



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD
Epidemiología clínica

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES VINCULADOS CON LA
INTERACCIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA ODONTOGÉNICA EN ODONTOMAS
COMPUESTOS, COMPLEJOS Y MIXTOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:
C.D. CORREA ARZATE LORENA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. LUIS FERNANDO JACINTO
ALEMÁN
Departamento de Patología bucal, Facultad de
Odontología de la Universidad Nacional
Autónoma de México

DRA. MARÍA LUISA PERALTA
PEDRERO
Centro dermatológico Dr. Ladislao de la
Pascua

COMITÉ TUTORAL:

DR. JAVIER PORTILLA ROBERTSON
Departamento de Patología bucal, Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma
de México

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, septiembre 2019



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.



RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El odontoma es un tumor odontogénico benigno de carácter mixto hamartomatoso formado por células epiteliales y mesenquimales, clasificado en compuesto, complejo y mixto. Su etiología es desconocida, sin embargo algunos autores sugieren que las alteraciones en los genes que regulan la odontogénesis es el origen de esta lesión.

OBJETIVO: Comparar la expresión de los genes MSX1, FGF2, APC, TRPS1, RUNX2 Y EVC en muestras de odontomas compuestos, complejos y mixtos vs un grupo control que fueron obtenidas en el Departamento de Patología y Medicina bucal del DEPEl de la Facultad de Odontología en el periodo de 2006 a 2016.

METODOLOGÍA: A partir de las muestras seleccionadas, se extrajo RNA a través del kit ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System, después se determinó la expresión de los transcritos con el kit Access RT-PCR system y lectura por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Para la estadística inferencial se utilizó la media de los grupos para un análisis de comparación múltiple con la prueba Kruskal Wallis y un análisis Post-Hoc de la U de Mann-Whitney considerando una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

RESULTADOS: Se analizaron 30 muestras de odontoma (8 complejo, 11 compuesto y 11 mixto) en las cuales el gen TPRS1 presentó mayor expresión en el grupo complejo ($P=0.012$), los genes EVC, FGF2 Y MSX1 presentaron mayor expresión en el grupo mixto ($p=0.005$, $p=0.005$, y $p=0.077$ respectivamente) finalmente APC ($p=0.009$) y RUNX2 ($p=0.811$) se expresaron en mayor medida en el grupo compuesto.

CONCLUSIÓN: En el grupo de odontomas complejos encontramos una mayor expresión de genes encargados de la diferenciación celular en etapas tempranas de la odontogénesis por lo cual podemos asumir que esta interferencia ocasiona



que los tejidos formen la estructura tan compleja de esta lesión, por el contrario en el grupo de odontomas compuestos tenemos afectaciones en estados tardíos de la odontogénesis donde las células tienen mayor proliferación pero una diferenciación ya establecida, resultados concordantes con las estructuras tan organizadas que tienen los dentículos que conforman esta lesión.

PALABRAS CLAVE: Odontogénesis, odontomas, genes, tumores odontogénicos, MSX1, FGF2, RUNX2, EVC, APC, TRPS1



ABSTRACT

INTRODUCTION: The odontoma is a benign odontogenic tumor of mixed hamartomatous character formed by epithelial and mesenchymal cells, classified as compound, complex and mixed. Its etiology is unknown, however some authors suggest that alterations in the genes that regulate odontogenesis is the origin of this lesion.

OBJECTIVE: To compare the expression of the genes MSX1, FGF2, APC, TRPS1, RUNX2 and EVC in samples of compound, complex and mixed odontomas vs a control group that were received in the Department of Oral Pathology of the Faculty of Dentistry in the period from 2006 to 2016.

METHODOLOGY: From the selected samples, RNA was extracted through the ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System kit, then it was amplified by PCR with the Access RT-PCR system and read by electrophoresis in 3% agarose gel. For the inferential statistics, the mean of the groups was used for a multiple comparison analysis with the Kruskal Wallis test and a Post-Hoc analysis of the Mann-Whitney U, considering $p < 0.05$ as statistically significant.

RESULTS: 30 samples of odontoma (8 complex, 12 compound and 11 mixed) were analyzed, in which TRPS1 gene showed higher expression in the complex group ($P = 0.012$), EVC, FGF2 and MSX1 genes presented higher expression in the group mixed ($p = 0.005$, $p = 0.005$, and $p = 0.077$ respectively) finally APC ($p = 0.009$) and RUNX2 ($p = 0.811$) genes were higher expressed in the composite group.

CONCLUSION: In the group of complex odontomas we find a higher expression of genes responsible for cellular differentiation in early stages of odontogenesis, so we can assume that this interference causes the tissues to form the complex structure of this lesion, on the contrary, in the group of compound odontomas have affectations in final stages of odontogenesis where the cells have higher proliferation



but an already established differentiation, results concordant with the structures organized that have the denticles that make up this tumor.

KEY WORDS: Odontogenesis, odontomas, genes, odontogenic tumors, MSX1, FGF2, RUNX2, EVC, APC, TRPS1



ÍNDICE **PÁGINA**

1. Marco teórico	
1.1 Odontoma	11
1.1.1 Localización anatómica	12
1.1.2 Etiología	12
1.1.3 Prevalencia de odontomas en México	13
1.2 Odontogénesis	13
1.3 Dientes supernumerarios	15
1.4 Síndromes y dientes supernumerarios	15
1.4.1 Displasia cleidocraneal	15
1.4.2 Poliposis adenomatosa familiar	15
1.4.3 Síndrome de Gardner	16
1.4.4 Síndrome Tricorínofalángico	16
1.4.5 Síndrome Ellis Van Creveld	16
1.5 Dientes supernumerarios y su relación con los odontomas	16
1.6 Genes asociados a síndromes que presentan dientes supernumerarios y función en la interacción epitelio – mesénquima odontogénica	18
1.6.1 EVC	18
1.6.2 APC	18
1.6.3 RUNX2	18
1.6.4 TRPS1	19
1.7 Genes asociados al desarrollo de tumores odontogénicos con funciones específicas en la odontogénesis	19
1.7.1 MSX1	19
1.7.2 FGF2	20
1.8 Técnicas moleculares para la determinación de la expresión génica	20
1.8.1 Extracción de ARN	21
1.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)	21
1.8.3 Electroforesis	22
2. Planteamiento del problema y pregunta de investigación	23
3. Justificación	24
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	
5.1 General	25
5.2 Específicos	25
6. Operacionalización de las variables	26



7. Material y métodos	27
7.1 Diseño de estudio	27
7.2 Lugar y tiempo de estudio	27
7.3 Población de estudio	27
7.3.1 Población objetivo	27
7.3.2 Grupo control	27
7.4 Criterios de selección	27
7.5 Tamaño de muestra	28
7.6 Muestreo	28
7.7 Descripción de los procedimientos	28
8. Plan de análisis estadístico	32
9. Consideraciones financieras	32
10. Consideraciones éticas	32
11. Limitantes	33
12. Resultados	34
13. Discusión	42
14. Conclusiones	46
15. Bibliografía	47
16. Anexos	
16.1 Trabajos derivados de la investigación	51
16.2 Artículos derivados de la investigación	52



ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Fig. 1</i>	A) Odontoma compuesto B) Odontoma complejo C) Odontoma mixto.
<i>Fig. 2</i>	Odontogénesis.
<i>Fig. 3</i>	Genes encargados de la regulación epitelio-mesénquima y con asociación a dientes supernumerarios o tumores odontogénicos.
<i>Fig. 4</i>	Diagrama de flujo del proceso de selección para la población de estudio.
<i>Fig. 5</i>	Comparación de la expresión de los genes TRPS1, EVC, APC, FGF2, MSX1 Y RUNX2 en los grupos: odontoma compuesto (Cp), complejo (Cj), mixto (Mx) y grupo control (Cn).
<i>Fig. 6</i>	Expresión de genes TPRS1, APC, EVC, FGF2, MSX1 y RUNX2 en los grupos de estudio.



ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1</i>	Genes asociados a síndromes que presentan dientes supernumerarios y su función en la interacción epitelio – mesénquima odontogénica.
<i>Cuadro 2</i>	Genes asociados al desarrollo de tumores odontogénicos con funciones específicas en la odontogénesis.

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1</i>	Diseño de primers.
<i>Tabla 2</i>	Componentes de la muestra de reacción.
<i>Tabla 3</i>	Frecuencia de tumores odontogénicos en el Departamento de Patología bucal del año 2006 a 2016.
<i>Tabla 4</i>	Frecuencia de los diferentes tipos de tumores odontogénicos en el Departamento de Patología bucal del año 2006 a 2016.
<i>Tabla 5</i>	Descripción de los 131 odontomas del Departamento de Patología bucal del año 2006 a 2016 incluidos en el estudio.



Tabla 6 Descripción de los 4 grupos de estudio (Odontoma compuesto, complejo, mixto y grupo control).

Tabla 7 Expresión génica de TRPS1, EVC, APC, FGF2, MSX1 Y RUNX2 en el grupo control y en los grupos de odontoma compuesto, complejo y mixto.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<i>Universidad Nacional Autónoma de México</i>	UNAM
<i>División de Estudios de Posgrado e Investigación</i>	DEPeI
<i>Facultad de Odontología</i>	FO
<i>Displasia Cleidocraneal</i>	DCC
<i>Poliposis Adenomatosa Familiar</i>	PAF
<i>Síndrome de Gardner</i>	SG
<i>Revoluciones por minuto</i>	RPM



1. MARCO TEÓRICO

El desarrollo de los dientes es un proceso complejo y altamente coordinado que se encuentra estrictamente regulado genéticamente a través de un gran número de moléculas organizadas en redes de señalización. Estas moléculas inician una serie de interacciones recíprocas entre el epitelio de la cavidad oral y su mesénquima subyacente y cualquier interrupción en estas interacciones podría dar lugar a anomalías en el número, tamaño, morfología y o cito-diferenciación de los dientes o inclusive generar una lesión como lo son los tumores odontogénicos.¹

1.1 Odontoma

El odontoma es considerado un tumor odontogénico benigno de carácter mixto hamartomatoso, formado por células epiteliales y mesenquimales caracterizado por su crecimiento lento e indoloro. Al presentar tanto células ectodérmicas como mesenquimales pueden observarse ameloblastos, odontoblastos y cementoblastos, las cuales cuentan con la capacidad de generar tejidos mineralizados como esmalte, dentina y cemento propios de la odontogénesis.^{2,3}

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, los odontomas se clasifican en dos tipos: **el compuesto**, el cual se describe como una malformación que presenta todos los tejidos dentarios con un patrón de distribución ordenado en estructuras similares a los dientes denominadas dentículos y **el complejo**, que de igual forma presenta todos los tejidos dentarios pero con un patrón de distribución desordenado. Algunos autores consideran que existe el odontoma mixto ya que esta lesión puede llegar a tener características histológicas de ambos tipos en diferente proporción, el por qué ocurre esta diferencia en la presentación clínica es aún una incógnita.²

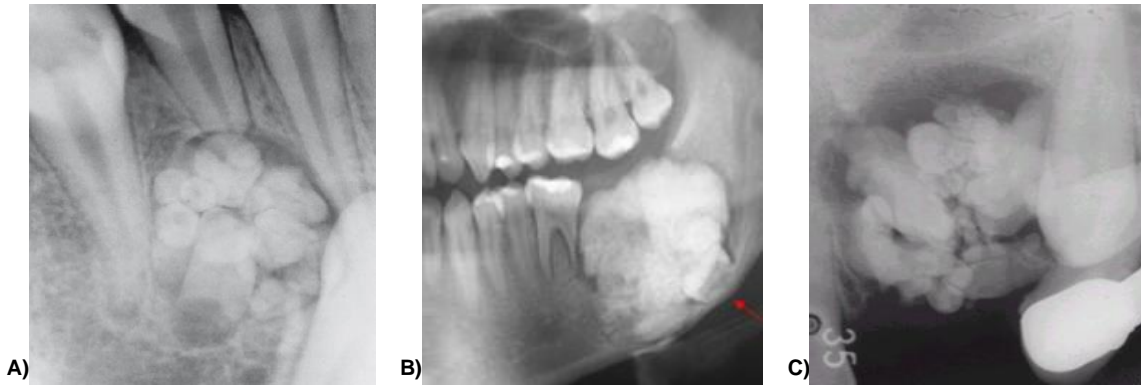


Fig 1. A) Odontoma compuesto B) Odontoma complejo C) Odontoma mixto^{1,2,4}

1.1.1 Localización anatómica y tratamiento

Clínicamente, los odontomas compuestos suelen localizarse en la parte anterior de maxilar y/o mandíbula. Suelen ser lesiones uniloculares con estructuras radiopacas múltiples (denticúlos). Los odontomas complejos suelen localizarse en la parte posterior de mandíbula sobre dientes retenidos y pueden alcanzar un tamaño de varios centímetros, tienen aspecto de masa radiopaca sólida irregular y están rodeados por una fina zona radiolúcida.^{2,4}

Los odontomas se presentan con mayor frecuencia en la primera y segunda década de vida. El tratamiento suele ser conservador ya que ambos tipos se encuentran encapsulados y se enuclean fácilmente del hueso circundante. No se han registrado recidivas².

1.1.2 Etiología

La etiología de estos tumores es desconocida, sin embargo se han postulado diversas teorías para tratar de encontrar un origen, algunos autores afirman que los odontomas pueden tener un factor hereditario, ser causados por una mutación o alteración en la regulación génica durante el desarrollo dental.^{2,4} También existe la teoría de que restos de la lámina dental podrían ser inducidos por el tejido conectivo para generar un tejido ectomesenquimal capaz de conducir al desarrollo de este tumor hamartomatoso.^{2,4} Philipsen y Cols., han sugerido que la hiperactividad en la lámina dental causada por un alteración génica durante la odontogénesis, puede



conducir al desarrollo de dientes supernumerarios u odontomas proponiendo un origen en común para estas dos lesiones.⁴

1.1.3 Prevalencia de odontomas en México

El odontoma se reporta como el tumor odontogénico más frecuente en México, seguido del ameloblastoma y el mixoma⁵. En el Departamento de Patología bucal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología (FO) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) se realizó un estudio para identificar la distribución de los odontomas en un periodo de 10 años (2006 a 2016) en el Departamento en el cual se reportaron un total de 126 casos, de los cuales el 58.7% eran mujeres (74 casos), el tipo complejo representó el 50% de los tumores, seguido del odontoma compuesto (34.9%) y por último el odontoma mixto (15,1%). El 58.7% de los tumores se presentaron en el maxilar.⁵

1.2 Odontogénesis

Durante la vida intrauterina se lleva a cabo el proceso de odontogénesis, dicho proceso depende de una serie ordenada de eventos inductivos que implican la coordinación de vías moleculares que regulan la generación y el diseño de los órganos dentarios.⁶

Los dientes se forman a través de una secuencia de señales inductivas transmitidas entre el epitelio y mesénquima dental, tejidos fundamentales de la odontogénesis. Cada capa de tejido le ordena a la otra diferenciarse de manera precisa para la formación de cada diente.

Morfológicamente, el desarrollo del diente comienza con un engrosamiento del epitelio dental en la sexta semana de gestación para formar una estructura conocida como la lámina dental, hacia la semana 7 las células del epitelio se invaginan y se introducen en el mesénquima dental formando un “botón” el cuál dará origen a un órgano dental (figura 2.A). Alrededor de éste botón las células comienzan a crecer y proliferar formando dos tejidos: epitelio interno del esmalte (dará origen al esmalte dental) y la papila dental (dará origen a la dentina y pulpa dental), el botón adquiere una forma cóncava y a medida que éste prolifera en el mesénquima, la densidad



celular aumenta conformando con ello el estadio de casquete (figura 2.B). La etapa de campana inicia en la semana 14 y en ella se denota el inicio de la diferenciación celular, observándose diversos tejidos: retículo estrellado, estrato intermedio y el epitelio del esmalte se divide en interno y externo (figura 2.C). Esta etapa constituye la última en el proceso de morfodiferenciación y se comienza a observar un periodo de mineralización de las estructuras dentales (figura 2.D), durante estas etapas, la interacción constante de señales entre el epitelio y el mesénquima da lugar a la diferenciación de diversas células, principalmente odontoblastos y ameloblastos. Estudios animales y humanos que emplean las herramientas de genética y biología molecular han identificado un gran número de genes que actúan en etapas de la odontogénesis y se encargan de regular el proceso de diferenciación celular, cualquier alteración durante estos procesos puede conducir al desarrollo de diversas patologías, entre ellas los odontomas.⁶

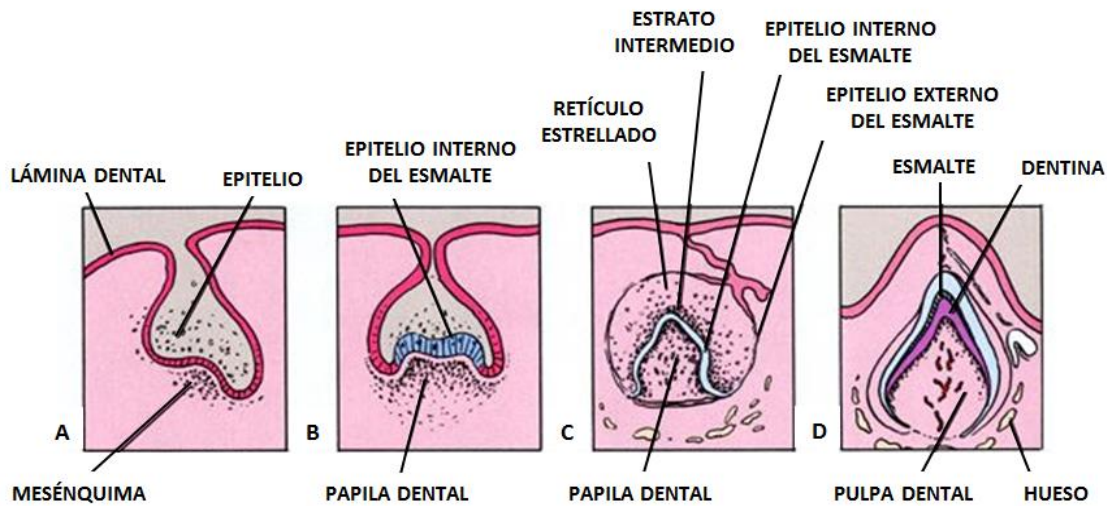


Fig 2. Odontogénesis. A) Estadio de botón. B) Estadio de casquete. C) Estadio de campana temprana. D) Estadio de campana tardía. Fuente directa



1.3 Dientes supernumerarios

Los dientes supernumerarios son alteraciones del desarrollo poco frecuentes, se pueden definir como dientes adicionales a la serie dental normal, adoptan diferentes formas, tamaños, localización y aparecen en cualquier área de los arcos dentales.⁷ La prevalencia de dientes supernumerarios oscila entre 0.2% y 0.8% en la dentición temporal y de 0.5% a 5.3% en la dentición permanente aproximadamente, variando entre poblaciones.⁸ La etiología de los dientes supernumerarios no ha sido comprendida totalmente, sin embargo, algunos autores han postulado teorías tratando de explicar su presencia, incluyendo entre ellas la dicotomía del germen dental, alteraciones en el proceso de la odontogénesis, hiperactividad de la lámina dental y factores hereditarios y genéticos. Las alteraciones genéticas en la mayoría de los casos se encuentran asociados a síndromes como la displasia cleidocraneal o el síndrome de Gardner.⁹

1.4 Síndromes y dientes supernumerarios

1.4.1 Displasia cleidocraneal

La Displasia Cleidocraneal (DCC) es una afección autosómica dominante rara, causada por la mutación del gen RUNX2 presente en el brazo corto del cromosoma 6 en la posición 21.1, un factor de transcripción esencial para la formación de dientes, cartílago y hueso. Los pacientes con DCC muestran las características clásicas de movilidad excesiva del hombro, la falta de reabsorción de los dientes deciduos, la falta de erupción de los dientes permanentes, presencia de dientes supernumerarios, la fontanela y suturas del cráneo abiertas, afecta a ambos géneros por igual sin ninguna predilección de género o etnicidad.¹⁰

1.4.2 Poliposis adenomatosa familiar

La Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) es un trastorno hereditario autosómico dominante caracterizado por la presencia de múltiples adenomas colorrectales. Se puede desarrollar hipertrofia congénita del epitelio de la retina, tumores de tejidos



blandos, tumores dermoides y anomalías dentales que incluyen dientes impactados, ausencia congénita de uno o más dientes, dientes supernumerarios, quistes dentígeros y odontomas, siendo la causa de este trastorno mutaciones en la línea germinal en el gen APC.¹¹

1.4.3 Síndrome de Gardner

El síndrome de Gardner (SG) describe un fenotipo variante de la poliposis adenomatosa familiar (FAP), que se caracteriza principalmente por lesiones extracolónicas que incluyen osteomas, anomalías dentales, quistes epidérmicos y tumores de tejidos blandos, al igual que PAF se debe a una mutación del gen APC.¹²

1.4.4 Síndrome Tricorinofalángico

El Síndrome Tricorinofalángico (TRPS) es causado por la mutación del gen TRPS1, un gen que codifica un factor de transcripción GATA. Este trastorno se caracteriza por presencia de cabello escaso y de crecimiento lento, cejas lateralmente dispersas, pestañas escasas, una punta bulbosa de la nariz, un filtro grande y plano, un labio superior delgado, alteraciones dentales, orejas grandes y prominentes y malformaciones de la cadera.¹³

1.4.5 Síndrome Ellis Van Creveld

El Síndrome de Ellis Van Creveld es una displasia condroectodérmica que se hereda con carácter autosómico recesivo, los pacientes afectados presentan talla corta, polidactilia bilateral postaxial, displasia ungueal, defectos cardíacos congénitos y alteraciones dentales como dientes neonatales y supernumerarios.¹⁴

1.5 Dientes supernumerarios y su relación con los odontomas

A pesar de que, desde un punto de vista nosológico, odontomas y supernumerarios se clasifican como entidades distintas, parecen ser la expresión de un mismo proceso patológico.¹⁵ Al realizar un análisis de los datos reportados por la literatura internacional diversos elementos apoyan esta teoría: alta frecuencia de incidencia



en las mismas áreas de la mandíbula, mayor frecuencia a una edad temprana y que se encuentran formados por todos los tejidos dentales completamente diferenciadas, por tal motivo se sugiere un origen en común para odontomas y dientes supernumerarios que parecen ser la expresión del mismo proceso de hiperactividad de la lámina dental con diferentes grados de morfo-diferenciación en relación con el tiempo y los genes que se vieron afectados.¹⁶

Basándonos en esta teoría propuesta por Philipsen y Cols.,¹⁶ se realizó una búsqueda bibliográfica de genes que se ha demostrado se encuentran alterados en pacientes con algún síndrome (con presencia de dientes supernumerarios) y a su vez tengan un papel en la interacción epitelio-mesénquima odontogénica (figura 3), además, se decidió incluir dos genes con funciones específicas en la odontogénesis y que se ha demostrado están presentes en otros tumores odontogénicos (figura 3). Uniendo los criterios obtuvimos los siguientes genes:

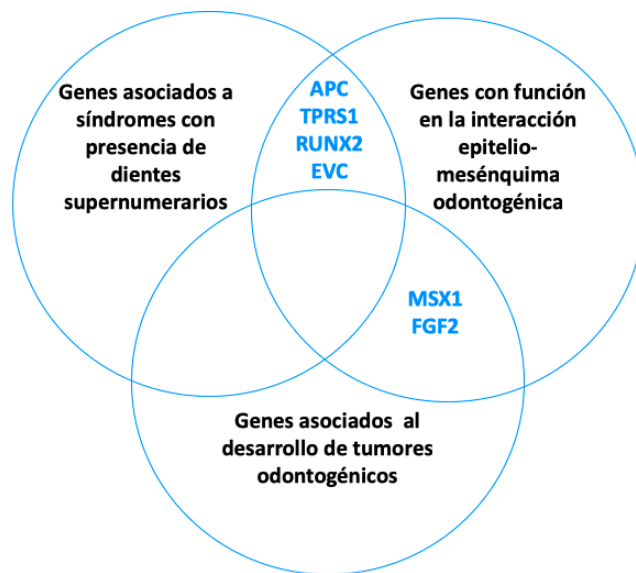


Fig 3. Genes encargados de la regulación epitelio-mesénquima y con asociación a dientes supernumerarios o tumores odontogénicos. Fuente directa



1.6 Genes asociados a síndromes que presentan dientes supernumerarios y función en la interacción epitelio – mesénquima odontogénica

1.6.1 EVC

El gen EVC desempeña un papel importante para la morfogénesis dental. La ausencia de la proteína ciliar EVC en ratones causa varios defectos de hipoplasia e hiperplasia durante el desarrollo molar, microdoncia, asimetría dental y fusiones radiculares.¹⁷

1.6.2 APC

La proteína APC es un gen supresor de tumores. La expresión alternativa de APC y el complejo cadherina-catenina es crítica para la formación del esmalte por ameloblastos durante la odontogénesis. La pérdida de la función de APC produce un aumento de los niveles de β -catenina citoplásmica y con ello la disminución de la migración celular, alteraciones en la adhesión célula-célula y alteraciones del citoesqueleto.¹⁸

1.6.3 RUNX2

Se ha demostrado que RUNX2 se expresa en abundancia en el mesénquima dental y que está involucrado en la mediación de las interacciones epitelio-mesenchimatosas durante las etapas de botón y campana de la odontogénesis, además RUNX2 está estrechamente involucrado en la calcificación durante la formación de los dientes. RUNX2 regula la expresión de genes relacionados con la odontogénesis, como amelogenina, ameloblastina y enamelina, así como la diferenciación de osteoblastos durante la formación de hueso, Someya H. y Cols sugieren que la sobreexpresión de Runx2 mutante afecta la amelogénesis y la osteogénesis.¹⁹



1.6.4 TRPS1

TRPS1 es una proteína de dedos de zinc que pertenece a la familia de factores de transcripción GATA. TRPS1 se en el mesénquima dental en las etapas de botón y campana, se condensa alrededor de los dientes en desarrollo y luego en el folículo dental y los pre-odontoblastos. Su expresión se regula a la baja tan pronto como los odontoblastos se diferencian completamente en odontoblastos maduros y comienzan a secretar la matriz de dentina.²⁰

Cuadro 1. Genes asociados a síndromes que presentan dientes supernumerarios y su función en la interacción epitelio – mesénquima odontogénica.

GEN	AUTOR	SÍNDROME ASOCIADO	UBICACIÓN	TIPO DE SÍNDROME	FUNCIÓN EN LA ODONTOGÉNESIS
EVC	Nakatomi M, Hovorakova M. y Cols. ¹⁷	Ellis-Van Creveld	Cromosoma 4p16	Autosómica recesiva	Mediación de la ruta Shh
APC	Sorkin BC, Wang MY. ¹⁸	Poliposis adenomatosa familiar (incluido síndrome de Gardner)	Cromosoma 5q21-q22	Autosómica dominante	Regulación de β -catenina y proliferación celular
RUNX2	Someya H, Fujiwara H. y Cols. ¹⁹	Displasia cleido cranial	Cromosoma 6p21	Autosómica dominante	Regula las interacciones epitelio-mesénquima entre las etapas de botón y campana.
TRPS1	Kantaputra P, Miletich J. ²⁰	Trico-rino-falángico	Cromosoma 8q24.12	Autosómica dominante	Maduración de odontoblastos y proceso de mineralización

1.7 Genes asociados al desarrollo de tumores odontogénicos con funciones específicas en la odontogénesis

1.7.1 MSX1

MSX1 es una proteína localizada en el cromosoma 4 se expresa en diversos tejidos embrionarios y participa en múltiples interacciones epitelio-mesenchimatosas durante el desarrollo dental, las mutaciones en esta proteína están relacionadas con anomalías dentales humanas, labio y paladar hendido y síndrome de displasia ectodérmica congénita. MSX1 se expresa fuertemente en el mesénquima dental y



se excluye del epitelio dental en todas las etapas de la odontogénesis. Se sugiere que MSX1 se expresa en múltiples tipos de tejido no diferenciados e inhibe la diferenciación celular, cuando los gérmenes de los dientes entran en la diferenciación, la expresión de MSX1 disminuye drásticamente.^{21, 22, 23, 24}

En embriones de ratones homocigotos para la delección MSX1 o PAX9, la odontogénesis se detiene en la etapa de brote, lo que sugiere que la expresión de estos genes es crítica para el desarrollo de la dentición.²⁴

1.7.2 FGF2

FGF2 es un miembro de la familia FGF compuesto de 288 aminoácidos. Regula la proliferación, diferenciación y morfología de las células. Esta molécula se distribuye en el mesénquima dental y estimula la proliferación celular en las etapas de botón y campana además de tener un papel en la reparación de la dentina.^{25, 26}

Cuadro 2. Genes asociados al desarrollo de tumores odontogénicos con funciones específicas en la odontogénesis

GEN	AUTOR	UBICACIÓN	TEJIDO DONDE SE ENCUENTRA	TUMOR ODONTOGÉNICO ASOCIADO	FUNCIÓN EN LA ODONTOGÉNESIS
MSX1	Feng XY, Zhao YM y Cols. ²³	Cromosoma 4p16.2	Ameloblastoma	Mesénquima	Se expresa en mesénquima y se encuentra en la etapa de campana ayudando a la diferenciación del odontoblasto.
FGF2	Dos Santos IG., Jorge EC. y Cols. ²⁵	Cromosoma 4q28.1	Ameloblastoma, fibroodontoma ameloblástico	Epitelio y mesénquima	Estimula la proliferación celular en las etapas de botón y campana.

1.8 Técnicas moleculares para la determinación de la expresión génica

El término *expresión génica* se refiere al proceso mediante el cual la información codificada en un gen se transcribe en uno o varios ARN funcionales y posteriormente dan lugar a la formación de proteínas que dictan la función de las células.



La expresión génica es un mecanismo altamente regulado que controla las funciones de las células vivas, en todos los organismos el contenido del ADN de todas sus células es idéntico, esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células.

Exceptuando a los genes constitutivos (genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales para su funcionamiento general) todos los demás genes se expresan de manera diferente en cada célula, en base a su función y el tejido en el que se encuentra, es por ello que la cuantificación de la expresión génica requiere de métodos que extraen RNA de muestras específicas (de interés) para su estudio.

1.8.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN y/o DNA de calidad constituye el primer paso para el análisis de la expresión génica, posteriormente se amplifican diferentes genes o regiones específicas mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En general los protocolos de extracción siguen una serie de pasos, que se basan en el hecho de que los iones salinos positivos son atraídos hacia las cargas negativas del DNA, permitiendo su disolución y posterior extracción de la célula. Los pasos secuenciales consisten principalmente en: lisado de las paredes y membranas celulares mediante la acción de un detergente, seguida de la degradación de la fracción proteica y de restos celulares, y finalmente precipitación del material nucleico.

1.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Esta es la técnica más sensible disponible para descubrir y cuantificar el ARN y/o DNA. Es una técnica que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de



ARN y/o DNA específico para que pueda analizarse o usarse de alguna otra manera. Para llevarla a cabo es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar (un gen, una parte de un gen, una región no codificadora, etc), son ampliamente utilizadas debido a su alta precisión y reproducibilidad.

1.8.3 Electroforesis

Es la técnica más utilizada para visualizar los resultados de una reacción de PCR, en ella una corriente eléctrica impulsa fragmentos de DNA amplificados a través de una matriz de gel y los fragmentos se separan según su tamaño; se recomienda incluir un marcador de peso molecular, para que pueda determinarse el tamaño de los fragmentos en la muestra de PCR. Los fragmentos de DNA de la misma longitud forman una banda en el gel que se puede identificar a simple vista si el gel se tiñe con un pigmento que se una al ADN.



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de la afectación en la calidad de vida de los pacientes con tumores odontogénicos con detección tardía, los tratamientos siguen siendo invasivos y la investigación sobre los procesos que subyacen a la formación de los tumores odontogénicos es prácticamente inexistente, incluyendo la referente a los odontomas. La teoría más aceptada postula que la alteración en la interacción entre el epitelio y el mesénquima dental durante la odontogénesis puede dar origen a un odontoma. Esta interacción se encuentra altamente regulada por genes, por lo cual identificar esos genes y su forma de expresión puede explicar el origen de una lesión como el odontoma, además de conocer cómo influyen para que los odontomas adopten una presentación histológica diferente (complejo, compuesto o mixto) o se desarrollen en una zona anatómica determinada, datos que hasta el momento son desconocidos. Por ello consideramos importante investigar:

¿Cuál es la diferencia en la expresión de los genes MSX1, FGF2, APC, TRPS1, RUNX2 Y EVC en muestras de pacientes con odontomas compuestos, complejos y mixtos comparados con folículos dentales?



3. JUSTIFICACIÓN

La expresión génica controla cada etapa de la odontogénesis, estudios muestran que hay genes que determinan la posición, número, tamaño y forma de los dientes en cada paciente, por lo tanto, alteraciones en estos genes causan anomalías que pueden tener como resultado la formación de un odontoma. El determinar cuáles son esas alteraciones nos brindará las bases de la etiología y patogenia de los odontomas, las cuales siguen siendo una incógnita. Además de poder entender el comportamiento clínico de estas lesiones, la información puede ser aplicada a otros tumores odontogénicos con características similares al odontoma.

Es de gran relevancia la capacidad de formar tejidos mineralizados que poseen las células de los odontomas, explotar esta capacidad de manera *in vitro* sería un gran avance en la regeneración celular logrando formar tejido orgánico como reemplazo de tejidos dentales u óseo, en ello radica la importancia de comprender la etiología y los genes que regulan el comportamiento de estos tumores.

4. HIPOTÉISIS

Los odontomas (compuesto, complejo, mixto) tendrán un patrón de expresión génica mayor y estadísticamente diferente al grupo control.



5. OBJETIVOS

5.1 General

- Comparar la expresión de los genes MSX1, FGF2, APC, TRPS1, RUNX2 Y EVC en muestras de odontomas compuestos, complejos y mixtos vs un grupo control, correspondientes al periodo de 2006 a 2016 que fueron obtenidas del Departamento de Patología y Medicina bucal del DEPeI de la Facultad de Odontología.

5.2 Específicos

- Describir los datos de los pacientes que presentaron odontomas del Departamento de Patología y Medicina bucal del DEPeI con las características clínicas: edad, sexo y localización anatómica.
- Determinar la expresión de los genes MSX1, FGF2, APC, TRPS1, RUNX2 Y EVC en los grupos: odontoma compuesto, complejo, mixto y control a través de la técnica de PCR.



6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NIVEL DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN	NIVEL METODOLÓGICO
Expresión de MSX1	Nivel de expresión del gen en las muestras seleccionadas	Cuantitativa continua	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Dependiente
Expresión de RUNX2	Nivel de expresión del gen en las muestras seleccionadas	Cuantitativa continua	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Dependiente
Expresión de TRPS1	Nivel de expresión del gen en las muestras seleccionadas	Cuantitativa continua	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Dependiente
Expresión de FGF2	Nivel de expresión del gen en las muestras seleccionadas	Cuantitativa continua	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Dependiente
Expresión de EVC	Nivel de expresión del gen en las muestras seleccionadas	Cuantitativa continua	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Dependiente
Expresión de APC	Nivel de expresión del gen en las muestras seleccionadas	Cuantitativa continua	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Dependiente
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	Cuantitativa discreta	Años	Independiente
Sexo	Condición orgánica que distingue a los hombres de las mujeres	Cualitativa nominal	Masculino o femenino	Independiente
Tipo de odontoma	Características microscópicas del tejido de la lesión que determinan el tipo de lesión	Cualitativa nominal	Compuesto, complejo o mixto	Independiente
Localización anatómica	Ubicación específica en una parte del cuerpo	Cualitativa nominal	Maxilar o mandíbula	Independiente



7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño de estudio

Transversal analítico

7.2 Lugar y tiempo de estudio

Laboratorio de investigación básica del Departamento de Patología y Medicina bucal DEPel de la Facultad de Odontología de la UNAM. Periodo: Agosto 2017 – Mayo 2019

7.3 Población de estudio

7.3.1 Población objetivo

Muestras de odontomas complejos, compuestos y mixtos del Departamento de Patología y Medicina bucal de la DEPel correspondientes al periodo de enero 2006 a diciembre 2016 que cumplan los criterios de selección.

7.3.2 Grupo control

El grupo control fue conformado por folículos dentales extraídos (dentición permanente) de pacientes sanos, sin presencia de dientes supernumerarios (confirmado con radiografía panorámica).

7.4 Criterios de selección

a) De inclusión

- Muestras de hombres y mujeres
- Muestras de odontomas que tengan tejido blando suficiente y próximo a dentículos o masas mineralizadas
- Bloques de parafina de las muestras de odontomas con suficiente cantidad de muestra para realizar cortes de 10µm
- Muestras de odontomas que cuenten con expediente clínico integro



b) De exclusión

- Muestras de pacientes que presenten algún síndrome
- Muestras de odontomas desmineralizadas por medio de ácido clorhídrico
- Muestras de pacientes que tengan antecedentes de algún otro tumor odontogénico

7.5 TAMAÑO DE MUESTRA

Al ser una lesión de baja prevalencia se analizaron todas las muestras que cumplieron los criterios de selección (n=30).

7.6 MUESTREO

No probabilístico.

Se incluyeron todas las muestras de enero 2006 a 2016 del Departamento de Patología bucal.

7.7 DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

7.7.1 Selección de muestras de estudio

Los registros de las muestras de lesiones orales que fueron obtenidas de enero 2006 a diciembre 2016 en el Departamento de Patología bucal donde fueron revisados y se seleccionaron los casos correspondientes a odontomas: complejos, compuestos y mixtos, de ellos se obtuvieron los datos correspondientes a: edad, sexo, tipo histológico y localización anatómica en la población en la que se presentaron las lesiones. Además se calcularon las frecuencias de cada variable y se seleccionaron las muestras que fueron viables para el estudio (criterios de exclusión). Aunado a ello se confirmó el diagnóstico histopatológico de las muestras seleccionadas con un Patólogo bucal.



7.7.2 Extracción del ARN de las muestras

Se utilizó el kit ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System (PROMEGA, Lot. 215618, USA) para la extracción de ARN de las muestras de odontomas siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente:

Se cortaron 5 secciones de 10 μm cada una del bloque de parafina en que se encontraban las muestras y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se desparafinaron con aceite mineral, agregando 300 μl de aceite mineral y se incubaron a 80 °C durante 1 minuto. Posteriormente se agregaron 100 μl de tampón de lisis a la muestra, se centrifugaron a 10,000 rpm x minuto por 15 segundos a temperatura ambiente, se formaron dos fases, una inferior (acuosa) y una superior (aceite), se agregaron 10 μl de proteinasa K directamente a la fase inferior y se mezclaron pipeteando, se incubaron a 56 ° C durante 15 minutos y después a 80° C durante 1 hora. Se retiraron los tubos del bloque térmico a 80 °C y se colocaron en hielo durante 1 minuto.

Previamente, se combinaron los siguientes reactivos para generar el buffer de DNasa empleado en cada muestra:

- MnCl_2 (0.09 M) 13 μl
- Tampón DNasa 7 μl
- Enzima DNasa I 10 μl

Se agregaron los 30 μl de mezcla de DNasa previamente preparada a la fase inferior de la muestra, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y posterior a ellos se agregaron 325 μl de tampón BL y 200 μl de isopropanol al 100%.

Se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente y se transfirió toda la fase inferior al conjunto columna de unión/tubo de colecta, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente.

Se agregó 500 μl de solución de lavado a la columna de unión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente, se desechó el flujo y se repitió el procedimiento, posteriormente se centrifugó a 16,000 rpm durante 3 minutos para secar la columna.

Se transfirió la columna de unión a un tubo de elución limpio y se agregó 30-50 μl de agua sin nucleasas a la columna, se centrifugó a 16,000 rpm durante 1 minuto a



temperatura ambiente. Se retiró y desechó la columna de unión, se tapó el tubo de elución y se almacenó el ARN a -65 ° C.

7.7.3 Amplificación de RNA

Para la amplificación del RNA se utilizaron 40 ng del total del RNA obtenido de la extracción de las muestras. Se utilizaron primers de la marca Eurofins Genomics para los marcadores: FGF2, EVC, APC, RUNX2, MSX1, TRPS1 y GAPDH como grupo control (Tabla 1).

Tabla 1	Diseño de primers	
Marcador	Secuencia de aminoácidos	Tamaño (pb)
TRP	up 5`-ACACATATCCAGAGGGGCCT-3´	541
	ds 5`-CTCCTCCTCTGCCTAGGGTT-3´	
EVC	up 5`-ATTGTACACATGGGCCCTCTG-3´	546
	ds 5`-CCTTCATCAGCTTCAGGGCA-3´	
MSX	up 5`-TGGAGAAGCTGAAGATGGCC-3´	574
	ds 5`-CGCTTTTCTTGCCTGGTGTC-3´	
FGF	up 5`-GTCCAGCCTAGGCAACAGAG-3´	577
	ds 5`-TCCCGCATACTCTGGAGACA-3´	
RUN	up 5`-TTCCAGAATGCTTCCGCCAT-3´	523
	ds 5`-CCTGGAGTCCACCTCTCTGA-3´	
APC	up 5`-GGAAATTCCTGGGGCAGTAA-3´	560
	ds 5`-ACATCTGCTCGCCAAGACAA-3´	
GAPDH	Up 5`-ACCACAGTCCATGCCCATCAC-3´	200
	ds 5`-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3´	
ds: downstream, us: upstream, pb: pares de bases		

Se trabajó con el kit Access RT-PCR system (Promega, Lot. 326553, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente:

Para cada muestra y producto a amplificar se preparó la mezcla de reacción combinando los volúmenes indicados en la tabla 2.



Tabla 2. Componentes de la muestra de reacción		
Componente	Volumen	Concentración final
Nuclease-Free Water (volumen final de 50µl)	Xµl	
AMV/Tfl 5X Reaction Buffer	10µl	1X
dNTP Mix	1µl	0.2mM
downstream primer	50pmol	1µM
upstream primer	50pmol	1µM
25mM MgSO4	2µl	1mM
AMV Reverse Transcriptase	1µl	0.1u/µl
Tfl DNA Polymerase	1µl	0.1u/µl
RNA de la muestra elegida	Xµl	
Volumen final	50µl	

Los primeros seis componentes indicados se mezclaron en un tubo de reacción de 0.2 ml y se conservaron en hielo, se agregó AMV Reverse Transcriptase y Tfl DNA Polymerase a la reacción mezclando suavemente el tubo durante 10 segundos para integrar los componentes. El RNA total de las muestras fue previamente descongelado y agregado a los componentes mezclados, colocando los tubos en un termociclador Axygen Maxigene II (Modelo: 1402025, EUA) con el siguiente ciclo: 1 ciclo de 45 °C por 45 minutos (transcripción reversa), 1 ciclo de 94 °C por 2 minutos (inactivación de AMV RT y desnaturalización del primer), 40 ciclos de amplificación de ADN: 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 60°C por 1 minuto (alineación) y 68°C por 2 minutos (extensión) por último un ciclo de 68°C por 7 minutos para la extensión final de los productos.

7.7.3 Resolución y visualización de la expresión génica

Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa en concentración de 3% en buffer TAE 1X con 5 µg/ml de bromuro de etidio (Promega Lot. 97089, USA) en una cámara de electroforesis (MajorScience MJ-105-R) con una corriente



constante de 100 V durante 30 minutos, terminado el tiempo se colocó para la lectura del producto en un sistema de fotodocumentación (Axigen Gel Documentation System -BL , GD -1000 , EUA) con luz UV 302 nm. La cuantificación de la densidad de pixeles se llevó a cabo con el software GelQuantNet, tomando en consideración la expresión de GAPDH para la normalización de los resultados de expresión de cada muestra.

8. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la descripción de las variables:

Variabes cualitativas (sexo, tipo de odontoma y localización anatómica) se describieron frecuencias y porcentajes.

Variabes cuantitativas: para la variable edad se obtuvo mediana y percentil 25 y 75. Para la expresión génica de MSX1, FGF2, APC, TRPS1, RUNX2 Y EVC se realizó la normalización del nivel de expresión empleando GADPH, posteriormente se obtuvo media y desviación estándar de cada marcador. A cada variable se realizaron análisis de asimetría y curtosis para determinar la distribución de los datos, después se realizó un análisis de comparación múltiple con la prueba Kruskal Wallis y un análisis Post-Hoc de la U de Mann-Whitney considerando una $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

9. CONSIDERACIONES FINANCIERAS

Este trabajo forma parte del proyecto PAPIIT IN223414 y PAPIME 209016. Todos los recursos materiales y de infraestructura se obtuvieron del Área de Investigación Básica del Departamento de Patología y Medicina Bucal (Certificado por la ISO 9001-2015) del DEPeI de la Facultad de Odontología de la UNAM.



10. CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en el artículo 17, fracción I este estudio se considera como **investigación sin riesgo**, debido a que se trabajaron con muestras de lesiones de cavidad oral fijadas en parafina y no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio.

11. LIMITANTES

Por la naturaleza del estudio el alcance es exploratorio, es necesario aumentar el tamaño de muestra en los grupos para aumentar la representatividad del mismo.



12. RESULTADOS

12.1 Determinación de los genes a investigar

El desarrollo del proyecto inició con una búsqueda bibliográfica para la determinación de los genes claves a estudiar, lo que incluyó la realización de la Revisión sistemática: **“Systematic review of the genetic alterations underlying the development of odontogenic tumors formed by epithelial and mesenchymal tissue (WHO classification 2017)”** (Anexo 16.2).

12.2. Revisión de expedientes del departamento de Patología bucal

Se revisó un total de 8784 expedientes del Departamento de Patología bucal que comprenden de enero 2006 a diciembre 2016, las frecuencias y porcentajes de las características clínicas de los pacientes que presentaron tumores odontogénicos se distribuyen de la siguiente manera (Tabla 3, 4 y 5):



Tabla 3. Frecuencia de tumores odontogénicos en el Departamento de Patología bucal del año 2006 a 2016

AÑO	TOTAL DE LESIONES	TUMORES ODONTOGÉNICOS	FRECUENCIA (%)
2006	678	19	2.80
2007	621	15	2.41
2008	724	22	3.04
2009	756	20	2.64
2010	707	20	2.83
2011	820	15	1.83
2012	801	15	1.87
2013	944	25	2.65
2014	924	26	2.81
2015	881	25	2.84
2016	928	14	1.51
Total	8784	216	100

Tabla 4. Frecuencia de los diferentes tipos de tumores odontogénicos en el Departamento de Patología bucal del año 2006 a 2016

Tumor odontogénico	Frecuencia	Porcentaje (%)
Ameloblastoma	41	18.98
Odontoma	131	60.65
Fibrodontoma ameloblástico	3	1.39
Cementoblastoma	9	4.17
Mixoma	15	11.90
Fibroma odontogénico central	1	0.46
Fibroma odontogénico periférico	9	4.17
Fibrodentinoma ameloblástico	1	0.46
Fibrodentinosarcoma ameloblástico	1	0.46
Carcinoma ameloblástico	2	0.93
Fibromixoma odontogénico	3	1.39
Total	216	100



Tabla 5. Descripción de los 131 odontomas del Departamento de Patología bucal del año 2006 a 2016 incluidos en el estudio

Variable	Frecuencia n = 131	Porcentaje (%)
Sexo		
• Femenino	69	52.67
• Masculino	62	47.33
Edad	15 (11, 26.5)*	
Intervalo de edad		
00 - 08 años	11	8.39
09 - 17 años	65	49.62
18 - 27 años	24	18.32
28 - 37 años	11	8.40
38 - 47 años	8	6.11
48 - 57 años	5	3.82
58 - 67 años	6	4.58
68 - 77 años	1	0.76
Localización anatómica		
• Maxilar	66	50.38
• Mandíbula	65	49.62
Tipo histológico		
• Odontoma mixto	31	23.66
• Odontoma compuesto	53	40.46
• Odontoma complejo	47	35.88

*Mediana y percentil 25 y 75

12.3. Selección de muestras de estudio

De enero 2006 a diciembre 2016 se presentaron 131 muestras de odontomas (prevalencia de 1.5% en 11 años) de las cuales se seleccionaron 30 para la realización del proyecto, distribuidas de la siguiente forma:



DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN

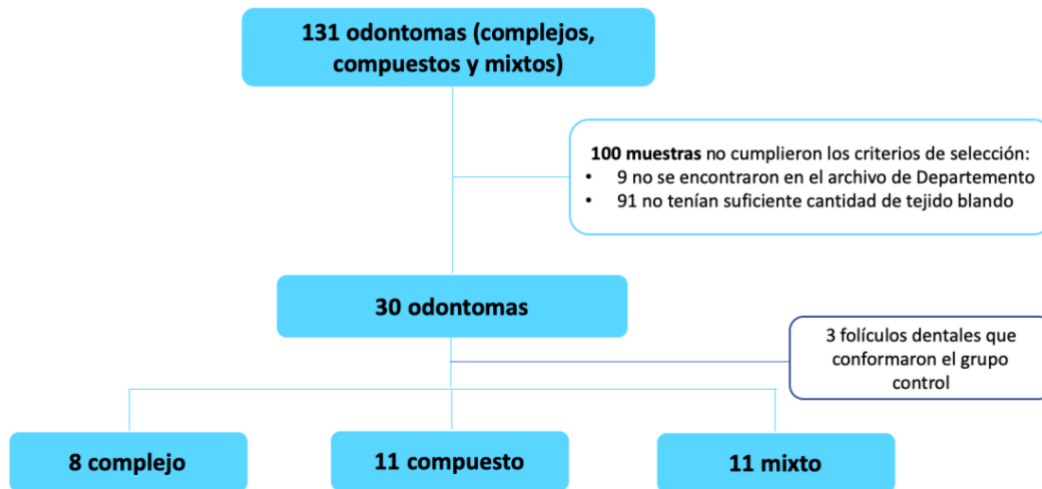


Fig. 4 Diagrama de flujo del proceso de selección para la población de estudio

Tabla 6. Descripción de los 4 grupos de estudio (Odontoma compuesto, complejo, mixto y grupo control)

Variable	Odontoma compuesto (n=11)	Odontoma complejo (n=8)	Odontoma mixto (n=11)	Grupo control (n=3)
Sexo				
• Femenino	9 (81.8%)	3 (37.5%)	4 (36.4%)	3 (100%)
• Masculino	2 (18.2%)	5 (62.5%)	7 (63.6%)	-
Edad	14 (13, 15)*	11 (9.5, 14)*	11 (7, 13)*	11.3**
Localización anatómica				
• Maxilar	6 (54.5%)	2 (25.0%)	3 (27.3%)	3 (100%)
• Mandíbula	5 (45.5%)	6 (75.0%)	8 (72.7%)	-

*Mediana (percentil 25, 75)

**Promedio



El diagnóstico histopatológico fue corroborado por el Mtro. Onner Cruz Tapia, Patólogo bucal adscrito al Departamento de Patología y Medicina bucal del DEPEI de la FO de la UNAM.

12.4 Resultados de la expresión génica

La estandarización para el dominio de la técnica de extracción de RNA, amplificación, electroforesis y lectura del gel de agarosa se llevó a cabo en el Laboratorio de investigación básica del Departamento de Patología bucal a cargo del Dr. Luis Fernando Jacinto Alemán, durante un periodo de dos meses, terminada la capacitación se realizaron los ensayos en las muestras de estudio.

Al analizar la distribución en la expresión génica en nuestra población con el análisis de comparación múltiple (prueba de Kruskal Wallis) se observó diferencias significativas para todos los genes: APC ($p < 0.001$), EVC ($p < 0.001$), FGF2 ($p = 0.009$), MSX1 ($p = 0.022$), TPRS1 ($p = 0.002$), RUNX2 ($p < 0.001$) y con el análisis Pos-Hoc determinamos la magnitud de las diferencias encontradas entre cada grupo (tabla 7, fig. 5), la expresión de APC fue mayor en el grupo de odontomas compuestos ($p = 0.009$), EVC y FGF2 tuvieron un predominio mayor en el grupo de odontoma mixto ($p = 0.005$ para ambos grupos). MSX1 presentó una expresión mayor en el grupo mixto ($p = 0.077$), TPRS1 se encontró mayormente en los odontomas complejos ($p = 0.012$). RUNX2 presentó menor expresión que el grupo control en los grupos complejo y mixto ($p = 0.009$ y 0.022 respectivamente).



Tabla 7. Expresión génica de TRPS1, EVC, APC, FGF2, MSX1 Y RUNX2 en el grupo control y en los grupos de odontoma compuesto, complejo y mixto.

GEN	CONTROL	COMPUESTO	P	COMPLEJO	P	MIXTO	P
APC	0.0017 ± 0.0003	0.5682 ± 0.3224	0.009	0.0079 ± 0.0038	0.009	0.1272 ± 0.2103	0.004
EVC	0.0037 ± 0.0017	0.6169 ± 0.2670	0.007	2.2093 ± 0.9343	0.012	4.2075 ± 3.9095	0.005
FGF2	0.7408 ± 0.3544	1.6111 ± 1.2576	0.007	3.6196 ± 1.6303	0.012	4.2816 ± 3.1604	0.005
MSX1	0.3507 ± 0.2362	2.3378 ± 1.2642	0.018	1.5815 ± 0.7476	0.012	2.3813 ± 1.2331	0.077
TRPS1	0.0019 ± 0.0005	0.7926 ± 0.5345	0.009	2.8744 ± 2.2523	0.012	1.4485 ± 1.1479	0.007
RUNX2	1.6211 ± 0.4097	1.9944 ± 1.1837	0.811	0.0188 ± 0.0131	0.009	0.4371 ± 0.5623	0.022

Se presenta promedio y desviación estándar



Fig. 5 Análisis comparativo de la expresión génica entre los diferentes grupos de odontomas

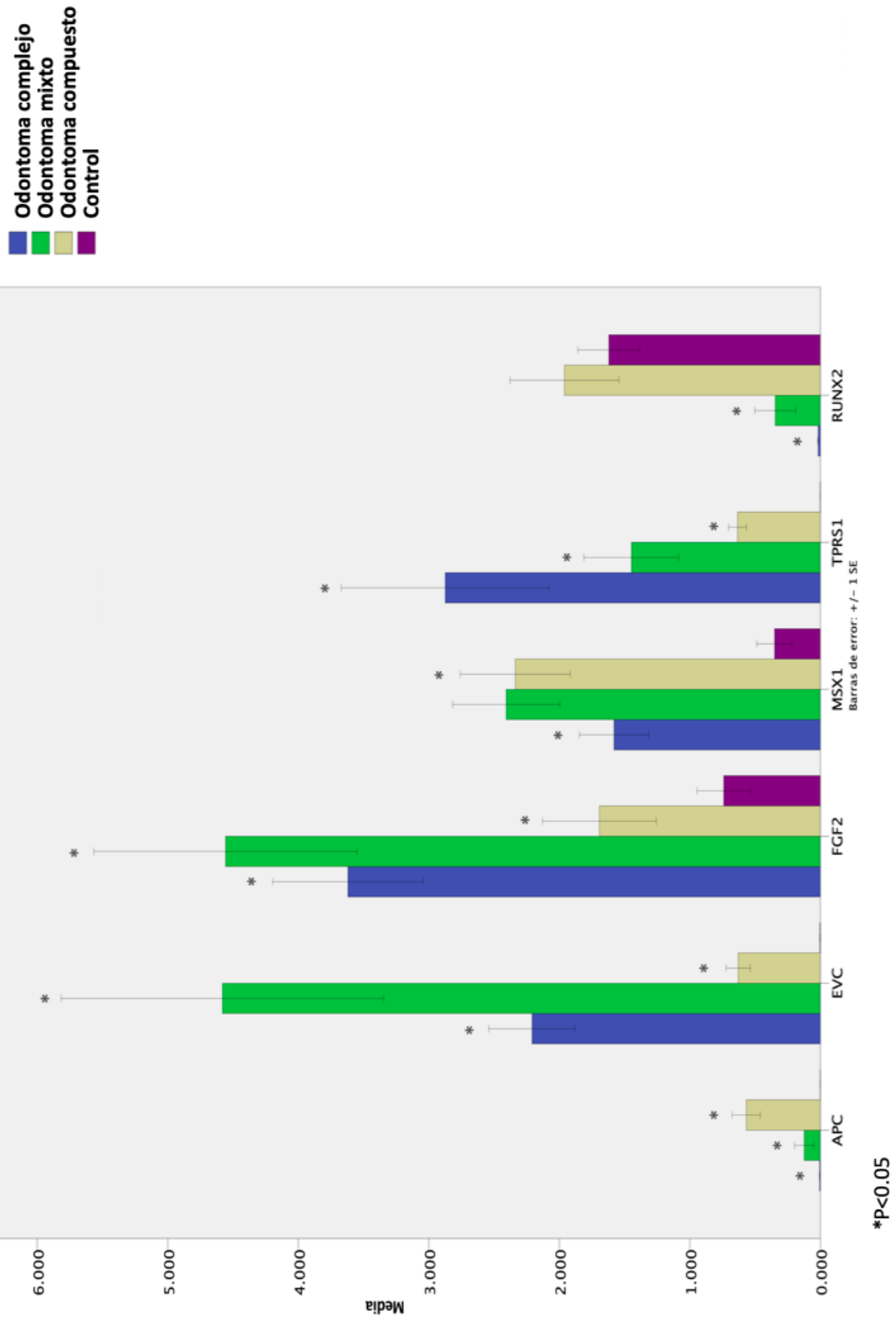




Fig 6. Expresión de genes TPRS1, APC, EVC, FGF2, MSX1 y RUNX2 en los grupos de estudio.

GEN	CONTROL	COMPUESTO	COMPLEJO	MIXTO
TRPS1				
APC				
EVC				
FGF2				
MSX1				
RUNX2				
GAPH				



13. DISCUSIÓN

Los tumores odontogénicos son lesiones de baja prevalencia en diversas partes del mundo, en nuestro estudio se obtuvo una frecuencia del 2.6%, muy similar a la reportada por India (2.17%)²⁷, Brasil (2.97%)²⁸, Chile (1.29%)²⁹ e Irán (1.9%)³⁰. Es notable que la prevalencia de los tumores odontogénicos en México se haya mantenido constante durante los últimos 20 años, Mosqueda A. y Cols³⁸. en 1997 reportaron la frecuencia de los tumores odontogénicos en México en un estudio multicéntrico, en el cual, el Departamento de Patología bucal reportó una prevalencia de 2.5% cifra idéntica a la reportada en el presente estudio, el odontoma y el ameloblastoma de igual manera encabezan la lista de frecuencias. Podemos asumir que los esfuerzos por obtener un diagnóstico oportuno han fallado y que el diagnóstico por hallazgo en revisiones radiográficas de rutina sigue siendo la principal fuente de detección de estas lesiones, aunado a ello, la investigación sobre la etiología de los tumores odontogénicos es escasa, lo que limita las oportunidades de crear tratamientos preventivos. Es imperativo la búsqueda de estrategias para la detección oportuna de los tumores odontogénicos, ya que en México siguen siendo una causa importante de procedimientos quirúrgicos extensos, los cuales comprometen la calidad de vida de los pacientes.

El tumor odontogénico más frecuente en nuestro estudio fue el odontoma (61.16%), Ochsenius G y Cols.²⁹ en la Universidad de Chile presentaron de igual manera al odontoma como la lesión más frecuente en su población (44.7%), países como Nigeria³¹ y Turquía³² reportan al ameloblastoma como el tumor odontogénico más frecuente (75.5% y 25% respectivamente), esta diferencia radica en el lugar donde se realizó el estudio. Nigeria y Turquía presentan reporte de Hospitales, en los cuales los pacientes son atendidos porque los ameloblastomas son lesiones invasivas y extensas por ello, las clínicas dentales o escuelas remiten a estos pacientes a hospitales para su atención, elevando con ello la prevalencia de estas lesiones en dicho lugar. En lo que respecta a los odontomas la distribución por sexo fue similar (52.67% de las lesiones se presentaron en mujeres y 47.33% en hombres) y, entre los 9 a 17 años fue el rango de edad en que los pacientes presentaron con mayor frecuencia las lesiones, esto se debe a que en esta edad los



pacientes inician tratamientos de ortodoncia, los cuales implican una serie de estudios radiográficos y en ellos las lesiones suelen detectarse por hallazgo, ya que, como previamente mencionamos son lesiones asintomáticas.

A pesar de que los odontomas son los tumores odontogénicos con mayor prevalencia el número de lesiones con las que trabajamos fue muy pequeño, las lesiones que no cumplieron los criterios de selección fue el 73.33%, en su mayoría, debido a la falta de tejido blando en las muestras, el tamaño de los odontomas es variable sin embargo esta falta de tejido en las muestras radica en las diferentes técnicas que utilizan los Cirujanos Maxilofaciales para hacer la remoción de la lesión. Al ser el tratamiento de los odontomas la enucleación y su envío a análisis histopatológico es muy difícil tener el control de tejido que se recibe en el Departamento de Patología bucal.

Los tumores odontogénicos tienen su origen durante el desarrollo dental por tal motivo durante mucho tiempo la investigación se ha centrado en la búsqueda de los genes blanco para su formación. En nuestro estudio el gen TRPS1 se expresó mayormente en los odontomas complejos, se ha demostrado en estudios *in vitro* que TRPS1 está involucrado en la maduración de odontoblastos y tan pronto como los odontoblastos se diferencian en odontoblastos maduros y comienzan a secretar matriz de dentina la expresión de TRPS1 va a la baja, es posible que la alta y constante expresión de este gen en el grupo de odontomas complejos induzca una sobre estimulación en estas células influenciado la regulación de la calidad, cantidad y estructura de la dentina. Una alteración en la expresión de TRPS1 es suficiente para perjudicar la mineralización y tamaño de tejidos dentales ya que se ha reportado una asociación con la expresión aberrante de OC y OPN (proteínas relacionadas con la mineralización y tamaño de los dientes) que van a la baja si TRPS1 no es expresado, curiosamente los grupos de odontomas mixtos y complejos presentaron mayor expresión de este gen, ambas lesiones tienen mayor presencia de dentina desorganizada, la cual afecta directamente con la estructura de la lesión y adicional a ello las lesiones suelen tener mayor tamaño.³³



La proteína β -catenina se encarga de diferenciar correctamente los ameloblastos para secretar esmalte funcional, esta proteína tiene una estrecha relación con el gen APC ya que tienen una regulación negativa entre ambas, por lo tanto APC también tiene una función importante en la amelogénesis dental. Se ha demostrado que es altamente expresado en los ameloblastos en la etapa de secreción y maduración, esto nos lleva a suponer que la alta expresión en nuestro grupo de odontomas complejos sobre-estimula los ameloblastos para la secreción de esmalte logrando con ello estructuras amorfas, además de repercusiones directas en la forma y cantidad del esmalte secretado.¹⁸

Tsuboi y Cols. encontraron que FGF2 se encarga de regular la diferenciación celular y la secreción de la matriz en los odontoblastos, identificaron una intensificación de su expresión durante la deposición de la matriz de dentina²⁶, por ello podemos asumir que una sobre-expresión de este gen puede conducir a una expresión aberrante de dentina durante la odontogénesis afectando la estructura normal, como sucede en los odontomas complejos y mixtos, curiosamente en nuestros resultados estos grupos fueron los que presentaron mayor expresión de FGF2.

Es indudable el papel que desempeña RUNX2 en las interacciones epitelio-mesenquimatosas durante las etapas de botón y campana de la odontogénesis, Wang y Cols. demostraron que ratones knockout RUNX2 carecen de dientes y que su desarrollo dental se detiene en la etapa de botón. En nuestros resultados encontramos una expresión mucho menor en el grupo complejo, pudiendo observar como la falta de este gen da como resultado la formación de un tumor con tejidos dentales sin estructura y por el contrario su sobre-expresión como lo muestra nuestro grupo de odontomas compuestos tiene como resultado una lesión con tejidos bien diferenciados y con estructura (denticulos), resultados concordantes con la función de este gen en etapas de la odontogénesis donde la diferenciación celular se lleva a cabo.^{34, 35}

Nakatomi y Cols. realizaron un estudio con ratones knockout EVC donde observaron la relevancia de este gen en la vía de señalización Shh, la cual se encarga de regular el crecimiento y la morfogénesis de los dientes en desarrollo. Los ratones tuvieron afectaciones en la ubicación buco-lingual de los molares inferiores, falta de



desarrollo de cúspides y raíces además de la fusión del primero y segundo molar, todos estos datos sugieren funciones en la morfología y ubicación dental, nuestros resultados de manera similar sugieren estas funciones en el gen. EVC presentó mayor expresión en el grupo de odontomas complejos, en los cuales podemos observar la alteración de la vía Shh reflejada en las características clínicas de este grupo (masas amorfas de tamaño variable y presentación de los tejidos desorganizada) y, al presentarse este grupo de estudio con mayor frecuencia en partes posteriores de la mandíbula sugerimos una función espacial para EVC.¹⁷ Mitsui y Cols.³⁶, mencionan la influencia de MSX1 en los arcos branquiales para el correcto desarrollo de las estructuras craneofaciales, dichas estructuras necesitan una regulación espacial extremadamente específica. Es contundente la evidencia de que las mutaciones en MSX1 tiene efectos en el desarrollo orofacial que conduce a un fenotipo variable, sin embargo, el mecanismo exacto en que esto sucede sigue siendo difícil de alcanzar.^{36, 37} Se ha descrito que mutaciones en MSX1 provocan agenesia de dientes premolares y terceros molares, sugiriendo que este gen tiene funciones particulares en zonas específicas de los arcos dentales (zona posterior), en nuestro estudio MSX1 se expresó mayormente en los odontomas compuestos, lo cuales se presentan en zonas posteriores de mandíbula y maxilar, con lo cual podemos sugerir que este gen tiene alta actividad en estas zonas de los maxilares.³⁹



14. CONCLUSIONES

Uno de los factores que impulsan a investigar la organogénesis es lograr comprender ampliamente los eventos moleculares que la regulan, con la intención de replicarlo y generar a voluntad estructuras celulares y tisulares complejas. Se podría decir que este es el *Santo Grial* de la ingeniería de tejidos y su búsqueda y descubrimiento logrará cambios trascendentales en la vida del ser humano. Como odontólogos no podemos sustraernos de esta realidad y debemos inducir a nuevas generaciones a pensar en términos de regeneración y no de reparación. La capacidad que tienen las células de los odontomas de generar tejidos dentales nos brinda la oportunidad de poder investigarlas y comprender los procesos que subyacen a estas entidades.

En este estudio, los resultados sugieren que hay genes con funciones específicas durante la odontogénesis y que la sobreexpresión o infraexpresión tiene resultados directos en las características clínicas de las lesiones. En el grupo de odontomas complejos encontramos una mayor expresión de genes encargados de la diferenciación celular en etapas tempranas de la odontogénesis por lo cual podemos asumir que esta interferencia ocasiona que los tejidos formen la estructura tan compleja de esta lesión, por el contrario en el grupo de odontomas compuestos tenemos afectaciones en estados tardíos de la odontogénesis donde las células tienen una diferenciación ya establecida, resultados concordantes con las estructuras tan organizadas que tienen los denticulos que conforman esta lesión.

Es imperativo estudiar diferentes genes y profundizar en los que presentamos. Actualmente los estudios dedicados a los procesos moleculares que subyacen a los tumores odontogénicos son escasos aun cuando existe evidencia de su participación en la odontogénesis, entender el comportamiento de estas lesiones ayudará a la creación de nuevas terapias para su tratamiento y su posible aplicación a la regeneración de tejidos.



15. BIBLIOGRAFÍA

1. Shahid M, Balto HA, Al-Hammad N, Joshi S, Khalil HS, Somily AM, Sinjilawi NA, Al-Ghamdi S, Faiyaz-UI-Haque M, Dhillon VS. Mutations in MSX1, PAX9 and MMP20 genes in Saudi Arabian patients with tooth agenesis. *Eur J Med Genet.* 2016 Aug;59(8):377-85.
2. Douglas R. Gnepp, *Diagnostic surgical pathology of the head and neck*, 2nd ed., Elsevier, Philadelphia, 2009.
3. Garg K, Chandra S, Raj V, Fareed W, Zafar M. Molecular and genetic aspects of odontogenic tumors: a review. *IJBMS.* 2015; 18:529-536.
4. Cawson RA. *Fundamentos de Medicina y patología oral.* 8ª ed. México: Elsevier; 2009.
5. Trejo D., Jacinto L. Frecuencia del odontoma compuesto y complejo en el Laboratorio de Patología bucal de la Facultad de Odontología, DEPeI [Tesina Licenciatura]. Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Odontología; 2014
6. Bei, M. (2009). Genética molecular del desarrollo dental. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19 (5), 504-510.
7. Sreekanth Kumar Mallineni, *Supernumerary Teeth: Review of the Literature with Recent Updates*, Conference Papers in Science Vol. 2014.
8. Wang XP, Fan J. Molecular genetics of supernumerary tooth formation. *Genesis.* 2011 Apr;49(4):261-77
9. Cruz EA. Clasificación de dientes supernumerarios: revisión de literatura. *Rev. estomatol.* 2014; 22(1):38-42.
10. Lotlikar PP, Creanga AG, Singer SR. Clinical and radiological findings in a severe case of cleidocranial dysplasia. *BMJ Case Rep.* 2018 Nov 12;2018.
11. Erdmann KS, Kuhlmann J, Lessmann V, Herrmann L, Eulenburg V, Müller O, Heumann R. The Adenomatous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain. *Oncogene.* 2000 Aug 10;19(34):3894-901.
12. Kiessling P, Dowling E, Huang Y, Ho ML, Balakrishnan K, Weigel B, Highsmith WE Jr, Niu Z, Schimmenti LA. Identification of aggressive Gardner



- syndrome phenotype associated with a de novo APC Variant, c.4666dup. Cold Spring Harb Mol Case Stud. 2019 Jan 29
13. Kantaputra P, Miletich I, Lüdecke HJ, Suzuki EY, Praphanphoj V, Shivdasani R, Wuelling M, Vortkamp A, Napierala D, Sharpe PT. Tricho-rhino-phalangeal syndrome with supernumerary teeth. *J Dent Res*. 2008 Nov;87(11):1027-31.
 14. Naqash TA, Alshahrani I, Simasetha S. Ellis-van Creveld Syndrome: A Rare Clinical Report of Oral Rehabilitation by Interdisciplinary Approach. *Case Rep Dent*. 2018 Jan 23;2018:8631602
 15. Wang XP and Fan J, Molecular genetics of supernumerary tooth formation, Special Issue on Craniofacial Development, Vol. 49, Issue 4, pp 261–277, 2011
 16. Pippi R, Odontomas and Supernumerary Teeth: Is There a Common Origin? *International Journal of Medical Science*, 2014; 11(12): 1282-1297
 17. Nakatomi M, Hovorakova M, Gritli-Linde A, Blair HJ, MacArthur K, Peterka M, Lesot H, Peterkova R, Ruiz-Perez VL, Goodship JA, Peters H. Evc regulates a symmetrical response to Shh signaling in molar development. *J Dent Res*. 2013 Mar;92(3):222-8.
 18. Sorkin BC, Wang MY, Dobeck JM, Albergo KL, Skobe Z. The cadherin-catenin complex is expressed alternately with the adenomatous polyposis coli protein during rat incisor amelogenesis. *J Histochem Cytochem*. 2000 Mar;48(3):397-406.
 19. Someya H, Fujiwara H, Nagata K, Wada H, Hasegawa K, Mikami Y, Jinno A, Sakai H, Koyano K, Kiyoshima T. Thymosin beta 4 is associated with RUNX2 expression through the Smad and Akt signaling pathways in mouse dental epithelial cells. *Int J Mol Med*. 2015 May;35(5):1169-78.
 20. Kantaputra P, Miletich I, Lüdecke HJ, Suzuki EY, Praphanphoj V, Shivdasani R, Wuelling M, Vortkamp A, Napierala D, Sharpe PT. Tricho-rhino-phalangeal syndrome with supernumerary teeth. *J Dent Res*. 2008 Nov;87(11):1027-31
 21. Shahid M, Balto HA, Al-Hammad N, Joshi S, Khalil HS, Somily AM, Sinjilawi NA, Al-Ghamdi S, Faiyaz-UI-Haque M, Dhillon VS. Mutations in MSX1, PAX9



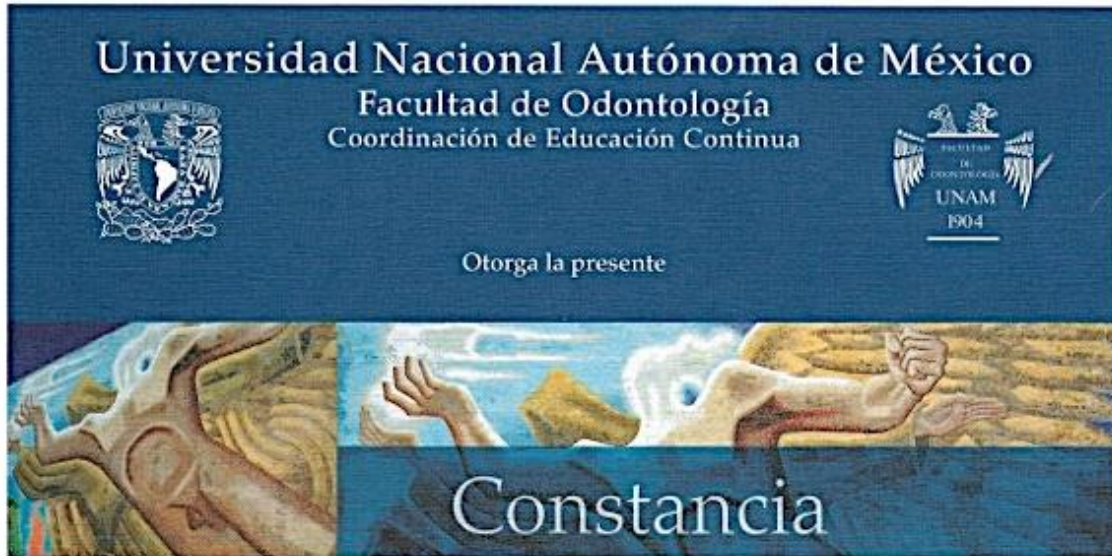
- and MMP20 genes in Saudi Arabian patients with tooth agenesis. *Eur J Med Genet.* 2016 Aug;59(8):377-85.
22. Xue Y, Zhu M, Qin D, Li Y, Cen X, Sun X, Lian W, Liao B. Establishment of a congenital tooth agenesis related gene MSX1 knockout human embryonic stem cell lines by CRISPR-Cas9 technology. *Stem Cell Res.* 2017 Oct;24:151-154.
23. Feng XY, Zhao YM, Wang WJ, Ge LH. Msx1 regulates proliferation and differentiation of mouse dental mesenchymal cells in culture. *Eur J Oral Sci.* 2013 Oct;121(5):412-20.
24. Mostowska A, Kobiela A, Trzeciak WH. Base molecular del diente no sindrónico. Agenesia: las mutaciones de MSX1 y PAX9 reflejan su papel en los patrones humanos dentición. *Eur J Oral Sci.* Octubre de 2003; 111 (5): 365-70.
25. Dos Santos ÍG, Jorge EC, Copola AG, Bertassoli BM, Goes AM, Silva GA. FGF2, FGF3 and FGF4 expression pattern during molars odontogenesis in *Didelphis albiventris*. *Acta Histochem.* 2017 Mar;119(2):129-141.
26. Tsuboi T, Mizutani S, Nakano M, Hirukawa K, Togari A. Fgf-2 regulates enamel and dentine formation in mouse tooth germ. *Calcif Tissue Int.* 2003 Nov;73(5):496-501
27. Nalabolu GRK, Mohiddin A, Hiremath SKS, Manyam R, Bharath TS, Raju PR. Epidemiological study of odontogenic tumours: An institutional experience. *J Infect Public Health.* 2017 May - Jun;10(3):324-330.
28. Osterne RL, Brito RG, Alves AP, Cavalcante RB, Sousa FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Apr;111(4):474-81.
29. Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Peñafiel C, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. *J Oral Pathol Med.* 2002 Aug;31(7):415-20.
30. Saghravanian N, Jafarzadeh H, Bashardoost N, Pahlavan N, Shirinbak I. Odontogenic tumors in an Iranian population: a 30-year evaluation. *J Oral Sci.* 2010 Sep;52(3):391-6.



31. Aregbesola B, Soyele O, Effiom O, Gbotolorun O, Taiwo O, Amole I. Odontogenic tumours in Nigeria: A multicentre study of 582 cases and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018 Nov 1;23(6):e761-e766
32. Olgac V, Koseoglu BG, Aksakalli N. Odontogenic tumours in Istanbul: 527 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Oct;44(5):386-8
33. Goss M, Socorro M, Monier D, Verdelis K, Napierala D. Trps1 transcription factor regulates mineralization of dental tissues and proliferation of tooth organ cells. *Mol Genet Metab*. 2019 Jan 23. pii: S1096-7192(18)30506-7
34. Wang XP, Aberg T, James MJ, Levanon D, Groner Y, Thesleff I. Runx2 (Cbfa1) inhibits Shh signaling in the lower but not upper molars of mouse embryos and prevents the budding of putative successional teeth. *J Dent Res*. 2005 Feb;84(2):138-43.
35. Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, Yuan GH, Dong J, Gay I, MacDougall M. Runx2, osx y dspp en el desarrollo dental. *J Dent Res*. 2009 Oct; 88 (10): 904-9.
36. Mitsui SN, Yasue A, Masuda K, Naruto T, Minegishi Y, Oyadomari S, Noji S, Imoto I, Tanaka E. Novel human mutation and CRISPR/Cas genome-edited mice reveal the importance of C-terminal domain of MSX1 in tooth and palate development. *Sci Rep*. 2016 Dec 5;6:38398.
37. Feng XY, Zhao YM, Wang WJ, Ge LH. Msx1 regulates proliferation and differentiation of mouse dental mesenchymal cells in culture. *Eur J Oral Sci*. 2013 Oct;121(5):412-20.
38. Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruiz-Godoy Rivera LM, Meneses-Garcia A. Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84(6): 672–5.
39. Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*. 1994 Apr;6(4):348-56.

16. ANEXOS

16.1 Trabajos derivados de la investigación



A **LORENA CORREA ARZATE**

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL TRABAJO:
**"PREVALENCIA DE TUMORES ODONTOGÉNICOS DEL DEPARTAMENTO DE
PATOLOGÍA BUCAL DEL AÑO 2006 A 2016"**

PRESENTADO EN LA EXPOSICIÓN DE CARTELES DURANTE
**EL CONGRESO NACIONAL E INTERNACIONAL
DE SALUD PÚBLICA BUCAL 2018**

Coautores:
LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN, JAVIER PORTILLA ROBERTSON

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"

Ciudad Universitaria, CDMX, 22 y 23 de febrero de 2018.



Mtro. José Arturo Fernández Pedrero
Director

Mtro. Enrique Navarro Bori
Coordinador de Educación Continua



16.2 Artículos derivados de la investigación

TÍTULO

Systematic review of the genetic alterations underlying the development of odontogenic tumors formed by epithelial and odontogenic mesenchyma

Revisión sistemática de las alteraciones genéticas subyacentes al desarrollo de tumores odontogénicos formados por tejido epitelial y mesénquima odontogénico

Correa-Arzate Lorena¹, Jacinto-Alemán Luis Fernando², Portilla-Robertson Javier³, Peralta-Pedrero María Luisa⁴

RESUMEN

ANTECEDENTES: Los tumores odontogénicos representan un amplio grupo de lesiones que derivan de los tejidos que dan origen a los dientes, por lo tanto, tienen una estructura histológica específica que refleja diversos estadios de la odontogénesis. La etiología es desconocida, sin embargo, diversos autores sugieren como origen una alteración genética para estas lesiones.

OBJETIVOS: Identificar cuales son las alteraciones genéticas subyacentes al desarrollo de tumores odontogénicos formados por tejido epitelial y mesenquimal.

MÉTODOS: Se realizó una revisión sistemática utilizando las bases de datos electrónicas: PUBMED y SCIEDIRECT, para identificar los artículos necesarios para el objetivo, se utilizaron los siguientes términos MESH: genes, odontogenic tumour, ameloblastic fibroma, primordial odontogenic tumour, odontoma, odontoma compound, odontoma complex, dentinogenic ghost cell, msx1, fgf2, apc, trps1, runx2, sox2 y etc. Los cuales fueron combinados con el término booleano 'AND' en 56 set de búsqueda.

RESULTADOS: 5 artículos publicados entre 1990 y 2018 cumplieron los criterios de inclusión, todos ellos eran transversales. Se evaluaron los siguientes genes: PRKAR1A, B-catenina, SOX2, TGFB2, FGF1 Y FGF2 en diversos tumores odontogénicos, encontrándose alterados en las lesiones evaluadas sin embargo la calidad metodológica de lo estudios no permite generalizar los resultados.

CONCLUSIONES: Los hallazgos obtenidos muestran que hay una relación entre las alteraciones genéticas con el desarrollo de tumores odontogénicos, sin embargo la metodología en los estudios moleculares tiene deficiencias que impide hacer una vinculación con la aplicación clínica de los resultados.

INTRODUCCIÓN

Los tumores odontogénicos son un complejo grupo de lesiones que derivan de elementos epiteliales, mesenquimatosos o ambos, que forman parte del sistema de formación de los dientes, por lo que son exclusivos de mandíbula y maxilar. Se desconoce la etiología y patogenia de este grupo de

tumores y no se conocen causas o estímulos que los originen. Desde un punto de vista clínico los tumores odontogénicos son asintomáticos, pero pueden producir expansión mandibular, movilidad dental y pérdida ósea, lo que compromete el tratamiento conservador afectando la calidad de vida de los pacientes. Desde el



punto de vista histológico, estas lesiones al igual que los tumores del resto del organismo son similares a la célula o tejido que los origina y pueden simular los tejidos blandos del órgano del esmalte y la pulpa dental o bien contener elementos de tejidos duros como esmalte, dentina, cemento o una mezcla de éstos. Las lesiones de este grupo varían desde las proliferaciones hamartomatosas hasta tumores malignos con capacidad de producir metástasis, por ello, la comprensión de la conducta biológica de los diversos tumores odontogénicos es una condición indispensable para el tratamiento de los pacientes.^{1,2}

Se han diseñado diversas clasificaciones histológicas con el fin de comprender este complejo grupo de lesiones, el denominador común en todas ellas es que dividen a los tumores en: los que se componen de elementos epiteliales, los que se constituyen de elementos mesenquimatosos odontogénicos y los que presentan proliferación de ambos componentes (mixtos), éste último grupo son los tumores mas raros e interesantes, al contar con estos dos tejidos tienen la capacidad de formar estructuras complejas formados por distintos tipos celulares, por este motivo diversos autores han tratado de descubrir los mecanismos génicos que subyacen al desarrollo de estos tumores. Diversas teorías apuntan hacia un origen en la odontogénesis, proceso que se encuentra altamente regulado por genes, cada gen se encuentra coordinado con señales y factores para llevar a cabo cada etapa que la conforma, por tal motivo la investigación se ha centrado en la búsqueda de alteraciones génicas que puedan derivar en un tumor odontogénico. La evidencia sobre esta teoría es muy limitada, lo que disminuye las oportunidades para la creación de terapias preventivas o tratamientos conservadores.

La investigación molecular ha tenido un avance considerable en los últimos años, la

creación de nuevas tecnologías favorece este crecimiento, sin embargo los estudios siguen teniendo deficiencias metodológicas que limita su aplicación clínica en pacientes, en ello radica la necesidad de evaluar críticamente la evidencia disponible para identificar áreas de oportunidad y que el conocimiento no se quede únicamente en estudios exploratorios o descriptivos.

Objetivos

Identificar cuales son alteraciones genéticas subyacentes al desarrollo de tumores odontogénicos formados por tejido epitelial y mesenquimal.

Material y métodos

Protocolo y registro

La revisión sistemática fue conducida siguiendo los lineamientos PRISMA. Se realizó un protocolo de registro en PROSPERO (International prospective register of systematic reviews) de la Universidad de York con número de registro CRD42018097065.

Búsqueda electrónica

Dos investigadores realizaron la búsqueda sistemática en las bases de datos electrónicas PUBMED y SCIENCE DIRECT (enero 1990 a enero 2018) para identificar las alteraciones genéticas en tumores odontogénicos benignos con epitelio y mesénquima. Se utilizaron los siguientes términos MESH: genes, odontogenic tumour, ameloblastic fibroma, primordial odontogenic tumour, odontoma, odontoma compound, odontoma complex, dentinogenic ghost cell, msx1, fgf2, apc, trps1, runx2, sox2 y evc. Los cuales fueron combinados con el término booleano 'AND' en 56 set de búsqueda. Las búsquedas en PUBMED y SCIENCE DIRECT se muestran en el apéndice 1.

Criterios de elegibilidad



Para su inclusión los estudios debían ser investigaciones originales (cohortes, casos y controles, transversales) que tuvieran diagnóstico confirmado por biopsia de cualquiera de los tumores siguientes: ameloblastic fibroma, primordial odontogenic tumour, odontoma, odontoma compound type, odontoma complex type y dentinogenic ghost cell. Adicional a ello, los estudios que no hayan realizado técnicas de biología molecular para la detección de genes serían excluidos. Los estudios debían estar publicados en español o inglés.

Selección de artículos y extracción de datos

Dos investigadores juzgaron de manera independiente todos los títulos y resúmenes de los estudios, subsecuentemente se obtuvieron los textos completos de los estudios relevantes que parecían cumplir con los criterios de elegibilidad. Posteriormente dos autores de manera independiente evaluaron los textos completos y resolvieron cualquier desacuerdo de elegibilidad mediante discusión o, si fuera necesario, a través de un tercero. La siguiente información es la que se recabó de los estudios incluidos: autor, año en que se publicó el estudio, país donde se realizó, diseño metodológico, tamaño de la muestra, gen y tipo de tumor odontogénico estudiado,

RESULTADOS

Búsqueda de la literatura

La figura 1 resume el proceso de selección para los estudios evaluados. La búsqueda inicial arrojó 2278 estudios de PUBMED y SCIENCE DIRECT de los cuales 19 se eliminaron por estar duplicados. Después del cribado para la elegibilidad por títulos y

resultados y técnicas moleculares utilizadas. La extracción de los datos fue clasificada en tres tablas (Tabla 1, 2 y 3).

Evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos

La evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos fue una de las grandes limitantes en la presente revisión, no se cuenta con instrumentos para la extracción de datos en estudios de ciencia básica, los cuales, en su mayoría son estudios transversales. Las tablas fueron construidas con los criterios mínimos necesarios para evaluar la calidad metodológica, los criterios de selección determinaron la inclusión de los artículos y a través de las tablas evaluamos críticamente la calidad de los mismos (tablas 1, 2 y 3). La construcción de las tablas se llevó a cabo por tres investigadores expertos en el área y la extracción de los datos se llevó a cabo por dos investigadores de manera independiente. Todos los estudios realizaron diferentes análisis en diferentes muestras pero en un solo periodo de tiempo, por tal motivo se consideraron estudios transversales, adicional a ello se clasificó si fue realizado en humanos o en modelo animal.

resumen, 27 textos fueron seleccionados, de los cuales, 22 artículos fueron excluidos después del cribado en texto completo. Las razones principales para su exclusión se describen en la figura 1.

Ninguna revisión sistemática acerca de genes en tumores odontogénicos fue encontrada.

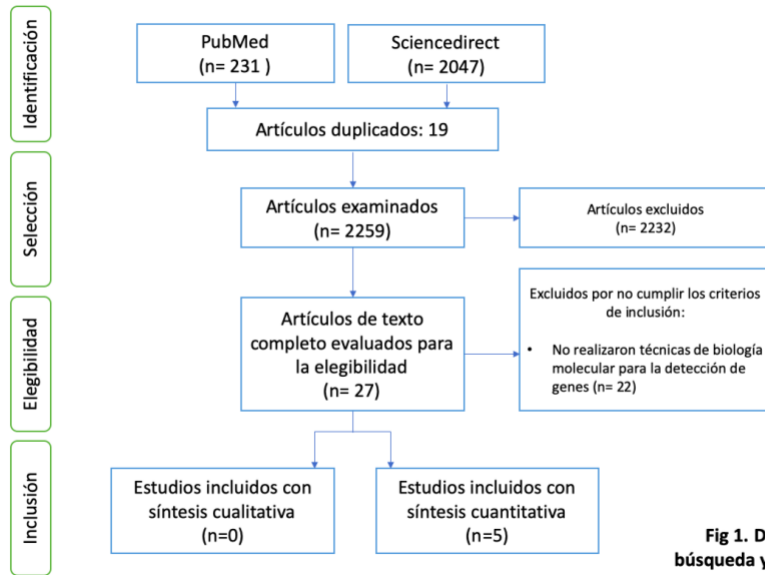


Fig 1. Diagrama de flujo de la búsqueda y proceso de selección

Descripción de los estudios incluidos

En total 5 artículos publicados fueron incluidos en esta revisión (Tabla 1). En un estudio las pruebas fueron realizadas en ratones, los 4 estudios restantes utilizaron tumores odontogénicos para su revisión, 4 estudios contaron con grupo control para su análisis. Los tumores odontogénicos estudiados fueron los siguientes: Fibromas ameloblásticos, Fibroodontomas ameloblásticos, Fibrodentinoma ameloblástico, Fibrosarcomas ameloblásticos, Ameloblastomas, Foliculos

dentales, Sarcomas odontogénicos, Tumor odontogénico de células fantasma, Mixomas, Quiste dentígero, Queratoquiste odontogénico, Quiste periodontal del desarrollo, Quiste gingival del adulto, Quiste odontogénico glandular, Quiste radicular, Quiste odontogénico calcificante, Ameloblastoma folicular, Tumor odontogénico adenomatoide, Tumor odontogénico epitelial calcificante, Fibroma ameloblastico, Fibroodontoma ameloblástico y Odontoma (Tabla 1



Tabla 1. Características de los estudios incluidos en la revisión sistemática de las alteraciones genéticas subyacentes al desarrollo de tumores odontogénicos formados por tejido epitelial y mesenquimal						
Autor/año /país	Título	Objetivo del estudio	Diseño	Tamaño de muestra	Limitantes	Fortalezas
Sousa S., y Cols ³ 2015, Brasil	Defects of the Carney complex gene (PRKAR1A) in odontogenic tumors	Investigar las alteraciones moleculares del gen PRKAR1A en los tumores odontogénicos (TO) con componente ecto-mesenquimal	Tansversal en tejido humano	Tumores en tejido fresco: 7 Fibromas ameloblásticos (FAM) 4 Fibroodontomas ameloblásticos (FOA) 2 Fibroodontinoma ameloblástico (FDA) 2 Fibrosarcomas ameloblásticos (FSA) 7 Ameloblastomas (AM) 6 Folículos pericoronales de terceros molares (FD) Tumores en parafina: 2 Sarcomas odontogénicos (SO) 4 Fibroodontomas ameloblásticos (FOA) 7 Fibromas ameloblásticos (FAM) Grupo control: 5 muestras de Mucosa oral sana (MO)	Tamaño de muestra pequeño, No describe la procedencia de la muestras ni la forma de selección de las misma.	Los tumores odontogénicos fueron revisados por dos patólogos para confirmar su diagnóstico histopatológico. La inmunohistoquímica fue analizada por tres investigadores. La probación del comité de ética fue descrita en el texto.
Kim S., y Cols ⁶ Corea, 2017	Investigation of the β -catenin gene in a case of dentinogenic ghost cell tumor	Describir las mutaciones y expresión del gen β -catenin en un caso de tumor odontogénico de células fantasma	Tansversal en tejido humano	Tumor en tejido fresco: 1 tumor odontogénico de células fantasma (TOCF)	El análisis genético en muestras que se obtienen de tejidos fijados e incluidos en parafina solo permiten detectar fragmentos pequeños de hasta 400 bp, para un producto de amplificación de 200 bp es aceptable.	Las mutaciones fueron detectadas a través de la técnica de PCR y se utilizó la secuenciación de ADN para confirmarlo.
Xavier G., y Cols ⁵ Londres, 2015	Activated WNT signaling in postnatal SOX2-positive dental stem cells can drive odontoma formation	Explorar si células madre positivas a SOX2 son responsables de iniciar de novo estructuras tipo diente posnatales ectópicas en un modelo Ctnnb1	Tansversal en tejido animal	Muestra: 44 ratones genotípicamente condicionados Sox2CreERT2/+; Ctnnb1lox(ex3)/+ and R26EYFP/+ y R26mTmG/+ (11 por genotipo) Grupo control: Células mutantes no estimulados con tamoxifen	El periodo de seguimiento es muy corto.	Es un diseño experimental muy bueno desde el punto de vista genético, el uso de mutantes es la forma mayormente aceptada para determinar la función de un gen.
Los K., y Cols ⁴ Finlandia 1992	Transforming Growth Factor B2 in Epithelial Differentiation of Developing Teeth and Odontogenic Tumors	Identificar la función del TGF β 2 en el desarrollo de tumores odontogénicos	Tansversal en tejido humano	Tumores en tejido fresco: 4 Ameloblastomas (AM) 2 Fibromas ameloblásticos (FAM) 2 Mixomas (MIX) Tejidos fetales: 8 mandíbulas de 13 a 20 semanas de gestación Grupo control: Placenta, niño y mandíbulas sin gérmenes dentales	No describe la forma de selección de las muestras.	Confirmación de la presencia de transcrito y proteína a través de pruebas complementarias y a la vez de confirmación (nothern blot, PCR, hibridación in situ e inmunocitoquímico).
So F., y Cols ⁷ Canada, 2000	Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2, and receptors FGFR2 and FGFR3 in the epithelium of human odontogenic cysts and tumors	Identificar por medio de inmunohistoquímica la presencia de FGF1 y FGF2 con sus receptores en quistes y tumores odontogénicos para determinar si están involucrados en la diferenciación del epitelio odontogénico y en el desarrollo de quistes y tumores.	Tansversal en tejido humano	Tumores en tejido fresco: 3 Quiste dentígero (QD) 3 Queratoquiste odontogénico (QO) 3 Quiste periodontal del desarrollo (QPD) 3 Quiste gingival del adulto (QGA) 3 Quiste odontogénico glándular (QOG) 3 Quiste radicular (QR) 3 Quiste odontogénico calcificante (QOC) 3 Ameloblastoma folicular (AMF) 3 Tumor odontogénico adenomatoide (TOA) 3 Tumor odontogénico epitelial calcificante (TOEC) 3 Fibroma ameloblástico (FAM) 3 Fibroodontoma ameloblástico (FOA) 3 Odontoma (ODO) Grupo control: Epitelio odontogénico normal y folículos dentales sanos	No describe la forma de selección de las muestras.	Mayor cantidad y diversidad de lesiones estudiadas, unificación de la técnica molecular en todas las lesiones.

Abreviaturas: Tumores odontogénicos (TO), Fibromas ameloblásticos (FAM), Fibroodontomas ameloblásticos (FOA), Fibroodontinoma ameloblástico (FDA), Fibrosarcomas ameloblásticos (FSA), Ameloblastomas (AM), Folículos dentales (FD), Sarcomas odontogénicos (SO), Mucosa oral (MO), Tumor odontogénico de células fantasma (TOCF), Mixomas (MIX), Quiste dentígero (QD), Queratoquiste odontogénico (QO), Quiste periodontal del desarrollo (QPD), Quiste gingival del adulto (QGA), Quiste odontogénico glándular (QOG), Quiste radicular (QR), Quiste odontogénico calcificante (QOC), Ameloblastoma folicular (AMF), Tumor odontogénico adenomatoide (TOA), Tumor odontogénico epitelial calcificante (TOEC), Fibroma ameloblástico (FAM), Fibroodontoma ameloblástico (FOA), Odontoma (ODO).



Los estudios realizaron diferentes técnicas de biología molecular de acuerdo al objetivo de su investigación, por ello no existe una homogeneidad entre ellos, sin embargo podemos identificar resultados concretos en cada uno de ellos (Tabla 2).

Sousa S., y Cols³ se encargaron de evaluar la alteración del gen PRKAR1A en 6 tipos de tumores odontogénicos, encontrando una disminución en la expresión de este gen en todos los tumores odontogénicos asociando esta baja expresión a un LOH en marcadores alrededor del gen. Kim S., y Cols⁴. Presentaron un reporte de caso evaluando las mutaciones del gen β -catenin en un caso de tumor odontogénico de células fantasma encontrando una mutación sin sentido en el codón 3 (ACT \rightarrow TCT) del gen catenina y la inmunohistoquímica acumulación nuclear, citoplásmica y membranosa de catenina en el tumor. Heikinheimo K., y Cols⁶. estudiaron la función de TGFB₂ durante el desarrollo dental y su función en los tumores odontogénicos, encontrando este factor presente durante toda la odontogénesis actuando en etapas tempranas como un

regulador y en estadios finales como inhibidor del crecimiento epitelial.

So F., y Cols⁷ evaluaron la presencia de FGF1 y FGF2 en diversos quistes y tumores odontogénicos, logrando identificar que FGF-1 y el receptor FGFR₃, estaban ausentes o solo se detectaban de manera muy débil, datos similares fueron encontrados para la odontogénesis normal por lo que sugiere que estos factores se asocian con la diferenciación odontogénica en lugar de la patogénesis de los tumores o quistes, por su parte los fibromas ameloblasticos y los fibroodontomas ameloblasticos presentaron importante tinción nuclear en las células epiteliales, lo que sugiere que el FGF2 participa en la activación nuclear durante la etapa de histodiferenciación. Xavier G., y Cols⁵ fueron los únicos que utilizaron un modelo animal para estimular células madres dentales en ratones de 5 semanas para generar estructuras semejantes a odontomas, encontrando que la activación de la vía WNT a través de B catenina y Sox2 en las células epiteliales con este genotipo pueden ser los inductores de estos tumores.



Tabla 2. Resultados obtenidos en lo estudios incluidos en la revisión sistemática de las alteraciones genéticas subyacentes al desarrollo de tumores odontogénicos formados por tejido epitelial y mesenquimal.																						
Autor/año/país	Gen	Tumor odontogénico														Resultados	Interpretación de los resultados					
		FAM	FOA	FDA	FSA	AM	SO	TOCF	ODO	MIX	OD	OO	OPD	OGA	OOG	OR	OOC	TOA	TOEC			
Sousa S., y Cols ³ 2015, Brasil	PRKAR1A	✓	✓	✓	✓	✓	✓														<p>PCR- PRKAR1A mostró una expresión disminuida en los TO evaluados en comparación con la MO, por su parte PRKAR2A fue similar en los dos grupos. En la inmunohistoquímica los AM mostraron una expresión positiva de PRKAR1A en las islas epiteliales, el FDA mostró una expresión fuerte en el ectomesénquima y en el epitelio. En el análisis LOH 4 FAM mostraron LOH para 2 marcadores evaluados en el mesénquima o epitelio, 1 FOA y FSA mostró LOH. Se encontró una alteración missense (c.802GOA) en el exon 8 y solo en mesénquima de FOA de además 2 alteraciones de secuencia en 5'-UTR y 4 variantes intrónicas en la secuenciación.</p>	<p>Los tumores odontogénicos mixtos mostraron disminución de la expresión de PRKAR1, adicional a ello se sometieron a LOH en el locus PRKAR1A en el componente epitelial y/o mesenquimatoso, lo que indica que la LOH encontrada en ellos podría ser una de las razones de su pérdida de expresión de proteínas. La alteración missense puede causar efectos en la interacción de la proteína con su ligado, que a su vez afecta su función. Las alteraciones de secuencia en 5' - UTR que se encontraron en el estudio no se conocen, sin embargo estudios revelan que pueden conducir a una síntesis de proteína alterada.</p>
Kim S., y Cols ⁴ . Corea, 2017							✓														<p>Histopatología: el tumor reveló grupos de células fantasma dentro de los componentes epiteliales de tipo ameloblastoso, el epitelio se formó por células columnares periféricas y centralmente por células que simulaban el retículo estrellado. Inmunohistoquímica: las células columnares del epitelio ameloblástico mostraron una expresión de b-catenina de leve a moderada tanto en citoplasma como en la membrana. Las células fantasma tuvieron reacción negativa. La ciqueratina AE1-3 se expresó altamente en las células tumorales y fantasma, mientras que Bcl-2 fue negativo. Ensayo tunel: mostró señales positivas en las celulas nucleadas adyacentes a la celulas fantasma. Análisis de mutación de B-catenina: el análisis de secuencia de ADN mostró una mutación sin sentido en el codón 3 del gen β-catenina cambiando en el codón 3 de trionina a serina.</p>	<p>La mutación de b-catenina en codón 3 no es un punto relevante de mutación en el gen de la b-catenina, no se demostró que afecte la estabilización del gen, es posible que afecte la estructura secundaria de la proteína que le impida interactuar con su regulador.</p>



<p>Xavier G., y Cols⁵. Londre 5, 2015</p>	<p>SOX2</p>							<p>✓</p>																<p>Se expresó una forma mutante activada de Ctnnb1 en células madre dentales de ratones de 5 semanas de edad utilizando tamoxifeno inducido por Sox2CreERT2/+. Tres meses después se observaron múltiples estructuras calcificadas en maxilar y mandíbula semejantes a los odontomas. La tinción con fosfohistoma-H3 reveló células en proliferación en los compartimientos mesenquimales y epiteliales de los odontomas formados. Se realizó inmunohistoquímica que confirmó células con fuerte expresión nuclear de b-catenina consistente con células que se encuentran mutadas con b-catenina. No se encontraron alteraciones en los ratones PrkaraC/K.</p>	<p>La activación de la vía WNT a través de B catenin y Sox2 indica que células epiteliales con este genotipo pueden ser los inductores de la formación de odontomas.</p>
<p>Heikin heimo K., y Cols⁶. Finlandia 1992</p>		<p>✓</p>			<p>✓</p>			<p>✓</p>																<p>La amplificación de las muestras produjo una única banda de 682 pb para TGF2 en las tres muestras de gérmenes de gérmenes dentales y en 3 de los AM. TGF2 no se detectó en el grupo control (mandíbulas sin gérmenes dentales) ni en los 2 MIX. TGF2 en el desarrollo del diente: BOTÓN: el TGF2-RNA se concentra en el folículo dental. CAMPANA: en los estadios iniciales e intermedios se encontró en el folículo dental, alrededor de la lámina y debajo del epitelio oral. CAMPANA TARDÍO: se encontró en epitelio del esmalte interno, lámina dental y epitelio oral. TGF2 en tumores odontogénicos: No se detectaron transcritos de TGF2 en células tumorales epiteliales de AM. En los MIX no se encontró TGF2. En todos los tumores odontogénicos Ck19 se localizó en el epitelio neoplásico.</p>	<p>TGF2 se expresa con diversos patrones y parcialmente superpuesto durante el desarrollo del diente humano lo que sugiere roles reguladores coordinados para varios TGF2. El cambio de la expresión del ARNm de TGF2 a las células de la lámina dental tuvo lugar cuando empezó a degenerar lo que sugiere que primero actúa como regulador de la diferenciación y después como inhibidor del crecimiento epitelial.</p>
<p>So F., y Cols⁷. Canadá, 2000</p>		<p>✓</p>	<p>✓</p>		<p>✓</p>		<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>✓</p>	<p>La mayoría de los tumores mostraron una tinción con FGF2 de moderada a intensa y poca o ninguna tinción con FGF1, la tinción fue usualmente citoplasmática. En los FAM y los FOA se encontró tinción nuclear para FGF2 en las células epiteliales. El receptor FGFR3 mostró una tinción citoplasmática de</p>	<p>El patrón de tinción en los tumores y en el grupo control (epitelio odontogénico normal) confirma que FGF2 no se pierde durante la tumorigénesis. El tejido odontogénico menos maduro como es observado en el FAM y en el FOA mostró tinción</p>



análisis de su objetivo. El empleo de la técnica de microdissección láser hace más específico el análisis al reducir el fondo que pudiese crear el tejido conectivo respecto a análisis génico, su principal limitante es el no incluir otro tipo de tumores de naturaleza epitelial, mixta y mesenquimal en el ensayo.

Kim S., y Cols. presentan un reporte de caso clínico, los resultados obtenidos del análisis sobre la mutación de B-catenina son limitados a un solo evento, sin embargo, los datos obtenidos son valiosos ya que emplea el enfoque de microdissección para limitar el fondo inespecífico del tejido conjuntivo.

Xavier G., y Cols. construyen del modelo experimental animal novedoso, sin embargo solo se queda a nivel morfo-histológico. El buscar estudios a nivel génico o proteómico era deseable. Dentro de los principales problemas en el estudio de los tumores odontogénicos es la presencia de modelos experimentales que permitan su estudio a nivel patogénico.

Heikinheimo., y Cols. muestran un estudio muy sólido, ya que los ensayos de PCR e hibridación in situ se complementan y comprueban, para el análisis de un biomarcador definido. Su principal limitante es esa, el no abrir o ampliar el número de biomarcadores estudiados, quizá el anexar más marcadores de importancia epitelial u mesenquimal odontogénico mejoraría su alcance.

So F., y Cols. presentan el estudio más limitado, el análisis inmunohistoquímico sólo permite un análisis semicuantitativo con beneficio de observación histológica, aunque para la época era novedoso con la métrica contemporánea es poco, ya que requeriría más tipos de ensayos. (Tabla 3)

Los genes estudiados por cada autor mostraron estar alterados en los tumores estudiados, sin embargo no podemos generalizar los resultados por el número tan reducido de lesiones que incluyeron en cada uno de ellos.



Tabla 3. Características de las técnicas moleculares de los estudios incluidos en la revisión sistemática de las alteraciones genéticas subyacentes al desarrollo de tumores odontogénicos. <i>Análisis de la expresión de genes y microARNs en la expresión epitelio-mesénquima odontogénica en odontomas compuestos.</i>						
Autor/año/país	Técnica empleada	Adecuada al objetivo		Reproducibilidad		Ejemplos y mixtos
		SI	NO	SI	NO	
Sousa S., y Cols ² 2015, Brasil	<p>Microdissección: se cortaron 10 secciones de 10 μm de forma manual y de 12 μm con láser (en 5 FAM, 2 FSA, 1 FDA y a 2 FOA).</p> <p>Extracción de RNA por el método de TRIZOL.</p> <p>PCR-RT: (genes diana PRKAR1A y PRKAR2A) (7 AM, 1 FAM, 1 FDA, 5 MO, 6 FD).</p> <p>Inmunohistoquímica: (proteína PRKAR1A (clone 6C7) diluida 1:80).</p> <p>Aislamiento de ADN con el kit QiaAmp DNA FFPE tissue kit (Qiagen) (7 AM, 5 FAM, 4 FOA, 2 FSA).</p> <p>Análisis de LOH: (4 marcadores polimorficos de ADN localizados alrededor del gen PRKAR1A), se realizó PCR y los productos de amplificación se detectaron mediante electroforesis capilar. (en 5 FAM, 2 FSA, 1 FDA y a 2 FOA)</p> <p>Secuenciación directa los puntos diana de ADN se amplificaron por PCR y se purificaron con GFX PCR DNA y un kit de gel de purificación de banda, se secuenciaron usando un terminador BigDye. (en 5 FAM, 1 FSA, 1 FDA y a 2 FOA).</p> <p>Ratones Prkar1aC/K: 5 y 6 ratones de 1 y 6 meses de nacidos respectivamente que portaban una deleción del exón 2, se estudiaron sus estructuras orofaciales, previa fijación en paraformaldehído al 4%, descalcificadas con EDTA al 0.9 M con pH de 7.5 por 20 días, embebidas en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HyE).</p>	✓		✓		Realizar un comparativo contra otros tipos de tumores odontogénicos de naturaleza epitelial, mixta y mesenquimal. Además la variabilidad radica en la selección de las zonas para la disección laser, con esta técnica se reduce el ruido generado por la expresión que hay en tejido conjuntivo.
Kim S., y Cols ⁵ . Corea, 2017	<p>Histopatología: se tiñeron tejidos de 5 micras con HyE.</p> <p>Inmunohistoquímica: se utilizaron los anticuerpos: anticatenina (1:200), anticitoqueratina AE1-3 (1:200) y anti Bcl-2 (1:50), como cromógeno 3-3=tetraclohidrato de diaminobenzidina.</p> <p>Ensayo tunel: se utilizó el kit Apoptag plus peroxidasa.</p> <p>Análisis de mutación de B-catenina: extracción de ADN de muestras incluidas en parafina y microdisseccionadas y amplificación por PCR de la región GSK3 que son sitios de fosforilación de b-catenina, posterior electroforesis en gel de agarosa al 1.8%. y secuenciación genética con el aparato Applied Biosystem 310 genetic analyzer.</p>	✓		✓		Al ser solo el reporte de un caso clínico, el alcance del estudio es limitado.
Xavier G., y Cols ⁵ . Londres, 2015	<p>Activación de CreERT2: Machos 5 semanas única dosis de tamoxifeno de 0.15 mg por gramo de peso (n=11) y para los embriones las madres gestantes recibieron 1.5 mg de tamoxifeno + 0.75 mg de progesterona (n=5).</p> <p>Histología: las cabezas se fijaron 48 hrs en PFA al 4% a 4 grados centígrados y se descalcificaron en EDTA al 15% por 4 meses.</p> <p>MicroCT micro tomografía con voxel de 14 μm y 80 kVp, 118uA y filtración con atenuador de aluminio de 0.02 mm. Reconstrucción de superficie tridimensional.</p> <p>Inmunotinción e hibridación in situ Se emplearon cortes de 8 μm, para la hibridación se empleó ribosondas marcadas con digoxigenin. Se visualizó en microscopia confocal. Se determinó el índice mitótico por medio del marcado KI-67.</p>	✓		✓		El diseño genético es muy bueno, su principal limitante es quedarse en un enfoque morfo-histológico, es decir, se puede indagar mas a nivel genómico (Real Time PCR) o proteómico (MS o WB).
Heikinheimo K., y Cols ⁶ . Finlandia 1992	<p>Hibridación in situ: se cortaron secciones de 5 mm de cada una de las mandíbulas y se colocaron en porta objetos, cada muestra incluía de 3 a 5 gérmenes dentales, con TGF/32 y Ck19 marcadas con 35S-a-UTP.</p> <p>Extracción de ARN: se diseccionaron 3 gérmenes dentales.</p> <p>PCR: con el kit de reactivos de amplificación de GeneAmp.</p> <p>Electroforesis en gel de agarosa a 1.6%.</p> <p>Inmunocitoquímica: se utilizó un sistema de detección de biotina-estreptavidina y anticuerpos para la localización del polipeptido TGF2.</p>	✓		✓		Una investigación con comprobación intrínseca, PCR e hibridación in situ se complementan y confirman.
So F., y Cols ⁷ . Canada, 2000	<p>Inmunohistoquímica: anticuerpo primario contra FGF1 o FGF2 policlonal antihumano de conejo a una dilución de 1:100 y el anticuerpo para FGFR2 y FGFR3 a una dilución de 1:200, se utilizó el sistema Vectastain ABC. El control negativo consistió en la omisión del anticuerpo primario.</p>	✓		✓		Es un estudio altamente limitado, el análisis inmunohistoquímico, aunque para la época era novedoso, con la métrica contemporánea es poco.



--	--	--	--	--	--	--	--

CONCLUSIONES

Los hallazgos obtenidos en cada estudio muestran una estrecha relación entre alteraciones genéticas con el desarrollo de lesiones orales, en específico con los tumores odontogénicos, por ello, es indudable la función que desempeñan en la etiología de estas lesiones, a pesar de las deficiencias metodológicas encontradas, los resultados obtenidos muestran evidencia que sirve de guía para futuras investigaciones. Es de suma importancia contar con metodología adecuada y protocolos estandarizados para poder garantizar que los resultados obtenidos sean verídicos y representativos de la población y que no se hayan debido al azar, sólo así podrán

ser utilizados en los pacientes y no quedarse en estudios exploratorios o descriptivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Regezi JA, Sciubba J, Jordan RCK. Oral pathology. Clinical-pathologic correlations. St. Louis, Missouri Saunders: Elsevier; 2003. pp. 267–288.
2. Philipsen HP, Reichart PA, Slootweg PJ, Slater LJ. Odontogenic tumours. In: Pathology and genetics: head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005:283–318.
3. Sousa SF, Gomez RS, Diniz MG, Bernardes VF, Soares FF, Brito JA, Liu S, Pontes HA, Stratakis CA, Gomes CC. Defects of the Carney complex gene (PRKAR1A) in odontogenic tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Jun;22(3):399-408.
4. Kim SA, Ahn SG, Kim SG, Park JC, Lee SH, Kim J, Yoon JH. Investigation of the beta-catenin gene in a case of dentinogenic ghost cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Jan;103(1):97-101.

5. Xavier GM, Patist AL, Healy C, Pagrut A, Carreno G, Sharpe PT, Martinez-Barbera JP, Thavaraj S, Cobourne MT, Andoniadou CL. Activated WNT signaling in postnatal SOX2-positive dental stem cells can drive odontoma formation. *Sci Rep*. 2015 Sep 28;5:14479
6. Heikinheimo K, Happonen RP, Miettinen PJ, Ritvos O. Factor de crecimiento transformante Beta 2 en la diferenciación epitelial de los dientes en desarrollo y tumores odontogénicos. *J Clin Invest*. 1993 Mar; 91 (3): 1019-27.
7. So F, Daley TD, Jackson L, Wysocki GP. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2, and receptors FGFR2 and FGFR3 in the epithelium of human odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*. 2001 Aug;30(7):428-33.
8. Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruiz-Godoy Rivera LM, Meneses-Garcia A.



Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997; 84(6): 672-5.

9. Nalabolu GRK, Mohiddin A, Hiremath SKS, Manyam R, Bharath TS, Raju PR. Epidemiological study of odontogenic tumours: An institutional experience. J Infect Public Health. 2017 May - Jun;10(3):324-330.

10. Osterne RL, Brito RG, Alves AP, Cavalcante RB, Sousa FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Apr;111(4):474-81.

11. Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Peñafiel C, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. J Oral Pathol Med. 2002 Aug;31(7):415-20.

12. Saghravanian N, Jafarzadeh H, Bashardoost N, Pahlavan N, Shirinbak I. Odontogenic tumors in an Iranian population: a 30-year evaluation. J Oral Sci. 2010 Sep;52(3):391-6.

El texto presentado es el borrador final del artículo derivado de la investigación realizada, actualmente se encuentra en revisiones para la aceptación de su publicación.

