



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**INMUNOEXPRESIÓN DE SOX2, OCT4A, β -CATENINA Y AMELOGENINA EN
AMELOBLASTOMAS Y CARCINOMAS AMELOBLÁSTICOS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

C.D. Esp. ROBERTO ONNER CRUZ TAPIA

TUTORES:

DR. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

**Coordinador del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial
División de Estudios de Posgrado e Investigación, F.O. UNAM**

DR. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

**Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial
División de Estudios de Posgrado e Investigación, F.O. UNAM**



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.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	4
5. MARCO TEÓRICO	7
5.1. Neoplasias odontogénicas	8
5.2. Histogénesis de las neoplasias odontogénicas	10
5.3. Clasificación de tumores odontogénicos	11
5.4. Ameloblastomas	12
5.4.1. Ameloblastoma convencional	13
5.4.2. Ameloblastoma tipo folicular acantomatoso	14
5.4.3. Ameloblastoma tipo folicular de células granulares	14
5.4.4. Ameloblastoma tipo folicular de células basales	14
5.4.5. Ameloblastoma tipo folicular desmoplásico	15
5.4.6. Ameloblastoma uniuquístico	16
5.4.7. Ameloblastoma extraóseo o periférico	17
5.4.8. Ameloblastoma metastatizante	18
5.4.9. Ameloblastoma atípico	19
5.5. Carcinoma ameloblástico	20
5.6. Amelogenina	22
5.7. Sox2	23
5.8. Oct4	24
5.9. β -catenina	25
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
7. JUSTIFICACIÓN	26
8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
9. HIPÓTESIS	26
10. OBJETIVO GENERAL	27
10.1. Objetivos específicos	27

11. DISEÑO DEL ESTUDIO	27
11.1. Tipo de estudio	27
11.2. Universo del estudio	27
11.3. Tamaño de la muestra	28
11.4. Criterios de inclusión	28
11.5. Criterios de exclusión	28
11.6. Criterios de eliminación	28
12. VARIABLES DE ESTUDIO	29
13. MATERIALES Y MÉTODOS	30
13.1. Análisis de las muestras en histoquímica	30
13.2. Técnica de inmunohistoquímica	30
13.3. Análisis de la inmunoexpresión	32
13.4. Plan de análisis	32
13.5. Aspecto éticos	32
14. RESULTADOS	33
14.1. Estadísticos descriptivos	33
14.2. Hallazgos histológicos de la muestra	35
14.3. Hallazgos en la prueba de inmunohistoquímica	38
14.4. Localización de la expresión inmunohistoquímica en los ameloblastomas	40
14.5. Localización de la expresión inmunohistoquímica en los carcinomas ameloblásticos	41
14.6. Evaluación de la intensidad y proporción de la expresión	43
15. DISCUSIÓN	46
16. CONCLUSIÓN	49
17. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
18. ANEXOS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ameloblastoma infiltrante

Figura 2. Odontoma en desarrollo

Figura 3. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud 2017

Figura 4. Ameloblastoma folicular

Figura 5. Ameloblastoma plexiforme

Figura 6. Ameloblastoma folicular acantomatoso

Figura 7. Ameloblastoma folicular células granulares

Figura 8. Ameloblastoma folicular desmoplásico

Figura 9. Tipos de proliferación en ameloblastoma uniuquístico

Figura 10. Ameloblastoma folicular pseudoglandular

Figura 11. Clasificación histológica de los carcinomas ameloblásticos

Figura 12. Carcinoma ameloblástico

Figura 13. Carcinoma ameloblástico con células claras

Figura 14. Esquema gen de amelogenina

Figura 15. Vías de transducción de señales implicadas con Sox2

Figura 16. Esquema de mórula y blastocisto

Figura 17. Hallazgos histológicos de la muestra

Figura 18. Ameloblastoma recurrente

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de tumores odontogénicos OMS 2017

Tabla 1. Variables del estudio

Tabla 1. Anticuerpos, dilución y controles

Tabla 1. Comparación del patrón de expresión

Tabla 1. Localización e intensidad de Amelogenina en Ameloblastomas

Tabla 1. Localización e intensidad de β -catenina en Ameloblastomas

Tabla 1. Localización e intensidad de Sox2 en Ameloblastomas

Tabla 1. Localización e intensidad de Amelogenina en Ca. Ameloblásticos

Tabla 1. Localización e intensidad de β -catenina en Ca. Ameloblásticos

Tabla 1. Localización e intensidad de Sox2 en Ca. Ameloblásticos

Tabla 1. Proporción de células positivas para Amelogenina, β -catenina y Sox2 en Ameloblastomas y Ca. Ameloblásticos

ÍNDICE DE GÁFICAS

Gráfica 1. Estadísticos descriptivos género

Gráfica 1. Estadísticos descriptivos tumor y área anatómica

Gráfica 1. Prueba estadística U de Mann-Withney

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Amb. Ameloblastoma

AmbA. Ameloblastoma Atípico

AmbM. Ameloblastoma Metastatizante

AmbU. Ameloblastoma Uniquístico

CAmb. Carcinoma ameloblástico

Sox2. Sex determining region-Y-related high mobility group box2

Oct4. Octamer-binding transcription factor 4

OMS Organización Mundial de la Salud

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto está dedicado a mi madre, padre y hermano, quienes han sido y serán mi orgullo y motivación en la vida.

Mi agradecimiento, admiración y respeto al Dr. Javier Portilla, Dra. Ana Cano y Dr. Luis F. Jacinto, quienes han sido mis maestros estos años.

Gracias Adriana Molotla por crecer personal y profesionalmente conmigo, por ser un ejemplo y una maestra todos en este tiempo.

A specially thank to Dr. Brad Neville for being my mentor and motivation since I was an Oral Pathology Resident.

Orgullosamente UNAM

Roberto Onner Cruz Tapia

1. RESUMEN

Los ameloblastomas (Amb) son neoplasias odontogénicas de origen epitelial, localmente agresivas, destruyen los huesos maxilares, presentan una alta tasa de recurrencia y llegan a dar metástasis. Hasta el momento no existen medidas preventivas ni predictivas para este tipo de tumores. Su contraparte maligna es el carcinoma ameloblástico (CAmb) caracterizado por presentar mayor morbilidad que el ameloblastoma, con frecuencia se detectan metástasis y recurrencia a corto plazo, histológicamente se caracteriza por presentar anaplasia, alto índice de mitosis, necrosis e infiltración a tejido adyacentes, nervios y vasos sanguíneos. En la actualidad siguen siendo controversiales los factores que predisponen a la transformación o desarrollo de *novο* de estas neoplasias. Se han propuesto la activación de ciertos factores de transcripción presentes en los CAmb Oct4A es un factor de transcripción descrito en la reprogramación de células troncales e implícito en la pluripotencialidad de las células neoplásicas. Su expresión se ha reportado como un factor de mal pronóstico de tumores gastrointestinales y mamarios.

Materiales y Métodos: En el presente estudio se utilizaron los marcadores de inmunohistoquímica Sox2, Oct4A y β -catenina en 22 casos de Amb y 14 de CAmb donde se analizó la localización, intensidad y proporción de expresión

Resultados: Se observó aumento en la expresión de Sox2 en CAmb y Amb, B-catenina positiva nuclear en CAmb y citoplasmática Amb, Oct4A fue negativo en todos los casos. La expresión de amelogenina disminuye gradualmente con las características histológicas de atipia.

Conclusiones: Los CAmb son muy agresivos y con la habilidad de generar metástasis su potencial de proliferación es similar otros carcinomas infiltrantes evaluados con Sox2, sin embargo, su negatividad a marcadores moleculares de mal pronóstico es nula o baja lo que puede interpretarse como una transformación biológica más compleja que requerirá de futuros estudios moleculares.

2. ABSTRACT

Ameloblastomas (Amb) are odontogenic neoplasms of epithelial origin, locally aggressive, destroys jaw bones they present a high rate of recurrence and metastasize. To date, there are no preventive & predictive measures or specific treatment for this tumor. Its malignant counterpart is ameloblastic carcinoma (CAmb) characterized by a higher morbidity than benign ameloblastoma, with frequent metastases and short-term recurrence, histologically characterized by anaplasia, high mitotic index, necrosis and adjacent tissue infiltration, nerves and blood vessels. At present the factors that predispose to the transformation or de novo development of these neoplasias remain controversial. Activation of certain transcription factors present in ameloblastic carcinomas has been proposed. Oct4A is a transcription factor described in stem cell reprogramming and implicit in the pluripotency of neoplastic cells. Their expression was reported as a poor prognostic factor for gastrointestinal and breast tumors.

Materials and Methods: In the present study, we used the immunohistochemical markers Sox2, Oct4 and Beta-catenin to 22 cases of AB and 14 cases of CA.

Results: A strong expression of Sox2 in ameloblastic carcinomas and ameloblastomas with atypical characteristics was observed, nuclear positive B-catenin in ameloblastic carcinomas and nuclear and cytoplasmic positive in atypical areas of ameloblastomas, Oct4 was negative in all cases and amelogenin loose expression in the atypical areas.

Conclusion: The ACs are very aggressive and potentially metastatic, their negativity to molecular markers of poor prognosis is null or low which could be interpreted as a more complex biological transformation which will require further molecular studies.

3. INTRODUCCIÓN

Los tumores odontogénicos son un grupo diverso de neoplasias que afectan a los huesos y tejidos blandos maxilares, durante su desarrollo exhiben características morfológicas que imitan de manera desorganizada procesos involucrados en la morfo e histodiferenciación dental. Estas neoplasias son divididas en benignas y malignas por la Organización Mundial de la Salud. En el análisis anatomopatológico cada una tiene características particulares, pero en términos generales están compuestas exclusivamente por epitelio odontogénico, ectomesénquima, o por la mezcla de ambos elementos que en ocasiones llegan a formar depósitos de matriz dentinoide y/o adamantina a las cuales se les ha designado mixtas.

Las teorías en la histogénesis de los quistes y tumores odontogénicos no son concluyentes todavía. Se ha tomado como un parámetro importante para el origen de estas lesiones la presencia de los restos de la lámina dental (Serres) y de la vaina epitelial de Hertwig (Malassez) así como a los elementos epiteliales y ectomesenquimales involucrados en la odontogénesis por su similitud morfológica.

Sin embargo, a partir de la evidencia que se tiene con base en su desarrollo epitelial, la histogénesis apunta a los restos epiteliales incluidos en la lámina propia de la encía en el caso de que el tumor se desarrolle de los tejidos blandos o los del epitelio reducido del esmalte en el ligamento periodontal circundante a los ápices dentales o de la pared fibrosa de los folículos dentales de los dientes no erupcionados si este se origina dentro del hueso alveolar.

La caracterización de los Amb y CAmb se ha basado en evaluar el perfil de expresión a ciertos marcadores de diferenciación celular, mutaciones genéticas, así como su proliferación; Pocos estudios se han realizado en evaluar factores de transcripción. Durante las últimas décadas, los estudios

moleculares se han realizado para caracterizar y tratar de elucidar detalladamente a estas neoplasias.

4. ANTECEDENTES

Los ameloblastomas (Amb) y su contraparte maligna el carcinoma ameloblástico (CAmb) son neoplasias epiteliales odontogénicas que afectan a los maxilares. Por un lado, el ameloblastoma es considerado benigno por su comportamiento biológico y características patológicas, sin embargo, su alta tasa de recidiva lo convierte en un tumor agresivo y mórbido con la habilidad de desarrollar metástasis.¹⁻³ En el caso del CAmb, a pesar de su baja incidencia, es aun tumor muy agresivo, destructivo e infiltrante que afecta a los maxilares, con la capacidad de generar metástasis a múltiples órganos disminuyendo el pronóstico de los pacientes afectados.¹

Raveleen y cols. recientemente concluyen que la patogénesis del Amb es multifactorial involucrando numerosas vías de señalización celular, alteraciones genéticas y moleculares que afectan el desarrollo y progresión del epitelio odontogénico por lo que el desarrollo neoplásico es regulado por diversas alteraciones moleculares.³

Hussenet y cols. describieron que la sobreexpresión de Sox2 está implicado en el proceso de malignización, migración celular y crecimiento independiente.³⁵ En 2014, Yu Lei y cols. proponen la expresión de Sox2 como un marcador potencial para carcinoma ameloblástico, con base en el análisis del patrón de inmunorreacción en ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos.²³⁻⁵⁹

En 2007, Rodríguez y Padilla después analizar su expresión en carcinomas de mama, encontraron que Sox2 está presente en tumores con fenotipo basaloide y esto puede contribuir como herramienta para la caracterización de células poco diferenciadas o con capacidad troncal en algunas neoplasias. En 2013 Liu y cols. describen la asociación de la expresión la proteína contenedora de Sry (Sox2) en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células troncales y la tumorogénesis. El mismo rol tiene esta proteína en las células troncales

embrionarias (CTE), también ha sido identificado en las células troncales cancerígenas (CTC).⁵⁹

Pocos estudios moleculares enfocados al análisis de Sox2 en tumores y quistes odontogénicos han sido reportados. Sin embargo, Malta da Cunha en 2013, evalúa las moléculas Sox2, Oct4, Nanog y Stat3 en gérmenes dentales, demostrando que estos factores de transcripción están activados durante la morfogénesis dental humana, y su expresión ocurre en poblaciones celulares que proliferan y expresan marcadores de células troncales pluripotenciales confirmando su potencial en el desarrollo y diferenciación tisular, concluyendo que la interrelación entre esos factores de transcripción es compleja y está relacionada con la formación del nicho de células troncales que regula la diferenciación de los ameloblastos y odontoblastos.²⁷⁻⁵³

Algunos estudios demuestran que Oct4, Nanog y Sox2 están involucrados en vías de señalización para regular el destino celular, proliferación y apoptosis de las células neoplásicas. Algunos mecanismos moleculares que regulan la autorrenovación en la etapa embrionaria pueden reactivarse durante la desregulación de la proliferación celular en la tumorigénesis.⁵⁶

Por otro lado, pocos han sido los estudios que reporten la expresión de las proteínas de la matriz del esmalte en los gérmenes dentales, pero ninguno en tumores o quistes odontogénicos. Estudios reportan que algunas proteínas, especialmente la proteína morfogénica ósea, ameloblastina, amelogenina, calretinina y proteínas de la matriz del esmalte, como syndecano-1 y metaloproteinasas de la matriz, están alteradas en su expresión, lo que se ha propuesto como un factor relacionado con el desarrollo de este tumor.⁵¹

Kumamoto y cols. describen la expresión aberrante de β -catenina y el gen la poliposis adenomatosa coli en Amb.¹² Más adelante, Siriwardena y cols.

demonstraron la expresión de las mismas moléculas descritas por Kumamoto también están expresadas en los carcinomas ameloblásticos.⁶¹

Barreto y cols. evaluaron la expresión de β -catenina, gamma-catenina y P-cadherina, reportando que la expresión de β -catenina es más pronunciada en la membrana de las células basales y estratos intermedios de los quistes odontogénicos; en ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos la expresión fue mucho menor en comparación a los quistes con localización nuclear y citoplasmática, debido que la pérdida de expresión de β -catenina puede ser equivalente a la pérdida de función de las cadherinas favoreciendo un desbalance en la adhesión celular que puede estar involucrada en la carcinogénesis. Vosughhosseini y cols. reportan que la expresión de β -catenina es menor en quistes dentígeros en comparación a ameloblastomas y queratoquistes cuyo hallazgo propusieron para diferenciar a estas entidades.^{61,63}

Algunos estudios evalúan el índice de proliferación celular en los Amb y CAmb, se sabe que a pesar de ser infiltrante y tener potencial metastásico, el índice de proliferación en los CAmb se reporta en bajos porcentajes; Bologna-Molina y cols. realizaron una comparación entre los marcadores de proliferación PCNA y Ki-67 en tumores ameloblásticos incluyendo Amb y CAmb donde enfatizan que la regulación molecular del ciclo celular es una compleja red que puede incluir otros factores para la expresión de proteínas. Esto indica un proceso que puede involucrar modificaciones, degradaciones y translocación de varias proteínas específicas que aun necesitan estudiarse más.⁸

En México son pocas las publicaciones sobre este tema, en el 2014 García-Muñoz y cols. identifican por western blot niveles incrementados de proteínas en un pequeño grupo de CAmb reportando la presencia de enzimas metabólicas implicadas en la respuesta celular a estrés y proteínas chaperonas implicadas en la estructura.¹¹

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Neoplasias Odontogénicas

Los tumores odontogénicos son un grupo diverso de neoplasias que afectan a los huesos y tejidos blandos maxilares, durante su desarrollo exhiben características morfológicas que imitan de manera desorganizada procesos involucrados en la morfo e histodiferenciación dental. Estas neoplasias son divididas en benignas y malignas por la Organización Mundial de la Salud. En el análisis anatomopatológico cada una tiene características particulares, pero en términos generales están compuestas exclusivamente por epitelio odontogénico, ectomesénquima, o por la mezcla de ambos elementos que en ocasiones llegan a formar depósitos de matriz dentinoide y/o adamantina a las cuales se les ha designado mixtas.^{2,6}

Las neoplasias odontogénicas que proliferan sólida, progresivamente y que además son carentes de cápsula, tienen la habilidad de infiltrar los espacios trabeculares óseos, destruir a los órganos dentarios (**Fig. 1**), permear los espacios perineurales y las paredes vasculares favoreciendo la capacidad de dar metástasis como es el caso de ameloblastoma metastatizante, los carcinomas y sarcomas odontogénicos.¹⁻³

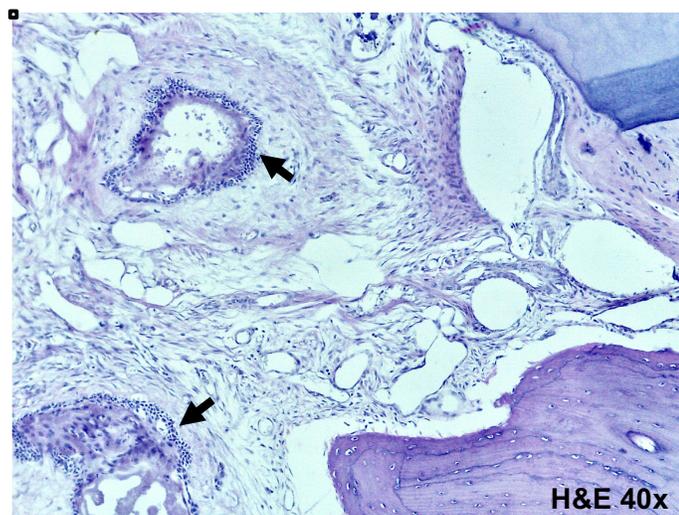


Figura 1. Ameloblastoma infiltrante (flechas) en el hueso alveolar y la raíz de un órgano dentario
(Fuente directa)

En estudios recientes se reportan alteraciones genéticas y citogenéticas en estos tumores, sin embargo, el mecanismo detallado de la oncogénesis que incluyen la anaplasia y progresión tumoral aún no se conocen completamente.⁴

5.2. Histogénesis de las neoplasias odontogénicas

Hasta la fecha, el origen de las neoplasias odontogénicas no está establecido en su totalidad; sin embargo, algunas teorías convergen en los procesos de señalización molecular que intervienen en los cambios morfológicos de la invaginación y permanencia de los restos epiteliales del órgano reducido del esmalte y la lámina dental; también se han contemplado alteraciones en la fusión de los procesos faciales durante el desarrollo craneofacial.¹⁻⁴

La migración apical del órgano del esmalte junto con el ectomesénquima circundante del folículo dental, promueve la formación del hueso alveolar y el ligamento periodontal. De esta manera, el epitelio odontogénico queda alojado en el hueso. La lámina dental, al involucionar, produce el conducto gubernacular a través del cual se guía el diente para su erupción. Durante este proceso la lámina dental deja residuos epiteliales conocidos como restos de Serres, mientras que los restos epiteliales de la vaina de Hertwig se denominan restos de Malassez que son ameloblastos postfuncionales.^{1,4,5}

Las propuestas del desarrollo de quistes y tumores odontogénicos epiteliales se han atribuido a la invaginación de la llamada "herradura" epitelial que recubre las crestas alveolares maxilares, mientras que para los tumores mixtos (epiteliales con ectomesénquima, o solo mesenquimales) se han atribuido a los elementos ectomesenquimales de la papila dental y el saco folicular en la odontogénesis; pues debido a la similitud morfológica, es que se ha tomado como un parámetro importante en la explicación del origen de estas neoplasias.⁵ **Fig. 2.**

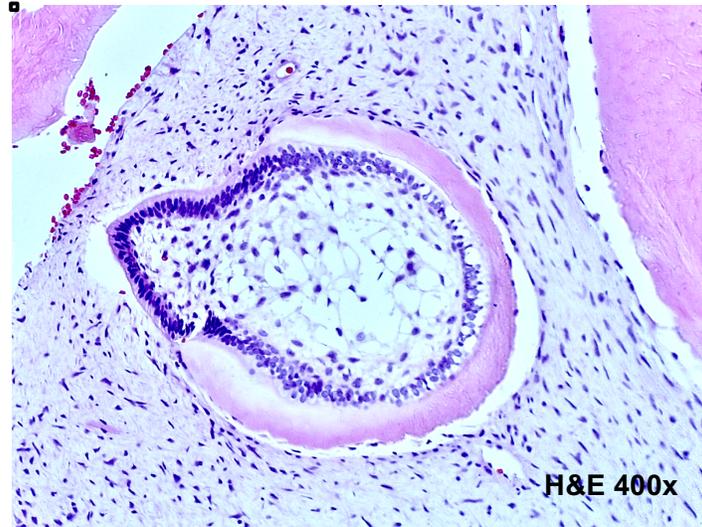


Fig 2. Odontoma en desarrollo (antes fibrodentinoma ameloblástico), donde ambos componentes neoplásicos (epitelial y ectomesenquimal) recuerdan a los estadios de histodiferenciación temprana en la odontogénesis. **(Fuente directa)**

Los quistes y algunos tumores odontogénicos con aspecto quístico radiográfica, macroscópica e histológicamente, como lo es la variante uníquística del ameloblastoma, tienen como un factor desencadenante la presencia de inflamación y los factores de crecimiento asociados a ésta, pues estimulan a los restos de Malassez incluidos en el ligamento periodontal provocando la formación de hiperplasia epitelial arcoidal o de "bucle y arcada" que al sobrepasar el suministro sanguíneo da paso a la formación de necrosis central, y que junto al gradiente osmótico que extrae fluido (plasma) del tejido conjuntivo circundante, determina la formación y expansión quística.^{1,2}

5.3. Clasificación de los tumores odontogénicos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) separa a los tumores odontogénicos en dos grandes grupos: tumores benignos y malignos, dentro de los benignos incluye al ameloblastoma y en los malignos a su contraparte maligna; el carcinoma ameloblástico. ¹**Tabla 1**

Carcinomas Odontogénicos OMS 2017

Carcinoma ameloblástico	9270/3
Carcinoma intraóseo primario, NOS	9270/3
Carcinoma odontogénico esclerosante	9270/3
Carcinoma odontogénico de células claras	9341/3
Carcinoma odontogénico de células fantasma	9302/3

Tumores Odontogénicos Epiteliales Benignos OMS 2017

Ameloblastoma	9310/0
Ameloblastoma tipo uniuístico	9310/0
Ameloblastoma extraóseo/periférico	9310/0
Ameloblastoma metastatizante	9310/3
Tumor odontogénico escamoso	9312/0
Tumor odontogénico epitelial calcificante	9340/0
Tumor odontogénico adenomatoide	9300/0

Tabla 1. Fragmento de la clasificación de tumores odontogénicos OMS 2017

5.4. Ameloblastomas

Los ameloblastomas (Amb) son neoplasias epiteliales odontogénicas benignas localmente agresivas, de crecimiento lento que afectan a los maxilares con distintas características histológicas que determinan su conducta biológica. Tienen a la recidiva si no son adecuadamente resecados.¹⁻⁴

El término ameloblastoma deriva de la palabra inglesa “amel” que significa esmalte y de la palabra griega “blastos” que significa germen o semilla. Estos tumores fueron descritos por primera vez por Broca en 1847 como “epitelioma”, en 1885 Malassez introdujo el nombre adamantinoma; sin embargo, ese nombre se describió para tumores que se desarrollan en los huesos largos y que histológicamente son similares al ameloblastoma en 1913 por Fisher. El Amb fue descrito detalladamente por Falkson en 1879. Pero hasta 1930 hasta que Ivey y Churchill describen y acuñan el nombre de ameloblastoma a este tumor.⁹

Estas neoplasias se clasifican con base en su característica clínica, conducta biológica y patrón histológico. Existen informes de casos con características histológicas no encuadradas en la clasificación, que confirman la diversidad de estas neoplasias.

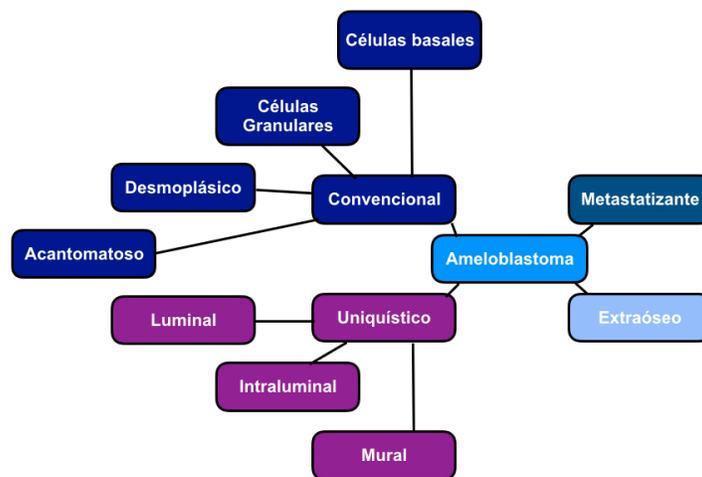


Figura 3. Clasificación de la OMS 2017 de los tipos y variantes de ameloblastoma. (Fuente directa)

5.4.1. Ameloblastoma convencional

El ameloblastoma convencional anteriormente llamado sólido/multiquístico es un tumor sólido que demuestra frecuentemente tendencia a la degeneración quística. Los quistes pueden ser de diversos tamaños macroscópicamente; histológicamente presentan 2 principales patrones de crecimiento: folicular y plexiforme.^{1,4} Se les considera tumores localmente agresivos debido a que expanden, adelgazan y perforan la cortical de los huesos maxilares, frecuentemente causa desplazamiento de los órganos dentarios y resorción radicular. Los tumores que llegan a tener un gran tamaño pueden llegar a provocar fracturas patológicas, infiltrar los tejidos blandos e incluso desarrollar la habilidad de producir enfermedad a distancia.^{1-3, 18}

El ameloblastoma folicular se caracteriza por islas de epitelio odontogénico separadas por estroma fibroso maduro; en la periferia de islas y cordones epiteliales se identifica la presencia de células en empalizada con polarización nuclear invertida, la organización de las células epiteliales dentro de los folículos es laxa exhibiendo una morfología ahusada y estelar por lo que recuerdan el retículo estrellado del órgano del esmalte.^{1,4} La formación de quistes y su agrandamiento dentro de las islas dan el aspecto de un patrón de crecimiento multiquístico que es común en los ameloblastomas foliculares. La formación de quistes dentro del Amb convencional no altera su tratamiento ni pronóstico.¹ **Fig. 4.**

En el ameloblastoma plexiforme el epitelio odontológico se organiza en largas bandas y cordones que regularmente aparecen rodeando áreas centrales de estroma fibroso. Igualmente, esta variante presenta células columnares en empalizada con polarización nuclear invertida y áreas centrales laxas que recuerdan el retículo estrellado. En adición a los cordones epiteliales interconectados pueden observarse hojas de células neoplásicas. En comparación a la variante folicular, la formación de quistes es poco común. Asimismo, la neoplasia se encuentra soportada por un estroma rico en fibras colágenas maduras que varía en densidad y forma septos bien vascularizados.^{1,3} **Imagen 5.**

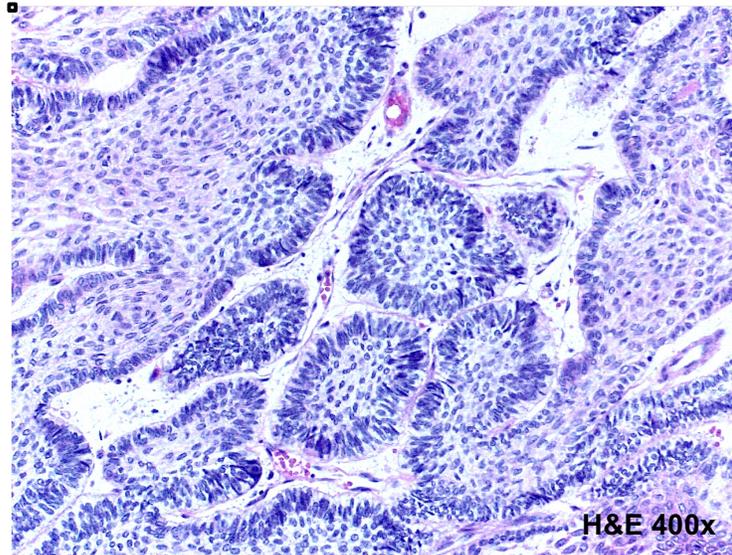


Fig. 4. Ameloblastoma con patrón folicular (Fuente Directa)

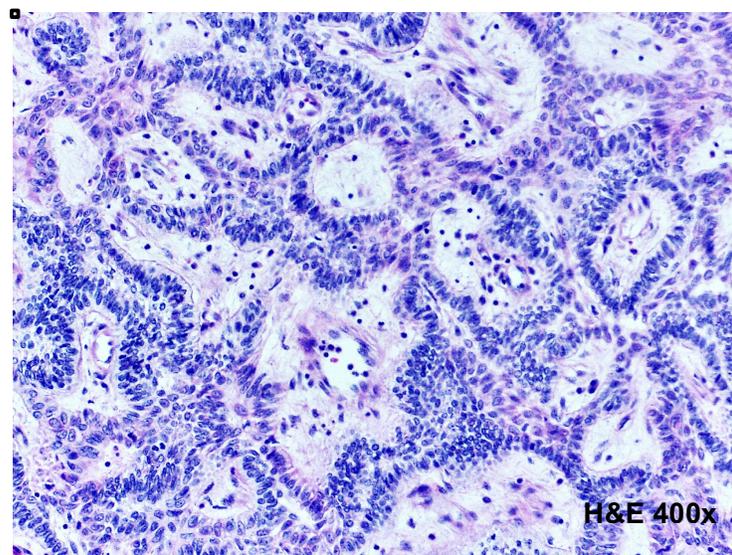


Imagen 5. Ameloblastoma con patrón plexiforme (Fuente Directa)

5.4.2. Ameloblastoma tipo folicular acantomatoso

Es el tipo más común del ameloblastoma y se caracteriza por la presencia de extensas áreas de queratinización individual o grupal dentro de las islas neoplásicas, en algunas ocasiones el tamaño de las perlas y globos córneos es tal que ocupa la totalidad de los folículos.¹⁻³ (ver **Fig. 6**) Samir y cols. en 2013 realizan un análisis de la expresión de citoqueratinas ácidas en los ameloblastomas estableciendo diferencias inmunofenotípicas con citoqueratinas independiente a

los hallazgos microscópicos.^{9,47} Los Amb con diferenciación escamosa presentan generalmente un patrón histológico folicular, aunque también han sido observadas en la variante plexiforme. Esta variante de Amb los incluye como diagnósticos diferenciales al tumor odontogénico escamoso y al carcinoma de células escamosas, este último con evidentes características de malignidad.¹¹

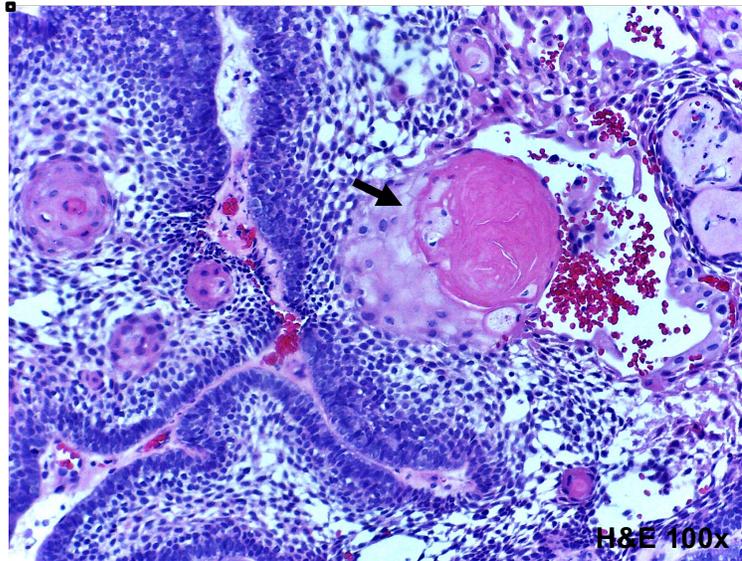


Figura 6. Fotomicrografía de ameloblastoma tipo folicular variante acantomatosa con perlas de queratina (flecha) **(Fuente directa)**

5.4.3. Ameloblastoma tipo folicular con células granulares

Este tipo de Amb presenta en la posición central de las islas neoplásicas una cantidad abundante de células con citoplasma eosinófilo claro y granular.¹⁻³ La presencia de células granulares en los ameloblastomas es poco frecuente; sin embargo, su aspecto histológico es muy característicos ya que estas células se encuentran reemplazando las áreas de retículo estrellado en los folículos, y en ocasiones pueden identificarse islas formadas únicamente por células granulares. Se han realizado estudios ultraestructurales e inmunohistoquímicos que confirman un aumento en el número de lisosomas lo que le da el aspecto granular a las células tipo retículo estrellado.¹ **Fig. 7**

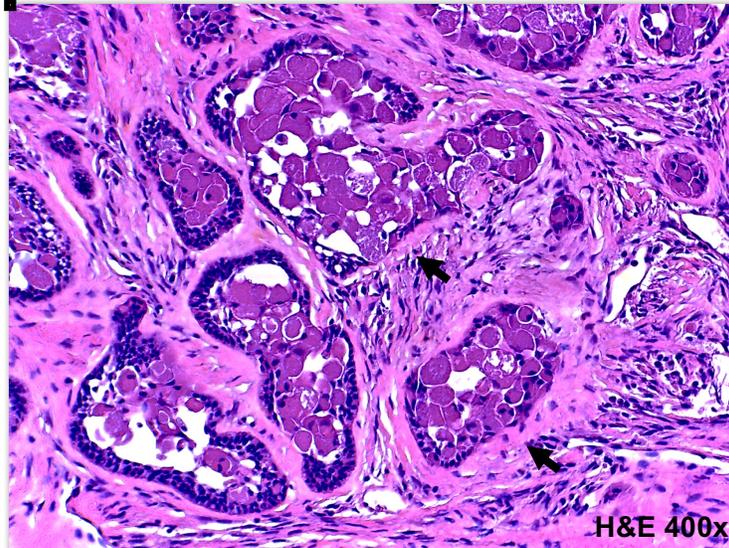


Imagen 7. Ameloblastoma tipo folicular con células granulares (flecha)
(Fuente directa)

5.4.4. Ameloblastoma tipo folicular de células basales

Presenta en la porción central de las islas neoplásicas una gran cantidad de células basófilas oscuras que presentan escaso citoplasma y semejan a esas células observadas en el carcinoma de células basales. Pocos reportes se han hecho sobre los ameloblastomas de células basales, esta variante histológica al igual que las demás, presenta los 3 tipos celulares, generalmente crece en un patrón folicular con estroma hialinizado. Las islas de epitelio pueden no presentar retículo estrellado, sin embargo, en la periferia del tumor pueden observarse de manera focal células columnares en empalizada.¹⁻⁴

5.4.5. Ameloblastoma folicular tipo desmoplásico.

Este tipo de ameloblastoma particularmente se ha clasificado así por la característica del estroma, ya que es extremadamente denso, la colágena se arregla en gruesos haces que se entremezclan con las islas epiteliales.¹ La colágena perifolicular sugiere que el estroma denso no es tejido cicatrizal. Sin embargo, se han identificado metaloproteinasas de la matriz extracelular.^{1,4}

Las células e incluso las islas y los cordones epiteliales tienen un aspecto ahusado y poligonal debido a la densa y gruesa proliferación estromal que los comprime, motivo por el cual en ocasiones es imposible distinguir la polaridad y morfología columnar de las células periféricas. El desarrollo de la desmoplasia promueve la resorción y erosión de la superficie ósea lo que genera un patrón radiográfico mixto.³ **fig. 8.**

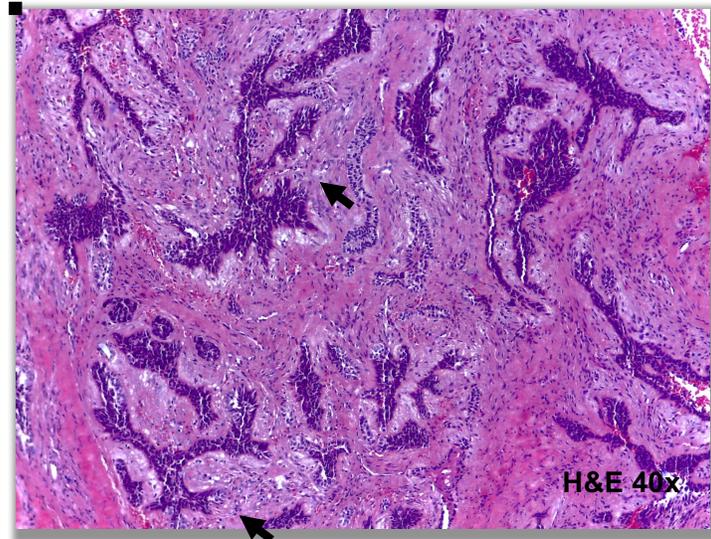


Imagen 8. Ameloblastoma tipo folicular desmoplásico (flecha desmoplasia) **Fuente directa**

5.4.6. Ameloblastoma uniuquístico

Desde hace cuatro décadas y debido a sus características clínicas, radiográficas e histopatológicas, el ameloblastoma uniuquístico (AmbU) fue reconocido como un subtipo distintivo de ameloblastoma. Este subtipo de ameloblastoma es el más común de todos y está asociado con frecuencia a dientes retenidos o impactados.¹

Responde satisfactoriamente a tratamientos conservadores en comparación al convencional que requiere de una cirugía más extensa. Se ha dividido en 3 subtipos de acuerdo al patrón de proliferación que presenta el epitelio que recubre la cavidad quística: luminal, intraluminal y mural, desde entonces se ha tomado como un acuerdo general que los primeros 2 subtipos responden a un tratamiento conservativo debido a que no penetran la pared del quiste por lo que pueden tratarse como tal; mientras que el subtipo mural debe ser tratado como un

ameloblastoma convencional infiltrante.^{1,4} **Fig. 9** En el 2000 se determinó que la infiltración mural de un ameloblastoma unicístico presenta recurrencia después de un tratamiento quirúrgico conservativo en comparación a las variantes luminal e intraluminal.³

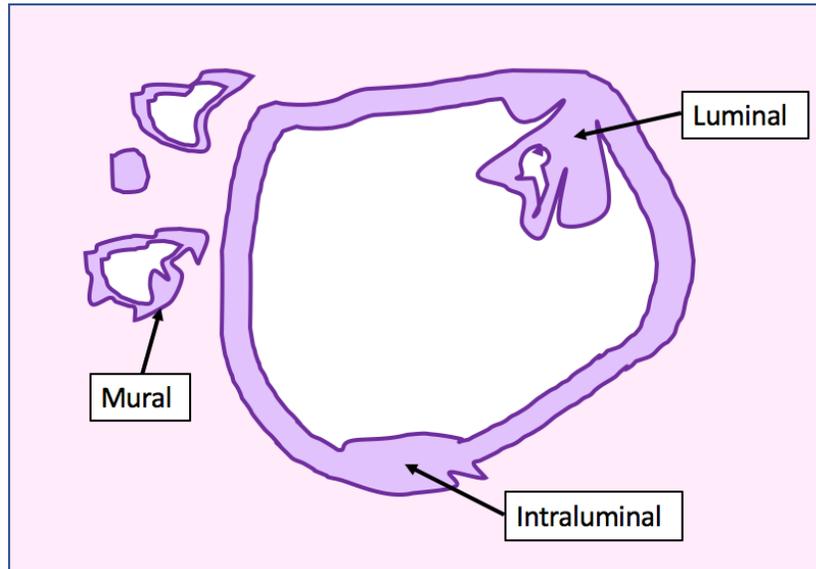


Figura 9. Esquema de los tipos de proliferación en el Ameloblastoma unicístico. (fuente directa)

5.4.7. Ameloblastoma Extraóseo o Periférico

Es una neoplasia benigna que se presenta en los tejidos blandos de la encía o proceso alveolar edéntulo, mostrando características microscópicas de ameloblastoma. Es poco frecuente y la media de edad es de entre los 50 y 54 años, con una ligera predilección por el sexo masculino. La localización más frecuente en los tejidos blandos es el área retromolar mandibular, seguida por la tuberosidad del maxilar. Se presenta como un aumento de volumen asintomático con superficie nodular y de un color más oscuro a la mucosa adyacente. Radiográficamente presenta erosión ósea. Su recurrencia es rara y se han reportado casos de transformación maligna.¹⁻⁴

5.4.8. Ameloblastoma Metastatizante

El ameloblastoma metastatizante (AmbM) es un tumor que muestra características histológicas idénticas al ameloblastoma tanto en el tumor primario como en las lesiones a distancia. El ameloblastoma con potencial metastático es histológicamente indistinguible del ameloblastoma convencional.¹

En 1984 Slootweg y Muller propusieron el término “ameloblastoma maligno” para describir a un ameloblastoma bien diferenciado que da metástasis pero que conserva las características citológicas del tumor original, dejando como carcinoma ameloblástico a un ameloblastoma con características citológicas de malignidad. Los factores asociados al desarrollo del AmbM incluyen la larga duración del tumor, enfermedad local extensa, procedimientos quirúrgicos frecuentes y radioterapia.^{1,13} Algunos postulan que el curetaje como opción terapéutica puede contribuir al incremento de riesgo de enfermedad metastásica. La mayoría de las metástasis son solitarias, pero pueden progresar a ser múltiples; la enfermedad pulmonar metastásica es multifocal afectando ambos pulmones, otros órganos afectados incluyen a los nodos linfáticos, huesos vertebrales, cráneo, cerebro, diafragma, hígado, riñón, bazo y tegumentos. De los pacientes que mueren por la enfermedad, la media de sobrevida después del descubrimiento de las lesiones a distancia es de 2 años, aunque esto puede variar.^{13, 18,38}

Kunze y cols. describieron que el AmbM se desarrolla por lo general en la mandíbula de adultos jóvenes destacando que la mayoría de los pacientes tuvieron múltiples procedimientos quirúrgicos por recurrencia.¹ Por lo que tanto la recurrencia y/o persistencia de un Amb se ha propuesto como factor de riesgo a la transformación maligna y la diseminación locoregional y a distancia. La quimioterapia ha sido inefectiva pero una respuesta parcial a corto plazo ha sido observada.¹⁸⁻²⁰

5.4.9. Ameloblastoma atípico

El ameloblastoma atípico (AmbA) es una neoplasia ameloblástica considerada limítrofe o borderline, designada así por su conducta biológica e histopatología. Debido a su complejidad patológica y la variación en los criterios entre observadores, no se ha logrado postular criterios para su diagnóstico por lo que no se encuentra dentro de la clasificación de tumores odontogénicos de la OMS.

Lee J Slater en el 2004 hace mención sobre algunos ameloblastomas que presentan hiperplasia basilar y un aumento en el índice mitótico como hallazgos morfológicos de malignidad, pero que no reúnen todos los criterios histológicos para ser llamados carcinomas, por lo que fueron designados como “ameloblastomas atípicos” o “ameloblastomas proliferativos”.

Como intento para establecer criterios de diagnóstico, Yu Lei y colaboradores en el 2014 toman como referencia los siguientes parámetros para el diagnóstico de AmbA: pérdida de la clásica diferenciación ameloblástica, incremento de la estratificación y pleomorfismo celular, menos de 2 mitosis por campo de alto poder y ausencia de permeación angiolinfática o invasión perineural.^{18,48}

Otras características morfológicas en los Amb se han encontrado; la presencia de células espumosas con citoplasma claro amplio y vesiculoso dando el aspecto de células mucosecretoras acompañados de formaciones pseudoductales en los folículos neoplásicos. **Fig. 10.**

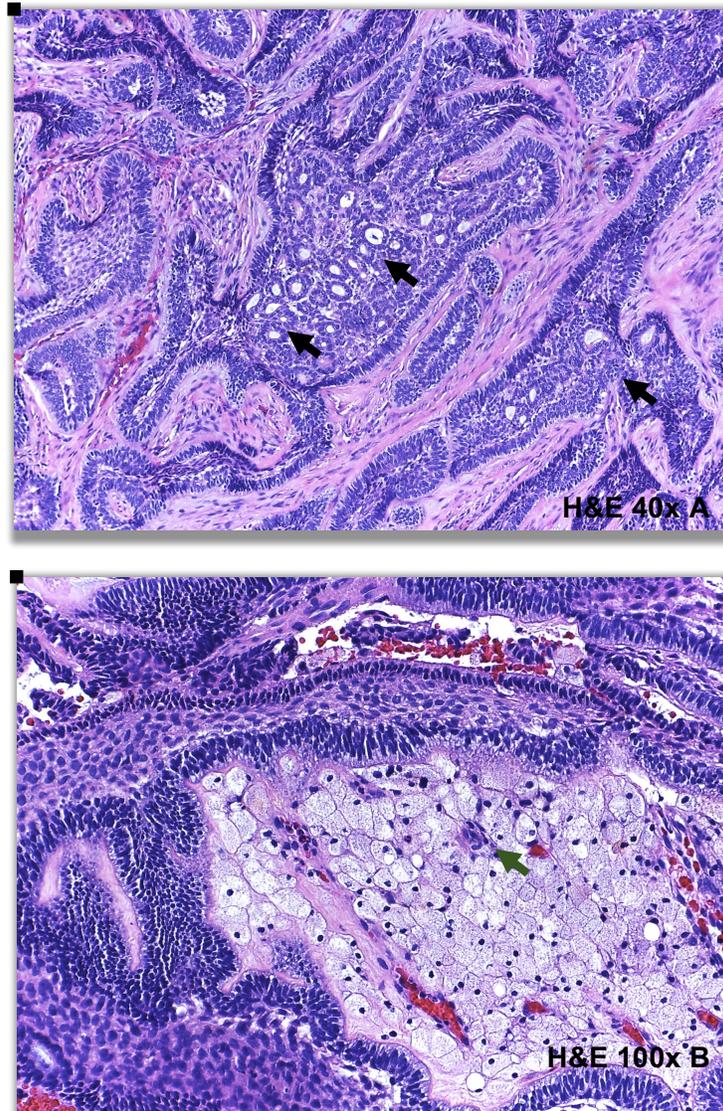


Imagen 10. Ameloblastoma folicular **A.** formación de pseudoconductos (flechas negras), **B.** Células mucosecretoras en Amb (flecha verde) (Fuente OSU 2016-3542)

5.5. Carcinoma ameloblástico

El carcinoma ameloblástico (CAmb) es una neoplasia epitelial odontogénica maligna poco frecuente. Existen muy pocos estudios relacionados con este tumor, lo que dificulta predecir la conducta biológica y los factores pronósticos, así como el diseño de protocolos para tratamientos específicos. Estas neoplasias pueden llegar a tener un grado de dediferenciación tan importante que morfológicamente semejan un carcinoma poco diferenciado, o un sarcoma.¹⁸⁻²⁰ **Figura 11**

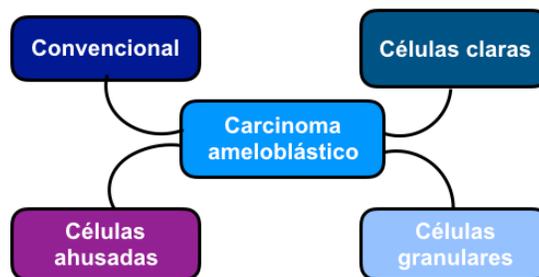


Fig. 11. Clasificación histológica del CAmb (Fuente directa)

El CAmb es considerado como la contraparte maligna del ameloblastoma; múltiples clasificaciones se han propuesto desde su primera descripción por Loose en 1913 como: “carcinoma epidermoide central de la mandíbula”. Sin embargo, fue hasta 1971 que Pindborg y cols. clasificaron a estas neoplasias en tres grupos: ameloblastoma maligno, carcinoma primario intraóseo y carcinomas que se desarrollan a partir de epitelio odontogénico incluyendo a los epitelios quísticos. Años más tarde Elzay, Slootweg y Müller modificaron esta clasificación con base en las características morfológicas del tumor primario y las metástasis.¹⁹ En 2009 Kruse y cols. propusieron una subclasificación de los tres tipos de acuerdo a la presencia de metástasis y las características morfológicas de éstas.¹⁹⁻²⁰

Las características histopatológicas del CAmb combinan las de un ameloblastoma con atipia celular, sin embargo, el aumento en el número de

mitosis, la presencia de necrosis intratumoral, permeación linfovascular e infiltración a espacios perineurales o intraneural son un hallazgo frecuente.

La atipia celular comprende parámetros observados en otros carcinomas como pérdida de la relación núcleo-citoplasma, pleomorfismo nuclear y celular, anisonucleosis, anisocitosis, nucléolos prominentes, cromatina compacta y vesiculosa, así como aumento en la estratificación de la empalizada periférica, en cuanto al estroma intratumoral tiende a ser más hialinizado al igual que en el frente de invasión, sin embargo, en este último la presencia de desmoplasia es variable. **Fig 12.** Julia A. Wooglar establece parámetros histológicos para el diagnóstico de CAmb como: 2 mitosis por campo de alto poder en áreas de alto grado, presencia focal de epitelio ameloblástico, atipia citológica, necrosis, permeación vascular e invasión neural. Aunque estos parámetros son importantes en el diagnóstico, algunas neoplasias no cuentan con todos estos parámetros por lo que se ha vuelto necesario el caracterizarlos con estudios de biología molecular.¹⁸

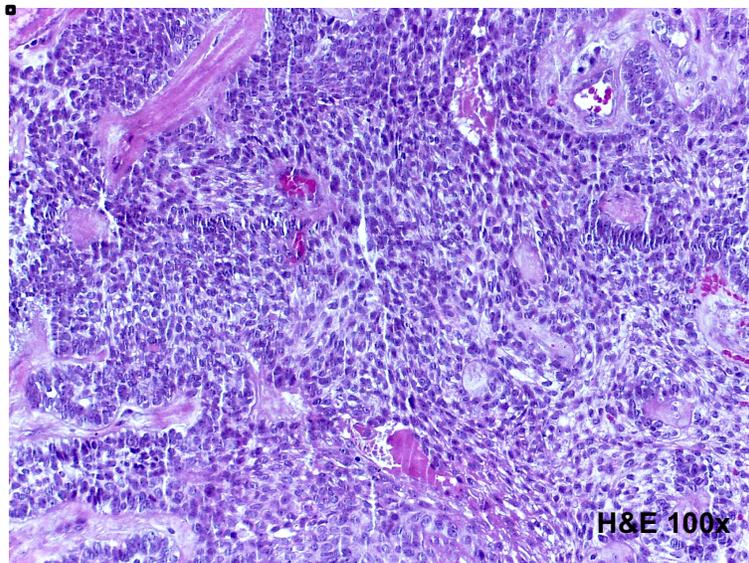


Fig 12. Carcinoma ameloblástico (Fuente directa)

En 2011 Kamath y cols. clasificaron a los CAmb con base en las características citológicas en cuatro variantes: ameloblástica (convencional), de células granulares, de células claras y células fusiformes o sarcomatoide.²⁸ **Fig. 13**

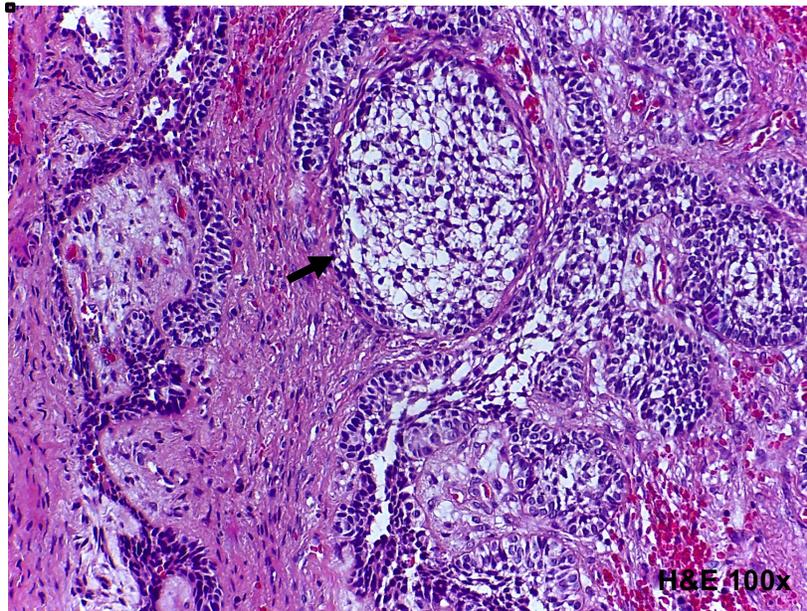


Fig 13. Carcinoma ameloblástico con claras (Flechas células claras) (fuente directa)

Las teorías para la histogénesis de los CAMb se han enfocado en todos los procesos moleculares que pudieran estar involucrados la transformación maligna que sufren los restos epiteliales de la lámina dental y del órgano reducido del esmalte para las neoplasias primarias de novo; mientras que, a partir del epitelio de quistes maxilares, la recurrencia o persistencia de tumores odontogénicos epiteliales condiciona la presencia del carcinoma ameloblástico secundario.^{1,2,17,18}

Varios genes se han involucrado en el mecanismo que sufre para transformarse en genes específicos que intervienen en los siguientes procesos: transcripción, transducción de señales, regulación del ciclo celular, apoptosis, desdiferenciación celular y angiogénesis.^{1,19} La inestabilidad cromosómica se ha reportado de manera aislada en los ameloblastomas con pérdidas en los cromosomas 10 y 2, así como aneuploidias que han sido atribuidas a su potencial maligno.^{10,17}

En los análisis genómicos la metilación de CpG de P16 ha sido observada en todas las muestras de carcinoma ameloblásticos.⁽¹⁻³⁾ Recientemente se ha demostrado por hibridación genómica comparativa una amplificación en 5q13.³

5.6. Amelogenina

La Amelogenina (Amg) es la proteína de matriz extracelular más abundante secretada por los ameloblastos durante la biomineralización del esmalte dental.⁵¹

El esmalte está formado por un proceso de mineralización altamente conservado evolucionariamente y que es controlado por proteínas de la matriz extracelular. Durante el estadio de secreción, los ameloblastos secretan 3 proteínas principalmente: amelogenina, ameloblastina y enamelina. El cromosoma humano 4 contiene el cluster de los genes de la matriz del esmalte que están localizados proximalmente al cluster que les pertenece a los genes SIBLING relacionados con el hueso y la dentina. Sin embargo, los genes que codifican para la amelogenina se encuentran en los cromosomas sexuales y están altamente conservados en al menos 26 especies de mamíferos.⁵¹⁻⁵²

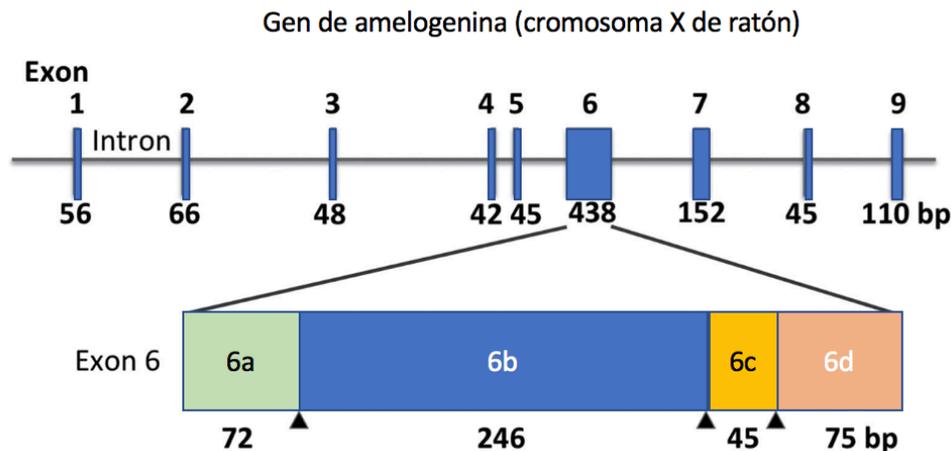


Fig. 14. Esquema del gen de amelogenina

Los dos genes de Amg están localizados en el cromosoma X (Amelx) y el cromosoma Y, (Amely). En los humanos el número de transcritos de Amely son casi el 10% de los que tiene Amelx. En un análisis de coensamblaje y colocación de las proteínas ameloblastina y amelogenina realizado por Parichita Mazmder y cols. describen que la inactivación del gen de la ameloblastina condiciona no sólo la pérdida total de su producción en el

ameloblasto, sino que también disminuye los niveles de expresión de la amelogenina. Sin embargo, la manifestación de ambas proteínas fue observada hasta que la expresión de la amelogenina terminó hasta el estadio de maduración de los ameloblastos.⁵¹⁻⁵²

Estudios recientes refieren que las amelogeninas poseen múltiples funciones, no sólo en la mineralización de la matriz extracelular del esmalte, sino también como moléculas de señalización en las células mesenquimales del tejido periodontal y la osteoclastogénesis.⁵²

5.7. Sex determining region-Y-related high mobility group box2 (Sox2)

Sox2 es una proteína que pertenece a la familia de proteínas SRY del grupo de la alta movilidad caja 2, que son factores de transcripción de alta movilidad esenciales para el mantenimiento y desarrollo de las células troncales embrionarias (CTE). Sox2 es un factor de transcripción expresado en células pluripotentes inducidas (CPI) a partir de fibroblastos. Se ha asociado con el desarrollo de carcinomas en pulmón, esófago, pulmón y de origen odontogénico como el CAmb.³⁵ Actualmente se sabe que esta proteína participa en la regulación y organización de genes involucrados en el desarrollo embrionario normal y procesos de malignidad.⁽³⁵⁾ Sox2 posee 317 aminoácidos, y en varios sitios puede ser modificada postraduccionalmente a través de fosforilación, acetilación, ubiquitización, metilación, sumoilación y cada una de estas modificaciones condiciona diferentes comportamientos de la proteína.⁽³⁵⁾ Se ha descrito sólo un transcripto de Sox2, y sus las actividades son variables debido a las modificaciones traduccionales y postraduccionales.^{54,59}

La amplificación de Sox2 en algunos tipos de carcinomas se ha relacionado con procesos de malignidad celular y el comportamiento clínico de las neoplasias; La sobreexpresión de esta proteína en las células tumorales presenta un pronóstico desfavorable, ya que se ha demostrado una disminución en la supervivencia de los pacientes.⁵⁹

Por otro lado, Sox2 también participa en varios procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo embrionario y postnatal, lo que ha conducido al estudio de múltiples vías de señalización asociadas con la activación y regulación de esta proteína. Estudios recientes demuestran que Sox2 es regulado por una gran cantidad de moléculas.^{55,59} **Fig. 15**

Con respecto a la regulación de la expresión genética que presenta Sox2 a través de su unión directa al ADN, los efectos son variables; modificaciones en la actividad celular, procesamiento de ácidos nucleicos (ADN y ARN), organización y ensamblaje de la cromatina.³⁵



Fig.15 Las vías de transducción de señales implicadas con Sox2. Tomado de Liu K. ⁵⁹

5.8. Octamer-binding transcription factor 4 (Oct4)

El gen de Oct4 humano puede generar tres transcritos (Oct4A, Oct4B y Oct4B1) y cuatro isoformas de proteínas (Oct4A, Oct4b-190, Oct4B-265 y Oct4B-164) a través de splicing alternativo. Oct4A es altamente expresado en células troncales embrionarias humanas (CTEh) regulando la autorenovación de células pluripotentes. Oct4B al igual que Oct4A se expresan en bajos niveles en células pluripotenciales así como en multipotenciales que exhiben características de troncalidad; Sin embargo, Oct4A es mucho más abundante en CTEh en comparación a Oct4B; adicional a esto Oct4A es nuclear mientras que Oct4B es citoplasmático.⁵⁴⁻⁵⁶

Oct4 también conocido como Oct3 u Oct3/4 está codificado por el gen Pou5f; Oct4 pertenece a la familia de los factores de transcripción POU, que incluyen algunos prototipos como Pit-1, Oct1 y Unc-86, cada uno de los catorce miembros de la familia POU contiene dominios POU bipartita bien conservados que consisten de 150 a 160 aminoácidos y son responsables para la unión al DNA. Los dominios POU de Oct4 consisten en subdominios específicos de sesenta aminoácidos y homodominios de setenta aminoácidos que están separados por un ligando flexible de 17 aminoácidos. Estos dos subdominios unen a Oct4 con el ADN.⁵³

Oct4B ha mostrado expresión en varias líneas celulares somáticas mientras que Oct4A es negativo a todas ellas, en resumen, Oct4A posee como única función el mantenimiento de la auto-renovación en las CTE.⁵³⁻⁵⁴

Oct4 es una proteína de 352 aminoácidos que pertenece a la clase V de los factores POU expresada en las células totipotenciales. Los mRNA de Oct4A y Oct4B codifican para la familia PUO que son proteínas que comparten un dominio de unión DNA, cuya diferencia son las secuencias del N terminal; Debido a esto, las funciones de Oct4 se han considerado como un activador transcripcional.²⁹

Como se ha descrito con anterioridad, las células pluripotenciales tienen como función mantener la proliferación y diferenciación celular en la etapa embrionario por medio de cascadas de señalizaciones moleculares.⁵³⁻⁵⁶

La proteína de Oct4 se presenta desde la fertilización hasta el crecimiento y desarrollo fetal. La expresión embrionaria de Oct4 inicia desde segmentación a hasta la mórula. Sin embargo, estudios recientes reportan que esta proteína está presente en el trofoblasto y epiblasto del blastocisto temprano y continua durante la etapa presomítica.⁵⁶ **Fig. 16**

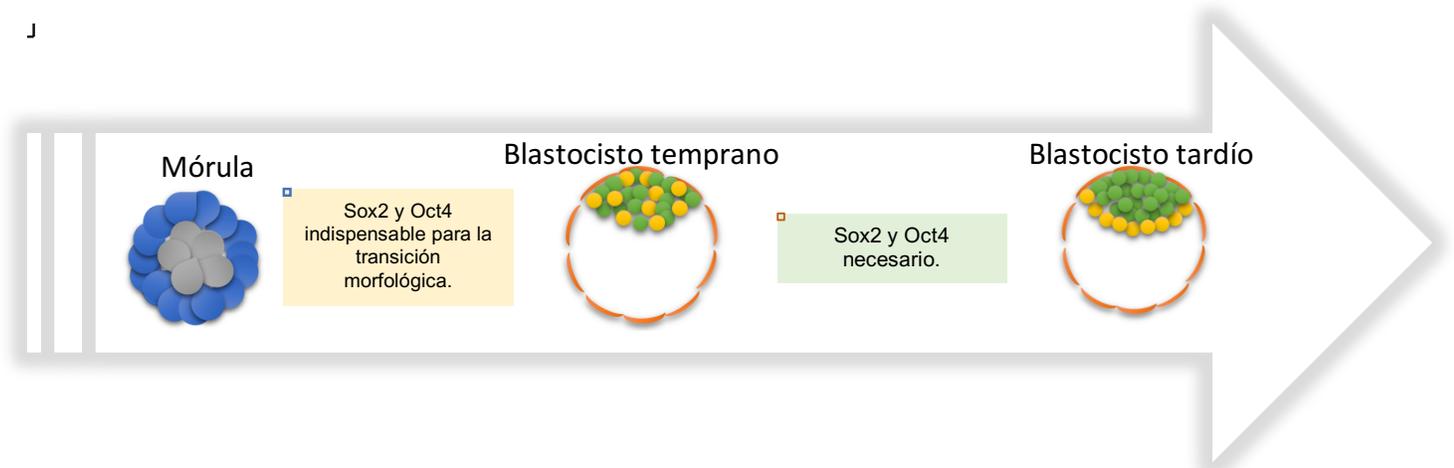


Fig. 16. Expresión de Sox2 y Oct4 en la etapa embrionaria. **Fuente directa**

5.9. β -catenina

La β -catenina es una proteína que se expresa en muchos tejidos, está implicada en la regulación y coordinación de la adhesión celular y la transcripción de genes. Mientras tanto, actúa como un transductor de señal intracelular en la vía de señalización Wnt donde desempeña un papel esencial en el desarrollo embrionario, mantenimiento de las células troncales y también en la carcinogénesis.⁶¹ Se ha identificado la expresión de β -catenina en los componentes del germen durante la morfodiferenciación e histodiferenciación dental.⁵⁻⁶¹

La señalización Wnt y su importancia en múltiples estadios de la odontogénesis ha sido bien reconocida y es observada específicamente en la lámina dental y el ectomesénquima. La activación canónica de β -catenina en células embrionarias es necesaria para la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular. Sathi y cols. en 2007 mostraron la acumulación de β -catenina junto con otras proteínas en el ameloblastoma de células granulares estableciendo que estas células sintetizan las moléculas de señalización pero que la secreción y transportación es dada por la acumulación dentro del citoplasma como autofagosomas. Siriwardena y cols. en un estudio encontraron la expresión aberrante en núcleo de β -catenina en Amb y CAmb. La desregulación de la señalización de β -catenina es un evento importante en el desarrollo de varios tumores malignos como carcinomas en el colon, hígado, ovario, endometrio, próstata meduloblastomas, melanomas y recientemente en odontogénicos, así como en tumores benignos como pilomatricomas y ameloblastomas por mencionar algunos. Las mutaciones de β -catenina están implicadas en la proliferación y muerte celular de las neoplasias.^{5,61}

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los estudios moleculares y propuestas en la caracterización de los Amb y CAmb, no se han establecido claramente los procesos patológicos que intervienen en la progresión y pronóstico, así como los factores que condicionan la transición de ameloblastoma a carcinoma ameloblástico. Sin embargo, a partir de la evidencia que se tiene con base en su conducta biológica y tendencia a la recidiva, se han propuesto la activación y supresión de genes por medio de vías de señalización, así como mutaciones específicas.

El avance en las técnicas de biología molecular, ha permitido estudiar factores de transcripción involucrados en la patogénesis de los tumores odontogénicos, se ha propuesto su participación activa en los procesos de tumorigénesis, recurrencia y transformación maligna.

7. JUSTIFICACIÓN

Evaluar la expresión de SOX2 y Oct4A; cada uno de estos pertenece a una familia de factores de transcripción con una función clave en el desarrollo de varias neoplasias y el mal pronóstico de estas. β -catenina y la proteína de la matriz del esmalte amelogenina en ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos, puede contribuir a definir las características morfológicas y moleculares de los Amb con respecto a los CAmb, asociando las características histológicas con las inmunofenotípicas para identificar de manera más objetiva los procesos de transformación maligna.

8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la expresión inmunohistoquímica de los factores de transcripción Sox2, Oct4A, β -catenina y la proteína de la matriz del esmalte amelogenina en muestras de ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos?

9. HIPÓTESIS

La expresión inmunohistoquímica de los factores de transcripción Sox2, Oct4A y la proteína de adhesión β -catenina será mayor en el CAmb en comparación de los Amb, mientras que la proteína de la matriz del esmalte amelogenina presentará mayor expresión en los Amb con respecto a los CAmb.

10. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión inmunohistoquímica de los factores de transcripción Sox2, Oct4A, β -catenina y amelogenina en muestras de ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos.

10.1. Objetivos específicos

- Determinar la localización e intensidad de la inmunorreacción para Sox2, Oct4A, β -catenina y amelogenina en muestras de ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos.
- Determinar la proporción de la inmunorreacción para Sox2, Oct4A, β -catenina y amelogenina en muestras de ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos.
- Comparar la inmunorreacción con Sox2, Oct4A, β -catenina y amelogenina entre ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos.

11. DISEÑO DEL ESTUDIO.

11.1. Tipo de estudio:

El presente estudio es transversal observacional.

11.2. Universo del estudio

Todas las muestras de Amb y CAmb en el servicio de diagnóstico histopatológico del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM, en un periodo comprendido de enero de 2005 a noviembre de 2015. Así como también las provenientes de colaboradores.

11.3. Tamaño de la muestra

La selección de la muestra fue la total disponible. Se revisaron las solicitudes y los diagnósticos histopatológicos de las bitácoras del Laboratorio de Patología Bucal en búsqueda de todos los tipos de Amb y CAmb diagnosticados en el servicio de diagnóstico histopatológico. En el periodo comprendido de enero de 2005 a noviembre de 2015 se encontraron 8847 especímenes diagnosticados, de todos los casos analizados 114 fueron ameloblastomas.

Se solicitaron y registraron los casos que contaron con bloque de parafina y laminilla en el "Instrumento de recolección de datos" **Anexo 1**, donde también se registraron los siguientes datos: género, edad y localización del tumor, dando un total de 84 casos de los que 32 cumplieron con los requisitos de inclusión.

De todas las muestras del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la UNAM y de las instituciones colaboradoras solo se solicitaron 6 cortes en laminillas salinizadas, por lo que el material nunca salió de las dependencias. Así mismo los únicos datos clínicos solicitados de cada caso fueron: edad, género y localización del tumor. **Ver Anexo 5**

11.4. Criterios de inclusión

1. Todos los casos con diagnóstico histopatológico de ameloblastoma y carcinoma ameloblástico de enero del 2005 a noviembre del 2015
2. Todos los casos de ameloblastomas que cumplan con los criterios histopatológicos propuestos por Vrickers y Gorlin.
3. Todos los casos de carcinoma ameloblástico que cumplan con al menos 3 de los criterios histopatológicos propuestos por Wooglar.
4. Los casos de Amb y CaAmb que cuenten con suficiente tejido en el bloque de parafina para los niveles solicitados.

11.5. Criterios de exclusión

1. Los casos que histológicamente se observen con inflamación severa.
2. Los casos que durante el procesamiento se dañe y pierda tejido o presenten algún tipo de artefacto.

11.6. Criterios de Eliminación

1. Bloques que durante los niveles de corte se pierda el área representativa del tumor a estudiar.
2. Los casos que no tengan una recuperación antigénica óptima para la técnica de inmunohistoquímica.

12. VARIABLES DEL ESTUDIO

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	FUENTES DE INFORMACIÓN	CATEGORÍA
Ameloblastoma INDEPENDIENTE	Neoplasia odontogénica epitelial benigna de lento crecimiento, localmente agresiva de los maxilares con un alto índice de recurrencia	Ameloblastoma (Amb) Se diagnosticaron como ameloblastomas a los tumores odontogénicos que cumplieran con los criterios histológicos propuestos por Vrckers y Gorlin	Clasificación histopatológica de la OMS 2017.	CUALITATIVA NOMINAL
Carcinoma Ameloblástico INDEPENDIENTE	Neoplasia epitelial maligna que combina las características citológicas de un ameloblastoma con las de atipia celular.	Carcinoma ameloblástico (CAmb) Se diagnosticaron como ameloblastomas a los tumores odontogénicos que cumplieran con los criterios histológicos propuestos por Wooglar.	Clasificación histopatológica de la OMS 2017.	CUALITATIVA NOMINAL
Sox2 DEPENDIENTE	Proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción implicada en el desarrollo temprano y mantenimiento de CTE y CTC	N. Nuclear C. Citoplasma M. Membrana	-Software ImageJ	ORDINAL CUANTITATIVO (PROPORCIÓN DE CÉLULAS) NOMINAL (LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN)
Oct4 DEPENDIENTE	Factor de transcripción. Implicado en el mantenimiento de las CTE y CTC	N. Nuclear C. Citoplasma M. Membrana	-Software ImageJ	ORDINAL CUANTITATIVO (PROPORCIÓN DE CÉLULAS) NOMINAL (LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN)
Amelogenina DEPENDIENTE	-Proteína más abundante de la matriz extracelular secretada por ameloblastos diferenciados.	N. Nuclear C. Citoplasma M. Membrana	-Software ImageJ	ORDINAL CUANTITATIVO (PROPORCIÓN DE CÉLULAS) NOMINAL (LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN)
β-catenina DEPENDIENTE	-Proteína de adhesión celular, que en condiciones patológicas está implicada en vías de señalización en procesos neoplásicos.	N. Nuclear C. Citoplasma M. Membrana	-Software ImageJ	ORDINAL CUANTITATIVO (PROPORCIÓN DE CÉLULAS) NOMINAL (LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN)

Tabla 2. Variables del estudio. Fuente Directa

13. MATERIALES Y MÉTODOS

13.1. Análisis de las muestras con histoquímica

Se solicitaron seis niveles del bloque de parafina con un grosor de 4 μm sobre laminillas previamente silanizadas; De las cuales una se empleó para la tinción hematoxilina-eosina y cinco para realizar la técnica de inmunohistoquímica. Las preparaciones teñidas con HyE fueron utilizadas para clasificar a las muestras histológicamente, así como para la obtención del índice de Kappa. La determinación del tipo de ameloblastoma y las características histológicas se registraron en el instrumento “Clasificación Histológica” (**Anexo 2**).

El diagnóstico de ameloblastoma se emitió cuando la neoplasia cubrió los criterios propuestos por Vrickers y Gorlin (presencia de células columnares basales, núcleo hiper cromático en empalizada, polarización invertida, membrana basal hialina y localización), para designar el tipo se utilizó la clasificación de la OMS.

Para los casos de carcinoma ameloblástico se tomaron en cuenta que los tumores cumplieran con al menos tres de los criterios propuestos por Wooglar (2 mitosis por campo de alto poder en áreas de alto grado, presencia focal de epitelio ameloblástico, atipia citológica, necrosis, permeación vascular e invasión neural).

Para cada una de las entidades analizadas, se realizó la prueba de concordancia entre el tutor Dr. Javier Portilla Robertson y el alumno Roberto Onner Cruz Tapia. Así mismo, un patólogo oral y maxilofacial externo que en este caso fue el Dr. Brad W. Neville corroboró los diagnósticos; La comparación de los datos se realizó mediante la prueba estadística Kappa con un instrumento de recolección (**Anexo 3**) obteniendo un índice de concordancia entre alumno y tutor de 0.95 para Amb, y 0.93 para CAmb, teniendo como resultado final un índice de 0.94. Las observaciones se realizaron con un fotomicroscopio Leica DM750 y el software Leica LAZ.

13.2. Técnica de inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica (IHQ) se estandarizó para cada uno de los anticuerpos y así obtener la dilución adecuada. Se utilizaron como controles positivos los siguientes tejidos: vellosidades coriónicas para Sox2, tumor germinal mixto en el área del seminoma para Oct4A, germen dental en el órgano reducido del esmalte para amelogenina, intestino delgado para β -catenina (**Tabla 3**). El procedimiento consistió en desparafinar en xilol las laminillas y rehidratar en baños secuenciales de alcohol a diferentes concentraciones y lavar en agua destilada desionizada, se realizó la recuperación antigénica en buffer de citratos con pH 6 al 0.1M y se llevó al horno de microondas por 5 minutos a potencia 100 y 15 minutos a potencia 50 en baño maría. Se realizaron 2 lavados con PBS cada uno por 5 minutos, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% incubándolos por 20 minutos en cámara húmeda; se hicieron 2 lavados de PBS por 5 minutos y enseguida se permeabilizó con Tritón-X10 al 0.2% durante 20 minutos y se lavaron nuevamente 2 veces con PBS de 5 minutos. Posteriormente se realizó la incubación para el bloqueo de marcaje inespecífico con PBS-albúmina al 0.2% durante 20 minutos en cámara húmeda, se realizaron 2 lavados de PBS de 4 minutos. Se colocaron los anticuerpos primarios: Sox2, Oct4A, β -catenina y amelogenina con las disoluciones previamente estandarizadas en los controles: 1:200, 1:400, 1:200,1:200 respectivamente. (Tabla 3) Se colocaron en la cámara húmeda con sellado hermético durante 24 horas a 4°C. Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 4 minutos para incubar el anticuerpo secundario.

El anticuerpo secundario utilizado fue anti-mouse/rabbit que se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y 2 lavados en PBS de 4 minutos, se prosiguió a la incubación con HRP en cámara húmeda por 10 minutos seguido de 2 lavados con PBS de 4 minutos. Se empleó diaminobencidina (DAB) como revelador de cromógeno y se colocó a cada tejido durante 5 minutos; Después de aplicar el DAB, se lavaron las laminillas con agua corriente durante 5 minutos, posteriormente se realizó contratinción con hematoxilina durante 5 minutos más.

Después de ser retiradas las preparaciones de la contratinción se enjuagaron con agua corriente para iniciar el montaje, el cual consistió en deshidratar las preparaciones con alcohol y xilol a diferentes concentraciones para finalizar la colocación del cubreobjetos con resina hidrofóbica.

Anticuerpos, dilución y controles positivos.

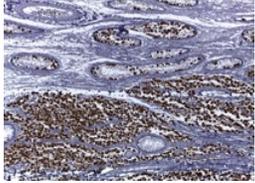
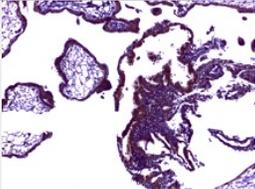
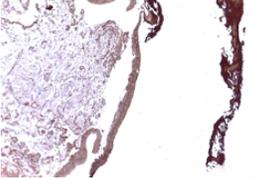
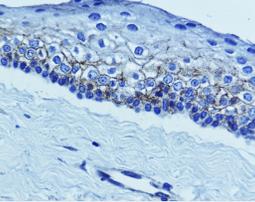
Anticuerpo	Clona/Catálogo	Tipo	Dilución	Control	Control positivo
Oct4A	C52GG3 /2890 Cell Signaling Technology®	Rabbit Monoclonal	1:400	Tumor germinal mixto (seminoma)	
Sox2	E4/SC-365823 Santa Cruz® Biotechnology	Mouse Monoclonal IgG ₁	1:200	Vellosidades coriónicas (placenta)	
Amelogenina	F-11/SC-365284 Santa Cruz® Biotechnology	Mouse Monoclonal IgG ₁	1:100	Folículo dental (OR del esmalte)	
β-catenina	EP35/ bsb5080 Bio SB®	Rabbit Monoclonal IgG	1:200	Epitelio Sano (Mucosa oral)	

Tabla 3. Fuente directa

13.3. Análisis de la inmunorreacción

La inmunorreacción de las células se analizó por medio del programa ImageJ® versión 1.46, ajustado a la escala micrométrica, en un microscopio óptico de la marca Leica DM750 con cámara digital para el análisis de imagen por computadora seleccionado para fines de este estudio, el número total de células por campo y el porcentaje de células positivas. Para determinar la proporción de células positivas se empleó la siguiente fórmula

Se tomaron 5 fotomicrografías a 40x de las áreas con un mayor número de células positivas a cada marcador IQH. Las imágenes fueron guardadas en formato “.jpg” para su posterior análisis. Se realizó la cuantificación de máximo 100 células neoplásicas teñidas de color marrón (positivas) con la herramienta “Multi point”. Se procedió a convertir las fotografías a escala de grises ya marcadas para conteo celular y cambio de píxeles a 2.0 obteniendo las densidades ópticas. Para obtener las categorías de inmunoexpresión nulo (0), leve (+), moderado (++) e intenso (+++), se procedió a calibrar por medio de escalas de grises asignando por rangos de densidad óptica a cada una de las categorías de inmunoexpresión.

Para determinar la localización de la inmunoexpresión, se observaron todas las laminillas escaneando todo el tejido a 40x en un microscopio óptico de la marca Leica DM750 registrando su patrón de expresión en la base de datos como (N) para núcleos, (C) para citoplasmas y (M) para membranas, así mismo si su reacción era mixta se colocaron las letras correspondientes.

13.4. Plan de análisis

Los resultados obtenidos se analizaron a través de medidas de tendencia central y dispersión para describir a la población, mientras que el análisis comparativo por medio de una prueba no paramétrica U de Mann Whitney para ver asociación entre grupos, tomando una $P < 0.05$ como significativo.

13.5. Aspectos éticos

De acuerdo en la declaración de Helsinki adoptada en 1964 en Finlandia y enmendada en 2013 en Brasil el presente proyecto no requiere consentimiento informado ni aprobación por el comité de ética debido a que no se llevará a cabo en seres vivos.

13.6. Recursos

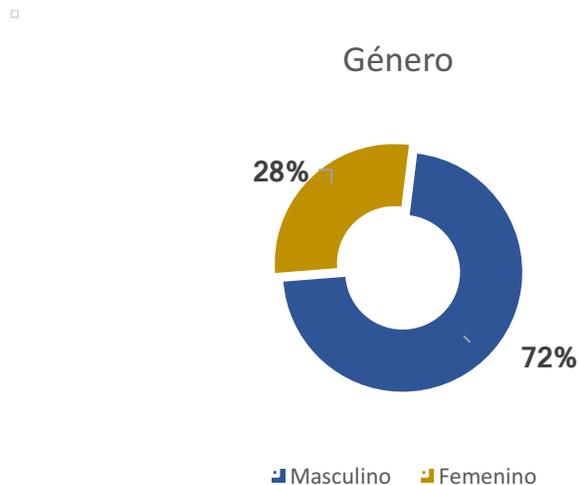
Este proyecto fue financiado con recursos económicos derivados del programa PAPIIT IN223414.

14. RESULTADOS

14.1. Estadísticos descriptivos.

Se analizaron un total de 32 muestras, de las cuales 18 correspondieron al grupo de Amb, mientras que 14 al grupo de CAmb.

De las 18 muestras de ameloblastoma analizadas, el 83% fueron obtenidas de pacientes masculinos el 17% del femenino. La edad promedio de que los pacientes en los cuales se obtuvo la muestra (biopsia o resección) fue de 28.1 años con una desviación estándar DE ± 12.9 . La localización anatómica de donde se obtuvo una mayor cantidad de muestras fue la mandíbula en un 95% comparada con el 5% en los maxilares. **Gráfica 1**

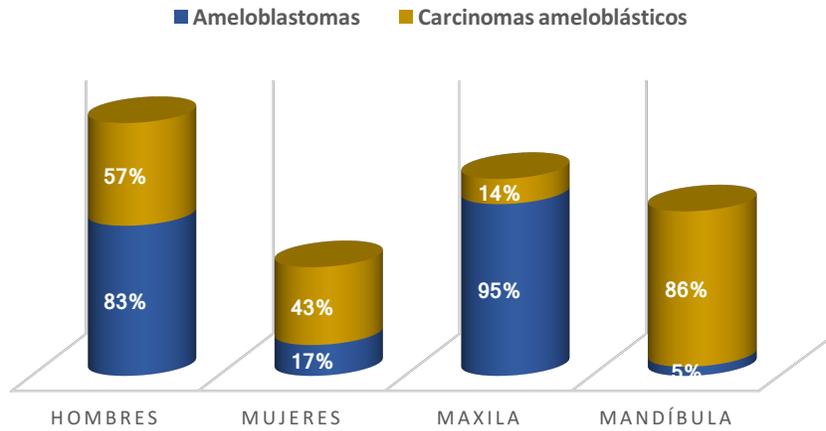


Gráfica 1. Representación del género en la muestra. Fuente directa

Catorce muestras de carcinoma ameloblástico en total fueron analizadas en este estudio, de las cuales el 57% de ellas correspondieron al género masculino y 43% al femenino. La edad promedio en la que los pacientes fueron intervenidos fue de 58.6 años con una DE ± 18.6 . La localización anatómica que predominó fue

similar a la de los ameloblastomas, las muestras mandibulares representaron el 86% y las maxilares el 14%. **Gráfica 2**

GÉNERO, TUMOR Y ÁREA ANATÓMICA AFECTADA



Gráfica 2. Representación del tipo de tumor y área anatómica afectada.

14.2. Hallazgos histopatológicos de la muestra

La observación microscópica de las 18 muestras de Amb se realizó con la técnica de histoquímica HyE, las cuales fueron analizadas y categorizadas con base en sus características histopatológicas en tipos y variantes según la OMS.

Del grupo de Amb, 12 muestras (67%) se clasificaron como ameloblastomas convencionales debido a que se trató de neoplasias con dos patrones de crecimiento histológicos: folicular (8 muestras) y plexiforme (4 muestras). Hubo 2 tumores que presentaron combinación de ambos patrones y que, además exhibían características citológicas de atipia como pérdida focal de la empalizada periférica y la polaridad nuclear invertida, duplicación del estrato basal y mitosis. En algunas áreas se identifican células de poligonales a redondas con citoplasma moderado, núcleos redondos con picnosis y cromatina compactada. Las variantes histológicas que se reconocieron en los Amb foliculares fueron 2 muestras con metaplasia escamosa en el centro de las islas (acantomatoso), una muestra presentó extensa fibrosis estromal que condicionaba la compactación de los folículos (desmoplásico) y otra muestra con presencia de células con citoplasma amplio eosinófilo y granula en las áreas que semejan el retículo estrellado (variante de células granulares).

En el mismo grupo Amb, se clasificaron 6 neoplasias (33%) como AmbU debido a que su patrón de crecimiento era predominantemente quístico, sin embargo, 3 de ellas presentaron proliferación epitelial en islas y cordones de diferentes tamaños dentro de la pared fibrosa por lo que se les designó con la variante mural. Así mismo, 2 muestras presentaron proyecciones hacia el espacio luminal donde predominó el patrón plexiforme. Finalmente, solo una variante intraluminal fue identificada presentando áreas de grosor irregular en el epitelio quístico donde la proliferación de células se limitaba al epitelio de revestimiento sin infiltrar la pared fibrosa o proyectarse al espacio luminal del quiste. **Imagen 16**

Como se mencionó anteriormente, 14 muestras de carcinoma ameloblástico fueron analizadas para este estudio y se clasificaron con base en los criterios histopatológicos de malignidad: más de 2 mitosis por campo de alto poder en áreas de anaplasia, presencia focal de empalizada periférica, atipia citológica,

presencia de necrosis, permeación vascular e invasión neural. Sin embargo, Wooglar y cols. dice que los CAmb pueden o no presentar todas las características que el describe y enfatiza que la permeación a vasos e infiltración neural es solo un hallazgo, y debido a eso, para este estudio tomamos en cuenta que las neoplasias presentaran al menos 3 de las características de malignidad para clasificarlas en CAmb, siendo la atipia citológica, necrosis y presencia focal de empalizada periférica los hallazgos más frecuentes en la muestra. **Imagen 16**

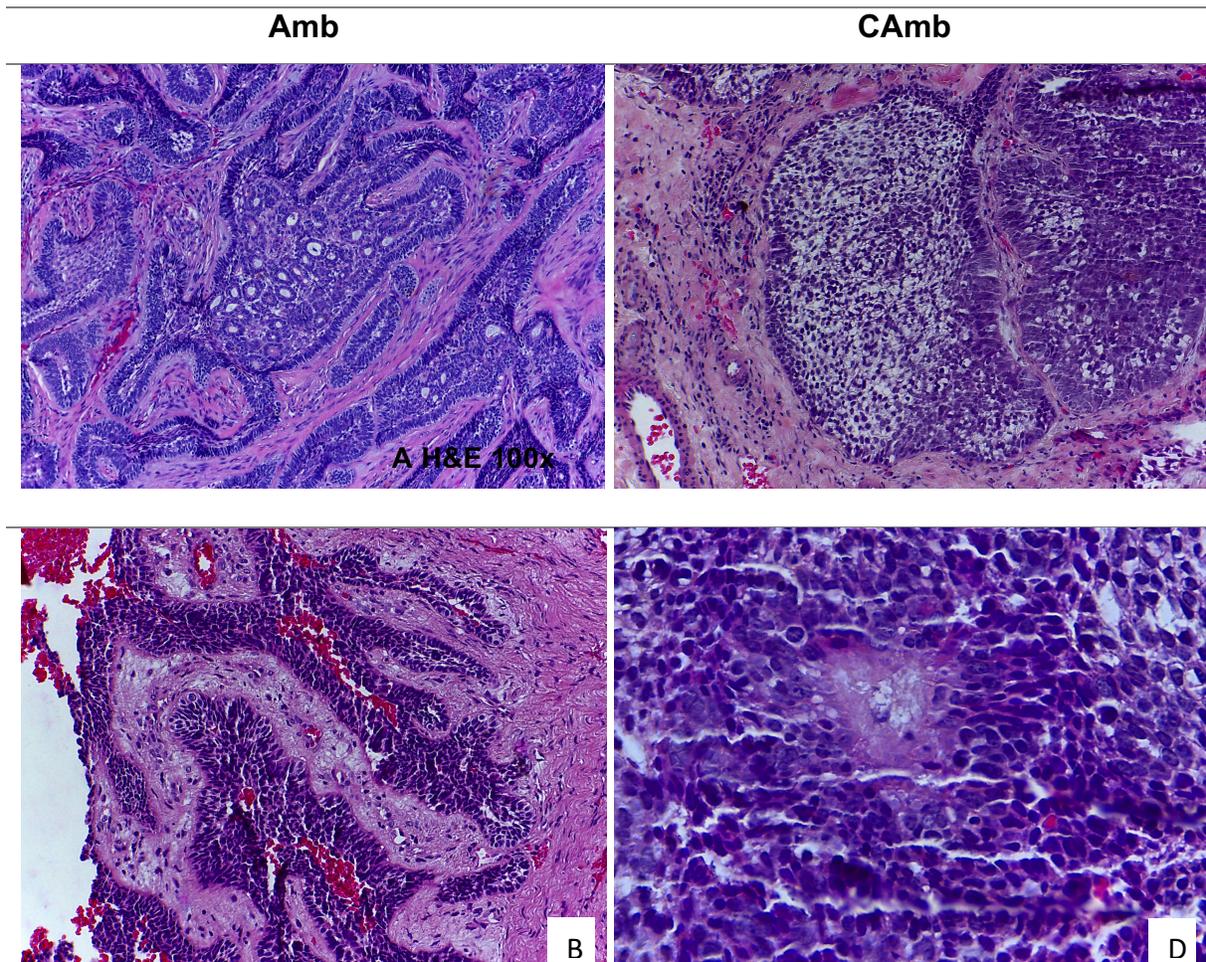


Figura 17. A. Fotomicrografía de Amb, **B.** Fotomicrografía de AmbU con proliferación mural, **C.** Fotomicrografía de CAmb, **D.** Fotomicrografía de atipia celular y necrosis en CAmb
(Fuente directa)

14.3. Hallazgos en la prueba de inmunohistoquímica

La expresión de los marcadores de inmunohistoquímica que se evaluaron en los grupos se presentó en diferentes patrones considerando las siguientes localizaciones: (N) para núcleos, (C) para citoplasma, (M) para membrana o (Mix) para las diferentes combinaciones, haciendo un comparativo en los mismos campos con los diferentes marcadores. Los patrones e intensidades fueron diversos y se ejemplifican en la **Figura 18**.

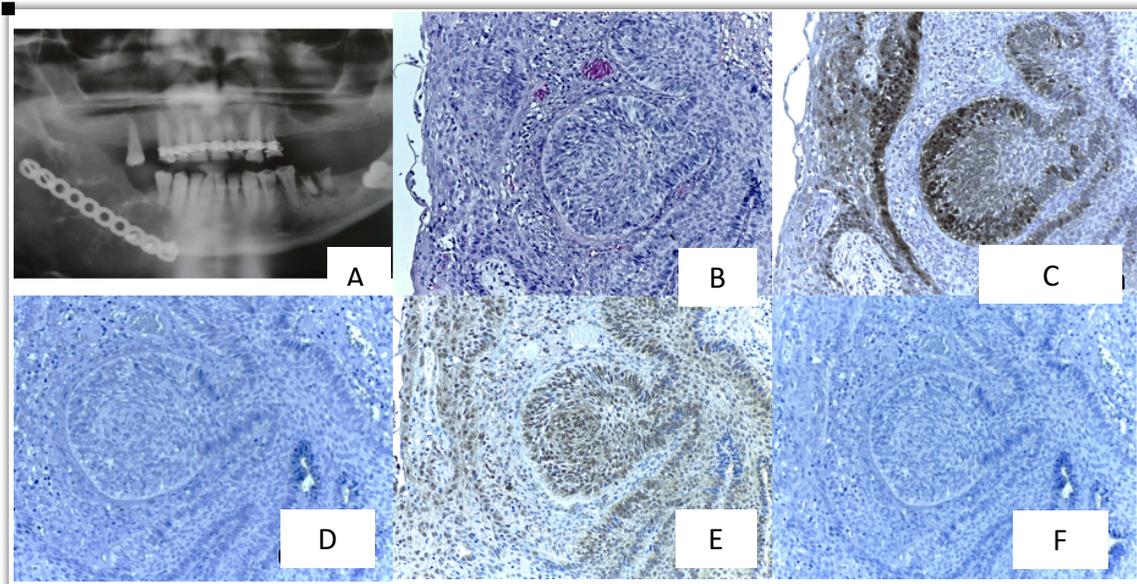


Figura 18. A. Radiografía de Amb recurrente, B. Tinción de rutina HyE, C. Inmunoexpresión para β -catenina, D. Inmunoexpresión para Oct.4A, E. Inmunoexpresión para amelogénina, F. Inmunoexpresión para Sox2.

Fuente Directa: Departamento de Patología Bucal UNAM

En la **Tabla 11** se ejemplifica la expresión que presentaron los diferentes tipos de tumores analizados con los anticuerpos.

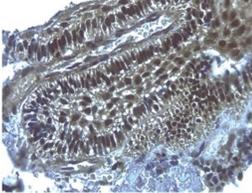
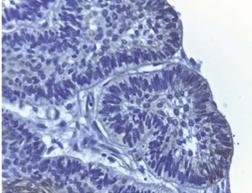
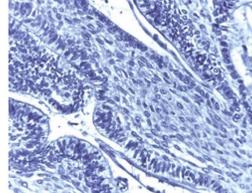
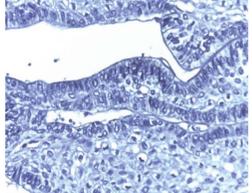
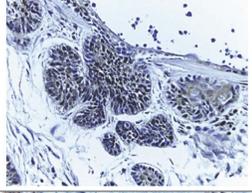
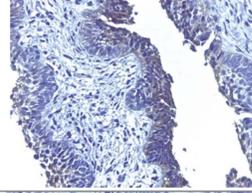
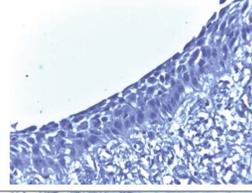
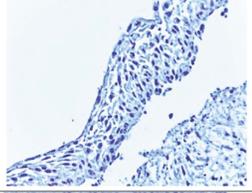
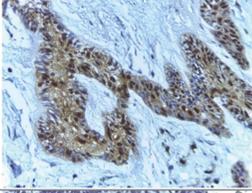
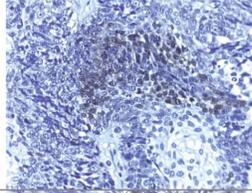
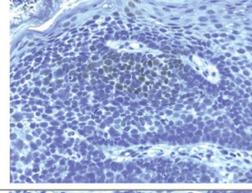
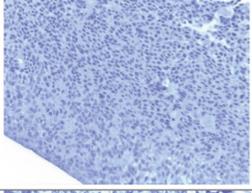
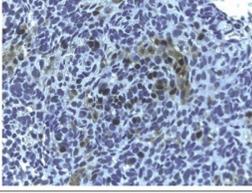
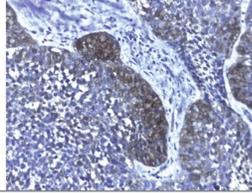
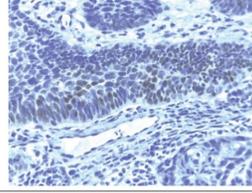
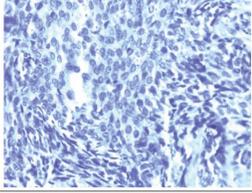
	Amelogenina	β -catenina	Sox2	Oct4A
Amb				
AmbU				
AmbA				
CAmb				

Tabla 11. Comparación del patrón de expresión de los marcadores en muestras de Amb, AmbU, AmbA (ameloblastoma atípico) y CAmb

14.4. Localización de la expresión inmunohistoquímica en los Amb

La expresión del anticuerpo Amg en los ameloblastomas se presentó en 2 patrones: predominantemente nuclear y de manera intensa con el 62%, el 42% tuvo expresión en citoplasma, núcleo y membrana (mixto) con variable nivel de intensidad. **Tabla 4.** El 59% de las muestras presento positividad a β -catenina en patrones e intensidades siendo el citoplasma la localización más frecuente con un 22%, la expresión únicamente nuclear se presentó en el 16% de los casos; de igual manera, otro 16% de la población presento positividad combinando varias localizaciones como núcleo y citoplasma (mixto), el 5% de las muestras presentó expresión en la membrana citoplasmática. **Ver Tabla 5**

La expresión considerada como positiva para el anticuerpo Sox2 en el estudio fue exclusivamente en el núcleo de las células neoplásicas; donde solo el 11% de los Amb presento reacción con intensidad de leve a moderada. **Tabla 6** La expresión para Oct4A fue negativa en todas las muestras.

Localización e intensidad de la expresión de Amg en Amb				
Nivel de Expresión	Casos Positivos n(%)	Leve (+)	Moderado (++)	Intenso (+++)
	18 (100%)	3	7	8
Nuclear	11 62%	2 18%	5 54%	4 36%
Mixto	7 38%	1 15%	2 28%	4 57%

Tabla 4. Fuente directa

Localización e intensidad de la expresión de β -catenina en Amb				
Nivel de Expresión	Casos Positivos	Leve	Moderado	Intenso
	n(%)	(+)	(++)	(+++)
	12 (61%)	6	2	4
Nuclear	3 16%	2 67%	1 33%	-
Citoplasma	4 22%	2 50%	-	2 50%
Membrana	1 5%	-	1 100%	-
Mixto	4 16%	2 50%	-	2 50%
Negativo	6 41%	-	-	-

Tabla 5. Fuente directa

Localización e intensidad de la expresión de Sox2 en Amb				
Nivel de Expresión	No. Casos	Leve	Moderado	Intenso
		(+)	(++)	(+++)
	2 (11%)	1	1	-
Nuclear	2 11%	1 50%	1 50%	-
Negativo	16 89%	-	-	-

Tabla 6. Fuente directa

14.5. Localización de la expresión inmunohistoquímica en los CAmb

La localización para Amg en el grupo CAmb predominó en el núcleo con el 58% de manera intensa, el 38% presento expresión leve en el núcleo y citoplasma, el 1% restante fue negativo. Ver **Tabla 7**. La expresión para β -catenina en los CAmb fue intensa en núcleo y citoplasma en el 35% de los casos, el 15% solo membranosa y 15% solo citoplasmática con una reacción moderada en ambos casos, 15% de los casos la expresión fue solo nuclear de manera intensa, y 20% fueron negativos. **Tabla 8**.

La intensidad para Sox2 fue exclusivamente nuclear de manera intensa en el 30% de los casos, el 8% presento positividad nuclear y citoplasmática moderada. La expresión para Oct4A fue negativa en todas las muestras. Ver **Tabla 9**

10.1. Evaluación de la intensidad y proporción de la expresión.

La proporción de cada uno de los marcadores fue diversa en cada muestra; En la **Tabla 10** se muestran los promedios y desviación estándar de las células positivas en cada uno de los grupos.

Se identificó que la proporción de células positivas para amelogenina en los Amb fue mayor en comparación al CAmb. Las células presentaron mayor intensidad de reacción para β -catenina en los Amb, la proporción de células positivas para este mismo marcador fue mayor en los CAmb. La proporción de células Sox2 fue mayor en los CAmb en comparación a los Amb.

Localización e intensidad de la expresión de Amg en CAmb				
Nivel de expresión	Casos Positivos	Leve	Moderado	Intenso
	n(%)	(+)	(++)	(+++)
	13 (92%)			
Nuclear	7 50%	5 70%	2 30%	-
Mixto	6 38%	2 34%	3 50%	1 16%
Negativo	1 12%	-	-	-

Tabla 7. Fuente directa

Localización e intensidad de la expresión de β-catenina en CAmb				
Nivel de expresión	Casos Positivos	Leve	Moderado	Intenso
	n(%)	(+)	(++)	(+++)
	10 (71%)	3	5	2
Nuclear	4 30%	1 25%	2 50%	1 25%
Citoplasma	3 20%	1 33%	2 67%	-
Mixto	3 20%	1 33%	1 33%	1 33%
Negativo	4 30%	-	-	-

Tabla 8. Fuente directa

Localización e intensidad de la expresión de Sox2 en CAmb

Nivel de expresión	Casos Positivos	Leve	Moderado	Intenso
	n(%)	(+)	(++)	(+++)
	5 (35%)	2	1	2
Nuclear	5 35%	2 40%	1 20%	2 40%
Negativo	9 65%	-	-	-

Tabla 9 Fuente directa

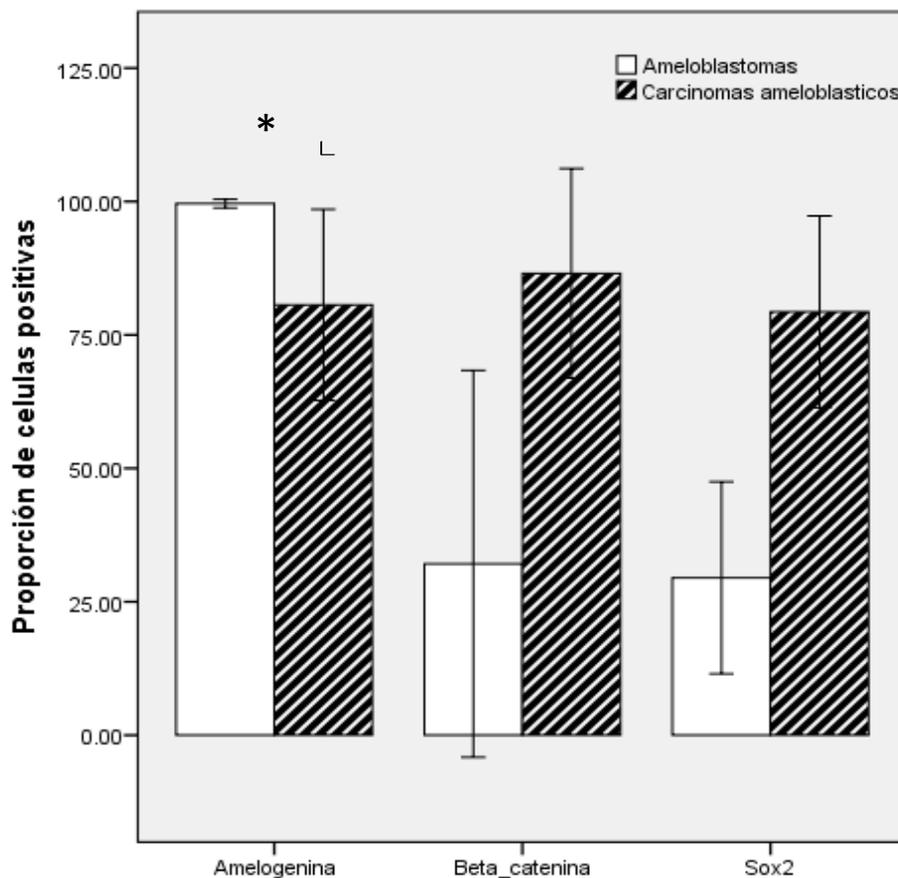
Proporción de células positivas para Amg, β-catenina, Sox2 en Amb y CAmb

Anticuerpo	Proporción de células (DE)	Neoplasia
Amg	89.44 ± 26.06	
β-catenina	75.40 ± 20.28	Amb
Sox2	29.95 ± 12.78	
Amg	76.72 ± 24.45	
β-catenina	86.25 ± 16.56	CAmb
Sox2	61.92 ± 21.84	

Tabla 10. Fuente directa

Se realizó el análisis estadístico U de Mann-Withney para dos grupos no paramétricos tomando como significativo una $p < (0.05)$, buscando diferencias para la proporción de células positivas a cada marcador entre grupos siendo significativa la expresión de amelogenina ($p=0.018$), así mismo no se encontró diferencia significativa para Sox2 ($p=0.61$) ni para β -catenina ($p=0.095$).

ver **Gráfica 5**



Gráfica 5 . Prueba U de Mann-Withney para la proporción de células positivas a los marcadores

11. DISCUSIÓN

La caracterización de los Amb y CAmb se ha basado evaluar el perfil de expresión a ciertos marcadores de diferenciación celular, mutaciones en genes para terapias blanco, así como su proliferación; Existen pocos estudios realizados para evaluar factores de transcripción. Comprender la histogénesis de los tumores odontogénicos es el punto de partida para poder establecer teorías y procesos involucrados en su desarrollo y transformación maligna.

Nuestro estudio incluye 14 muestras de CAmb, que debido a su baja frecuencia le da gran significancia, ya que este trabajo reporta la serie de casos más grande publicada en México; actualmente la OMS establece que el CAmb no cambia su pronóstico en cuanto si se originó de una lesión preexistente o *de novo*,¹⁻⁴ sin embargo y de acuerdo en algunas revisiones sistemáticas, el Amb en comparación a su CAmb presenta similitud en agresividad y progresión, sin embargo, el término ameloblastoma “benigno” causa controversia, pues al igual que su contraparte maligna tiende a infiltrar y destruir los huesos maxilares, comprimir nervios e inclusive desarrollar la habilidad de producir metástasis¹⁻⁴

Si valoramos al Amb junto a otras neoplasias agresivas en el organismo, específicamente con aquellas que comparten características morfológicas de malignidad se les denominan limítrofes o borderline. Como bien se sabe el Amb atípico presenta características histológicas y clínicas de malignidad de manera focal, por lo cual numerosos intentos de caracterizarlo siguen aún modificándose, nosotros consideramos que el comportamiento “benigno” del ameloblastoma no solo está en duda en las características histológicas, sino también en su caracterización molecular, se ha determinado que el CAmb presenta pérdidas en genes implicados en la regulación del ciclo celular, así mismo expresa marcadores involucrados en la transición meséquimo-epitelial que está directamente relacionada con la transformación maligna pero estos hallazgos aun no son específicos de estos carcinomas ya que también son expresados por algunos ameloblastomas a los que se les denomina “agresivos”. Estos hechos dejan en

evidencia la complejidad de estos tumores para su clasificación y la limitada información que brinda el estudio histológico.

El objetivo de este estudio se enfocó a comparar la expresión de dos factores de transcripción involucrados en la progresión tumoral en Amb y CAmb, estos factores de transcripción (Sox2 y Oct4A) han sido estudiados en otros cánceres como carcinoma escamoso de esófago y de pulmón, cuya expresión está relacionada con el mal pronóstico.³⁵ estos factores de transcripción están relacionados no solo con el pronóstico de las neoplasias, si no en su potencial de proliferación, el destino celular y el mantenimiento de las células

Varias teorías se han propuesto para explicar la patogénesis de los ameloblastomas, el objetivo de entender su comportamiento y los mecanismos involucrados en la proliferación celular están encaminados al desarrollo de terapias dirigidas y tratamientos efectivos.³ En nuestro estudio incluimos 2 factores de transcripción que de manera normal se encuentran expresados en el desarrollo embrionario, específicamente en el estadio de blástula y estas expresiones se continúan hasta la organogénesis, su finalidad es el mantenimiento de las células troncales pluripotenciales embrionarias CTPE. Sox2 es un factor de transcripción que se ha estudiado en varios tumores donde se ha identificado que su presencia está implícita en la proliferación celular, tumorigénesis y metástasis; Factores que establecen un mal pronóstico en los pacientes.¹⁸⁻²⁰

Previo a nuestro estudio, Liu y cols. en 2014 realizaron el primer análisis comparativo de Amb y CAmb con Sox2; Concluyen que la expresión de Sox2 es potencial para CAmb y agregan que se deben complementar marcadores de proliferación celular para establecer con certeza el diagnóstico de CAmb. Sin embargo, reportan positividad en algunas muestras de ameloblastomas.⁴⁸

En nuestro estudio el 35% de los CAmb fueron positivos a Sox2 en diferentes grados de intensidad predominado su expresión intensa, por otro lado, el 12% de los Amb también presentaron leve expresión nuclear; un hallazgo que cabe resaltar en los Amb fue que solo las islas y nidos de proliferación mural de los AmbU presentaron expresión a este marcador, así como en las áreas de atipia celular de un Amb folicular. Esto nos hace pensar en los siguientes puntos: 1. La

expresión de Sox2 es sensible para los CAmb pero no específica, y 2. La expresión de Sox2 no es un parámetro para determina malignidad o transformación maligna en los Amb sino un potencial marcador de progresión tumoral; Existen herramientas como PCNA o Ki67 para cuantificar proliferación celular, ya que se utilizan como índices, nosotros interpretamos y proponemos con base en nuestros resultados y lo reportado a Sox2 como un factor de progresión tumoral a nivel de proliferación celular en los Amb y CAmb. Saigusa y Cols. estudian la expresión de Sox2 a nivel inmunohistoquímico y ARNm asociando su sobreexpresión con el tiempo de sobrevida de los pacientes y el tiempo libre de enfermedad en pacientes con carcinoma colorrectal.⁵⁴⁻⁵⁹

En un metaanálisis realizado en el 2014 por Weimin Li y cols. indican que la expresión de SOX2 se asoció con parámetros clínicos evaluados en el índice TNM y profundidad de invasión en los cánceres de cabeza y cuello, Además, la expresión positiva de SOX2 se asoció con un mal pronóstico en comparación que fueron negativos, SOX2 fue un factor independiente asociado con una supervivencia reducida. En nuestro estudio, no podemos relacionar la expresión de Sox2 con el pronóstico, ya que la conducta biológica es diferente en ambos establecer y buscar su asociación con la expresión de esta molécula, requiere de más estudios.⁵⁹

Hasta la fecha no hay estudios publicados de la expresión de Oct4A en tumores ameloblásticos, nuestro estudio al utilizar este marcador por primera vez en estos tumores, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros utilizados en otras neoplasias: Oct4A es un factor de transcripción expresado por las CTPh y está implicado en la auto-renovación de las células pluripotentes, los hallazgos muestran que la expresión de Oct4A es nuclear mientras que Oct4B es citoplasmático, cabe señalar que en nuestro estudio todas las muestras fueron negativas, pudiendo interpretarse como un indicador en la diferencia pronostica del CAmb. Malta da Cunha menciona que la pluripotencialidad de las células debería ser atribuida a Oct4A que es una de las isoformas del gen Oct4, ya que esta es una proteína nuclear que estudio en diferentes estadios de la odontogénesis, done su intensidad de marcaje depende de cada estadio.

Sugiriendo que hay una relación entre las proteínas y el potencial de auto-renovación de las células y su capacidad de proliferación.⁵³⁻⁵⁴

La señalización de la vía WNT es importante en múltiples estadios de la odontogénesis, puede ser localizada en la lámina dental y el ectomesénquima subyacente. La activación de β -catenina como la vía canónica en células embrionarias se ha encontrado necesaria para la proliferación sobre vida celular migración y diferenciación como un paso necesario para la formación del diente, su activación se conoce como una causa de arresto en el desarrollo. Nosotros encontramos una mayor expresión de β -catenina en los carcinomas ameloblásticos en comparación a los ameloblastomas sin embargo la intensidad de expresión fue mayor en los Amb. La localización más frecuente para β -catenina en los CAmb fue nuclear lo que nos hace pensar que está actuando como un factor de transcripción implicado en la progresión del tumor ya que los casos con positividad nuclear a Sox2 también expresaron β -catenina.

Por otro lado, Liu y cols. establecen como motivo de estudio la posible activación de la cascada de señalización WNT β -catenina. En nuestro estudio podemos inferir la activación de esta vía en los Amb y CAmb por su expresión nuclear y citoplasmática; sin embargo, esto tiene que ser aún más estudiado.⁴⁸

Con respecto a la expresión de amelogenina en nuestra muestra encontramos mayor expresión en los ameloblastomas en comparación a los CAmb presentando mayor intensidad en los ameloblastomas que en los carcinomas, lo que nos hace pensar que conforme el tumor progresa hacia la malignidad deja de expresar esta proteína y podría ser utilizado como un parámetro de desdiferenciación.

La evidencia reciente marca como posibles funciones a la amelogenina no solo en la mineralización de la matriz del esmalte sino también como moléculas de señalización en células mesenquimales incluyendo el ligamento periodontal y la osteoclastogénesis, activadas por diferente vía de señalización.⁵¹⁻⁵²

La expresión de Amg se presenta en los ameloblastos secretores y esta se mantiene hasta que termina su ciclo En donde se encuentra WNT β -catenina lo que nos hace pensar que pueda existir una relación entre la expresión de β -

catenina y amelogenina como un marcador de diferenciación celular y no necesariamente como un proceso de cambio neoplásico. ⁵

Sox2 y Oct4, cada uno de ellos, pertenece a una familia de factores de transcripción con una función clave en los estados del desarrollo en mamíferos. Similar a Oct4, la expresión de Sox2 inicia durante la embriogénesis temprana, la expresión en el cigoto de esta proteína comienza en el estadio de mórula, donde es preferentemente localizado en la masa celular interna, durante el estadio del blastocisto Sox2 se restringe únicamente a la masa celular interna de la mórula. Sox2 también se expresa en un linaje celular germinal. ²⁸ Por lo que hemos relacionado que la función de estos marcadores en los Amb y CAmb está enfocado al mantenimiento de las células neoplásicas más que en su transformación.

12. CONCLUSIONES

- Los Amb y CAmb tienen expresión a Sox2 como un marcador potencial de progresión tumoral, sin embargo, su expresión es mayor en CAmb debido a su potencial de proliferación.
- La expresión de amelogenina es intensa en los Amb y esta va disminuyendo o se pierde en los CAmb, y sugerimos que puede utilizarse como un marcador de diferenciación ameloblástica y su asociación con la transformación maligna.
- La expresión de Sox2 en Amb es un parámetro importante que debe ser tomado en cuenta para el tratamiento de los pacientes, pues debido a su capacidad de proliferación se pueden crear protocolos para evitar la permanencia y disminuir la recurrencia.
- β -catenina se expresó de manera intensa nuclear en la mayoría de los CAmb y algunos Amb, lo que nos hace pensar en que está actuando como un factor de transcripción en la expresión de genes implicados no solo en la progresión tumoral, si no en la diferenciación de las células neoplásicas, por lo que su importancia biológica debe seguir estudiándose.
- La negatividad a Oc4A nos hace pensar que la activación de genes neoplásicos está relacionada con otros genes activados por diferentes vías de activación en donde pueda estar implicado Sox2 y β -catenina.

Perspectivas a futuro.

La alta tasa de recurrencia en el Amb y CAmb puede ser atribuida a su potencial de proliferación, por lo que sería necesario enfocar los estudios en la permanencia y progresión de las células neoplásicas para comprender completamente la conducta de estas neoplasias y crear protocolos de tratamiento.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T., Slootweg P.J., WHO Classifications of Head and Neck Tumours (4th Edition).
2. Wright J. M., Vered M. Update from the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours Head and Neck Pathology. 2017; 11:68-77
3. Nagi R., Sahu S., Rakesh N. Molecular and genetic aspects in the etiopathogenesis of ameloblastoma J Oral Maxillofac Pathology. 2016; 20 (3) 497-503
4. Panda S., Ranjan Sahoo S., Srivastav G., y cols. Pathogenesis and Nomenclature of Odontogenic carcinomas. Journal of Oncology. 2014
5. Tanahashi J., Daa T., Yada N., et al. "Mutational analysis of Wnt signaling molecules in ameloblastoma with aberrant nuclear expression of β -catenin" J Oral Pathol Med. 2008; 37:565-570
6. Gonçalves Diniz M., Cavalieri Gomes C., Antonini Guimarães B. V., et al. "Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours" Tumor Biol. 2015; 36:5649-5653
7. Sweeney R., McClary A., Myers B., et al. "Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas" Nature genetics. 2014; 46:1038-2986
8. Bologna Molina R., Mosqueda Taylor A., Molina Frechero N., et al. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors Oral Medicine and Pathology. 2013; 18(2):174-9
9. Kumar pal S., Sakamoto K., Aragaki T., et al. "The expression profiles of acidic epithelial keratins in ameloblastoma" Oral and Maxillofacial Pathology. 2013; 115:523-531
10. Keun Lee S., Sook Kim Y. Ameloblastoma and Adenomatoid Odontogenic Tumor. The Korean Journal of Pathology. 2013; 47:191-202

11. García Muñoz A., Bologna Molina R., Aldape Barrios B., et al. Identification of Proteins with Increased Levels in Ameloblastic Carcinoma. *Surgical Oncology and Reconstruction*. 2013; 72:1183-1196
12. Kumamoto H., Ooya K. Immunohistochemical detection of β -catenin and adenomatous polyposis coli in ameloblastomas” *J Oral Pathol Med*. 2005; 34:401-6
13. Jayaraj G., Sherlin H. J., Ramani P., et al. Metastasizing Ameloblastoma *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2014; 42:772-779
14. Carranza Carranza A., Sánchez Bernal M., Olano Acosta M., y cols. Ameloblastoma maligno de células claras 7 Congreso virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2005
15. Matsushita Y., Fujita S., Yanamoto S., y cols. “Spindle cell variant of ameloblastic carcinoma” *Oral and Maxillofacial Pathology*. 2015; 121:e54-e61
16. L. Barnes J. W. Everson, P. Reichart, and D. Sidransky, Eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Head and Neck Tumors, IARC Press, Lyon, France, 2005.
17. Panda S., Ranjan S., Srivastav G., et. al. Pathogenesis and Nomenclature of Odontogenic Carcinomas Revised. *Journal of Oncology* Volume 2014, article ID 197425, 9.
18. Wooglar J., Triantafillou A., Ferito A., DevaneyetK., et. al. Intraosseous carcinoma of the jaws –A clinicopathologic review. Part I: Metastatic and salivary-type carcinomas. *Head and Neck* 35: 895-901, 2013.
19. Wooglar J., Triantafillou A., Ferito A., DevaneyetK., et. al. Et. al. Intraosseous carcinoma of the jaws: A clinicopathologic review. Part II: Odontogenic Carcinomas. *Head and Neck* 35: 902-905, 2013.
20. Wooglar J., Triantafillou A., Ferito A., DevaneyetK., et. al. Et. al. Intraosseous carcinoma of the jaws: A clinicopathologic review. Part III: Primary intraosseous squamous cell carcinoma. *Head and Neck* 35: 906-909, 2013.

21. Pindborg JJ, Kramer IR, Torloni H. Histological Typing of Odontogenic Tumors, Jaw Cysts and Allied Lesions. Geneva: World Health Organization; 1971. pp. 35–6.
22. Elzay RP. Primary intraosseous carcinomas of the jaws. Review and update of odontogenic carcinomas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1982;54:299–303.
23. Jindal C, Palaskar S, Kaur H, Shankari M. Low-grade spindle-cell ameloblastic carcinoma: report of an unusual case with immunohistochemical findings and review of the literature. Curr Oncol. 2010;17:52–7
24. Kawauchi S, Hayatsu Y, Takahashi M, Furuya T, Oga A, Niwa S, et al. Spindle-cell ameloblastic carcinoma: a case report with immunohistochemical, ultrastructural, and comparative genomic hybridization analyses. Oncol Rep. 2003;10:31–4.
25. Ismail SB, Zain RB, Yaacob HB, Abraham MT. “Ameloblastic carcinoma (spindle cell variant”) Pathology. 2009;41:292–5.
26. Bello IO, Alanen K, Sloopweg PJ, Salo T. “Alpha smooth actin within epithelial islands is predictive of ameloblastic carcinoma.” Oral Oncol. 2009;45:760–5.
27. Richard J., Zarbo, Marunick y Robert Johons. Malignant Ameloblastoma, Spindle Cell Variant. Arch Pathol Lab Med- Vol 127, March 2003.
28. Venketech V. Kamath, Krishnanand Satelur y Komali Yerlagudda. Spindle cell variant of ameloblastic carcinoma from a unicystic ameloblastoma: Report of a rare case. Dental Research Journal 2012 May-Jun; 9(3): 328-333.
29. Karan Dhir, James Sciubba, Ralph P. Tufano. Ameloblastic carcinoma of the maxilla. Oral Oncology (2003) Elsevier 39 736-741.
30. S.K. Roy Chowdhury. S Remen, P.K. Chattopadhyay, et. al. Ameloblastic Carcinoma or the mandible. J. Maxillofac. Oral Surg (June 2010) 9(2):198-201.

31. Lau S., Tideman H., y Wu P., Ameloblastic carcinoma of the jaws, Oral surg Oral Med Oral Pathol Radio Endod 1998;85:78-81.
32. Avon S., McComb J., Clokie C., Ameloblastic Carcinoma: Case Report and Literature Review. Journal of the Canadian Dental Association. October 2003, Vol. 69, No.9.
33. Lu T., Chen X., Zhang WZ., Ameloblastic Carcinoma of The Jaws. Asian J. Oral Maxillofac surg. 2006
34. Datta R., S J. Winston, Díaz Reyes G. y cols., Ameloblastic Carcinoma: Report of an Aggressive Case With Multiple Bony Metastases. American Journal of Otolaryngology, Vol 24 No. 1 (January-February), 2003: 64-69.
35. Pundir S., Saxena S., Rathod V., Ameloblastic carcinoma: Secondary dedifferentiated carcinoma of the mandible: Report of a rare entity with a brief review. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology Vol. 15 issue 2 May-Aug 2001. Pag. 201-204.
36. Kizito C. Ndukwe, Emmanuel K. Adebisi, Wasiu L. Adeyemo. Ameloblastic Carcinoma: A Multicenter Nigerian Study. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 2010. 0278-2391/10/6809-0013.
37. Yoon H., Hong S., Lee J., Lee S., et. al. Ameloblastic carcinoma: an analysis of 6 cases with review of the literature. Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;109:904-913.
38. James Hall, Dwight R. Weathers, et al. Ameloblastic carcinoma: An analysis of 14 cases. Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103:799-807.
39. Anni Suomalainen, Jarkk Hietanen, Soraya Robinson et al. Ameloblastic carcinoma of the mandible resembling odontogenic cyst in a panoramic radiograph. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2006;101:638-42.
40. Xiuqiu Gao, Guannan Wang, Yun-Kai Zhang. Expression and mechanism of regulation of PP2A/Pr65 in ameloblastoma. The Surgeon, Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland. 12(2014) 129-133.
41. Arash Khojasteh, Abbas Khodayari, Faezaneh Rahimi et. al. Hypermethylation of p16 Tumor-Suppressor Gene in Ameloblastic

- Carcinoma, Ameloblastoma, and Dental Follicles. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 0278-2391/13/71001-0.
42. Hsing-Hao, Sau-Tung Chu, Yu-yi Huo, et. al. Spindle Cell Carcinoma of the Oral Cavity and Oropharynx: Factors Affecting Outcome. Chin Med Assoc October 2006 Vol 69 No. 10 pag, 478-483.
43. Samir Kumar Pal, Kei Sakamoto, Tadanobu Aragaki et. al. The expression profiles of acidic epithelial keratins in ameloblastoma, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol vol. 115 No. 4 April 2013. Pag 523-531.
44. R. Torembeek, M.A.J.A. Hermensen, G.A. Meijer, et. al. Analysis by comparative genomic hybridization of epithelial of spindle cell components in sarcomatoid carcinoma and carcinosarcoma: histogenetic aspects. Journal of Pathology 189: 338-343 (1999).
45. O. de Wever, P. demetter, M. Mareel, y M. Bracke, Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. International Journal of Cancer, Vol. 45 no. 10, pp. 2229-2238, 2008.
46. Hye-Jung Yoon, Byoung-Chan Jo, Wui-Jun Shin y cols. "Comparative immunohistochemical study of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma" Oral and Maxillofacial Pathology, Vol. 112 No. 6 December 2011. Pag. 767.
47. Rima A. Safadi, Basma F Quda y Huda M. Hammad. "Immunohistochemical expresion of K6, K8, K16, K17, K19, maspin, syndecan-1 (CD138), α -SMA, and Ki-67 in ameloblastoma and ameloblastic carcinoma: diagnostic and prognostic correlations.", Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Vol. 121 No.4 April 2016. Pag. 402.
48. Yu Lei, Jumana M. Jaradat, Adepitan Owosho y cols. "Evaluation of Sox2 as a potential marker for ameloblastic carcinoma" Oral and Maxillofacial Pathology Vol 117 No.5 May 2014. Pag. 608.
49. Kennedy R. William, Werning W. Jhon y Kaye Frederic J. y col. "Treatment of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma with radiotherapy", Eur Arch Otorhinolaryngol, DOI 10.1007/s00405-016-3899-3.

50. Mazumder P., Prajapati S., Bekshe Lokappa S., Gallon V., Moradian-Oldak J.. Analysis of co-assembly and co-localization of ameloblastin and amelogenin. *Frontiers in physiology* DOI: 10.3389/fphy.2014.00274
51. Haruyama N., Hatakeyama J., Kulkarni A., Amelogenins: Multi-Functional Enamel Matrix Proteins and Their Binding Partners. *J Oral Biosci.* 2011 August 1;53(3):257-266
52. Malta da Cunha J., Costa Neves A., Kerkis I., Cavenaghi Pereira M., Pluripotent stem cell transcription factors during human odontogenesis. DOI: 10.1007/s00441-013-1658-y.
53. Rizzino A., Wuebben E., Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1859 (2016) 780-791.
54. Liu A., Yu X., Liu S., Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. DOI: 10.5732/cjc.012.10282.
55. Liu N., Lu M., Tian X., Han Z., Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. DOI: 10.1002/jcp.20978.
56. Jun H., Li J., Yue X., Wang J., Liu J., Sun L., Kong D., Expression of the cancer stem cell markers ABCG2 and OCT-4 in right-sided colon cancer predicts recurrence and poor outcomes. *Oncotarget advance publications* 2017.
57. Riajul S., Islam F., Gopalan V., King-Yin A., The Identifications and clinical implications of cancer stem cells in colorectal cancer. 1533-0028/Elsevier 2017.
58. Liu K., Lin B., Zhao M., Yang X., Chen M., Gao A., Que J., Lan X., The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.02.013.
59. Li W., Li B., Wang R., Huang D., Jin W., Yang S., SOX2 as prognostic factor in head neck cancer: a systematic review and meta-analysis. DOI:10.3109/00016489.2014.913311.
60. Prakash S., Swaminathan U., Nagamalini B., Krishnamurthy A., Beta-catenin in disease. DOI: 10.4103/0973-029X.185938.

61. Diniz M., Guimaraes B., Pereira N., Menezes G., Gomes C., Gomez R., DNA damage response activation and cell cycle dysregulation in infiltrative ameloblastomas: A proposed model for ameloblastoma tumor evolution. *Experimental and Molecular Pathology* 102 (2017) 391-395.
62. Diniz M., Gomez C., Sousa S., Xavier G., Gomez R., Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncology* 72 (2017) 165-173.
63. Heikinheimo K., Kurppa K., Elenius K., Novel Targets the Treatment of Ameloblastoma. Doi: 10.1177/0022034514560373.

ANEXO 3. INSTRUMENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL ÍNDICE DE CONCORDANCIA

Ameloblastomas

Observador 2: Roberto Onner Cruz Tapia		Observador 1: Dr. Javier Portilla Robertson								
		Uniquístico			Sólido Plexiforme	Sólido Folicular			Desmoplásico	Extraóseo
		Mural	Luminal	Intraluminal	-	Acantoatoso	Basales	Granulares	-	-
Uniquístico	Mural									
	Luminal									
	Intraluminal									
Sólido Plexiforme	-									
Sólido Folicular	Acantomatoso									
	Basales									
	Granulares									
Desmoplásico	-									
Extraóseo	-									

**ANEXO 4. INSTRUMENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL ÍNDICE DE
CONCORDANCIA**

Observador 2 Roberto Onner Cruz Tapia		Observador 1: Dr. Javier Portilla Robertson															
		Convencional				Células ahusadas				Células Claras				Células Granulares			
		Necrosis	Mitosis	Invasión neural	Permeación vascular	Necrosis	Mitosis	Invasión neural	Permeación Vascular	Necrosis	Mitosis	Invasión Neural	Permeación Vascular	Necrosis	Mitosis	Invasión neural	Permeación vascular
Convencional	Necrosis																
	Mitosis																
	Invasión neural																
	Permeación vascular																
Células Ahusadas	Necrosis																
	Mitosis																
	Invasión neural																
	Permeación vascular																
Células Claras	Necrosis																
	Mitosis																
	Invasión neural																
	Permeación vascular																
Células Granulares	Necrosis																
	Mitosis																
	Invasión neural																
	Permeación vascular																

ANEXO 5. MUESTRA DEL ESTUDIO

Muestra de Ameloblastomas y Carcinomas ameloblásticos

Caso	Folio / Fuente	Diagnóstico	Género	Localización	Edad
1	B-14-20636 HGM	Amb	M	Mandíbula	19
2	B-09-14963 HGM	Amb	F	Mandíbula	17
3	FO 331-06 B UNAM	AmbU mural	M	Mandíbula	35
4	FO 545-13 UNAM	Amb	M	Mandíbula	18
5	FO 816-13 UNAM	AmbU mural	M	Mandíbula	43
6	FO 149-10 UNAM	AmbU	M	Mandíbula	12
7	FO 631-13 UNAM	AmbU	F	Mandíbula	20
8	FO 604-13 UNAM	Amb	M	Mandíbula	18
9	FO 271-12 UNAM	AmbU	M	Mandíbula	13
10	B-16-7568 HGM	Amb	M	Maxilar	38
11	FO 128-14 UNAM	AmbU mural	F	Mandíbula	23
13	FO 118-08 UNAM	Amb	M	Mandíbula	55
14	FO 690-14 UNAM	Amb	M	Mandíbula	51
15	B 08-12405 HGM	Amb	M	Mandíbula	28
16	FO 004-07 UNAM	Amb	M	Mandíbula	36
17	B-15-1852 HGM	Amb	M	Mandíbula	37
18	B-13-2771 HGM	Amb	M	Mandíbula	12
19	B-13-11826 HGM	Amb	M	Mandíbula	26
12	FO 454-10 UNAM	CAmb	M	Mandíbula	33
20	IC-15-10881-2 INCAn	CAmb	M	Mandíbula	85
21	IC-16-7821 INCAn	CAmb	F	Mandíbula	62
22	IC-13-11734-8 INCAn	CAmb	M	Mandíbula	31
23	IC-16-4470 INCAn	CAmb	M	Maxilar	38
24	IC-14-9482-2 INCAn	CAmb	F	Mandíbula	54
25	"Amelo" Dr Ocampo	CAmb	M	Mandíbula	49
26	J 4172-156 Dr. Basurto	CAmb	M	Mandíbula	88
27	S-12-1238 MUSC	CAmb	F	Maxilar	64
28	S-162142 MUSC	CAmb	M	Mandíbula	87
29	FO 468-16 UNAM	CAmb	F	Mandíbula	62
30	S-13-3883 MUSC	CAmb	M	Mandíbula	46
31	Fow4507 UK	CAmb	M	Mandíbula	53
32	IC-10-4743 INCAn	CAmb	M	Mandíbula	43

ANEXO 5. HGH: Hospital General de México, INCAn: Instituto Nacional de Cancerología, UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México, MUSC, Medical University Of South Carolina Usa, UK University Of Kentucky