



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**OBTENCIÓN DE CULTIVO PRIMARIO DE UN TUMOR
ODONTOGÉNICO QUÍSTICO CALCIFICANTE**

**TRABAJO TERMINAL ESCRITO DEL PROGRAMA DE
TITULACIÓN POR ALTO PROMEDIO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

EDITH CASTAÑÓN ALONSO

TUTOR: Dr. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

ASESORES: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMAN
DRA. SANDRA LUZ CASTAÑÓN ALONSO

Agradecimiento: UNAM, DGAPA, PAPIIT IN223414

Cd. Universitaria, D. F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



OBTENCIÓN DE CULTIVO PRIMARIO DE UN TUMOR ODONTOGÉNICO QUÍSTICO CALCIFICANTE

ÍNDICE

1. Resumen
2. Introducción
3. Marco teórico
 - 3.1 Odontogénesis y Tumores Odontogénicos
 - 3.2 Epidemiología
 - 3.3 Clasificación de TO de la OMS, (2005)
 - 3.4 Tumor Odontogénico Quístico Calcificante
 - 3.4.1 Definición y antecedentes
 - 3.4.2 Sinónimos
 - 3.4.3 Epidemiología
 - 3.4.4 Características Clínicas
 - 3.4.5 Características Imagenológicas
 - 3.4.6 Características Histopatológicas
 - 3.4.7 Pronóstico y Tratamiento
 - 3.5 Cultivo de Tumores Odontogénicos
4. Planteamiento del problema
5. Justificación del problema
6. Hipótesis
7. Objetivos
8. Variables
9. Recursos
 - 9.1 Humanos
 - 9.2 Infraestructura
 - 9.3 Económicos
10. Materiales y métodos
 - 10.1 Obtención del espécimen y cultivo primario
 - 10.2 Determinación del Crecimiento Celular
 - 10.3 Inmunocitoquímica



10.4 Análisis estadístico

11. Implicaciones éticas
12. Resultados
13. Discusión
14. Conclusiones
15. Anexos
16. Referencias



1. RESUMEN

El Tumor Odontogénico Quístico Calcificante (TOQC) fue descrito por primera vez por Gorlin y col en 1962, desde entonces su identificación es específica, generalmente está compuesto por lesiones quísticas, células conocidas como “fantasmas” y comúnmente es asociado a otro tumor odontogénico.

Objetivo: Obtener células epiteliales y/o mesenquimales derivadas del cultivo primario de una muestra de TOQC.

Materiales y métodos: Paciente de 16 años de edad de sexo masculino se presentó con una lesión localizada en el ángulo, cuerpo y rama mandibular izquierda, radiográficamente se observó lesión radiolúcida mal delimitada. Se decidió tomar dos fragmentos de biopsia; uno para el diagnóstico histopatológico y otro para el cultivo celular primario. Este último espécimen fue microdisecionado, digerido y cultivado en DMEM-SFB 10%, con antibiótico y antimicótico. La proliferación celular se midió utilizando el ensayo de proliferación MTT Vybrant Cell Kit a 0, 24, 48 y 72 horas, fibroblastos PDL fue empleado como control. Se realizó un análisis inmunocitoquímico para determinar la expresión de actina, pancitoqueratina AE1/AE3 y vimentina, la intensidad de expresión fue analizada a través del software ImageJ.

Resultados: El estudio histopatológico confirmó el diagnóstico de TOQC. Los ensayos de proliferación revelaron que las células del TOQC tienen una conducta diferencial a los fibroblastos del PDL, estabilizando su proliferación a las 72 h y 24h, respectivamente. El análisis inmunocitoquímico reveló expresión de actina similar en fibroblastos y TOQC, sin embargo vimentina y Citoqueratina presentaron expresión mayor en el TOQC.

Conclusiones: La velocidad de crecimiento de células TOQC es más lenta comparado al control, lo cual puede derivar de un inmunofenotipo heterogéneo. Esto nos sugiere que este tipo de tumores tienen un desarrollo lento. No obstante, el establecimiento de poblaciones primarias de tumores odontogénicos ayudará a comprender el perfil, comportamiento y características celulares que puedan ser comunes en la conducta clínica.



2. INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares pueden constituir modelos útiles para estudiar algunos procesos genéticos, bioquímicos, metabólicos o fisiológicos que tienen lugar en los organismos. La facilidad de su manipulación permite el análisis de las condiciones adecuadas antes de realizar los experimentos definitivos en animales o los ensayos clínicos en seres humanos.¹

Los modelos *in vitro* constituyen una útil herramienta para la validación de nuevos métodos terapéuticos, para la definición del mecanismo de acción de nuevas moléculas y en general, para la investigación biomédica y biotecnológica.¹

La patogenia de los tumores odontogénicos se asocia a alteraciones del desarrollo dental. Estos pueden derivar de los componentes epiteliales y/o mesenquimales presentes durante la odontogénesis. El tumor odontogénico quístico calcificante es una neoplasia quística benigna de origen odontogénico.

El cultivo primario es una alternativa para el estudio de estas neoplasias, ya que ofrece un modelo que permite estudiar variables como la proliferación o invasión con un enfoque distinto al análisis histopatológico, y a cuyos resultados podrían ser relacionados con conductas biológicas significativas con la etiología y/o patogénesis del tumor.²



3. MARCO TEÓRICO

3.1 ODONTOGÉNESIS Y TUMORES ODONTOGÉNICOS

La Odontogénesis depende de las secuencias y las interacciones recíprocas entre las células ectomesenquimales derivadas de la cresta neural craneal (CNC) y el epitelio que recubre la cavidad oral. El contacto de estas células CNC con epitelio oral inicia el desarrollo del diente por la formación de un diente con la yema epitelial que rodea una condensación de las células CNC. Aún no está claro si el potencial odontogénico inicial reside en las células del epitelio que inducen a las células de la CNC para formar el brote o es a la inversa. Sin embargo, se sabe que después de estos sucesos iniciales, el epitelio dental adquiere la capacidad de instruir la formación del diente cuando se combina con las células CNC.

El proceso de odontogénesis en el humano comienza a partir del establecimiento de la lámina dental derivada del epitelio oral embrionario a través de su proliferación e invaginación en el mesénquima embrionario. Posteriormente, dicha lámina se alarga y sus extremos dejan excrecencias que forman un brote o botón, el cual es la primera etapa de la odontogénesis. En la siguiente etapa o de casquete, las células se multiplican agrandando dicha estructura y diferenciando células del ectomesenquima y papila dental. En la tercera etapa o de campana se establecen patrones morfológicos de cúspides y la diferenciación del órgano del esmalte (epitelio externo, interno, retículo estrellado y estrato intermedio). Este último da lugar a la formación del esmalte e induce la diferenciación de odontoblastos y formación de dentina. Posteriormente se forma un folículo dental maduro que participa en la erupción dental, mientras se da la raíz a partir de la vaina epitelial de Hertwig por la diferenciación de cementoblastos y producción de dentina a partir de los odontoblastos.³

Los estudios experimentales y de eventos moleculares asociados con el desarrollo de los dientes han dado como resultado la identificación de más de 200 genes que juegan un papel en este ámbito. De éstos, hallazgos del factor



de crecimiento de fibroblastos-8, se sabe que participa en el desarrollo de la parte alveolar de la mandíbula y una parte basal, mientras que los genes Sonic Hedgehog están involucrados en la formación de la yema del diente. La expresión de estos dos genes, inducen la regulación positiva de genes adicionales, tanto en el epitelio y ectomesénquima. La etiología de los tumores odontogénicos benignos y malignos no se conoce pero se considera que dichos genes podrían estar relacionados, y a que la mayoría de los tumores odontogénicos parecen surgir de novó, sin un factor causal aparente.⁴

Durante la formación de los órganos dentales los tejidos epiteliales y ectomesenquimales muestran una secuencia de procesos interactivos o de inducción recíproca que conducen al desarrollo de los ameloblastos, células productoras del esmalte, y a los odontoblastos, células que generan la dentina. Los tumores odontogénicos pueden estar constituidos exclusivamente por tejido epitelial, ectomesenquimal, o ambos, reproduciendo diferentes etapas evolutivas del diente, sin formación de tejidos duros o con presencia de esmalte y dentina o de estructuras que se parecen a estos tejidos. La gran mayoría de los tumores odontogénicos ocurren a nivel intraóseo en el esqueleto maxilofacial, no obstante, sus manifestaciones clínicas se hacen evidentes a nivel de la mucosa. Las características clínicas de los tumores odontogénicos más benignos son inespecíficos; ya que muestran crecimiento expansivo lento sin o con dolor leve. Por el contrario, el dolor es la primera y más común de los síntomas, seguido de rápido desarrollo y hinchazón en casi todos los tumores odontogénicos malignos. El tumor puede erosionar o romper a través de la cortical de los huesos, mandíbula o maxilar.

Se considera que lesiones precursoras tales como quistes odontogénicos o del desarrollo pueden contribuir a la formación de ciertos tumores odontogénicos y/o carcinomas de células escamosas intraóseos.

Recientemente la OMS ha propuesto una nueva clasificación de los tumores odontogénicos, basada en las características histológicas que exhiben cada uno de los tumores y que a su vez corresponden a un comportamiento biológico que puede ser francamente benigno, maligno, o simplemente hamartoso.⁵



3.2 EPIDEMIOLOGÍA

La epidemiología es variada a través del mundo. Los datos de China, Hong Kong, Nigeria, Zimbabue, Alemania, Turquía, Japón, Canadá, África del Sur entre otras naciones, han marcado las diferencias en las frecuencias relativas entre los tumores odontogénicos benignos.

Estudios clínicos e histopatológicos han proporcionado datos en los cuales se dice que el tumor más frecuente fue el ameloblastoma tipo multiquístico (8,6%) comparable a la encontrada en Hong Kong (59,4%), Japón (57%) y en Zimbabue y Nigeria (79,1% y 58,5%, respectivamente). Esto contrasta con las bajas proporciones en otras poblaciones, donde el tumor más frecuente fue odontoma tal como en Estados Unidos de América con 73,8% y Canadá 56,4%, donde el ameloblastoma multiquístico que representa sólo el 12,2% y 14,8%, respectivamente.⁶

Estas diferencias pueden ser derivadas de las discrepancias entre los centros de captación ya que en países como la República Popular China, Hong Kong, Japón y varios países africanos son diagnosticados y tratados en Unidades Maxilofaciales de Hospitales Médicos, mientras que los pacientes de los Estados Unidos de América y Canadá en general son monitoreados en las Facultades de Odontología y hospitales.⁶

3.3 Clasificación de TO de la OMS, (2005)

Esta clasificación principalmente divide a los tumores odontogénicos según sus criterios de benignidad y malignidad. En los tumores malignos se observan dos subtipos principales: los carcinomas y sarcomas odontogénicos. Mientras que para los benignos la clasificación es algo más elaborada, ya que toma en cuenta la combinación de la presencia de epitelio odontogénico, estroma y/o ectomesénquima para agrupar a cada tumor.⁷

Tabla 1. Clasificación Histológica de Tumores Odontogénicos OMS (2005)

Tumores Benignos	Tumores Malignos
<p>Epitelio odontogénico con estroma maduro sin ectomesenquima odontogénico:</p> <p>Ameloblastoma: Sólido, multiquistico, extraoseo tipo periférico, desmoplástico y uniquistico. Tumor odontogénico escamoso Tumor odontogénico epitelial calcificante Tumor odontogénico adenomatoide Tumor odontogénico queratósquístico</p>	<p>Carcinomas odontogénicos:</p> <p>Ameloblastoma metastatizante (maligno) Carcinoma ameloblástico: Tipo primario, secundario intraóseo y secundario periférico Carcinoma espino celular intraóseo primario: Tipo sólido y derivados de tumor odontogénico queratósquístico Carcinoma espino celular primario derivado de quistes odontogénicos Carcinoma odontogénico de células claras Carcinoma odontogénico de células fantasma</p>
<p>Epitelio odontogénico con ectomesénquima odontogénico, con o sin formación de tejido dentario duro:</p> <p>Fibroma ameloblástico Fibrodentinoma ameloblástico Fibroodontoma ameloblástico Odontoma: Tipo complejo y compuesto Odontoameloblastoma Tumor odontogénico quístico calcificante Tumor odontogénico dentigero de células fantasma</p>	<p>Sarcomas odontogénicos:</p> <p>Fibrosarcoma ameloblástico Fibrodentino y fibroodonto sarcoma ameloblástico Sarcoma ameloblástico Sarcomas odontogénicos: Fibrosarcoma ameloblástico Fibrodentino y fibroodonto sarcoma ameloblástico Sarcoma ameloblástico</p>
<p>Mesenquima y/o ectomesénquima odontogénico con o sin epitelio odontogénico:</p> <p>Fibroma odontogénico (con abundante o escaso epitelio odontogénico) Mixoma odontogénico (Mixofibroma) Cementoblastoma</p>	<p>Lesiones relacionadas al hueso:</p> <p>Fibroma osificante Displasia fibrosa Displasia óseas Lesión central de células gigantes (Granuloma) Querubismo Quiste óseo aneurismático Quiste óseo simple</p>
	<p>Otros tumores</p> <p>Tumor neuroectodérmico melanótico de la infancia</p>



3.4 TUMOR ODONTOGÉNICO QUÍSTICO CALCIFICANTE

3.4.1 Definición y antecedentes

Es una neoplasia quística benigna de origen odontogénico, caracterizado por un epitelio tipo ameloblástico, como con células fantasmas que pueden calcificarse.^{6, 8}

El TOQC primero fue nombrado como Quiste Odontogénico Calcificante por Gorlin en 1962. En el año 2005, debido a su comportamiento neoplásico, fue reclasificado como Tumor Odontogénico Quístico Calcificante (TOQC) por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta es una neoplasia, que representa el 25% de todos los quistes odontogénicos.⁶

Las células responsables del Quiste Odontogénico Calcificante son procedentes de la lámina dental (restos de Serres) las cuales pueden ser localizadas en los tejidos blandos o en el hueso.⁷

3.4.2 Sinónimos.

Queratinizante y quiste odontogénico calcificante, Quiste de Gorlin, quiste odontogénico calcificante⁶

3.4.3 Epidemiología.

El TOQC puede presentarse como un proceso intraóseo o extraóseo. El rango de edad varía desde 5 hasta 92 años sin predilección de género. Representa el 1,6 % de los tumores odontogénicos.⁸ Aunque según un estudio realizado en Queensland donde se reportaron 633 casos de lesiones orales, de los cuales 540 casos fueron reportados como quísticos odontogénicos y 93 casos tumores odontogénicos. La incidencia total reportada señala al tumor odontogénico queratínico como el más frecuente, seguido por el Ameloblastoma y el odontoma. El TOQC presenta una incidencia similar al odontoma con 1.1 casos por cada millón de habitantes.⁹

Datos de Gaitán-Cepeda y Cols. indicaron que la prevalencia del TOQC no ha cambiado drásticamente a través del tiempo, incluso ante la reclasificación de



los tumores odontogénicos por parte de la OMS en el 2005 en una serie de casos reportaron la prevalencia del 0.8% dentro de los tumores odontogénicos en el período de 1981-2004 y de 1.4% para el periodo de 2005-2007.¹⁰

3.4.4 Características clínicas

La mayoría de los casos son diagnosticados en la segunda y tercera décadas de la vida. Clínicamente, el TOQC generalmente se presenta como un crecimiento indoloro lento con inflamación, que afecta igualmente el maxilar y la mandíbula, con una predilección en la región anterior, aunque puede llegar a presentarse en la zona del primer molar en personas mayores a 50 años de edad.

El TOQC puede llegar a crear expansión leve y crecimiento asintomático. El tamaño medio es de unos 3 cm, con un rango de 1 a 8 cm. El quiste odontogénico calcificante extraóseo representa el 25% de todos los quistes calcificantes odontogénicos. Los TOQC pueden presentarse de forma extraósea normalmente en el área de los incisivos.⁷

El TOQC tiene un comportamiento similar al ameloblastoma, aunque el TOQC presenta un crecimiento más lento, invasivo y con tendencia a reaparecer si no es completamente retirado.¹¹

3.4.5 Características imagenológicas:

Se presenta como una imagen radiolúcida unilocular o multilocular bien definida, que podrá contener diversas cantidades y formas de materiales radiopacos.⁶

Se considera que este tipo de tumor inicia como lesiones uniloculares, sin embargo es tos se vuelven multiloculares. Al principio de su desarrollo, presentan completamente una zona radiolúcida. A medida que maduran, desarrollan calcificaciones bien circunscritas, con aspecto radiotransparente y radiopaco mixto. Se observan tres patrones generales de radiopacidad, el primero se trata de un patrón de manchas de sal y pimienta, el segundo es un modelo de nube esponjosa, y el tercero es un patrón en forma de media luna con un lado radiolúcido ("luna nueva")⁷



El análisis con una tomografía axial computarizada se caracteriza por imágenes hipodensas uniloculares, asociadas a la expansión de los tejidos adyacentes, así como lesiones hipodensas que puede ser asociadas con depósitos calcificados dentro de la lesión.¹²

3.4.6 Características Histopatológicas:

En cualquier variante las características generales en la pared del quiste, se presenta revestimiento por un epitelio tipo ameloblástico delgado con la formación de células fantasma, las cuales pueden calcificarse.

Los TOQC son habitualmente quistes uniloculares, con revestimiento de capa de células basales, dicha capa consiste en columnas de células cuboidales con núcleos hipercromáticos que pueden ser polarizados lejos de la membrana basal. El epitelio proliferativo en un grado variable y muestra diversidad morfológica.

El revestimiento de epitelio puede ser grueso o delgado y puede llegar a ocupar la mayor parte del volumen, esto puede dar la impresión de un tumor sólido, las células ameboides semejan un retículo estrellado, y pueden mezclarse con las áreas celulares densas.

Un hallazgo característico es la presencia de células fantasma. Estas son células epiteliales eosinófilas, que se manifiestan solas o en grupos. Los contornos celulares suelen ser distintos, pero pueden relacionarse con otros grupos. Los núcleos se degeneran, por lo general completamente, de modo que quedan células redondas sin núcleo sólo.

Estas células parecen representar un proceso de queratinización normal y están sujetas a la calcificación distrófica, esto puede observarse como gránulos basófilos finos, pero cuando son extensos puede haber amplias hojas de calcificación. Si las células fantasmas se encuentran en contacto con la pared del tejido conectivo se puede llegar a presentar una reacción a cuerpo extraño debido a su exudación de queratina. También pueden encontrarse numerosas células gigantes multinucleadas.

Ocasionalmente, la dentina displásica puede ser depositada en la pared adyacente al epitelio. Con frecuencia el TOQC suele relacionarse con un odontoma, en el que a menudo se encuentra abundante queratinización y calcificación.⁷

El diagnóstico de quiste odontogénico calcificante, como la del queratoquiste, depende de su histopatología patognomónica.⁷

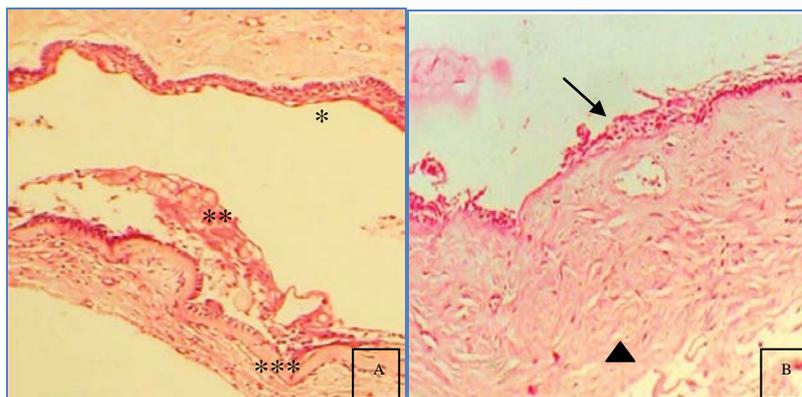


Fig. 1 a) Presencia de revestimiento epitelial (*) presencia de células fantasma (**) y depósito dentinoide (***). b) Microfotografía mostrando epitelio quístico simple (flecha), con cápsula fibrosa (triángulo).¹³

3.4.7 Pronóstico y tratamiento:

La enucleación es el tratamiento adecuado para la mayoría de TOQCs. La recurrencia no se ha reportado para el tipo extraóseo. Algunas recurrencias se han reportado para el tipo intraóseo.⁶ Estas características son compartidas por un gran número de tumores odontogénicos.⁶ Por lo cual se considera que no hay justificación o evidencia suficiente para tratar un TOQC con algo más agresivo que la enucleación.⁷

Reportes de Reyes Velázquez y Reyes Campos, reportan la enucleación como la alternativa quirúrgica de elección, tomando como medida preventiva la remoción de los órganos dentales involucrados.^{14, 15}



3.5 CULTIVO DE TUMORES ODONTOGÉNICOS

Estudios de tumores odontogénicos han proporcionado una mejor comprensión de la biología de la Odontogénesis. Un modelo celular *in vitro* se considera útil para el estudio de los mecanismos detallados de su proliferación y diferenciación. La elucidación de los factores asociados con la inducción de tumores odontogénicos es importante no sólo en el desarrollo del tumor, sino también para la comprensión de los mecanismos asociados con la Odontogénesis normal. Por lo tanto, el establecimiento de una línea celular permanente o estable se considera un paso importante para facilitar los estudios de tumores odontogénicos, así como diferenciación y la regeneración.

En la actualidad, hay tres métodos principales usados para inmortalizar las células y mantener una línea celular estable. Uno de ellos es la transfección de oncogenes, en el que se considera la introducción de oncogenes en el genoma de la célula para superar el mecanismo de regulación del crecimiento celular inicial de la senescencia y prolongar la vida celular. La segunda estrategia es la inmortalización por telomerasa, la introducción de una telomerasa humana subunidad inversa transcriptasa (hTERT) permitiría la retención de la longitud de los telómeros estable y evitar irreversible la detención del crecimiento, lo que resulta en una vida útil extendida. El tercer método es cultivos seriados. Sin embargo, las líneas celulares estables espontáneas son difíciles de obtener, porque los resultados dependen del tipo de célula, e incluso la cepa de animales.⁴

Por lo cual muchos estudios tratan de analizar las características de un órgano o tejido a partir de los cultivos primarios. Un cultivo primario se define como un fragmento de tejido el cual es cultivado con el fin de obtener crecimientos y proliferaciones celulares.

En la actualidad los cultivos de tejidos se pueden agrupar en 3 grupos:¹

A) Cultivo de órganos. El cual implica que la estructura característica del tejido *in vivo* se mantiene al menos en parte, para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena opción para el mantenimiento del tejido de origen; pero por el



contrario no permite su propagación pues el crecimiento de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a empezar en cada nuevo experimento con nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad.

B) Explantes primarios. Son fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante.¹ Se obtiene a partir de un explante de tejido, bien sea permitiendo a las células que migren de él y que se adhieran a un sustrato apropiado, bien sea por medio de disgregación mecánica o enzimática de tejido, con el fin de lograr una suspensión celular capaz de unirse al sustrato y proliferar.¹⁷

C) Cultivos celulares. Supone una disgregación celular y a sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Es el más utilizado porque destaca por la alta propagación de poblaciones uniformes y homogéneas, que posibilitan su caracterización, su cuantificación, su mantenimiento y la repetición de muestras.¹

Este tipo de estrategias han sido empleadas para la obtención de líneas celulares primarias de odontomas y tumores odontogénicos eptelial calcificante, sin embargo, aun no se ha reportado en TOQC.



4. Planteamiento del problema

El TOQC, puede presentarse como un proceso intraóseo o extraóseo. El rango de edad varía desde 5 hasta 92 años, sin predilección de género, representa el 1,6 % de los tumores odontogénicos. Hasta la fecha, la patogénesis de este tipo de tumor es desconocida, su origen es derivado de los restos epiteliales de Serres, lo cual ha sido la mayor información obtenida, sin embargo, el proceso por el cual se desarrolla ha permanecido inconcluso. Existen diversas propuestas para analizar esta carencia. Con relación a lo anterior, Jin-Seon Song y colaboradores en 2009²² reportaron estudios realizados en cultivo primario de odontoma obteniendo datos sobre las características de crecimiento celular; y Hope M. Amm en 2014²³ realizó estudios de inmunocitoquímica, características y análisis en el comportamiento celular de un Tumor Odontogénico Epitelial Calcificante (TOEC). Este tipo de estrategia es prometedora, sin embargo, aún no ha sido empleada para el TOQC. Quizá el emplearla para su estudio permita elucidar incógnitas sobre la conducta clínica de este tumor.



5. Justificación del problema

Como ya se menciona el cultivo primario de tumores odontogénicos, es una alternativa para su estudio. Los beneficios que se pueden obtener de este modelo es poder analizar la conducta celular in vitro, es decir, que se puede observar cuales características y conducta de proliferación, invasión y muerte celular presentan las células que conforman dichos tumores, pueden ser empleadas para comprender lo que ocurre en la clínica. Como se sabe el TOQC tiene un comportamiento asintomático, lento, e invasivo de crecimiento o proliferación.

Sería importante el poder analizar si esta conducta es preservada in vitro, lo cual podría ayudar en la comprensión de su patogénesis.



6. Hipótesis

H1. Se obtendrá de células de cultivo primario derivadas de una muestra de TOQC.



7. Objetivos

Objetivo general

Obtener células estables derivadas del cultivo primario de una muestra de TOQC.

Específicos

- Determinar las tasas de proliferación de las células primarias del TOQC
- Analizar la expresión inmunocitoquímica de antígenos determinantes del linaje celular.

8. Variables

Dependientes:

- Tiempo de cultivo
- Densidad celular de cultivo

Independientes

- Inmunofenotipo
- Proliferación celular



Descripción de variables

Nombre de variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operativa
Tiempo de cultivo	Cuantitativa	Periodo de tiempo en el cual, las células fueron sometidas a condiciones y concentraciones de cultivo apropiados.	Se establecieron cortes de 0, 24, 48 y 72 como parámetros de referencia para establecer la medición.
Densidad celular de cultivo	Cualitativa	Concentración específica celular por área.	A través de conteo celular por hemocitómetro, se definió la cantidad de células presentes por unidad de volumen.
Proliferación celular	Cuantitativa	Aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular. ¹⁸	A través del ensayo MTT, que se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa que determina la funcionalidad mitocondrial y proliferación celular, ya que la relación de la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, medido a través de absorbancia. ¹⁹
Inmunofenotipo	Cualitativa	Es la caracterización de las células según los marcadores inmunológicamente activos presentes.	A través de la técnica de Inmunocitoquímica se identificara la presencia de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular. Se realizará la medición de la intensidad de reacción a través de software ImageJ. ¹⁹



9. Recursos

• 9.1 Humanos

- Tesista
- Asesor de cultivo celular, ensayo de proliferación e inmunocitoquímica

• 9.2 Infraestructura

- Laboratorio de Patología Bucal, Clínica y Experimental. Área de Cultivo celular.

• 9.3 Económico

- Este proyecto fue financiado por el UNAM, D GAPA, PAPIIT IN223414.



10. MATERIALES Y MÉTODOS

Equipo y Materiales

- Agitador Orbital (Sea star Modelo: Sea star)
- Auto Clave (All American, Modelo 25x, EU)
- Baño María (Thermo scientific Modelo 2242 EU)
- Báscula (Ea Adam Modelo: 17250 E.U)
- Campana de flujo laminar (Baker, Edge Gard, Maine, EU)
- Centrífuga Universal (Sorvall, Modelo: 750044, CHINA)
- Equipo de filtración al vacío (Corning 500ML BottleTopFilter 78045, EU)
- Filtro (Corning Incorporate, 25 mm Syring Filter 431222 Alemania)
- Hematocitómetro (Sigma – Aldrich, Bright-Line E.U)
- Incubadora (Queue, Stabil Therm Modelo: QWJ300TABB, E,U)
- Lector de Placas (Chro-Mate Awareness Technology INC Modelo: 4300 E.U)
- Microscopio invertido (ZEIZZ Modelo: 37881, E.U)
- Refrigerador (Cool lab Modelo 3767 Hertz E.U)
- Ultra Congelador (REVCO Modelo: ULT1386-7-A E.U.)
- Cajas Petri 100mm²
- Kit Quirúrgico
- Pipetas 10 ml, 5 ml, 1ml (Exacta Cruz TM Technology, INC.CHINA)
- Pipetas 1 µl,- 10µl, 10µl -100µl, 100 µl- 1000µl (Exacta Cruz TM Technology, INC.CHINA)
- Placas de cultivo celular (25 cm² Corning incorporate, E.U)
- Puntas para pipeta de 10µl-100µl, 100µl- 1000µl (Bio Centrix, E.U)
- Tubos 15 ml (Ultra Cruz, Santa Cruz Technology, México)
- Tubos 50 ml (Ultra Cruz, Santa Cruz Technology, México)
- Tubos de criopreservación
- Tubos Ependorf
- Probetas graduadas
- Vasos de precipitado



- Agua Desionizada
- Albúmina al 20%
- Alcohol al 70%
- Azul De Tripán
- Anticuerpo Primario Actin (C-2 Santa Cruz Biotechnology SC- 8432)
- Anticuerpo P rimario B asic C ytokeratin (AE1/AE3 Santa C ruz Biotechnology SC 57004,)
- Anticuerpo Primario Vimentin (RV 202 Santa Cruz Biotechnology , SC 32322)
- Anticuerpo Secundario ABC Staining Sistem SC 2017.)
- Criopreservador Ultra Cruz Cell (Santa Cruz Biotechnology, 50 m l s c- 255729)
- Dimetil Sulfoxido (AMRESCO)
- Hipoclorito al 10%
- Medio de c ultivo D MEM w ith 4. 5g/L G lucose y L -Glutamine, w ithout Sodium Pyruvate (sc – 224478 Santa Cruz Biotechnology)
- MOUSE / RABBIT INMUNODETECTOR HRP/ DAB REF BSB 0003 (BIO SB.E,U)
- MTT (Vibrant MTT Molecular Porbes, Invitrogen, EU)
- peróxido al 3%
- Suero Fetal bov ino 500 ml GIBCO, Certificado libre de m icoplasma, bacteriófago, endotoxina y virus. (Gibco by l ife t echnologies LOT:1606662 E,U)
- Solución de PBS / EDTA 0.004 %
- Solución de PBS 1X, 10X
- Tripsina 0.25%–EDTA 1X (gibco by life technologies LOT: 1391607 E,U)
- Tritón al 20%



Métodos

10.1 Obtención del espécimen y cultivo primario

Se tomó una muestra de tejido de paciente de 16 años de edad, sexo masculino con una lesión localizada en el ángulo, cuerpo y rama mandibular, radiográficamente presentaba lesión radiolúcida mal delimitada, que involucraba el desplazamiento del O.D 38 y reabsorción radicular del O.D 37.

Se realizó la resección quirúrgica, obteniendo dos fragmentos uno para su análisis histopatológico, el cual fue fijado en formol al 10%, procesado convencionalmente para su inclusión en parafina, realizando cortes de 4 μ m, tinción en H&E y análisis histopatológico.

El otro fragmento fue empleado para su cultivo primario. Este último fragmento presentó una dimensión de 10x 10x5 mm aproximadamente. Posterior a su obtención quirúrgica, el fragmento fue lavado en solución salina fisiológica 0.9% NaCl, para la eliminación de sangre. Seguido de este paso, la muestra fue inmersa en D MEM S FB 10% antibiótico/antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 μ g/mL y anfotericina B 0.25 μ g/mL). Posteriormente, este fragmento fue lavado con PBS-antibiótico/antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 μ g/mL y anfotericina B 0.25 μ g/mL). El espécimen fue diseccionado a fragmentos pequeños de 1x1 mm aproximadamente. Posteriormente los fragmentos fueron colocados en un tubo estéril para centrifuga de 15 ml, adicionando 3 ml de DMEM/Colagenasa IV al 0.25%, colocado a 37 °C durante 60 minutos aproximadamente, realizando agitación mecánica por inversión del tubo cada 15 minutos. Seguido de esto fue adicionado 9 ml de D MEM S FB 10% antibiótico/antimicótico para centrifugar a 1800 rpm por 3 minutos. El botón o pellet fue resuspendido en 3 ml de S FB 10% antibiótico/antimicótico para posteriormente ser colocado en una caja de cultivo de 25cm² a 37°C con 5% CO₂.

Se conservó la caja incubación durante 7 días, retirando los fragmentos de tejido y realizando el cambio de medio de cultivo fresco. Una vez obtenida la confluencia del 80%, se realizó el subcultivo. Se retiró el medio de cultivo presente para realizar el lavado con PBS/EDTA 0.04% a 37°C, se incubó con



tripsina 0.25% durante 10 minutos, se colocó DMEM SF B 1 0% antibiótico/antimicótico, se recuperó el contenido, para centrifugar a 1800 rpm/3 minutos, el botón celular fue subdivido en tres cajas. Las poblaciones celulares analizadas para los ensayos subsecuentes fueron las pertenecientes del tercer al décimo pase o subcultivo.

10.2 Determinación del crecimiento celular

Para determinar la proliferación celular se utilizó el ensayo de MTT (metiltiazoltetrazolio). Las células empleadas para este ensayo fueron células del TOQC y de cultivos de células de ligamento periodontal como muestra control (Proporcionadas por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez).

Las cajas de cultivo fueron tripsinizadas como ya fue mencionado, para el proceso de subcultivo, llevando la solución a 1ml. Se realizó cuantificación de proporción de células presentes a través de hemacitómetro (Cámara de Neubauer). Se tomaron 10µl del concentrado celular y añadió 90 µl de Azul tripano. Se realizó el conteo de cuatro cuadrantes de la cámara, ajustando la proporción celular a un mililitro.

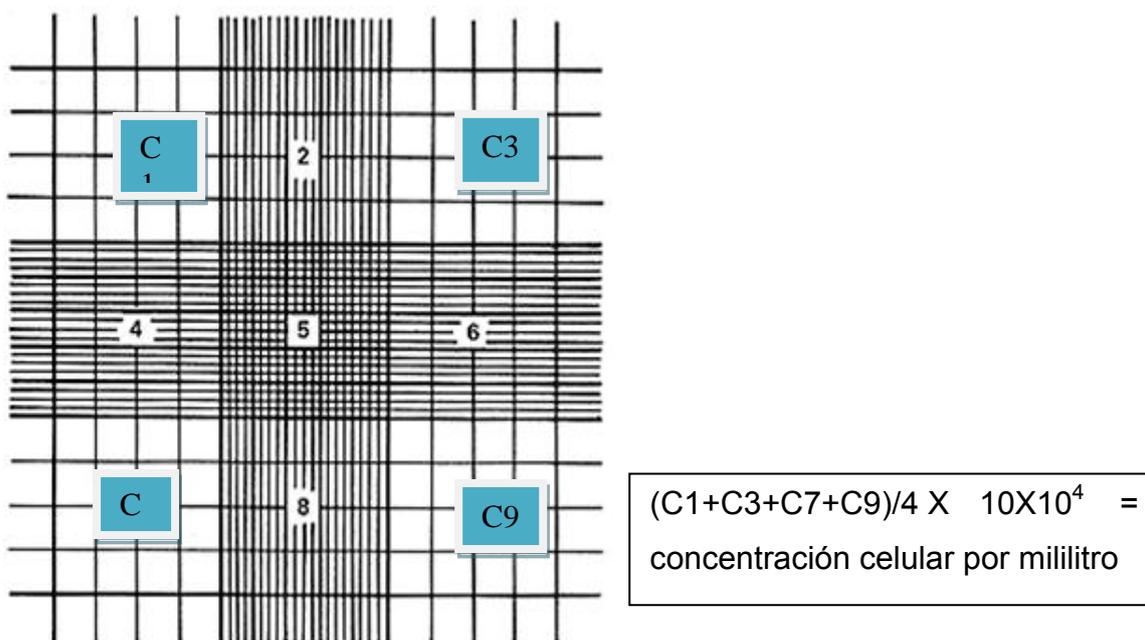


Fig. 2 Campos en hemacitómetro

Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos a una concentración de 10,000 células. Los tiempos de cultivo y medición únicos fueron a las 0, 24, 48 y 72 horas. Se utilizó el ensayo Vibrant MTT (Molecular Porbes, Invitrogen, EU) siguiendo las instrucciones del fabricante adicionando el reactivo a cada tiempo de medición. Brevemente, se adiciono 10 µl de la solución MTT, se incubo a 37°C por 4 horas, la reacción fue detenida adicionando 50µl de DMSO,



incubando nuevamente por 10 minutos. La lectura de absorbancia fue realizada a un a longitud de 545 n m e n el l ector de placas (Chro M ate A wareness Technology Inc E.U).



10.3 Inmunocitoquímica

Para el estudio de Inmunocitoquímica se colocaron concentraciones celulares de 10 000 células por pozo, en cajas de 96 pozos, dejando 24 horas en incubación. Se retiró medio de cada pozo, y se lavó con PBS 1X, posteriormente se colocaron 100 ml de formaldehído a cada pozo, realizándose 3 lavados de 3 minutos cada uno de PBS 1X en seguida se retiró el PBS y se colocó 100 ml de peróxido durante 30 minutos

Posteriormente se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno y se colocaron 100 ml de albúmina durante 5 minutos, se retiró la albúmina y se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno y se colocaron 100 ml de tritón durante 5 minutos.

Se realizaron lavados de cada pozo y se colocaron anticuerpos primarios de Actina, Citoqueratina y Vimentina y se dejaron en refrigeración durante toda la noche a 4 °C.

Después de la incubación se retiraron los anticuerpos primarios, realizando tres lavados de tres minutos cada uno, y se agregó anticuerpo secundario (Biolink) a cada pozo y se incubó durante 20 minutos, se retiró anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 3 minutos cada uno.

Posteriormente se agregó HRP 100 ml a cada pozo y se incubó durante 20 minutos y se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se colocó Buffer Diaminobencidina (DAB) durante dos minutos y se colocaron 100ml de Hematoxilina durante 1 minuto y realizando 4 lavados de PBS 1X.

Finalmente se observaron las tinciones en el microscopio invertido y se tomaron fotos de cada pozo de 10x y 20x, las cuales se llevaron a cabo con cámara Axiocam GmbH 105 color, y el programa ZEN 2012 Microscopy (Zeiss Germany)

Las fotografías obtenidas del estudio de inmunohistoquímica en anticuerpos de Vimentina, Actina y Citoqueratina en aumento de 10x en formato PGJ, fueron analizadas, basándose en la intensidad de tinción por el software ImageJ (NIH, Bethesda MD, EE.UU.)



10.4 Análisis estadístico

La intensidad se determinó a partir de un total de 100 puntos marcados en cada fotografía.¹⁹ De los datos de inmunoexpresión capturados se realizó un análisis descriptivo de las variables a través de medidas de tendencia central (promedio) y dispersión (desviación estándar), utilizando el programa de Excel.

11. Consideraciones Éticas

La participación del paciente en el trabajo fue voluntaria, bajo conocimiento del procedimiento quirúrgico firmando un consentimiento informado (Anexo 1) para la obtención de biopsias óseas y de partes blandas. Los resultados de este trabajo serán utilizados de manera global únicamente con finalidad estadística, manteniendo estándares de confidencialidad. Basado en Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Titulo II, Capítulo I, Artículo 17-1). La toma de biopsia y el desarrollo de los experimentos sobre la muestra de tejido no representó ningún riesgo para los participantes.

12.RESULTADOS

1) ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Paciente de 16 años de edad de sexo masculino presentó lesión localizada en el ángulo, cuerpo y rama mandibular izquierda, radiográficamente se observó lesión radiolúcida mal delimitada, que involucraba dientes inferiores izquierdos con desplazamiento del tercer molar y reabsorción de la raíz del órgano dentario

37

(fig.4).



Fig. 4 Radiografía panorámica, se observa lesión radiolúcida de rama a cuerpo izquierdo, con desplazamiento de tercer molar.

Descripción macroscópica

A: Se recibió un espécimen multifragmentado de tejido duro y blando, de forma irregular, superficie lisa, color amarillo, con áreas parduzcas, que se incluyó en cápsulas para descalcificar.

B: Se recibió un espécimen de tejido blando y duro que midió 7.5 x 6.5 x 1.9 cm. El tejido duro fue correspondiente a cortical mandibular, forma irregular, superficie lisa, color grisáceo, firme, resiliente, se tomaron piezas representativas para descalcificar en cápsulas.

El tejido blando fue conformado por una parente cápsula, tejido de consistencia firme, superficie irregular, color amarillo y áreas color gris, presentó cara interna lisa con proyecciones papilares de color amarillo con



áreas parduzcas, se tomaron muestras representativas para descalcificar en cápsulas.

Descripción microscópica

Se realizaron 2 estudios histopatológicos, dentro de los cuales se observaron fragmentos de epitelio odontogénico, recubriendo la cavidad quística con capas celulares, cuboidales bajas de aspecto basal y queratinizaciones individuales, intraepiteliales, sobre un estroma de tejido conjuntivo denso y laxo bien vascularizado que presenta infiltrado inflamatorio mixto de predominio linfoplasmocitario, así como áreas de hemorragia reciente.

En el segundo estudio se observó:

- A) Tejido óseo vital en un estroma de tejido fibroso laxo de aspecto mixoide.
- B) Lesión compuesta por tejido conjuntivo fibroso laxo bien alinizado, abundantes fibroblastos de aspecto fusiforme, cubierto parcialmente por epitelio escamoso estratificado con áreas paraqueratinizadas de aspecto quístico con presencia de células semejantes a células fantasma.

El tejido conjuntivo de algunas áreas se dispone en haces, dentro del estroma se observan islas de epitelio odontogénico, células de aspecto columnar con polarización inversa, con degeneración del centro semejando retículo estrellado, dando apariencia ameloblastomatosa.

La lesión fue diagnosticada como un Tumor Odontogénico Quístico Calcificante (Fig. 5).

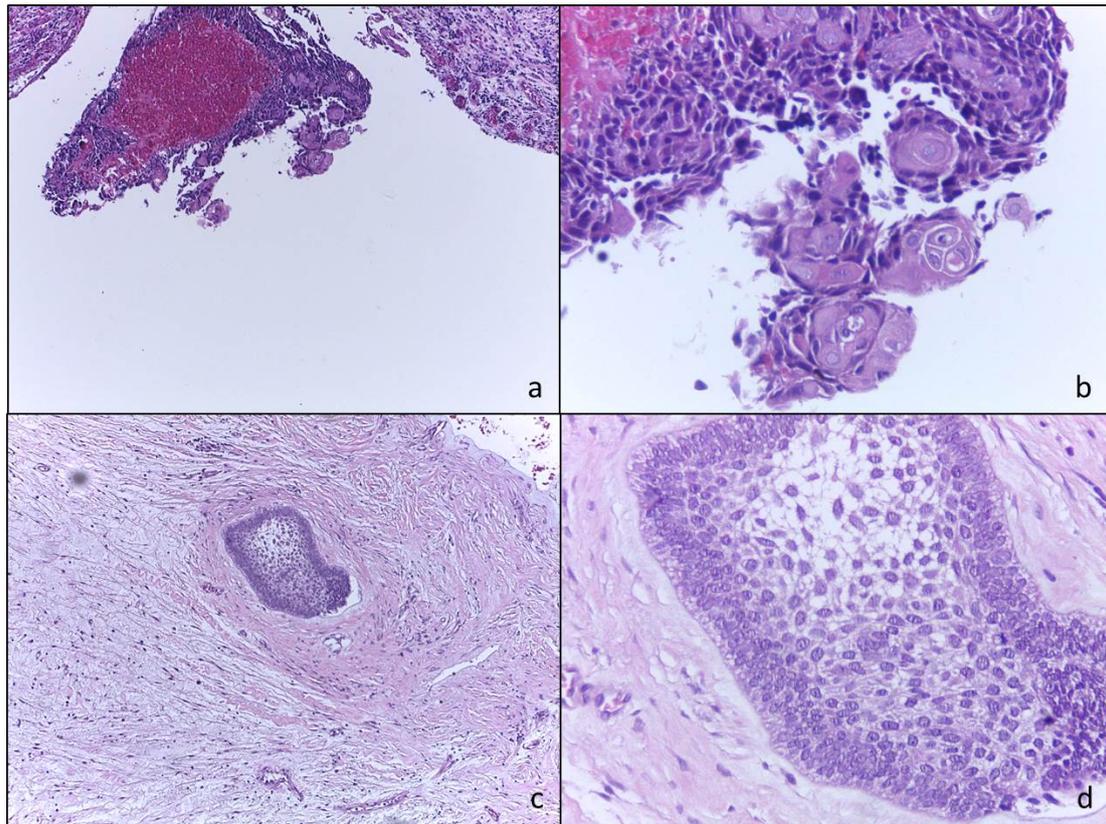


Fig. 5 a) Presencia de epitelio quístico, b) Epitelio quístico con presencia de células fantasma, c) Epitelio de alta proliferación ameloblastosa localizada en capsula fibrosa, d) Mayor aumento del epitelio tipo ameloblastomatoso, presencia de células con apariencia de retículo estrellado. Inciso a) y c) 100X; b) y d) 400x. Tinción con H&E.

2) ESTABLECIMIENTO DE POBLACIÓN CELULAR.

El cultivo primario se inició en la última semana del mes de junio del año 2014, en la figura 6a se observa la disección del tejido en la campana de flujo laminar, en la figura 6b se observan fragmentos de tejido en suspensión sin adhesión celular a la caja de cultivo.

Después de una semana se realizó el segundo pase, en el cual se observaron crecimiento y adhesión celular rodeando los fragmentos de tejido. (Fig. 6c)

Aproximadamente el 1 de agosto de dicho año (4 semanas después) se realizó el tercer pase celular, observándose un mayor aumento en la adhesión y crecimiento celular. (Fig. 6d)

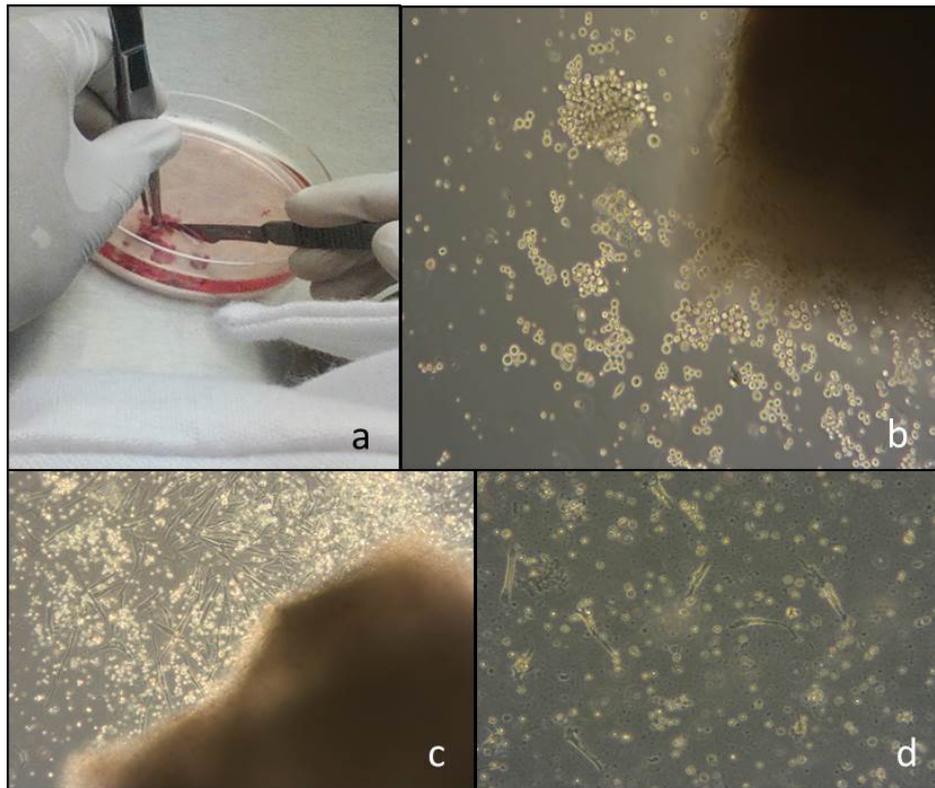


Fig. 6 Establecimiento de población celular de TOQC. a) Disección y fragmentación de muestra, b) cultivo de explante, c) Adhesión de células primarias y d) cultivo primario sin presencia de fragmentos de tejido con presencia de células adheridas y en suspensión.

3) ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON MTT

La proliferación de las células derivadas del TOQC dentro de las primeras 24 horas fue decreciente, en contraposición con el grupo control, el cual tuvo un comportamiento ascendente.

Después de 48 horas siguió el descenso de absorbancia celular en el TOQC, mientras que en el grupo control, se observó un ascenso significativo en la absorbancia celular.

Al cabo de 72 horas el TOQC fue aumentando su absorbancia. Dichas concentraciones se observan en la gráfica y tabla correspondiente (Fig. 7).

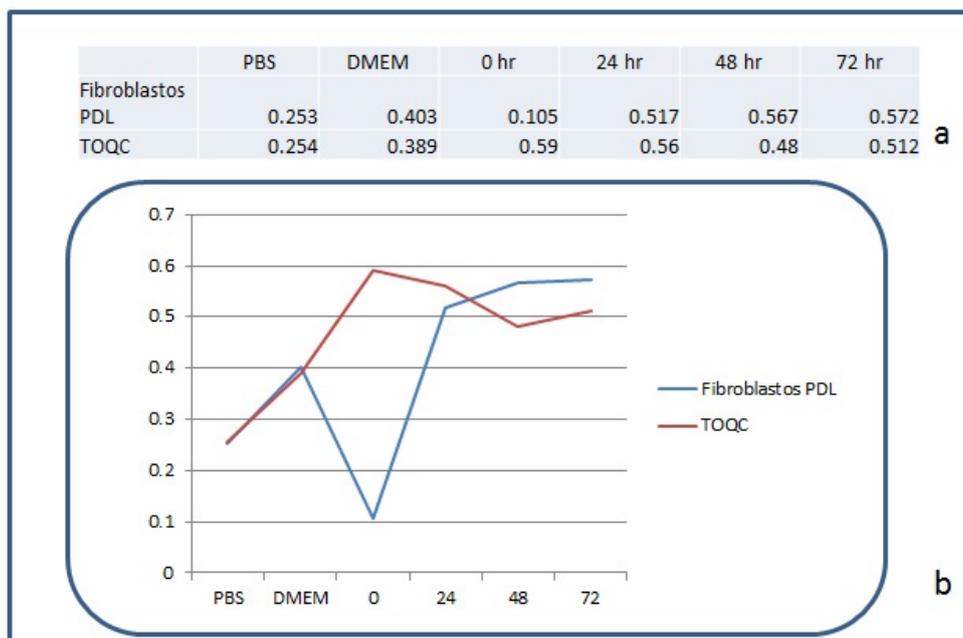


Fig. 7 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON MTT. a) Tabla comparativa de grupo control y grupo experimental, b) Gráfica comparativa de grupo control y grupo experimental.

4) INMUNOCITOQUIMICA

La inmunexpresión de actina para fibroblastos PDL fue 109.68 (± 29.11) UO, y en células de TOQC fue de 113.91 (± 38.95) UO. La inmunexpresión de Citoqueratina en fibroblastos dio como resultado una media de 140.99 (± 23.71) UO, la cual se observan en la figura 8 a, comparativamente se observó expresión del TOQC, con una media de 173.58 (± 29) UO, expresada en la figura 8 B. La inmunexpresión de vimentina en fibroblastos PDL indicó una media de 144.34 (± 15.95) UO, mientras que para TOQC fue de 167.41 (± 38.39) UO (Tabla 2, Fig. 8).

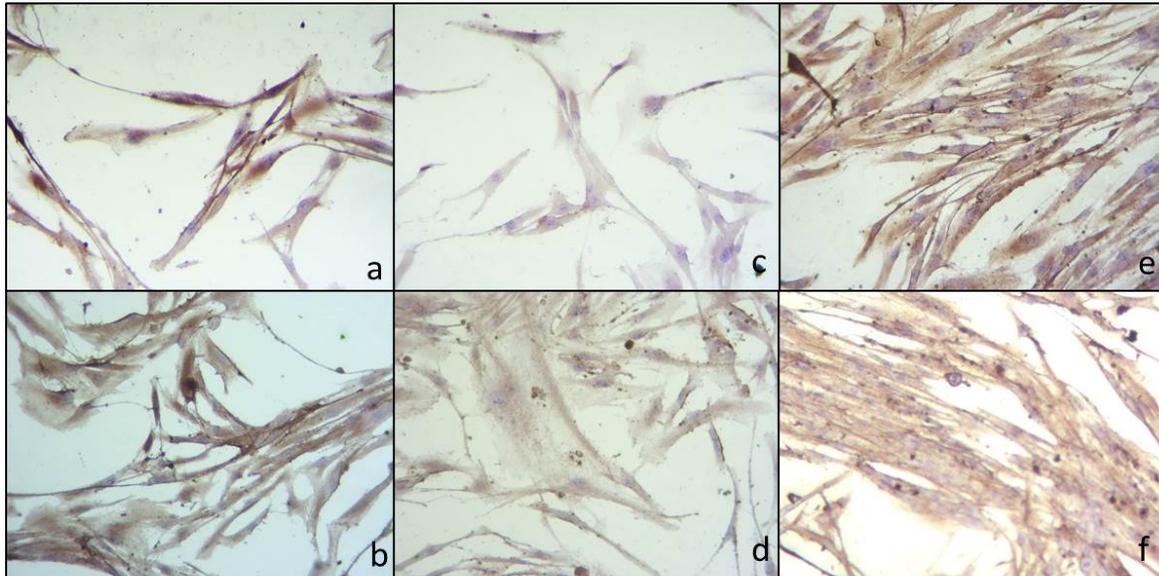


Fig. 8 Análisis inmunocitoquímico a) y b) inmunoexpresión de actina en fibroblastos PDL y TOQC, c) y d) inmunoexpresión de Citoqueratina en fibroblastos PDL y TOQC y e) y f) inmunoexpresión de vimentina en fibroblastos PDL y TOQC. Microfotografías a 100x.

Tabla 2. Comparativo de niveles de inmunoexpresión de grupo control (Fibroblastos PDL) y grupo experimental (TOQC).

Célula	Actina		Citoqueratina		Vimentina	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
LPD	109.68	29.11	140.99	23.71	134.44	15.95
TOQC	129.24	35.54	153.36	31.74	157.26	35.05

*Medición a través del software ImageJ, expresado en unidades ópticas (UO)



13. DISCUSIÓN

El TOQC se caracterizó histológicamente por presentar tejido óseo vital en un estroma de tejido fibroso laxo de aspecto mixoide, tejido hialinizado y áreas paraqueratinizadas de aspecto quístico con presencia de células semejantes a células fantasma. Asimismo se observó presencia de epitelio similar a un ameloblastoma, dichas las características anteriores concuerda con un artículo publicado por Ledesma y colaboradores (2007) quienes señalan que existen cuatro clasificaciones para el TOQC, una de las cuales presenta una cavidad quística con presencia de células fantasma y epitelio semejante al de un ameloblastoma²⁰. Lo que concuerda con el resultado histopatológico del diagnóstico de TOQC.

En este estudio se logró establecer una población primaria estable de TOQC. La técnica de explante primario, es un método desarrollado por Harrison en 1907, Carrel 1912, entre otros autores para la iniciación de cultivos primarios¹. En este estudio, se estableció una población primaria de TOQC lo cual ayudara a explorar sus características básicas, tales como proliferación, supervivencia, entre otras.

Al analizar los resultados de curvas de proliferación observamos que los fibroblastos de ligamento periodontal, presentaron una mayor proliferación comparado a las células primarias del TOQC. Esta conducta puede ser derivada de una mayor adaptación al cultivo celular, lo cual se observó al presentar un aumento exponencial de las células de ligamento desde las 24 horas, estabilizando su crecimiento a las 48 hrs, comparado con el TOQC que presentó un descenso de su actividad celular, restaurándola hasta las 72 horas. En un estudio similar, Hope M Amm y colaboradores²³ analizaron el Tumor Odontogénico Epitelial Calcificante (TOEC), observando que la tasa de crecimiento celular se estableció a los siete días, el cual nos da referencias similares al cultivo primario del TOQC, es decir, nuestros datos sugieren que el nivel de crecimiento celular se estabiliza en periodos más largos de tiempo. El análisis de Inmunocitoquímica reportó niveles de expresión para actina muy similares tanto para fibroblastos de ligamento periodontal como para las células primarias de TOQC. Como se sabe, la Actina es una proteína constitutiva del



citoesqueleto, su expresión es básica para la morfología celular. Los niveles similares nos sugieren que existieron condiciones de cultivo homogéneas para ambas líneas celulares, que no afectan la viabilidad o inducen una conducta aberrante o diferente. Por otro lado, la expresión de Citoqueratina AE1/AE3 mostró ser levemente mayor en células de TOQC, sugiriendo presencia de un linaje epitelial, esto puede ser válido a nivel de explante y cultivo primario, ya que nos habla de una población heterogénea a esta etapa del cultivo primario. El artículo reportado por Hope M. Amm²³ nos señala que la inmunopresión de dos tipos de Citoqueratinas fueron ampliamente (CK 14 y CK17) expresados en el TOEC, ya que estas forman parte de células epiteliales, demostrando que es un componente básico de tumores epiteliales tales como el TOQC y otros tumores odontogénicos. El estudio de otros autores como Rodríguez Fregani y colaboradores,²² mencionan que la inmunopresión de citoqueratinas de alto y bajo peso molecular en cortes histológicos observaron inmunopresión en el epitelio de revestimiento de los tumores odontogénicos y su débil positividad o negatividad en células fantasma, sugieren que el TOQC es una aberración del desarrollo dental normal. Para poder clarificar si las células aisladas en este estudio pertenecen a células epiteliales o bien a células fantasmas, se requiere análisis más profundos, quizá hasta análisis genéticos.

La vimentina es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, brinda soporte a organelos, y es usada como marcador en ciertos tumores. La expresión de vimentina en células de TOQC fue levemente mayor que en los fibroblastos de ligamento periodontal, sin embargo, no podemos considerarla como concluyente hasta analizar cuál es el papel de este marcador en la conducta celular, o si solo es una proteína constituyente del citoesqueleto. No obstante, su presencia nos confirma que las células cultivadas aún conservan características propias del tumor, y a que la alta inmunopresión de las citoqueratinas y vimentina, es localizada con mayor frecuencia en células que forman parte del epitelio de revestimiento en cavidades quísticas, así como en algunos casos en células fantasmas.²⁴



14. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que es posible la generación de líneas celulares primarias es tables derivadas de tumores odontogénicos como el TOQC. El análisis de proliferación sugiere que este tipo celular presenta periodos de tiempo más prolongados para su adaptación, lo cual es compatible con sus características clínicas así como con otros tipos de tumores odontogénicos. Se comprueba que las células presenta un linaje epitelial al observar la inmunexpresión de citoqueratinas AE1/AE3, conservando características de normalidad a conservar la expresión de otros marcadores como la actina y vimentina, esta última expresada de forma importante en los epitelios tumorales.

El establecimiento de una población primaria en el Tumor Odontogénico Calcificante sería útil para comprender el perfil, comportamiento celular y características fenotípicas, los cuales son fundamentales para el desarrollo en nuevas terapias.



15. ANEXOS

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA BIOPSIA ÓSEA O DE PARTES BLANDAS

Usted tiene derecho a conocer el procedimiento al que va a ser sometido y las complicaciones más frecuentes que ocurren. Este documento intenta explicarle todas estas cuestiones; léalo atentamente y consulte con su médico todas las dudas que se le planteen. Le recordamos que, por imperativo legal, tendrá que firmar, usted o su representante legal, familiar o persona vinculada de hecho, el Consentimiento Informado para que podamos realizarle dicho procedimiento/tratamiento.

PACIENTE

Yo, años de edad, Historia Clínica n.º con domicilio en

REPRESENTANTE LEGAL, FAMILIAR O PERSONA VINCULADA DE HECHO

Yo, de años de edad, con domicilio en en calidad de del paciente. (Representante legal, familiar o persona vinculada)

DECLARO

Que el Dr./la Dra. me ha explicado que es conveniente proceder, en mi situación, a realizar el procedimiento/tratamiento quirúrgico de biopsia ósea o de partes blandas y he leído esta información que me ha entregado.

PREOPERATORIO

1. Antes de la cirugía será necesario realizarle algunas pruebas diagnósticas, como analítica, radiografías o electrocardiograma. También le indicaremos desde qué hora debe permanecer en ayunas.
2. El propósito principal de la intervención consiste en el estudio anatomopatológico, inmunohistoquímico, bacteriológico y/o citogenético de la lesión.
3. La intervención puede precisar de anestesia
4. La intervención consiste en la obtención de una muestra, parcial o global, de la lesión, bien mediante punción, o practicando una incisión.



16. REFERENCIAS

- 1) Documentos de aplicación Cultivos Celulares [base de datos en línea]. España: Cultek 2007 [Fecha de acceso 15 octubre 2013] URL disponible en: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf
- 2) Guillarte C, Perrone M. Bacterias Periodonto patógenas: Bacilos Anaerobios gran negativos como agentes Etiológicos de la Enfermedad Periodontal. Acta odontológica venezolana. 2005; 43: 198-204.
- 3) Sakano M, Otsu K, Fujiwara N, Fukumoto S, Yamada A, Harada H. Cell dynamics in cervical Loop epithelium during transition from crown to root: implications for Hertwig's epithelial root sheath formation. J Periodontal Res. 2013;48(2):262-7
- 4) Hatano H, Shimasue H, Higashikawa K, Kamata N. Establishment of mesenchymal cell line derived from human developing odontoma, Oral Diseases. 2012;18(8), 756–762.
- 5) Delgado WA, Dulanto MA, Calderón V. TUMOR ODONTOGÉNICO HÍBRIDO: tumor odontogénico quístico calcificante con odontoma complejo y focos de Ameloblastoma, Revista Estomatológica Herediana. 2006; 16(2):120-125.
- 6) Eveson J.W, Reichart P., Sidransky D. Chapter 6. Odontogenic Tumors, Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours, World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press, France. 2003. pag 283-313.
- 7) Marx R.E., Oral and Maxillofacial Pathology, 1st edition 2003, MIAMI. Pag 582-607.



- 8) Chindasombatjaroen J, Poomsawat S, Kakimoto N, Shimamoto H. Calcifying cystic odontogenic tumor and adenomatoid odontogenic tumor. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2012;114(6): 796-803.
- 9) Tecnología Médica [base de datos en línea]. Chile: Mención Morfofisiopatología y citodiagnóstico 2012 [Fecha de acceso 15 octubre 2013] URL disponible en http://morfocitologia.blogspot.mx/2009/05/definicion-inmunoquimica-histopat_16.html
- 10) Gaitan LA, Quezada D, Tenorio F, Leyva ER. Reclassification of odontogenic keratocyst as tumor. Impact on the odontogenic tumors prevalence. *Oral Diseases*. 2010; (16) 185–187.
- 11) Cawson RA, Odell EW. *Oral Pathology*. Churchill Livingstone, United States of America. 1993. pag39.
- 12) Utumi E, Pedron I, Silva LN, Machado G, Rocha A. Different manifestations of calcifying cystic odontogenic tumor. *Einstein Sao Paulo*. 2012;10(3):366-70.
- 13) Sonawane K, Singaraju M, Gupta I, Singaraju S. Histopathologic Diversity of Gorlin's Cyst: A Study of Four Cases and Review of literature. *The Journal of contemporary Dental practice*. 2011;12(5):392-7.
- 14) Reyes JA, Liceaga CJ. Tumor odontogénico quístico calcificante (Quiste odontogénico calcificante). Reporte clínico patológico de dos casos, *Revista odontológica Mexicana*. 2009; 13, (2):109-11.
- 15) Reyes JO, Moran AJ. Tumor odontogénico quístico calcificante, Reporte de un caso. *Med Oral*. 2008;10 (3) pag 72-75.
- 16) Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Wiley-Blackwell, UK, 6th Edition, 2010 ,pag 149-194.



17) Instituto Nacional del cáncer [base de datos en línea]. E E.UU: Institutos Nacionales de la Salud, 2007 [Fecha de acceso 15 octubre 2013] URL disponible en: <http://www.cancer.gov/diccionario?cdrid=46479>

18) Biofísica [base de datos en línea]. E E.UU: 2009 Comunidades de divulgación científica técnica 2008 [Fecha de acceso 15 octubre 2013] URL disponible en: <http://www.elergonomista.com/biologia/11se02.htm>

19) Pardo CC. Pruebas de Tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba del MTT. Bogotá, Colombia. 2006. (3) 37-9

20) Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF. "Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer" . PLOS ONE Sao Paulo, Brazil. 2014; 9(1).

21) Song JS, Stefanik D, Poprawa MD, Alawi F, Akintoye SO. Differentiation and Regenerative Capacities of Human Odontoma-Derived Mesenchymal Cells, Differentiation, University of Pennsylvania, Philadelphia. 2009; 77(1): 29–37.

22) Ledesma C, Gorlin RJ, Shear M, Torius FP, Mosqueda A, Altini M, Unni K, Almeida OP. International collaborative study on ghost cell odontogenic tumours: calcifying cystic odontogenic tumour, dentinogenic ghost cell tumour and ghost cell odontogenic carcinoma. J Oral Pathol Med. 2008;37: 302–308.

23) Amm HM, Rollins DL, Ren C, Dong J, Villiers P, Rivera H, MacDougall M. Establishment and characterization of a primary calcifying epithelial odontogenic tumor cell population, J Oral Pathol Med. 2014; 43(3): 183–190.

24) Fregnani ER, Pires FR, Quezada RD, Shih M, Vargas PA, Almeida OP. Calcifying odontogenic cyst: clinicopathological features and immunohistochemical profile of 10 cases, Journal of Oral Pathology and Medicine. 2003; 32(3):163-70.