este trabajo analizamos la expresión en todos ellos de una de las proteínas halladas con expresión diferencial entre el MO y el FD, la proteína 14-3-3 [17]. Mediante ensayos de Western blot confirmamos que la proteína 14-3-3 se expresa en el mixoma odontogénico, pero no FD ni en los otros tejidos dentales sanos, indicando que esta proteína, que participa en diversos eventos de señalización, pudiera tener un papel importante en el desarrollo y/o en el comportamiento biológico del MO.

14-3-3 es una familia de proteínas diméricas de 28 a 33 kDa altamente conservadas que están expresadas en organismos eucariontes y son muy abundantes en el cerebro [47], donde fueron identificadas por primera vez a finales de 1960 [48]. En mamíferos la familia de las proteínas 14-3-3 está compuesta por siete subtipos llamados β , γ , ϵ , ζ , θ , η y σ [49]. Estas proteínas tienen un papel importante en una amplia gama de procesos biológicos tales como la transducción de señales, el control del ciclo celular, el transporte vesicular, la replicación del ADN, la reparación del ADN, la apoptosis, el metabolismo celular, la organización del citoesqueleto y la transformación maligna [50-54]. Además, estudios previos sugirieron que 14-3-3 podría ser un oncogen [55], ya que interactúa con muchas proteínas clave implicadas en el desarrollo y progresión de diversos tumores [56]. Entre los procesos que son relevantes para la biología del cáncer y que están reguladas por la proteína 14-3-3 se incluyen la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la señalización mitogénica [57].

De todas las isoformas de 14-3-3, la 14-3-3 σ ha sido más directamente relacionada con el cáncer. Su expresión está restringida a células epiteliales y aumenta durante la diferenciación epitelial. 14-3-3 σ es un importante mediador de la actividad supresora de tumores de p53, y, presumiblemente, de BRCA1 [58-60]. En ausencia de 14-3-3 σ , las células irradiadas experimentan catástrofe mitótica y muerte celular [60]. Se cree que 14-3-3 σ puede funcionar como un supresor del tumor mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular. La inactivación de 14-3-3 σ se produce en muchos niveles, y la alta frecuencia de la inactivación de 14-3-3 σ en diversos tumores indica que tiene un papel crucial en la tumorigénesis [57]. La inactivación por silenciamiento epigenético de 14-3-3 σ ha sido detectado en varios tipos de tumores, tales como gástrico [61], hepatocelular [62], carcinomas de pulmón de células pequeñas [63], carcinomas de células escamosas vulvares y orales (SCC)[64,65] y carcinoma basocelular [66].

Por otra parte, 14-3-3 ϵ y 14-3-3 ζ están involucrados en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo [67]. 14-3-3 ζ se requiere para la segregación cromosómica durante la mitosis [57]. La sobre expresión de la proteína 14-3-3 ζ incrementa la migración celular y disminuye la adhesión celular mediante la activación de la vía TGF-beta/Smads, lo que lleva a la sobre regulación de ZFHX1B/SIP-1, pérdida de E-cadherina y transición epitelio-mesenquimal. Además, la sobre expresión de 14-3-3 zeta asociada con la baja en la regulación de p53 incrementa el riesgo de tumorigénesis [68,69]

Adicionalmente, la 14-3-3 ζ tiene un papel importante en algunos cánceres comúnmente resistentes a quimioterapia, como el linfoma difuso de células B y el cáncer prostático. La disminución de la expresión de 14-3-3 mediante ensayos con RNA interferente (iRNA) han mejorado la sensibilidad de células tumorales a la inducción del agente quimioterapéutico en el mieloma múltiple, el linfoma difuso de células B grandes, la leucemia promielocítica aguda, el cáncer de pulmón, cáncer de próstata, hepatoma y cáncer de mama [70-76]. Interesantemente, también se ha sugerido una relación entre la proteína 14-3-3 ζ con la tumorigénesis oral, ya que en ensayos de inmunohistoquímica se ha observado un incremento en la expresión de la 14-3-3 ζ en diferentes estadios de tumorigénesis oral. Lesiones premalignas orales presentan una tinción intensa en el 69% de los casos analizados, mientras que los casos del carcinoma oral de células escamosas se presentó tinción intensa en el citoplasma y moderada en el núcleo en el 79% de los casos lo que los llevó a concluir que la sobre expresión de 14-3-3 ζ ocurre en etapas premalignas del cáncer oral como en la hiperplasia y su expresión se mantiene durante la evolución de la tumorigénesis. [77]. Por otra parte, en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, la expresión de la proteína 14-3-3 ζ ocurre del 30 al 40% de los casos examinados [78], además en ensayos silenciamiento de 14-3-3 ζ

mediante RNAi se suprime significativamente la tasa de crecimiento de las líneas celulares del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [50].

Tradicionalmente, los productos de oncogenes mutantes o sobre expresados han sido elegidos como posibles blancos de fármacos anticancerosos [79,80], sin embargo, estos pueden tener la desventaja de estar limitados a un número relativamente pequeño de casos de un tipo particular de cáncer. Además, la activación de vías de señalización paralelas o la mutación de la proteína específica podría llevar a la resistencia de los tumores contra los inhibidores específicos [81]. La inducción farmacológica de la apoptosis [82], o la supresión del punto de control mediante la inhibición de toda una clase de proteínas (en este caso, las proteínas 14-3-3), podría ser una estrategia que podría ser utilizada para dirigirse específicamente a las células tumorales y a la vez eludir el desarrollo de células tumorales resistentes. Como se ha descrito anteriormente, la activación de 14-3-3 generalmente inhibe el ciclo celular y previene la apoptosis. La interferencia terapéutica de la 14-3-3 puede dar lugar a una mayor proliferación y aumento de la sensibilidad a la apoptosis. Ambos efectos probablemente aumentarían la eficacia de los fármacos convencionales contra el cáncer, ya que son selectivos para las células que proliferan rápidamente y son menos eficaces en las células resistentes a la apoptosis [57].

Con estos antecedentes se puede sugerir que la proteína 14-3-3 podría estar jugando un papel importante en el desarrollo del MO, aunque es necesario encontrar su función biológica precisa en esta neoplasia, y en su caso, poder eventualmente dirigir fármacos contra la actividad de esta proteína que pudiera tener un efecto terapéutico en este tipo de tumor.

Conclusión

Nuestros resultados mostraron que los perfiles de proteínas de OM y DF son similares, apoyando la hipótesis de que el MO podría provenir de DF y no de la DP, PL o PA. Por otra parte, mediante ensayos de Western blot se detectó la expresión de la proteína 14-3-3 sólo en el tejido tumoral. Las propiedades y funciones de 14-3-3 en este tumor no están claras, aunque la evidencia actual sugiere una participación importante de esta proteína en el comportamiento biológico del MO.

Bibliografía

1. Pathology and genetics, World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours, Leon Barnes, John W. Eveson, Peter Reichart, David Sidransky, IARC Press Lyon, 2005, 285, 286, 316, 317.
2. Antonio Azoubel Antunes, Ricardo Wathson Feitosa de Carvalho, Rafael Linard Avelar, Paulo Germano de Carvalho Bezerra Falcão, Thiago de Santana Santos, Emanuel Sávio de Souza Andrade. Mixoma odontogenico: estudio retrospectivo de 15 casos, Acta Odontológica Venezolana, 2010 Feb., 48(2):9
3. Carvalho de Melo AU, de Farias Martorelli SB, Cavalcanti PH, Gueiros LA, Martorelli Fde O. Maxillary odontogenic myxoma involving the maxillary sinus: case report. Braz J Otorhinolaryngol. 2008 May-Jun;74(3):472-5. Review.
4. Martínez-Mata G, Mosqueda-Taylor A, Carlos-Bregni R, de Almeida OP, Contreras-Vidaurre E, Vargas PA, Cano-Valdéz AM, Domínguez-Malagón H. Odontogenic myxoma: clinico-pathological, immunohistochemical and ultrastructural findings of a multicentric series. Oral Oncol. 2008 Jun;44(6):601-7. Epub 2007 Nov 8
5. Miyagi SP, Maranduba CM, Silva Fde S, Marques MM. Dental pulp stem cells express proteins involved in the local invasiveness of odontogenic myxoma. Braz Oral Res. 2012 Apr;26(2):139-44.
6. Gomes CC, Doniz MG, Duarte AP, Bernardes VF, Gomez RS. Molecular review of odontogenic myxoma. Oral Oncol. 2011 May;47(5):325-8. Epub 2011 Mar 27. Review.

7. Rocha AC, Gaujac C, Cecchetti MM, Amato-Filho G, Machado GG. Treatment of recurrent mandibular myxoma by curettage and cryotherapy after thirty years. *Clinics (Sao Paulo)*. 2009;64(2):149-52.
8. Pogrel MA. The management of lesions of the jaws with liquid nitrogen cryotherapy. *J Calif Dent Assoc*. 1995 Dec;23(12):54-7.
9. Noffke CE, Raubenheimer EJ, Chabikuli NJ, Bouckaert MM. Odontogenic myxoma: review of the literature and report of 30 cases from South Africa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:101–9.
10. Schneider LC, Weisinger E. Odontogenic fibromyxoma arising from the periodontal ligament. *J Periodontol*. 1975 Aug;46(8):493-7.
11. Iezzi G, Piattelli A, Rubini C et al.: MIB-1, Bcl-2 and p53 in odontogenic myxomas of the jaws. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2007;27:237
12. Barker BF: Odontogenic myxoma. *Semin Diagn Pathol* 1999;16:297
13. Suarez PA, Batsakis JG, El-Naggar AK: Don't confuse dental soft tissues with odontogenic tumors. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:490
14. Mosqueda-Taylor A: New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008, 13:E555–E558.
15. Bast BT, Pogrel MA, Regezi JA: The expression of apoptotic proteins and matrix metalloproteinases in odontogenic myxomas. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1463
16. Nonaka CF, Augusto Vianna Goulart Filho J, Cristina da Costa Miguel M et al.: Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 in odontogenic myxoma and dental germ papilla. *Pathol Res Pract* 2009;205:458

17. Garcia-Munoz A, Rodriguez MA, Bologna-Molina R et al.: The orosomucoid 1 protein (alpha1 acid glycoprotein) is overexpressed in odontogenic myxoma. *Proteome Sci* 2012;10:49
18. Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci.* 2009;5(3):226-43. Epub 2009 Feb 24. Review
19. Slavkin HC. Embryonic tooth formation. A tool for developmental biology. *Oral Sci Rev.* 1974;4(0):7-136.
20. Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV. Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol.* 1999 May;43(3):261-7
21. Senkler M, Braun HP. Functional Annotation of 2D Protein Maps: The GelMap Portal. *Front Plant Sci.* 2012;3:87. Epub 2012 May 14
22. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009 Sep;88(9):792-806. Review.
23. Infante Contreras, Clementina (2009) Fundamentos para la evaluación del crecimiento, desarrollo y función craneofacial. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 237- 270
24. Thesleff I, Tummers M. Tooth organogenesis and regeneration. 2009 Jan 31. In: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008
25. Kim J, Ellis GL. Dental follicular tissue: misinterpretation as odontogenic tumors. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993 Jul;51(7):762-7; discussion 767-8.

26. Choi MH, Noh WC, Park JW, Lee JM, Suh JY. Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontal Implant Sci.* 2011 Aug;41(4):167-75. Epub 2011 Aug 31.
27. Color Atlas of Dental Hygiene: Periodontology, Herbert Wolf, Thomas Hassell, Thieme, 2006, 7-16.
28. Obsilova V, Silhan J, Boura E, Teisinger J, Obsil T. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res* 2008; 57(Suppl 3): S11–S21.
29. Revisión en Biología Celular y Molecular, Antonia de los Ángeles Álvarez Díaz, Enrique Hilario Rodríguez, Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, 2010, Capítulo 4: Ontogénesis Dental y Células Madre, 115-127.
30. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology.* 2011 Jan;99(1):1-7. Epub 2011 Jan 27. Review.
31. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004 Dec;4(12):3665-85. Review. Erratum in: *Proteomics.* 2005 Feb;5(3):826-7.
32. Gauss C, Kalkum M, Löwe M, Lehrach H, Klose J. Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis.* 1999 Mar;20(3):575-600.
33. Cázares-Raga FE, González-Lázaro M, Montero-Solís C, González-Cerón L, Zamudio F, Martínez-Barnette J, Torres-Monzón JA, Ovilla-Muñoz M, Aguilar-Fuentes J, Rodríguez MH, de la Cruz Hernández-Hernández F.

GP35 ANOAL, an abundant acidic glycoprotein of female *Anopheles albimanus* saliva. *Insect Mol Biol.* 2007 Apr;16(2):187-98. Epub 2007 Feb 6.

34. Wilson AM, Kimura E, Harada RK, Nair N, Narasimhan B, Meng XY, Zhang F, Beck KR, Olin JW, Fung ET, Cooke JP. Beta2-microglobulin as a biomarker in peripheral arterial disease: proteomic profiling and clinical studies. *Circulation.* 2007 Sep 18;116(12):1396-403.
35. Svetlov SI, Xiang Y, Oli MW, Foley DP, Huang G, Hayes RL, Ottens AK, Wang KK. Identification and preliminary validation of novel biomarkers of acute hepatic ischaemia/reperfusion injury using dual-platform proteomic/degradomic approaches. *Biomarkers.* 2006 Jul-Aug;11(4):355-69.
36. Romeo MJ, Espina V, Lowenthal M, Espina BH, Petricoin EF 3rd, Liotta LA. CSF proteome: a protein repository for potential biomarker identification. *Expert Rev Proteomics.* 2005 Jan;2(1):57-70. Review.
37. Wulfkuhle JD, Paweletz CP, Steeg PS, Petricoin EF 3rd, Liotta L. Proteomic approaches to the diagnosis, treatment, and monitoring of cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2003;532:59-68. Review.
38. Wang ZH, Yan C, Zhang ZY, Zhang CP, Hu HS, Tu WY, Kirwan J, Mendenhall WM. Impact of salivary gland dosimetry

on post-IMRT recovery of saliva output and xerostomia grade for head-and-neck cancer patients treated with or without contralateral submandibular gland sparing: a longitudinal study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011 Dec 1;81(5):1479-87. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.07.1990. Epub 2010 Oct 8.

39. Rennstam K, Hedenfalk I. High-throughput genomic technology in research and clinical management of breast cancer. Molecular signatures of progression from benign epithelium to metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2006;8(4):213. Review.
40. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000, 21:1037-1053.
41. Perez E, Gallegos JL, Cortes L, Calderon KG, Luna JC, Cazares FE, Velasquillo MC, Kouri JB, Hernandez FC: Identification of latexin by a proteomic analysis in rat normal articular cartilage. *Proteome Sci* 2010, 8:27.
42. T.K. Bandiwadekar, B.P. Reddy, R. Desai, S. Manjunath, S. Shubhalakshmi, K.V. Umashankar. Odontogenic tumours-an enigma to surgeon. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Volume 36, Issue 11, November 2007, Pages 1046-1047
43. Regezi JA, Scuibba JJ. *Oral Pathology.Clinical-Pathologic Correlations.* WB Saunders. Philadelphia. 1989.
44. Reichart PA, Philipsen HP (2004). *Odontogenic Tumours and Allied Lesions.* Quintessence Publishing: London.

45. Veras Filho Rde O, Pinheiro SS, Almeida IC, Arruda Mde L, Costa Ade L. Odontogenic myxoma of the maxilla invading the maxillary sinus. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008 Nov-Dec;74(6):945.
46. John L. Hays, Geoffrey Kim, Iulia Giuroiu, Elise C. Kohn. Proteomics and ovarian cancer: Integrating proteomics information into clinical care Review Article. *Journal of Proteomics*, Volume 73, Issue 10, 10 September 2010, Pages 1864-1872
47. Aitken A, Collinge DB, van Heusden BP, Isobe T, Roseboom PH, Rosenfeld G et al. 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 498–501.
48. Moore, B. E. & Perez, V. J. in *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration* (ed. Carlson, F. D.) 343–359 Prentice–Hall, Englewood Cliffs, 1967).
49. Martin H, Patel Y, Jones D, Howell S, Robinson K, Aitken A. Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein: an antibody specific for the N-acetylated amino-terminus of a protein. *Febs Lett* 1993; 336: 189
50. Morrison DK. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 16–23.
51. Lee JA, Park JE, Lee DH, Park SG, Myung PK, Park BC *et al.* G1 to S phase transition protein 1 induces apoptosis signal-regulating kinase 1 activation by dissociating 14-3-3 from ASK1. *Oncogene* 2008; 27: 1297–1305.
52. Dong S, Kang S, Gu TL, Kardar S, Fu H, Lonial S *et al.* 14-3-3 integrates prosurvival signals mediated by the AKT and MAPK pathways in ZNF198-FGFR1-transformed hematopoietic cells. *Blood* 2007; 110: 360–369.

53. Obsilova V, Silhan J, Boura E, Teisinger J, Obsil T. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res* 2008; 57(Suppl 3): S11–S21.
54. Masters SC, Subramanian RR, Truong A, Yang H, Fujii K, Zhang H *et al.* Survival-promoting functions of 14-3-3 proteins. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 360–365.
55. Tzivion G, Gupta VS, Kaplun L, Balan V. 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 203–213
56. Neal CL, Yu D. 14-3-3zeta as a prognostic marker and therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 1343–1354.
57. Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec;3(12):931-43. Review.
58. Hermeking, H. *et al.* 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* **1**, 3–11 (1997). The first demonstration of a direct connection between 14-3-3 genes and tumour suppression by p53.
59. Yarden, R. I. *et al.* BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nature Genet.* **30**, 285–289 (2002). 14-3-3 σ is an integral part of BRCA1-induced G2 arrest.
60. Chan, T. A. *et al.* 14-3-3 σ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**, 616–620 (1999). The first knockout study of 14-3-3 function in mammalian cells.
61. Suzuki, H. *et al.* Inactivation of the 14-3-3 σ gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res.* **60**, 4353–4357 (2000).

62. Iwata, N. *et al.* Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 σ gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 19, 5298–5302 (2000).
63. Osada, H. *et al.* Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3 σ in human lung cancers. *Oncogene* 21, 2418–2424 (2002).
64. Gasco, M. *et al.* Coincident inactivation of 14-3-3 σ and p16INK4a is an early event in vulval squamous neoplasia. *Oncogene* 21, 1876–1881 (2002)
65. Gasco, M. *et al.* Epigenetic inactivation of 14-3-3 σ in oral carcinoma: association with p16INK4a silencing and human papillomavirus negativity. *Cancer Res.* **62**, 2072–2076 (2002).
66. Lodygin, D. *et al.* Analysis of 14-3-3 σ expression in hyperproliferative skin diseases reveals selective loss associated with CpG-methylation in basal cell carcinoma. *Oncogene* 22, 5519–5524 (2003). Shows that there is 14-3-3 σ silencing in BCC, whereas other skin diseases associated with hyperproliferative keratinocytes retain 14-3-3 σ expression.
67. Su, T. T. *et al.* Cell cycle roles for two 14-3-3 proteins during *Drosophila* development. *J. Cell Sci.* 114, 3445–3454 (2001).
68. Danes CG, Wyszomierski SL, Lu J, Neal CL, Yang W, Yu D. 14-3-3 zeta down-regulates p53 in mammary epithelial cells and confers luminal filling. *Cancer Res* 2008; 68: 1760–1767.
69. Roma AA, Goldblum JR, Fazio V, Yang B. Expression of 14-3-3sigma, p16 and p53 proteins in anal squamous intraepithelial neoplasm and squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 419–425.
70. Ge F, Lu XP, Zeng HL, He QY, Xiong S, Jin L *et al.* Proteomic and functional analyses reveal a dual molecular mechanism underlying arsenic-

- induced apoptosis in human multiple myeloma cells. *J Proteome Res* 2009; 8: 3006–3019.
71. Maxwell SA, Li Z, Jaye D, Ballard S, Ferrell J, Fu H. 14-3-3zeta mediates resistance of diffuse large. *J Biol Chem* 2009; 284: 22379–22389.
72. Fan T, Li R, Todd NW, Qiu Q, Fang HB, Wang H et al. Upregulation of 14-3-3zeta in lung cancer and its implication as prognostic and therapeutic target. *Cancer Res* 2007; 67: 7901–7906.
73. Chen J, Emara N, Solomides C, Parekh H, Simpkins H. Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 1103–1111.
74. Chatterjee D, Goldman M, Braastad CD, Darnowski J, Wyche JH, Pantazis P et al. Reduction of 9-nitrocamptothecin-triggered apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by ectopic expression of 14-3-3zeta. *Int J Oncol* 2004; 25: 503–509.
75. Choi JE, Hur W, Jung CK, Piao LS, Lyoo K, Hong SW et al. Silencing of 14-3-3zeta over-expression in hepatocellular carcinoma inhibits tumor growth and enhances chemosensitivity to cis-diammined dichloridoplatium. *Cancer Lett* 2011; 303: 99–107.
76. Neal CL, Yao J, Yang W, Zhou X, Nguyen NT, Lu J et al. 14-3-3zeta overexpression defines high risk for breast cancer recurrence and promotes cancer cell survival. *Cancer Res* 2009; 69: 3425–3432.
77. Matta A, Bahadur S, Duggal R, Gupta SD, Ralhan R. Over-expression of 14-3-3zeta is an early event in oral cancer. *BMC Cancer*. 2007 Sep 2;7:169.

78. Lin M, Morrison CD, Jones S, Mohamed N, Bacher J, Plass C. Copy number gain and oncogenic activity of YWHAZ/14- 3-3zeta in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2009; 125: 603–611.
79. Shawver, L. K., Slamon, D. & Ullrich, A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1, 117–123 (2002).
80. Hermeking, H. The *Myc* oncogene as a cancer drug target. *Curr. Cancer Drug Targets* 3, 163–175 (2003).
81. Druker, B. J. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell* 1, 31–36 (2002).
82. Lodygin, D., Menssen, A. & Hermeking, H. Induction of the Cdk inhibitor p21 by LY83583 inhibits tumor cell proliferation in a p53-independent manner. *J. Clin. Invest.* 110, 1717–1727 (2002).