



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DETECCIÓN DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR
EXPLANTES DE TUMORES ODONTOGÉNICOS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A
CARBALLEDA GARCÍA KARLA ELIZABETH

DIRECTOR DE TESIS: DR. GARCIA MUÑOZ ALEJANDRO

AESORES:

DR. PEREZ MARTINEZ ISAAC OBED
MTRO. TORIZ MALDONADO MANUEL JAVIER
CMF. LICEAGA ESCALERA CARLOS JUAN
DR. MORENO EUTIMIO MARIO ADAN



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS POR EXPLANTES DE TUMORES
ODONTOGÉNICOS.**

DEDICATORIA

Para mis abuelos.

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

Los tumores odontogénicos son entidades patológicas derivadas de restos epiteliales del aparato formador de los dientes.

Dentro de los tumores odontogénicos más frecuentes se encuentra ameloblastoma, que se caracteriza por ser un tumor benigno, sin embargo, localmente agresivo y con un alto índice de recidiva.

En México es frecuente que este tipo de lesiones sean detectadas de manera tardía debido a múltiples causas, entre ellas, miedo por parte de los pacientes y mal diagnóstico; lo cual tiene una repercusión directamente proporcional en tratamientos quirúrgicos altamente invasivos.

Uno de los principales problemas es la falta de pruebas específicas para la detección temprana de estas lesiones, que sean además mínimamente invasivas y con un alto grado de certeza.

El siguiente aspecto a tratar es la búsqueda de biomarcadores precisos (genes o proteínas) participes en el desarrollo, progresión y comportamiento de dichas lesiones, con la finalidad de brindar la oportunidad de obtener un diagnóstico precoz e incluso marcadores genéticos específicos con fines terapéuticos.

El objetivo de este proyecto es encontrar biomarcadores en los secretomas de células ameloblásticas que puedan, además, ser encontrados en saliva o suero hematológico; con la finalidad de facilitar el diagnóstico a través de pruebas mínimamente invasivas que requieran simplemente de un par de muestras de saliva o sangre del paciente; algo similar al término de biopsia líquida.

De obtener resultados positivos se abriría la posibilidad de contribuir con el diagnóstico, pronóstico e incluso tratamiento, ante la posibilidad de encontrar y establecer blancos terapéuticos genéticos específicos de estas lesiones.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1 ASPECTO MICROSCÓPICO AMELOBLASTOMA SÓLIDO 100X.....	21
FIGURA 2 ASPECTO MICROSCÓPICO AMELOBLASTOMA SÓLIDO 200X.....	22
FIGURA 3 AMELOBLASTOMA SÓLIDO/MULTIQUÍSTICO.	25
FIGURA 4 AMELOBLASTOMA UNIQUÍSTICO.	26
FIGURA 5 VÍAS DE SECRECIÓN.	38
FIGURA 6 RUTA EXPERIMENTAL.....	56
FIGURA 7 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LA MUESTRA DE LESIÓN TUMORAL.....	58
FIGURA 8 CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS DE EXPLANTES DE AMELOBLASTOMA SÓLIDO Y VISTA MICROSCÓPICA EN LA QUE SE PUEDE OBSERVAR COMO LOS CULTIVOS LLEGARON A CONFLUENCIA...	60
FIGURA 9 ELECTROFORESIS SDS-PAGE SECRETOMAS.	62
FIGURA 10 ELECTROFORESIS DE MUESTRAS SALIVALES	64
FIGURA 11 ELECTROFORESIS MUESTRAS TO.....	66
FIGURA 12 RESULTADOS ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	67
FIGURA 13 RESULTADOS ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN VALORES PORCENTUALES.....	68
FIGURA 14 ESTRUCTURA DE ALBUMINA SÉRICA (ALB).	70
FIGURA 15 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE ALBÚMINA	71
FIGURA 16 INTERACTOMA ALBÚMINA.	72
FIGURA 17 ESTRUCTURA DE POSTN.....	74
FIGURA 18 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE POSTN.....	75

FIGURA 19 INTERACTOMA PERIOSTINA.....	76
FIGURA 20 ESQUEMA INTERACCIONES POSTN..	84
FIGURA 21 ESQUEMA HIPOTÉTICO DEL PAPEL DE PERIOSTINA DENTRO DE LA TUMORIGÉNESIS	85

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	7
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Tumores Odontogénicos.....	13
1.2. Clasificación Tumores Odontogénicos.....	13
1.3. Epidemiología	17
1.4. Ameloblastoma	19
1.4.1. Características clínicas	20
1.4.2. Características histopatológicas	21
1.4.3. Características radiográficas	23
1.4.4. Tratamiento	23
1.5. Características celulares y microambiente.....	27
1.5.1. Capacidad Adquirida. Autosuficiencia en señales de crecimiento	27

1.5.2.	Capacidad Adquirida. Insensibilidad a las señales de crecimiento....	29
1.5.3.	Capacidad Adquirida. Evadir apoptosis	31
1.5.4.	Capacidad Adquirida: Potencial Repetitivo Ilimitado.....	32
1.5.5.	Capacidad Adquirida: Angiogénesis Sostenida	33
1.6.	Análisis de expresión protéica	34
1.6.1.	Secretomas	34
1.6.1.1.	Vías de secreción.....	36
1.6.1.2.	Estudios de proteómica para el análisis del secretoma	39
1.6.1.2.1.	Análisis directo por proteómica clásica	39
1.6.1.2.2.	Análisis indirecto in silico	43
CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN		44
CAPÍTULO III OBJETIVOS		46
3.1.	Objetivo general.....	46
3.2.	Objetivos particulares.....	46
CAPÍTULO IV HIPÓTESIS		48
CAPÍTULO V MATERIALES Y MÉTODOS		48
5.1.	Explantos de tumores odontogénicos	49

5.2.	Procesamiento de las muestras para realizar el mapa proteómico.....	50
5.3.	Electroforesis	50
5.4.	Espectrometría de masas	52
5.4.1.	Procesamiento químico de las muestras	52
5.4.2.	Análisis espectrométrico.....	52
5.4.3.	Búsqueda en PDB e identificación de proteínas.....	54
5.5.	Redes de interacción protéica.....	55
CAPÍTULO VI RESULTADOS.....		57
6.1.	Muestra y estudio histopatológico.....	57
6.2.	Cultivos celulares y obtención de secretoma	59
6.3.	Caracterización de la secreción de proteínas de cultivo celular de ameloblastoma sólido por electroforesis SDS-PAGE.....	61
6.4.	Análisis diferencial de perfil proteico de saliva de personas sanas vs perfil proteico de paciente con lesión tumoral por electroforesis SDS-PAGE.....	63
6.5.	Análisis diferencial de perfil proteico de ameloblastoma por electroforesis SDS-PAGE.	65
6.6.	Caracterización de proteínas identificadas en secretoma, muestra tumoral y saliva asociada a AS mediante MS.....	67

6.7. Albumina	70
6.7.1. Características y funciones.....	70
6.7.2. Análisis in silico de la red de interacción proteica de la albúmina.....	72
6.8. Periostin	73
6.8.1. Análisis in silico de la red de interacción proteica de periostin	76
CAPÍTULO VII DISCUSIÓN	77
CAPÍTULO VIII CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS.....	88
BIBLIORAFÍA	89

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1.1. Tumores Odontogénicos

Los tumores odontogénicos (TO) son un grupo heterogéneo de tumores con diversas características histopatológicas y manifestaciones clínicas. El espectro de comportamiento biológico de esas lesiones incluye proliferación hamartomatosa, tumores benignos agresivos y no agresivos, y tumores malignos. (Buchner A, Merrell PW, 2006)

Se trata de una serie de neoplasias derivadas de elementos epiteliales, ectomesenquimatosos y/o mesenquimatosos del aparato formador de los dientes.(Luo & Li, 2009)

1.2. Clasificación Tumores Odontogénicos

A lo largo de la historia y tras descubrirse una amplia variedad de lesiones neoplásicas cuyo origen se presumía estaba relacionado a la odontogénesis, surgió la necesidad de dividir y clasificar dichas lesiones.

En 1869, el médico y profesor francés de patología y cirugía clínica, Pierre Paul Broca, redactó una monografía sobre la clasificación de tumores que también incluía la clasificación de los TO se incluyeron quistes odontogénicos y tumores osteogénicos fibrosos en la clasificación, sin embargo, el término odontoma

permaneció como la designación común para cualquier tumor de origen odontogénico.(Hans Peter Philipsen & Reichart, 2006)

Fue en el año de 1971 cuando Ivor Kramer y Jens Pindborg redactaron y publicaron la entonces primera edición de la clasificación TO, quistes y lesiones aliadas. La clasificación de la OMS de los tumores epiteliales de la mandíbula (1971) se basó en el comportamiento con una amplia división de las lesiones en tumores "benignos" o "malignos". La tipificación histológica de la OMS de TO, quistes de la mandíbula y lesiones aliadas, desde la primera edición, 1971, incluyó tres divisiones principales: "neoplasias y otros tumores relacionados con el aparato odontogénico", "neoplasias y otras lesiones relacionadas con los huesos" y "quistes epiteliales".(Main, 1985)

Posteriormente en 1992, apareció una segunda edición: "Mecanografía histológica de TO", en la cual, la categoría benigna se subdivide en tres grupos: lesiones en las que existe un epitelio odontogénico sin ectomesénquima odontogénica (morfológicamente identificable); lesiones en las que ambos elementos son identificables (algunas lesiones en este grupo muestran cambios inductivos que conducen a la formación de uno o más de los tejidos duros dentales) y lesiones en las que parece predominar el ectomesénquima odontogénico. En esta se realizaron cambios en la sección sobre ameloblastomas, incluyendo nuevas variantes como ameloblastoma desmoplásico y keratoameloblastoma. (Kramer, Pindborg, & Shear, 1993)

A principios de 2002, Philipsen y Reichart actualizaron una revisión de la segunda clasificación, para esta clasificación se basaron en el comportamiento biológico de las lesiones, y fueron clasificadas en: benignas, malignas y no neoplásicas. La clasificación fue aprobada en la conferencia editorial y de consenso celebrada en Lyon, Francia (OMS / IRAC) en julio de 2003 junto con la preparación del nuevo libro azul de la OMS y la genética de los tumores de cabeza y cuello.(Reichart & Philipsen, 2004)

Actualmente la OMS ha publicado una cuarta edición de la clasificación de estas lesiones en 2017, en la cual resaltan los siguientes cambios dentro de la clasificación de algunas lesiones como: el tumor odontogénico queratoquístico regreso a su clasificación previa con el nombre de queratoquiste odontogénico. El quiste odontogénico calcificante y su variante sólida se incluyó como una entidad separada con el termino de tumor dentinogénico de células fantasma, en la clasificación, el quiste odontogénico calcificante se retomó como quiste odontogénico y su variante sólida como tumor benigno.(Speight & Takata, 2018)

Previamente el quiste odontogénico ortoqueratinizado era considerado como una variante del queratoquiste, razón por la cual no era incluido en las ediciones previas de la clasificación de la OMS sin embargo en la 4° actualización ha sido incluida como una lesión distinta.

Respecto a los tumores odontogénicos, su abordaje ha sido más reducido y simplificado respecto al de las clasificaciones previas y se han incluido tres nuevas lesiones, se trata de: Carcinoma odontogénico esclerosante, tumor odontogénico primordial y el carcinosarcoma odontogénico.

Actualmente la clasificación según la OMS 2017 (El-Naggar et al., n.d.), es la siguiente:

a) Tumores Odontogénicos malignos, subdivididos en:

1. Carcinomas odontogénicos tales como son el carcinoma ameloblástico, carcinoma intrauréico primario, carcinoma odontogénico esclerosante, el carcinoma odontogénico de células clavas y carcinoma odontogénico de células fantasma,

2. Carcinosarcoma odontogénico

3. Sarcomas odontogénicos

b) Tumores odontogénicos epitiales benignos como son ameloblastoma y sus variantes, incluyendo el ameloblastoma metastatizante, tumor odontogénico escamoso, tumor odontogénico epitelial calcificante, tumor odohtogénico adenomatoide

c) Tumores odontogénicos de epitelio mixto, benigno y mesenquimal como son el Fibroma ameloblástico, Tumor odontogénico primordial, Odontoma y sus variantes, Tumor de células fantasmas dentinógenas

d) Tumores odontógenos mesenquimales benignos, entre los que se encuentran

Fibroma odontogénico, el Mixoma odontogénico / mioxofibroma y Cementoblastoma y Fibroma osificante del cemento.

1.3. Epidemiología

Con el fin de establecer la incidencia y prevalencia de estas lesiones, a lo largo de los años se han realizado diversos estudios, sin embargo, se cree que estas pueden variar debido a la alta diversidad genética y cultural.(Avelar et al., 2011)

A continuación, abordaremos los estudios más representativos con el fin de idealizar la epidemiología de los TO a nivel mundial.

Rafael Avelar y cols realizaron una extensa revisión literaria a través de las bases de datos PubMed, Ovid, EMBASE, y Cochrane Library; abarcando el periodo de enero de 1960 a enero de 2010, en la cual se realizó la compilación de 19 artículos con reportes de incidencia de TOs (Tabla 1). Se encontraron un total de 8544 TOs. Los resultados mostraron una baja frecuencia de TOs malignos. El tumor más frecuente fue el ameloblastoma (39,6%), seguido del odontoma (20,1%) y el TO queratocístico recién incluido (13,8%). En la Tabla 1, se muestran las principales lesiones encontradas en este estudio.(Avelar et al., 2011)

Author	Country	Cases	WIHO	OT More Common*	% Malignant OTs	Male-Female Ratio	Maxilla-Mandible Ratio
Luo and Li ²	China	1309	2005	AME	9.73	1.27:1†	1:3.89†
Avelar et al ⁷	Brazil	238	2005	AME	0	1.33:1	1:2.05
Adebayo et al ⁸	Nigeria	318	1992	AME	1.26	1.35:1†	1:4.41†
Fernandes et al ¹⁰	Brazil	340	1992	AME	1.18	1:1.23	1:1.90†
Jing et al ¹²	China	1642	2005	AME	4.74	1.27:1†	1:3.83†
Ladeinde et al ¹³	Nigeria	319	1992	AME	3.45	1.03:1	1:4.08†
Lu et al ¹⁴	China	759	1992	AME	6.32	1.28:1†	1:3.22†
Moskeda-Taylor et al ¹⁵	México	349	1992	Odontoma	1.15	1:1.25†	1:1.03
Oschenius et al ¹⁶	Chile	362	1992	Odontoma	1.1	1:1.15	1:1.14
Odukoya ¹⁷	Nigeria	289	1992	AME	5.19	1:1.27	1:5.56†
Okada et al ¹⁸	Sri Lanka	229	1992	AME	2.65	1:1.11	1:3.91†
Olgac et al ⁹	Turkey	527	1992	AME	1.26	1:1.07	1:1.94†
Santos et al ¹⁹	Brazil	127	1992	Odontoma	0	1:1.76	1.36:1
Tawfik and Zyada ²⁰	Egypt	82	2005	AME	3.65	1.15:1	1:4.85
Tamme et al ²¹	Estonia	75	1992	Odontoma	1.33	1:1.68†	1:1.61
Sriram and Shetty ²²	India	250	1992	AME	1.2	1.19:1	1:4.76
Simon et al ²³	Tanzania	116	1992	AME	2.59	1:1.09	Unknown
Arotiba et al ²⁴	Nigeria	415	1992	AME	2.34	1.10:1	1:2.88†
Buchner et al ¹	Canada	1088	1992	Odontoma	0.46	1.07:1	Unknown
Present study (world)	—	8364	2005	AME	2.66	1.13:1	1:2.52

WHO, World Health Organization.

*Odontogenic keratocyst deleted.

† $P < 0.05$.^{1,2,7-10,12-24}

TABLA 1 Incidencia de tumores odontogénicos reportados en diversos estudios a nivel global de 1992 - 2005.

En México se realizó un estudio retrospectivo de 349 casos, de los cuales 345 resultaron benignos (98,8%) y los 4 restantes eran malignos (1. 1%) de los cuales 3 eran carcinomas intraóseos primarios y 1 un ameloblastoma maligno. Los tumores más frecuentes fueron el odontoma (34,6%), el ameloblastoma (23,7%), el mixoma (17,7%), el tumor odontogénico adenomatoide (7,1%) y el quiste odontogénico calcificante (6,8%). (Mosqueda-Taylor et al., 1997)

1.4. Ameloblastoma

En el presente estudio el TO de nuestro interés es el ameloblastoma, debido a que hemos trabajado y realizado los experimentos pertinentes para la obtención de secretomas de esta lesión, con la finalidad de detectar y establecer cuáles son las proteínas secretadas por las células presentes en dicha entidad patológica.

El ameloblastoma es la neoplasia odontogénica más común. Se ha observado que esta lesión es localmente agresiva con alta propensión a la recidiva, se especula que surge de los restos del epitelio odontogénico, el revestimiento de los quistes odontogénicos y de la capa basal de la mucosa superpuesta. (Mallick, 2002)

De acuerdo con Thoma el ameloblastoma podría surgir de las células epiteliales debido a: 1) Alteración del tejido del esmalte o que lo forma; 2) de los restos celulares del órgano del esmalte durante el desarrollo de los dientes o más tarde; 3) epitelio odontogénico; 4) del epitelio superficial; 5) de epitelio desplazado en otras partes del cuerpo. (Taylor, 1968)

El ameloblastoma es un tumor invasivo localmente benigno, con tendencia a reaparecer, metastatizar y someterse a una transformación maligna. La recurrencia parece depender de varios factores como el método de tratamiento de la lesión primaria, la extensión de la lesión y el lugar de origen. Las tasas de recurrencia también varían según los procedimientos utilizados para tratar la lesión primaria. Varios autores han encontrado una tasa de recurrencia del 55 al 90% para todos los

ameloblastomas tratados con conservador (enucleación y curetaje). Sin embargo, la incidencia de recurrencia después de la resección radical es del 5 al 15%. (H. P. Philipsen & Reichart, 1998)

1.4.1. Características clínicas

El ameloblastoma representa el primer lugar de incidencia entre los tumores odontogénicos de la maxila y mandíbula, es decir, el 39.6% de todos los tumores odontogénicos.(Avelar et al., 2011)

El pico de incidencia es de los 20 – 50 años de edad. (Regezi, Kerr, & Courtney, 1978) La distribución entre hombres y mujeres es igual. El 80% de los ameloblastomas ocurren en la rama mandibular.(Ackermann, Altini, & Shear, 1988) mientras que el 20 % remanente ocurre en la maxila (Appel & Verbin, 1985)

El ameloblastoma multiquístico o convencional puede tener un amplio crecimiento e infiltrar estructuras adyacentes, además, tiene alta capacidad de recidiva e incluso una variante histológica capaz de presentar metástasis. Cabe mencionar que el ameloblastoma multiquístico tiene un peor pronóstico que el ameloblastoma uniquístico.(Williams, 1993)

1.4.2. Características histopatológicas

Los ameloblastomas se clasifican en cuatro grupos; Unicístico, sólido o multiquístico, periférico y maligno.

El ameloblastoma unicístico es esencialmente una lesión "quística" con una proliferación intramural o intraluminal.(Robinson & Martinez, 1977)

Histológicamente tiene tres características significativas: 1) Las células columnares se asemejan a los ameloblastos que ocupan la capa basal; 2) Núcleos hipercromáticos con un citoplasma atípico vacuolado y 3) Epitelio similar al retículo estrellado. Usualmente son menos agresivos que los ameloblastomas sólidos.(Robinson & Martinez, 1977) (Figura 1 y 2)

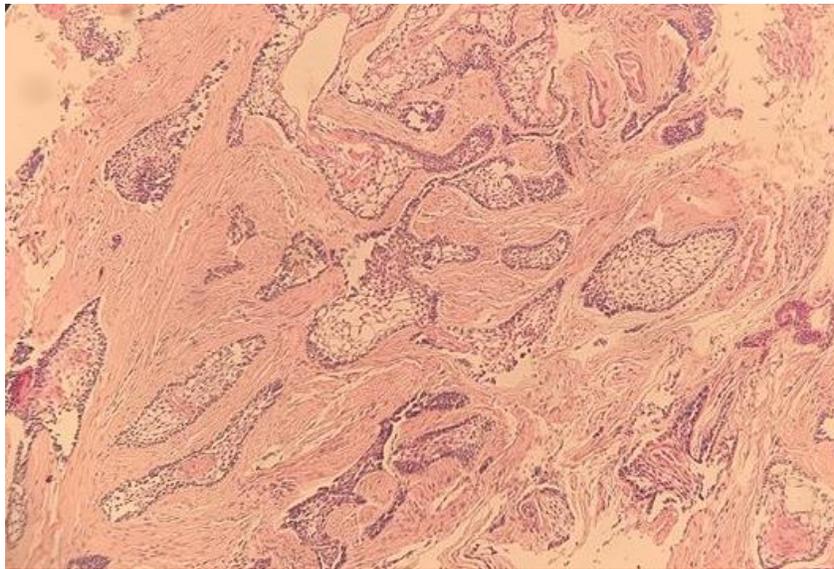


FIGURA 1 Aspecto microscópico ameloblastoma sólido 100x

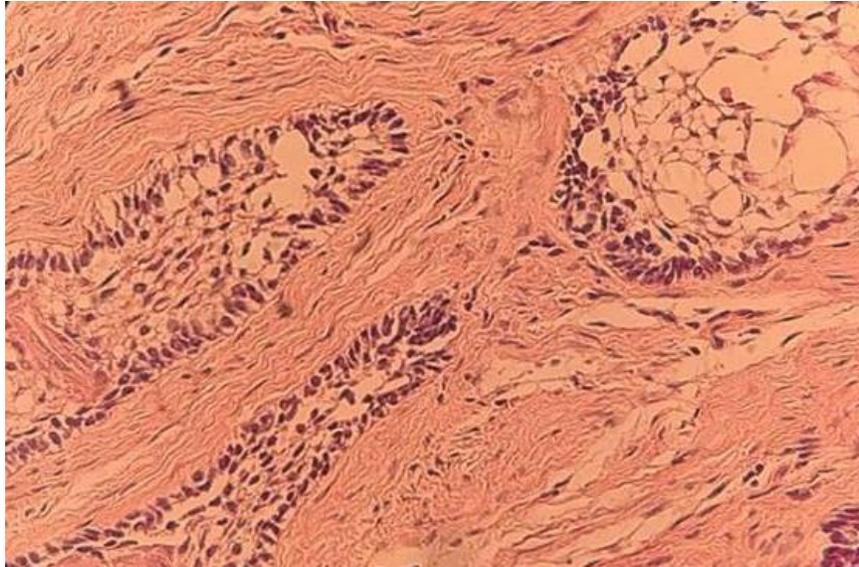


FIGURA 2 Aspecto microscópico ameloblastoma sólido 200x. Se observan islotes de células similares a las del retículo estrellado, dispuestas en empalizada, con núcleos hiper cromáticos y polarización inversa.

1.4.3. Características radiográficas

La radiología y la localización son factores clave para diagnosticar correctamente el ameloblastoma. Radiografía simple, radiografía panorámica, tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) se utilizan como herramientas diagnósticas.

Los hallazgos radiográficos pueden incluir la expansión de la placa cortical con márgenes festoneados, multiloculares o en pompas de jabón y apariencia con reabsorciones radiculares (Fig. 3a y 4a). Las TC se utilizan para delinear tejidos blandos de la lesión, la erosión del hueso y la extensión del tumor en estructuras adyacentes (Fig. 3c y 4c), las RM no son útiles para tumores difíciles, utilizadas para detectar los bordes y la consistencia de la lesión. (Minami et al., 1992)

1.4.4. Tratamiento

La cirugía es el tratamiento de elección para los ameloblastomas. El tratamiento abarca desde cirugía conservadora hasta procedimientos radicales, que incluyen radioterapia, legrado y enucleación. La cirugía incluye: extirpación de al menos 1 cm de hueso normal más allá de los márgenes del tumor (Fig. 3b y 4b).(Müller & Sloomweg, 1985) También pueden ser considerados bordes de tejidos blandos en el momento de la resección para posteriores estudios de las secciones congeladas

con el fin de garantizar y confirmar la eliminación completa del tumor.(Williams, 1993)

La radioterapia rara vez se utiliza como tratamiento primario. Algunos autores creen que la radioterapia debe ser utilizado para casos inoperables (Miyamoto, Brady, Markoe, & Salinger, 1991) . Otros investigadores abogan por que la radioterapia en conjunto con la cirugía puede tener un lugar en el manejo de pacientes seleccionados con recurrencia. Cuando la primera escisión es inadecuada y el tejido blando está involucrado o se observan márgenes quirúrgicos positivos, una dosis total de radioterapia 5000 cGy postoperatoria se debe administrar (Pinsolle , J. Michelet, 1995).

El ameloblastoma tiene variantes clínicas, radiográficas y microscópicas, en el presente proyecto se analizó la variante de ameloblastoma sólido la cual cumple lo anteriormente descrito.

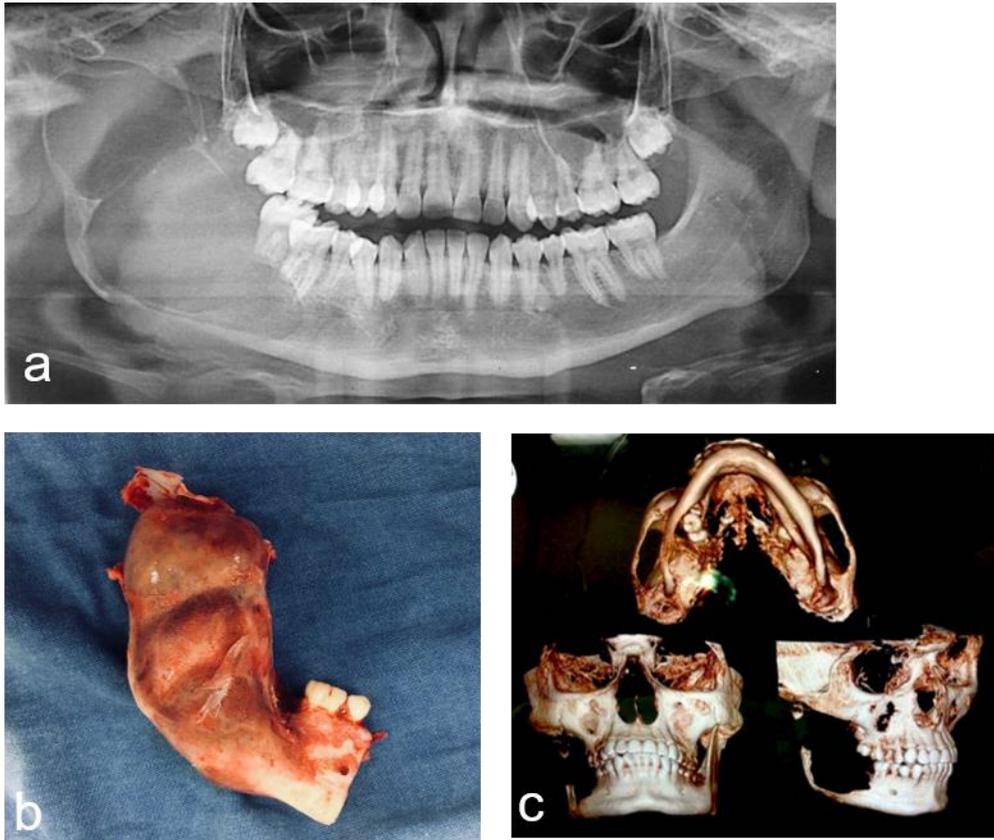


FIGURA 3 Ameloblastoma sólido/multiquistico. a) Se observa la apariencia radiográfica como una lesión radiolúcida. Multilocular que abarca la rama y ángulo mandiular derecho y rizoclasia en los molares. b) Apariencia de la lesión posterior al tratamiento quirúrgico de resección en bloque. c) TAC en la que se observa el alto índice de infiltración y destrucción ósea provocado por la lesión.

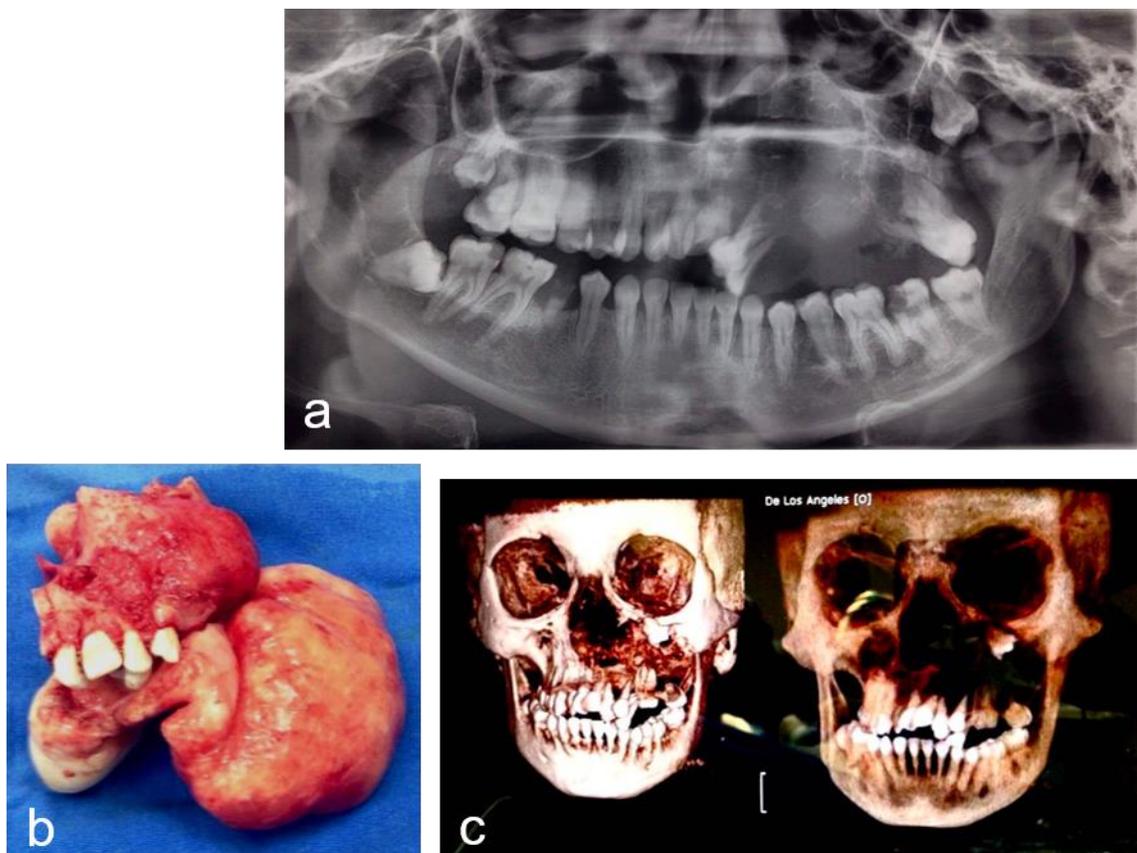


FIGURA 4 Ameloblastoma unilocular. a) Radiográficamente se observa una zona radiolúcida con bordes que no están bien definidos en zona maxilar izquierda y desplazamiento dentario. b) Apariencia de la lesión posterior al tratamiento quirúrgico de resección en bloque. c) TAC en la que se observa el alto índice de infiltración y destrucción ósea provocado por la lesión.

1.5. Características celulares y microambiente

Dentro de la tipificación de los rasgos y cambios que existen en las células y microambiente del tumor podemos encontrar distintas alteraciones, debido a que las células neoplásicas tienen defectos en los circuitos reguladores que gobiernan la proliferación celular normal y la homeostasis. (Hanahan & Weinberg, 2000) entre las que destacan las descritas a continuación.

1.5.1. Capacidad Adquirida. Autosuficiencia en señales de crecimiento

Las células normales requieren señales de crecimiento mitogénico (GS) antes de que puedan moverse de un estado inactivo a un estado proliferativo activo. Estas señales son transmitidas a la célula por receptores transmembranales que unen clases distintivas de moléculas de señalización: factores de crecimiento difusibles, componentes de matriz extracelular y moléculas de adhesión / interacción de célula a célula. (Hanahan & Weinberg, 2000) Sin embargo, las células tumorales generan muchas de sus propias señales de crecimiento, reduciendo así su dependencia a la estimulación del microambiente tisular normal. Esta liberación de la dependencia de las señales derivadas de forma exógena interrumpe el mecanismo homeostático que normalmente opera para la regulación del comportamiento adecuado de los diversos tipos de células dentro de un tejido.

Mientras que la mayoría de los factores de crecimiento mitogénicos solubles (GFs, por sus siglas en inglés growth factors) se hacen por un tipo de célula para estimular la proliferación de otro proceso conocido como señalización heterotípica, muchas células cancerosas adquieren la capacidad de sintetizar GFs a las que son sensibles, creando un bucle de señalización de retroalimentación positiva a menudo denominada estimulación autocrina. (Hanahan & Weinberg, 2000)

Lo anterior indica que la fabricación de GF por una célula tumoral evita la dependencia del mismo por otras células dentro del tejido.

Los receptores de la superficie celular que transducen las señales estimuladoras del crecimiento en el interior de la célula son los mismos objetivos de la desregulación durante la patogénesis del tumor. Los receptores de GF, que a menudo llevan actividades de tirosina quinasa en sus dominios citoplásmicos, están sobreexpresados en muchos cánceres. La sobreexpresión del receptor puede permitir que la célula cancerosa desarrolle una hiperrespuesta a los niveles ambientales de GF que normalmente no desencadenarían la proliferación. (Hanahan & Weinberg, 2000)

Las células cancerosas también pueden cambiar los tipos de receptores de la matriz extracelular (integrinas) que expresan, favoreciendo a los que transmiten señales de crecimiento. (Lukashev & Werb, 1998)

Estos receptores bifuncionales unen físicamente las células a la matriz extracelular, la unión exitosa a grupos específicos de la matriz extracelular permite receptores de integrina transducir las señales dentro del citoplasma que influyen en procesos tales como la motilidad celular, resistencia a la apoptosis y le entrada a ciclo celular activo. Se habla también de la desregulación de vías de señalización de crecimiento y proliferación. Una vía de señalización se describe como un grupo de moléculas de una célula que trabajan juntas para controlar una o más funciones de las células, tales como la multiplicación celular o la muerte celular. Después de que la primera molécula en una vía de señalización recibe una señal, ésta activa a las otras moléculas. Este proceso se repite hasta que la última molécula se activa y la célula realiza la función.

1.5.2. Capacidad Adquirida. Insensibilidad a las señales de crecimiento

En un tejido normal, operan múltiples señales antiproliferativas para mantener la quiescencia celular y la homeostasis del tejido; estas señales incluyen inhibidores de crecimiento solubles como inhibidores inmovilizados incrustados en la matriz extracelular y sobre las superficies de células cercanas.

Las señales de crecimiento pueden bloquear la proliferación mediante dos mecanismos distintos. Las células pueden ser forzadas fuera del ciclo proliferativo activo a entrar en estado de reposo (G_0) y reactivarse en alguna ocasión futura

cuando las señales extracelulares lo permitan. Alternativamente, las células pueden ser inducidas a renunciar permanentemente a su potencial proliferativo al ser inducidas a entrar en estados postmitóticos, usualmente asociadas con la adquisición de rasgos específicos asociados a la diferenciación.(Hanahan & Weinberg, 2000)

Las células tumorales por su parte poseen la capacidad de evadir estas señales antiproliferativas. Uno ejemplo claro esto es el caso del retinoblastoma donde ha sido reportada la interrupción de la vía pRb.

Gran parte de los circuitos que permiten que las células normales respondan a las señales de crecimiento se asocia con el reloj del ciclo celular, específicamente los componentes que gobiernan el tránsito de la célula a través de la fase G1 de su ciclo de crecimiento. Las células monitorean su ambiente externo durante este período y, sobre la base de señales detectadas, deciden si proliferan, permanecen inactivos o entran en un estado postmitótico. A nivel molecular, muchas y quizás todas las señales antiproliferativas se canalizan a través de la proteína retinoblastoma (pRb) y sus dos familiares, p107 y p130. (Weinberg, 1995)

La interrupción de la vía pRb libera E2Fs y, por tanto, permite la proliferación celular, haciendo que las células sean insensibles a los factores de crecimiento que normalmente operan a lo largo de este camino para bloquear el avance a través de la fase G1 del ciclo celular. (Moses, Yang, & Pietsenpol, 1990)

1.5.3. Capacidad Adquirida. Evadir apoptosis

La capacidad proliferativa de las poblaciones de células tumorales no está sólo determinada por la velocidad de proliferación celular sino también por la tasa de desgaste celular, representado principalmente por la muerte celular programada (apoptosis).

La maquinaria apoptótica puede ser ampliamente dividida en dos clases de componentes: sensores y efectores. Los sensores son responsables de monitorear el ambiente extracelular e intracelular para condiciones de normalidad o anormalidad que influyen en si una célula debe vivir o morir. Estas señales regulan la segunda clase de componentes, que actúan como efectores de la muerte apoptótica. (Lotem & Sachs, 1996).

Los sensores intracelulares monitorizan el bienestar de la célula y activan la vía de la muerte en respuesta a la detección de anomalías, incluyendo daño al ADN, desequilibrio de señalización provocado por la acción oncogénica, insuficiencia de factores de supervivencia o hipoxia. (Evan & Littlewood, 1998)

Además, la vida de la mayoría de las células se mantiene, en parte, por las señales de supervivencia basadas en la adhesión celular y celulares, cuya abrogación provoca la apoptosis. (Giancotti & Ruoslahti, 1999)

Los efectores finales de la apoptosis incluyen una serie de proteasas intracelulares denominadas caspasas. (Thornberry & Lazebnik, 1998) Estas caspasas

desencadenan a su vez la activación de otras caspasas efectoras que ejecutan el programa de muerte celular, mediante la destrucción selectiva de subestructuras celulares y orgánulos y del genoma.

La inactivación funcional de la proteína supresora de tumores p53, se observa en más del 50% de los cánceres humanos y resulta en la eliminación de un componente clave del sensor de daño del ADN que puede inducir la cascada efectora apoptótica. (Harris, 1996)

La inactivación de p53, un componente de los circuitos de señalización apoptótica, conlleva a un crecimiento tumoral rápido con un bajo número de células apoptóticas.(Symonds et al., 1994)

1.5.4. Capacidad Adquirida: Potencial Repetitivo Ilimitado

Las capacidades adquiridas anteriormente mencionadas, la autonomía de la señal de crecimiento, inestabilidad a las señales de crecimiento y la resistencia a la apoptosis, conducen a un desacoplamiento del programa de crecimiento de una célula en las señales de su entorno.

Los primeros trabajos de Hayflick demostraron que las células en cultivo tienen un potencial replicativo finito.(Hayflick, 1997)

Una vez que las poblaciones celulares han progresado a través de cierto número de duplicaciones, dejan de crecer, entrando a un proceso de senescencia.

Peculiarmente, la mayoría de los tipos de células tumorales que se propagan en cultivo parecen estar inmortalizados, lo que sugiere que el potencial replicativo ilimitado es un fenotipo que se adquirió in vivo durante la progresión tumoral y fue esencial para el desarrollo de su estado de crecimiento maligno. Esto indica que en algún momento durante la progresión tumoral, la evolución de las poblaciones celulares premalignas agota sus duplicaciones permitidas y rompe la barrera de mortalidad adquiriendo un ilimitado potencial replicativo.

1.5.5. Capacidad Adquirida: Angiogénesis Sostenida

El oxígeno y los nutrientes suministrados por los vasos sanguíneos son cruciales para la correcta función y supervivencia celular. Durante la organogénesis, esta cercanía está asegurada por el crecimiento coordinado de vasos sanguíneos y parénquima. Una vez que se ha formado el tejido el proceso de angiogénesis es transitorio y bien regulado debido a la dependencia de los capilares cercanos; pareciera que las células que proliferan dentro del tejido tendrían la capacidad intrínseca de estimular el crecimiento de los vasos sanguíneos, sin embargo, la evidencia dicta lo contrario. Las células presentes en lesiones proliferativas aberrantes carecen inicialmente de capacidad angiogénica, limitando de esta

manera su capacidad de expansión. Para progresar a mayor tamaño, las neoplasias deben entonces desarrollar capacidad angiogénica. (Bouck, Stellmach, & Hsu, 1996)

1.6. Análisis de expresión protéica

Las proteínas son los efectores finales de los procesos que suceden en las células, por lo que el estudio proteómico es la manera más adecuada de analizar los procesos biológicos que tienen lugar en un organismo, así como de comprender los mecanismos moleculares subyacentes a dichos procesos.

1.6.1. Secretomas

El término "secretoma" o "secretómico" se utiliza para describir el estudio global de todas las proteínas secretadas por una célula, un tejido o un organismo en un momento dado y bajo ciertas condiciones; este término fue utilizado por primera vez en 2000 por Tjalsma en un estudio de proteínas secretadas por la bacteria *Bacillus subtilis*.(Tjalsma, Bolhuis, Jongbloed, Bron, & van Dijn, 2000)

En biología de sistemas se hace gran énfasis en las interacciones célula-célula debido a que los fenómenos fisiológicos pueden ser orquestados por la diafonía celular que se produce cuando las células secretan sustancias, secretoma, incluidas las proteínas/péptidos y la matriz extracelular para la señalización hacia otras células. (Tjalsma et al., 2000)

En organismos superiores, la secreción de proteínas es un proceso relativamente complejo y altamente regulado que involucra diferentes rutas.

Las proteínas secretadas son moléculas activas. Algunos de estos productos secretados también se utilizan como agentes terapéuticos, por ejemplo, la insulina. El secretoma también refleja el estado funcional de una célula en las circunstancias dadas. De hecho, una célula puede secretar diferentes proteínas (o en diferentes proporciones) estímulos y mensajes que recibe. Por ejemplo, los linfocitos B secretan una variedad de inmunoglobulina (IgM, IgG, IgA) dependiendo del antígeno o estímulos externos.(Askonas, 1975)

Las proteínas secretadas tienen un papel importante en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Esto hace que sea una fuente potencial ideal para la investigación o biomarcadores para blancos terapéuticos de muchas enfermedades tales como cáncer.(Chenau, Michelland, & Seve, 2008)

En el caso del cáncer, la interacción célula-célula se produce entre el tumor y las células huésped, así como entre patógenos y células hospedadoras. Por ejemplo, las masas tumorales crean un estado de inmunosupresión donde las células tumorales y las células huésped se contrarrestan entre sí para obtener la máxima supervivencia (Ochsenbein, 2002).

Aunque ya se sabe que muchos péptidos / proteínas, incluyendo hormonas y citoquinas son liberadas durante la interacción célula-célula-patógeno (Gupta,

Harkin, Kawakubo, & Maheswaran, 2004), el mecanismo sistémico por el cual las células, así como los patógenos y sus células huésped interactúan está lejos de ser completo. Los métodos tradicionales de caracterización del secretoma implican obtener proteínas / péptidos liberados del medio de células in vitro/ cultivo de patógenos y luego analizar sus propiedades in vivo.(Friis, Pin, Pearson, & Wells, 2005)

El secretoma es un elemento clave para conocer y entender el microambiente tumoral ya que en este se encuentran todas las proteínas que son secretadas por las células tumorales, en este caso, células ameloblásticas, por lo cual es de gran importancia estudiar a fondo cuáles son las proteínas involucradas en los ameloblastomas, las interacciones que llevan cabo y la función de cada una y así especular sobre el binomio de interacción proteica relación-función y explicar el comportamiento y características que confieren a estas lesiones.

1.6.1.1. Vías de secreción

Las proteínas son secretadas por las células a través de tres líneas principales: la vía clásica, canales no tradicionales y por medio de exosomas (Figura 5).

Las proteínas secretadas por la vía clásica tienen un péptido señal en su extremo N-terminal de 15 a 30 aminoácidos de orientación para ser secretada. Este péptido señal dirige la proteína a través del retículo endoplásmico, y luego se escinde. La

proteína madura es transportada entonces a través del aparato de Golgi y después a la membrana plasmática en las vesículas. Posteriormente se fusionan con la membrana y por lo tanto permiten la liberación de las proteínas por exocitosis en forma soluble en el medio extracelular.

Las proteínas secretadas de acuerdo con la vía no clásica no tienen señal y por tanto son secretadas por diferentes mecanismos que no impliquen ni el retículo o el aparato de Golgi. Las proteínas pueden secretarse a través de los transportadores de membrana (Por ejemplo: FGF-1 y -2), mediante el reciclaje endosomal de vesículas preexistente, seguido por exocitosis convencional (por ejemplo: IL-1 beta, HMGB1) o por un mecanismo de flip-flop, es decir, una translocación de proteínas de la capa interna de la membrana plasmática a la capa exterior (por ejemplo: HASPB). (Nickel, 2003)

La tercera vía secretora corresponde a la liberación de proteínas en exosomas. Los exosomas corresponden a la exocitosis de vesículas de membrana que contienen de proteínas expresadas de forma ubicua, tales como enzimas del metabolismo intracelular, proteínas del citoesqueleto o proteínas chaperonas. (Pisitkun, Shen, & Knepper, 2004)

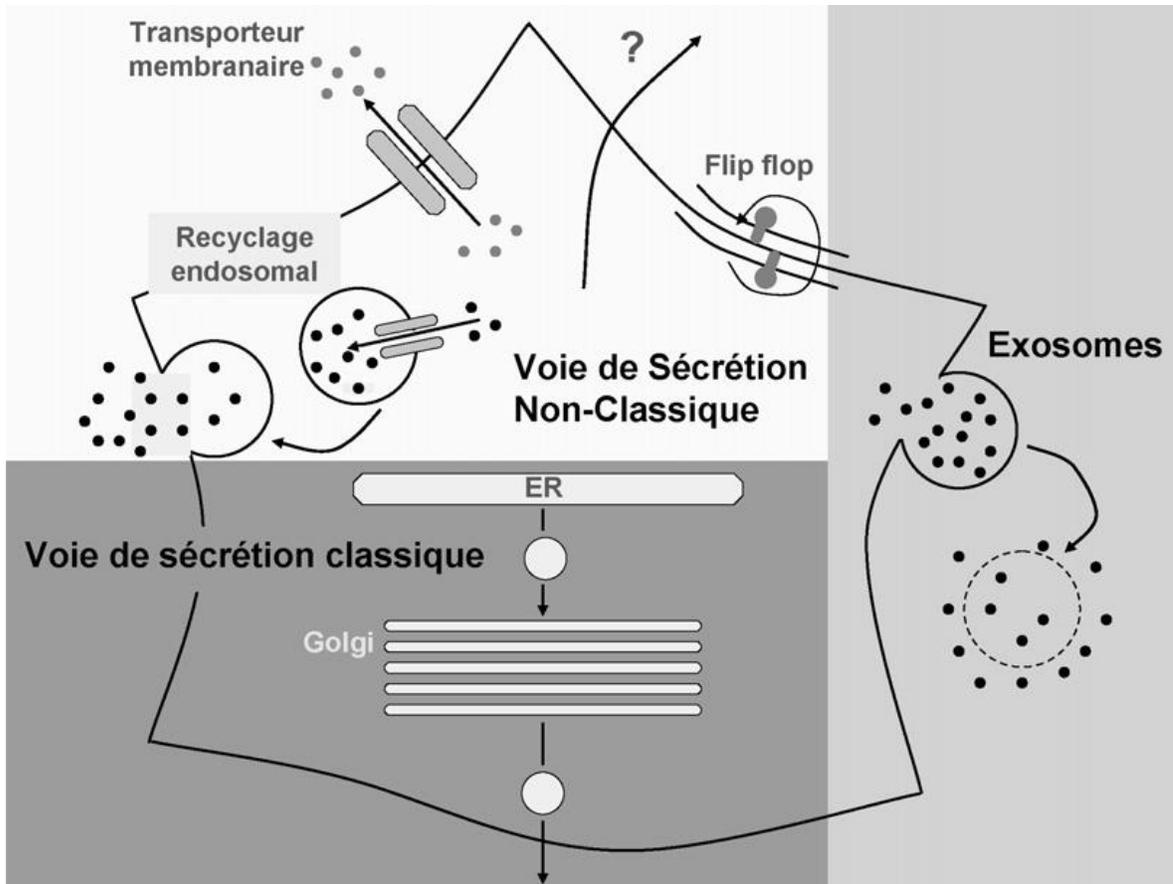


FIGURA 5 Vías de secreción. Las proteínas son secretadas por las células a través de tres líneas principales: la vía clásica (por medio de péptidos señal), vía no clásica por medio transportadores de membrana y canales no tradicionales y la tercera vía por medio de exosomas.

1.6.1.2. Estudios de proteómica para el análisis del secretoma

El análisis del proteoma de un organismo ha estado tradicionalmente basado en la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y la identificación de las mismas por espectrometría de masas (MS). (Twyman, 2004) Este tipo de estudios proteómicos se conocen en la actualidad como Proteómica Clásica.

1.6.1.2.1. Análisis directo por proteómica clásica

La Proteómica es la ciencia que estudia de manera dinámica todas las proteínas expresadas por un organismo, en un momento dado y bajo determinadas condiciones de tiempo y ambiente, lo que se denomina proteoma. (Bjellqvist et al., 1982) También se agrupan con el mismo nombre el conjunto de técnicas que permiten analizar un proteoma.

La aparición de la proteómica ha facilitado el análisis exhaustivo de las proteínas en muestras biológicas, incluyendo secretomas. Un análisis proteómico se basa en dos pasos principales: etapa de separación (decomplexificación) y etapa de identificación de proteínas. (Graves & Haystead, 2002) Estas dos fases consisten en: el estudio de huella peptídica (PMF por sus siglas en inglés peptide mass fingerprinting) las proteínas se separan mediante electroforesis, posteriormente se corta cada mancha de interés y se digiere en tripsina que genera un conjunto de

péptidos. El análisis en masa de los péptidos por espectrometría de masas proporciona una firma de esta proteína. La comparación de estos datos experimentales con los presentes en la base de datos permite la identificación de la proteína de interés. Existe, además, un segundo estudio que combina la cromatografía multidimensional con identificación de proteínas mediante la secuenciación de péptidos por espectrometría de masas. Estas técnicas tienen la ventaja de ser utilizadas para el análisis diferencial de líneas celulares o secretomas sanos frente a tejidos enfermos.(Wu, Wang, Baek, & Shen, 2006)

Electroforesis (SDS-PAGE)

La electroforesis consiste en geles de acrilamida (PAGE) es la técnica analítica empleada para la separación de proteínas. SDS-PAGE permite separar las proteínas concretamente en función de su peso molecular. Por un lado, la mezcla de acrilamida/bis-acrilamida forma una red compleja en polimerizar, a través de la cual migran las proteínas al aplicarles un campo eléctrico; por otro lado, la presencia de SDS, detergente anfipático que desnaturaliza las proteínas y les confiere una densidad de carga global negativa, permite separarlas principalmente según su peso molecular.

Espectrometría de masa (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se emplea para determinar la masa molecular de un compuesto mediante el uso de instrumentos que pueden medir la relación masa/carga (m/z) de iones, trabajando en condiciones de vacío. (Bjellqvist et al., 1982) La identificación por MS Consiste en la identificación de una proteína mediante el empleo de las masas de los péptidos obtenidos tras digestión enzimática, que generalmente se realiza con tripsina. Cada proteína puede ser inequívocamente identificada por las masas de los péptidos que la forman, y eso constituye lo que denominamos huella peptídica. Este tipo de identificación se realiza para proteínas únicas o mezclas simples de proteínas, que pueden provenir de manchas proteicas de un gel 2-DE y bandas de geles 2D unidimensionales o fracciones de LC de baja complejidad. Una vez obtenido el espectro en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF, se utiliza un programa informático denominado motor de búsqueda que compara el espectro obtenido con los espectros teóricos de una base de datos que contiene las digestiones teóricas de todas las proteínas descritas, y nos da un listado de las posibles proteínas ordenadas según su mayor correlación con el espectro.

Una de las principales ventajas en el estudio de los secretomas es que se puede considerar como un subproteoma del plasma, siendo por lo tanto de menor complejidad que este, además de permitir el análisis directo de las proteínas implicadas en la patología de estudio, que podrán ser detectadas en la sangre de

manera no invasiva. La mayoría de los estudios del secretoma han sido llevados a cabo en líneas celulares, frecuentemente en líneas tumorales, dada su facilidad de manejo y la facilidad para obtener material de cultivo (Hortin, Carr, & Anderson, 2010). Una manera de minimizar la variabilidad experimental introducida en estudios con líneas celulares es el empleo de explantes de tejido, que además permite mimetizar mejor las condiciones in vivo al tener en consideración los diferentes tipos celulares del tejido y las posibles interacciones entre ellos.

El estudio de secretoma puede ser utilizado para comprender mejor los procesos moleculares implicados en ciertas condiciones patológicas. En los tumores, las células presentan ciertos cambios en su metabolismo, responsables de un cambio en la secreción de ciertas proteínas. Estas variaciones inducen cambios de interacciones de las células tumorales con su microambiente por la activación de ciertos procesos de tumorigénesis, como la invasión / metástasis, la neoangiogénesis o la supervivencia celular. (Khwaja, FW. Svoboda, P. Reed, M. Poh, J. Pyrzynska, B. Van Meir, n.d.)

1.6.1.2.2. *Análisis indirecto in silico*

Las redes de interacción proteicas pueden ser generadas a partir de softwares como STRING, que consiste en una base de datos de interacciones proteínicas predichas, que incluyen, asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) y son derivadas de diferentes fuentes: contexto genómico, experimentos throughput, coexpresión, conocimientos previos encontrados en Pubmed.

STRING integra cuantitativamente datos de interacciones de estas fuentes para un gran número de organismos y transfiere información entre estos organismos cuando es aplicable.

El uso de bioinformática, a través de la comparación de secuencias y la presencia de péptido señal permite predecir la proteína potencialmente secretada por las células. Los softwares SignalP (Dyrlov Bendtsen, Nielsen, von Heijne, & Brunak, 2004) y SecretomeP (Bendtsen, Jensen, Blom, von Heijne, & Brunak, 2004) son utilizados para buscar proteínas secretadas respectivamente de acuerdo con las rutas clásicas (a través de la búsqueda de la presencia del péptido señal) y no clásicas. Otros enfoques basados en la comparación de secuencias con las secuencias de proteínas conocidas como referencias secretadas, también son utilizados por el software de alineación tal como herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990).

CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN

Los tumores odontogénicos son entidades patológicas derivadas de restos epiteliales del aparato formador de los dientes, constituyen un grupo heterogéneo de lesiones particularmente interesante debido a sus características clínicas e histopatológicas.

En México es frecuente que este tipo de lesiones sean detectadas de manera tardía debido a múltiples causas, entre ellas, miedo por parte de los pacientes y mal diagnóstico; lo cual tiene una repercusión directamente proporcional en tratamientos quirúrgicos altamente invasivos.

Uno de los principales problemas es la falta de pruebas específicas, mínimamente invasivas y con un alto grado de certeza, para la detección temprana de estas lesiones.

Los secretomas representan grupos protéicos completos, en este caso, secretados por células ameloblásticas que pueden ser de gran ayuda para el estudio del microambiente tumoral.

Es de suma importancia realizar un estudio proteómico a fondo de los secretomas en TO, en este caso ameloblastoma sólido, y estudiar la interacción protéica presente en los mismos con el fin de tipificar los rasgos clínicos y de comportamiento que confiere cada proteína a la lesión.

Por lo anterior, el objetivo primario de este proyecto es encontrar biomarcadores en los secretomas provenientes de células ameloblásticas.

Además, al buscar facilitar los estudios diagnósticos a través de pruebas mínimamente invasivas, concisas y predictivas, consideradas biopsias líquidas, se realizó la búsqueda de biomarcadores a nivel sistémico en la sangre (suero hematológico) y en fluidos que mantienen una relación estrecha con las lesiones, tal es el caso de la saliva, que además consiste en un filtrado del plasma sanguíneo. Al establecer biomarcadores específicos, dichas pruebas requerirían sólo de un par de muestras de saliva o sangre del paciente, abriendo la posibilidad de contribuir con el diagnóstico, pronóstico e incluso tratamiento, ante la posibilidad de encontrar y establecer blancos terapéuticos genéticos específicos de estas lesiones.

CAPÍTULO III OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo principal de la presente Tesis es el estudio del perfil proteico del ameloblastoma sólido, así como la caracterización del secretoma de las células asociadas al ameloblastoma y la evaluación de las proteínas específicamente secretadas por dichas células tumorales y finalmente verificar si estas proteínas son expresadas en la muestra tumoral, secretoma y saliva.

3.2. Objetivos particulares

1. Optimización de las condiciones de preparación histológica del ameloblastoma para el análisis del proteoma mediante electroforesis SDS-PAGE.
2. Análisis y caracterización del proteoma del ameloblastoma sólido, aislando del perfil proteico aquellas proteínas que se encuentren expresadas diferencialmente en nuestras tres muestras: tumor, saliva y secretoma.
3. Caracterización del secretoma de células tumorales de ameloblastoma mediante metodología de proteómicas básicas acopladas a espectrometría de masas.

4. Optimización del método de obtención del secretoma de células pertenecientes al ameloblastoma para enriquecer la muestra en proteínas secretadas.
5. Realizar un análisis *in silico* de las –proteína de mayor interés en nuestro estudio.

CAPÍTULO IV HIPÓTESIS

Las células presentes en el ameloblastoma secretan proteínas dentro del microambiente tumoral, las cuales pueden ser aisladas, analizadas y caracterizadas mediante estudios de proteómica básica; el proteoma de la muestra tumoral, secretoma y saliva deberá presentar perfiles proteicos con ciertas similitudes en bandas proteicas que compartirían la misma identidad.

CAPÍTULO V MATERIALES Y MÉTODOS

La ruta experimental siguió el protocolo descrito a continuación (Figura 6) obtención de la muestra tumoral, la cual fue proporcionada por el servicio de cirugía maxilofacial del Hospital Juárez de México, posteriormente se realizaron cultivos celulares primarios utilizando DMEM modificado y suplementado con Penicilina/Estreptomicina y suero fetal bovino, los cultivos celulares fueron revisados de manera periódica y se realizaba cambio de medio de cultivo. Una vez que se logró una confluencia celular en el pozo se procedió a realizar la obtención de los secretomas. Para ello se realizaron lavados con PBS con la finalidad de enjuagar y eliminar cualquier residuo de medio de cultivo, eliminando la posibilidad de alteraciones en nuestros resultados, estos lavados se realizaron en distintos

tiempos, 15, 30 minutos y 2 horas, siendo el último recolectado para el estudio del secretoma. Posteriormente se realizaron geles de acrilamida para el corrimiento electroforético de las muestras en una dimensión. Se realizó un análisis de las bandas protéicas y se realizó el estudio de espectometría de masa de aquellas bandas que se encontraron expresadas diferencialmente, que eran, además, coincidentes en las tres muestras (muestra tumoral, secretoma y saliva). Una vez que fue revelada la identidad de las bandas de nuestro interés se procedió a realizar un análisis in silico de la interacción proteica de nuestras proteínas de interés con la finalidad de explicar y conferir el papel que tienen dentro del desarrollo de los ameloblastomas sólidos y las características con las que se relacionan.

5.1. Explantes de tumores odontogénicos

La obtención de muestras se realizó bajo el protocolo del comité de ética de la institución bajo el número de registro HJM1996/11.03.08.

Las muestras tumorales fueron procesadas inmediatamente después de que el tumor se extirpó, posteriormente fueron lavadas con solución fisiológica con el fin de eliminar sangre y residuos contaminantes.

Posteriormente la muestra se procesó en la unidad de investigación del Hospital Juárez de México, donde se realizaron los cultivos celulares con el explante de la muestra tumoral. Para ello se utilizó medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con Penicilina/Estreptomina y suero fetal bovino.

Finalmente, el cultivo se dejó en la incubadora, bajo supervisión continua y mantenimiento periódico hasta que las células llegaron a confluencia.

5.2. Procesamiento de las muestras para realizar el mapa proteómico

Una vez obtenidos los secretomas de los explantes tumorales, las muestras se homogenizaron en amortiguador de muestra para isoelectroenfoque (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, amortiguador IPG 2%, DTT 40mM y agua MQ), en presencia de inhibidores de proteasas (Complete “cocktail”, GE Healthcare). Entonces, mediante centrifugación (10,000 xg) se obtuvo el sobrenadante, al que se le realizó tres lavados con el amortiguador 2-D Clean-Up (AmershamBiosciences) y la concentración de proteínas se cuantificó usando el reactivo “kit 2-D Quant Kit” (AmershamBiosciences). Se disolvió 400 µg de muestra en solución de hidratación para isoelectroenfoque (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, amortiguador IPG 0.5% ó 2%, DTT 40mM, azul de bromofenol 0.002% y agua MQ), con inhibidores de proteasas (GE Healthcare).

5.3. Electroforesis

Tras realizar la extracción y purificación de las proteínas utilizando el método de Lowry, se realizó el corrimiento electroforético para conocer el perfil proteico de los

secretomas. Para analizar el perfil proteico de las diferentes muestras, en primer lugar, se llevó a cabo la separación de las proteínas con base en su punto isoeléctrico, esta separación se realizó en tiras pre-elaboradas para electroforesis ya hidratadas. Las muestras fueron sometidas a electroforesis a 16-20 kV/h durante 2 horas en el IPGphor (GE Healthcare). Posteriormente, las tiras se incubaron durante 10 min en el amortiguador de equilibrio reductor y alquilante (6 M urea, 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, glicerol 29.3%, dodecil sulfato de sodio 2% y azul de bromofenol 0.1%, 65 mM DTT, 135 mMiodoacetamida). Las proteínas se separaron por su peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS al 12% utilizando un sistema estándar de electroforesis vertical (15 cm × 13 cm) (Gibco BRL V16). La electroforesis se llevó a cabo manteniendo constante el voltaje a 100 voltios hasta que el frente de corrida alcanzara el borde inferior del gel. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal G250 (BIO-RAD).

Se realizó un análisis de las proteínas que se encontraban diferencialmente expresadas en muestras de ameloblastomas sólidos de distintos pacientes y las proteínas cuya incidencia se encontraba en las tres muestras (tumor, secretoma y saliva) pertenecientes a la misma lesión tumoral que se obtuvo para este estudio. Mediante el uso del software Melanie proteomics se estudiaron los geles con distintos contrastes para poder identificar aquellas bandas proteicas diferenciadas en los tres tipos de muestra.

5.4. Espectrometría de masas

Las bandas proteicas coincidentes en las tres muestras se mandaron al IBT (Instituto de biotecnología y proteómica de la UNAM) para realizar un análisis por espectrometría de masa y de esta manera conocer la identidad de las proteínas presentes en las bandas de nuestro interés. (Figura 6)

5.4.1. Procesamiento químico de las muestras

Las muestras fueron previamente reducidas con dithiothreitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digerida “in gel” con Tripsin (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En el procesamiento de la muestra con tripsina se utilizó una solución que contiene 50mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) y la incubación fue de 18 horas a temperatura de 37°C.

5.4.2. Análisis espectrométrico

Tanto para la identificación de la proteína y para el Mapeo de puente disulfuro los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba Dionex (Thermo-

Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621. Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (Fourier Transform) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para extender la calibración de masas a menores valores de m/z . Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-90% (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 minutos utilizando una columna capilar hecha en casa (ID 0.75 μm y 10cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto.

El escaneo total de iones (Full Scan) fue realizado en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas (Resolution Power; $\text{RP} = m/\text{FWHM}$) de 60,000. La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation)) en la trampa (IT). Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación

fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas (solamente se fragmento iones con carga z^{2+} , z^{3+} y z^{4+}) con un ancho de aislamiento de 2.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 5 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 120 segundos.

5.4.3. Búsqueda en PDB e identificación de proteínas

La identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos en formato raw en el programa Proteome Discoverer 1.4. (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos invertida (Decoy database) de *Homo sapiens*; con un FDR-False Discovery Rate (Mínimo) de 0.01 y FDR 0.05 (Máximo). La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor cuando comparados los valores teóricos contra experimentales (precursor mass tolerance) fue de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos obtenidos por disociación del ion precursor (fragment mass tolerance) fue de 0.6 Da. Para la búsqueda automática fueron

establecidas modificaciones constantes carbamidometilación de cisteínas y variables como oxidación de metioninas y deaminación de asparagina y glutamina.

5.5. Redes de interacción protéica

Tras recibir los resultados se encontraron distintas proteínas presentes en las muestras. Para concluir con el estudio se realizó un análisis in silico para conocer el interactoma de las proteínas encontradas en nuestro estudio y así determinar el posible rol dentro del comportamiento tumoral y su relación con las características clínicas de estas lesiones, es decir. la agresividad y el alto grado de infiltración.

La red de interacción de las proteínas identificadas fue generada mediante software STRING.



FIGURA 6 Ruta experimental. Diagrama que representa la metodología de esta investigación.

CAPÍTULO VI RESULTADOS

6.1. Muestra y estudio histopatológico

El procedimiento para la obtención de muestra tumoral consistió en asistir a la cirugía programada para la resección de la lesión tumoral, una vez que finalizaba la extirpación de la masa tumoral esta era colocada en solución salina y se dividía en distintos fragmentos que eran almacenados en sustancias y soluciones de acuerdo al estudio a realizar; en formol para su posterior estudio histopatológico, solución salina e inhibidor de proteasas para las muestras destinadas a estudios de proteómica (electroforesis), mientras que los fragmentos designados a realizar cultivos celulares eran inmediatamente acondicionados y procesados.

Se realizó un estudio histopatológico para corroborar el diagnóstico de ameloblastoma sólido, para ello se analizaron bloques de parafina con tinción de hematoxilina eosina, de acuerdo a las características histológicas la muestra resulto coincidente con el diagnóstico de ameloblastoma sólido. (Figura 7)

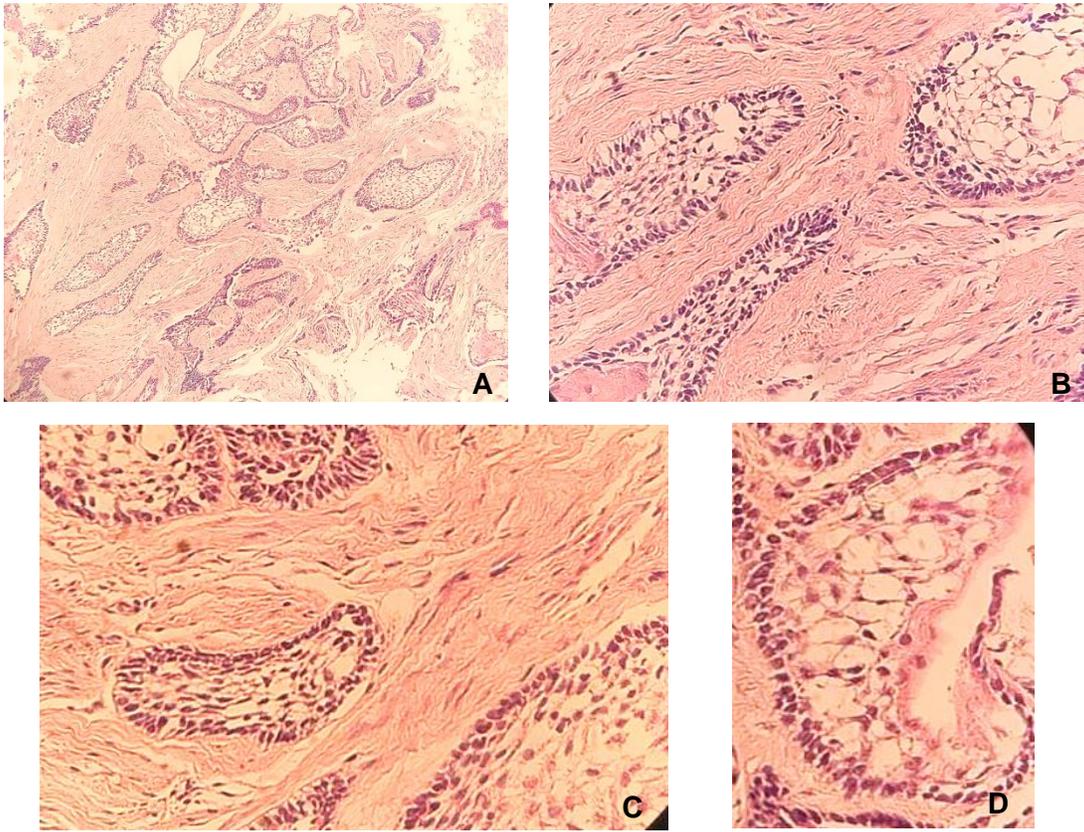


FIGURA 7 Estudio histopatológico. Estudio de la muestra de lesión tumoral, cuyo resultado es coincidente con ameloblastoma sólido en tinción de (A.H/E - 100x, B. Magnificación 200x detalle de zona con microquistes y células ameloblásticas organizadas en empalizada con polarización inversa, C. y D. Magnificación 400x, en el centro de los microquistes se células poco organizadas semejantes al retículo estrellado del órgano dentario).

6.2. Cultivos celulares y obtención de secretoma

Se realizó el cultivo celular de explante de ameloblastoma sólido. Los cultivos celulares eran revisados la primer semana cada 24 horas para verificar la adhesión a la placa, el desprendimiento inicial de células y su proliferación, del mismo modo se realizaba cambio de medio de cultivo para evitar contaminación; tras la segunda semana se realizaba el mismo mantenimiento en intervalos de 48 a 72 horas hasta obtener confluencia celular en cada pozo.

Se realizaron cultivos celulares primarios utilizando DMEM modificado y suplementado con Penicilina/Estreptomicina y suero fetal bovino, los cultivos celulares fueron revisados de manera periódica registrando el progreso (Figura 8). Una vez que se logró una confluencia celular en el pozo se procedió a realizar la obtención de los secretomas.

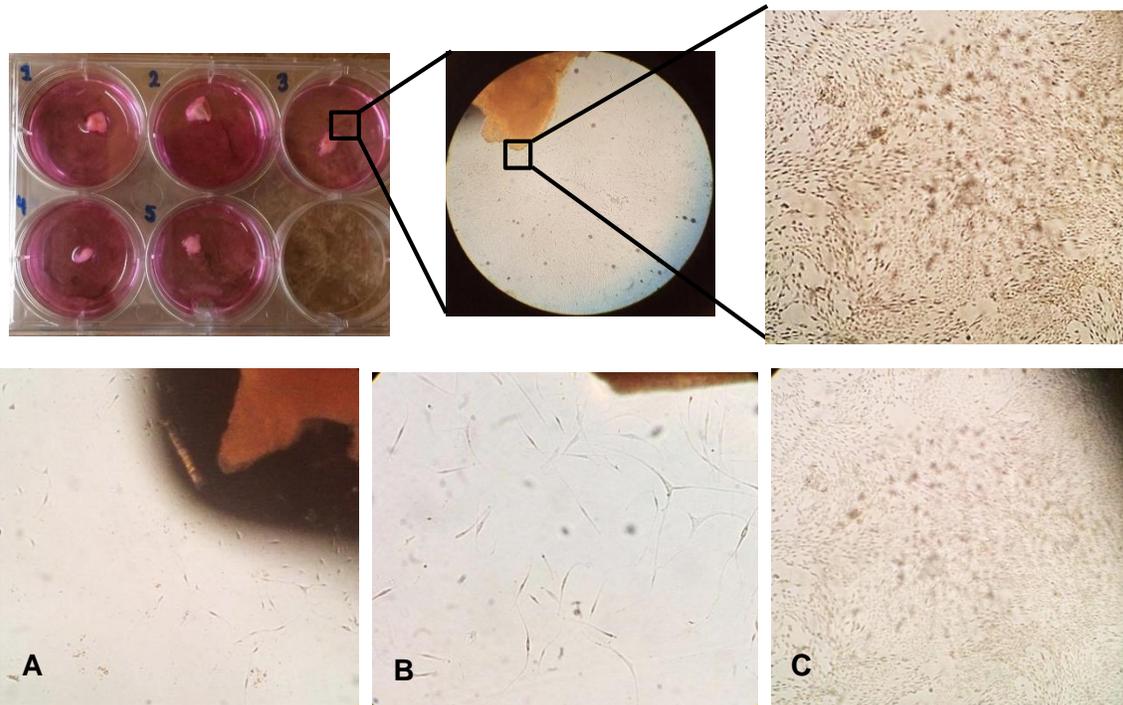


FIGURA 8 Cultivos celulares primarios de explantes de ameloblastoma sólido. Se observa el progreso y multiplicación celular hasta que los cultivos llegaron a confluencia. A. Foto inicial cultivos celulares 200x, B. Cultivos celulares (semana 2) 400x, C. Cultivos celulares en confluencia (cuarta semana) 200x.

Se realizaron lavados con PBS con la finalidad de eliminar cualquier residuo de medio de cultivo, descartando la posibilidad de que esto alterara nuestros resultados, estos lavados se realizaron en distintos tiempos, 15, 30 minutos y 2 horas siendo el último recolectado para el estudio del secretoma.

Por otro lado, las muestras de sangre y saliva que eran obtenidas previo a la resección tumoral eran almacenadas y procesadas al momento de su obtención para evitar la contaminación y degradación de proteínas.

6.3. Caracterización de la secreción de proteínas de cultivo celular de ameloblastoma sólido por electroforesis SDS-PAGE.

Tras realizar la extracción y purificación de las proteínas utilizando el método de Lowry, se realizó el corrimiento electroforético de las muestras en geles de poliacrilamida para conocer el perfil proteico de los secretomas. Los resultados de la electroforesis correspondiente a los secretomas en distintos tiempos (Figura 9) derivaron 3 bandas proteicas.

Las tres bandas proteicas fueron posteriormente analizadas e identificadas por espectrometría de masas dando lugar a una proteína única, albúmina. Cabe destacar que esta proteína fue encontrada en las tres muestras de secretoma a diferentes tiempos y para excluir cualquier alteración por restos de medio de cultivo se realizaron lavados con PBS, incluso se realizó el análisis por electroforesis de una muestra de medio de cultivo para poder realizar el análisis diferencial, que se observa en un carril previo a las muestras de secretomas (Figura 9).

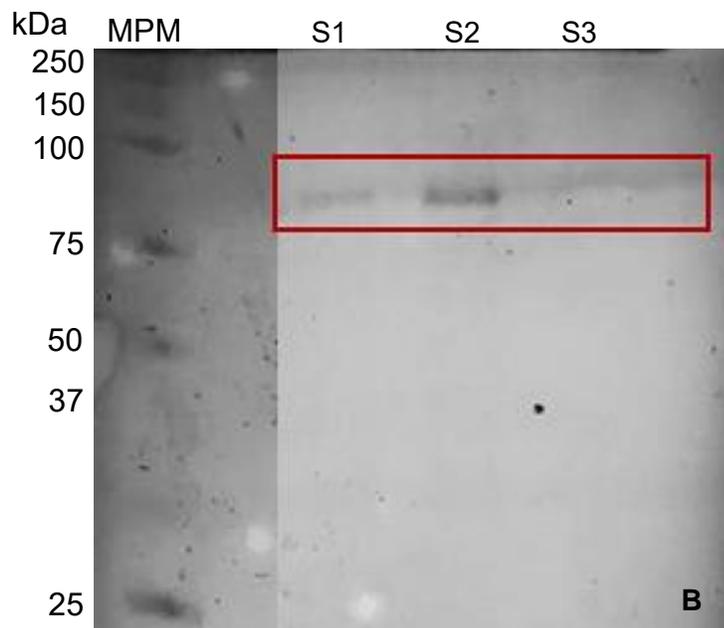
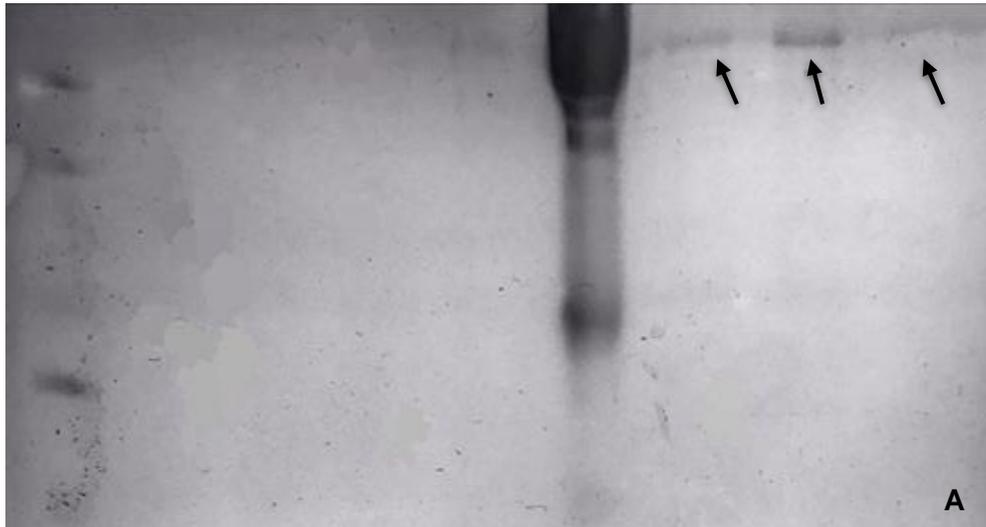


FIGURA 9 Electroforesis SDS-PAGE secretomas. Gel de acrilamida al 15% de corrimiento electroforético de una dimensión, A) Gel completo comparación medio de cultivo con secretomas. B) Bandas protéicas correspondientes a los secretomas de cultivos primarios de ameloblastoma uniuéstico a distintos tiempos. S1 tras 15 minutos, S2 30 minutos y S3 dos horas.

6.4. Análisis diferencial de perfil proteico de saliva de personas sanas vs perfil proteico de paciente con lesión tumoral por electroforesis SDS-PAGE.

Comenzamos por realizar la estandarización del patrón o perfil proteico de una persona sana para establecer un grupo control (Figura 10 A y B) y de esta manera poder realizar el análisis diferencial en base a la presencia de bandas diferenciales significativas a las del grupo control.

Mientras el perfil proteico del grupo control presentaba un total de 10 bandas proteicas en el perfil correspondiente a saliva asociada a ameloblastoma encontramos una variación en el total de 5 -7 bandas proteicas; además de encontrar diferencias notorias en el perfil de los grupos control vs nuestro grupo experimental asociado a ameloblastoma.

En la figura 10C podemos observar el perfil proteico de muestras pertenecientes a 3 ameloblastomas uniuquísticos, 3 ameloblastomas sólidos, 2 ameloblastomas desmoplásicos y 1 carcinoma ameloblástico. Se observan perfiles similares ya que todas las muestras pertenecen a variantes del ameloblastoma (incluyendo una rara variante maligna), sin embargo, de acuerdo al subtipo de la lesión se pueden encontrar bandas proteicas diferenciales.

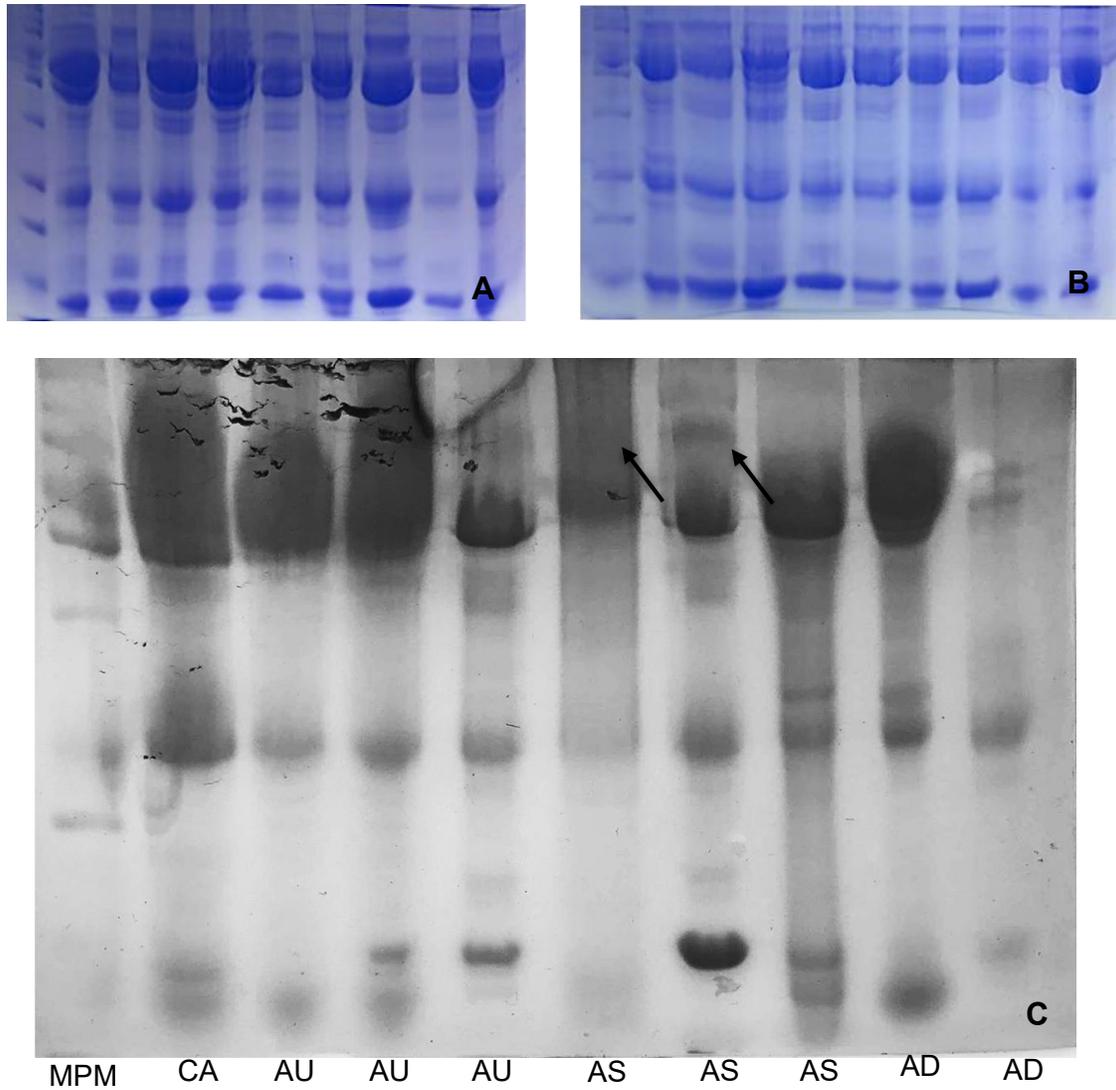


FIGURA 10 Electroforesis SDS PAGE de grupo control de personas sanas vs pacientes con TO

AyB) Electroforesis de muestras salivales de grupo control, perfiles proteicos de personas sanas. **C)** Electroforesis salivas de distintos px con TOs. Gel de acrilamida a 15% de corrimiento electroforético en una dimensión, en el que pueden observarse bandas proteicas correspondientes a diversos tumores odontogénicos. CA (carcinoma ameloblástico), AU (ameloblastoma unicuístico), AS (ameloblastoma sólido) y AD (ameloblastoma desmoplásico). Se logra observar una similitud en los patrones de aquellos tumores del mismo tipo, a pesar de que cada muestra tumoral pertenece a distintos pacientes.

6.5. Análisis diferencial de perfil proteico de ameloblastoma por electroforesis SDS-PAGE.

En el gel perteneciente a los experimentos de análisis diferencial de muestras tumorales de distintas variantes de ameloblastoma obtuvimos el perfil proteico de 3 ameloblastomas sólido y 2 ameloblastomas uniuíquisticos. (Figura 11)

Dentro del perfil de ameloblastoma uniuíquístico encontramos un promedio de 9 a 10 bandas proteicas, mientras que el perfil de ameloblastoma sólido presenta de 7 a 8 bandas proteicas; puede observarse un patrón proteico similar entre las lesiones del mismo tipo y cierta variación con bandas expresadas de manera diferencial en cada tipo de lesión.

Tras el análisis diferencial entre los perfiles de las variantes de ameloblastoma encontramos una banda proteica expresada de manera diferencial en las muestras de ameloblastoma sólido (Figura 11), que es nuestra muestra de interés por los experimentos de caracterización del secretoma.

Al realizar la caracterización de la identidad de las proteínas presentes en la banda proteica mediante MS encontramos 5 proteínas: Periostin, Lumican, Prolargin, Keratin II Y fragmentos de Protein P.

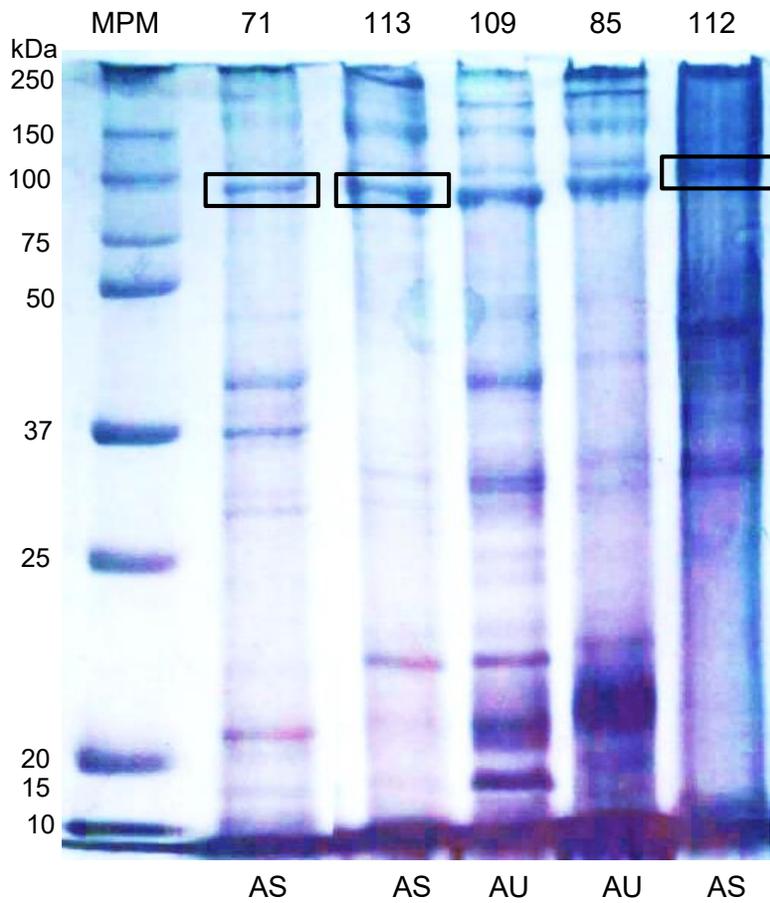


FIGURA 11 Electroforesis muestras TO. Gel de acrilamida a 15% de corrimiento electroforético en una dimensión, se observan los perfiles proteicos correspondientes a diversas variantes de ameloblastomas: AU (ameloblastoma uniuíquístico), AS (ameloblastoma sólido). Nuevamente se logra observar similitud en los patrones de los perfiles correspondientes a la misma variante, a pesar de que cada muestra tumoral pertenece a distintos pacientes. Se marca con un recuadro negro las bandas proteicas diferencialmente expresadas y coincidentes en peso molecular, de acuerdo a su localización, con la banda encontrada en los secretomas

6.6. Caracterización de proteínas identificadas en secretoma, muestra tumoral y saliva asociada a AS mediante MS

Tras la selección de las bandas de interés de la electroforesis que consistió en aquellas bandas que se mostraban coincidentes en los tres grupos de estudio (tumor, saliva y secretoma) seleccionamos 10 bandas proteicas del siguiente modo: 6 muestras de bandas correspondientes a muestra de ameloblastoma sólido, 1 banda ameloblastoma desmoplásico, 2 bandas de saliva asociada a ameloblastoma sólido y 1 banda de secretoma. (Figura 12 y 13)

Al realizar el análisis de por espectrometría de masas, la identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos (raw) en el programa Proteome Discoverer 1.4 a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos invertida (Decoy database) de *Homo sapiens*.

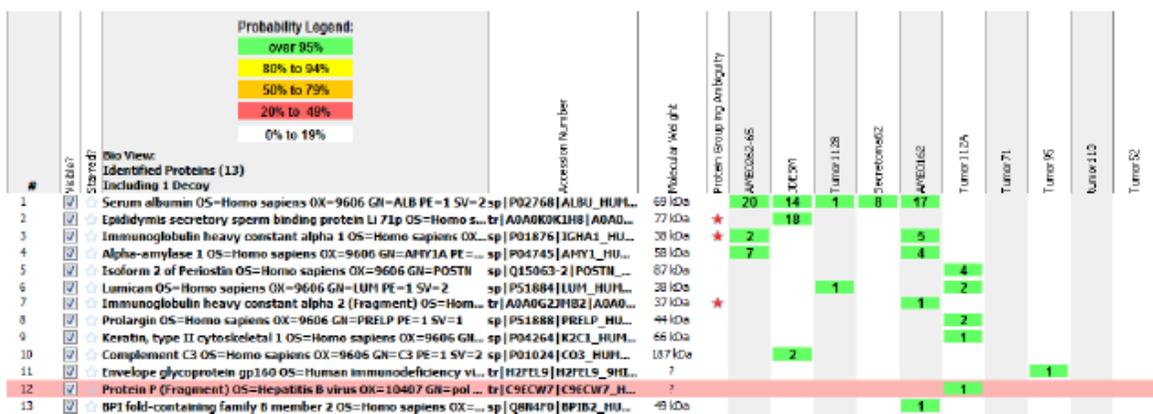


FIGURA 12 Resultados espectrometría de masas. Se encontraron un total de 13 proteínas de las cuales 1 de ellas se encontró expresada en los tres tipos de muestras (secretoma, tumor y saliva) cuya identidad resultó coincidente con albúmina sérica, se identificaron también 5 proteínas distintas en la muestra tumoral cuyas identidades son Periostin Isoform 2, Lumican, Prolargin, Keratine type 2 cytoskeletal y protein P.

Al realizar el análisis se identificaron un total de 13 proteínas (Figura13), de las cuales 9 se encontraron en bandas correspondientes al grupo de muestra tumoral, 5 proteínas en bandas del grupo de muestra salival y 1 en el caso de secretoma.

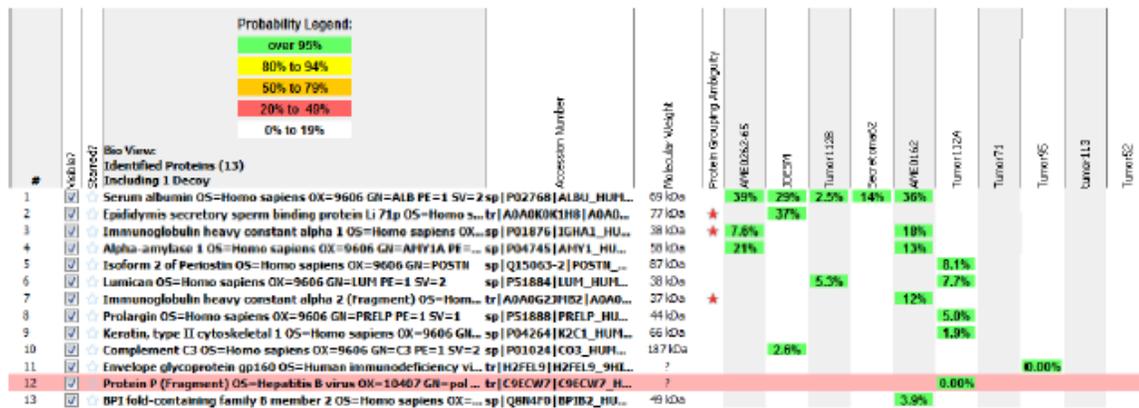


FIGURA 13 Resultados espectrometría de masas en valores porcentuales, referentes al porcentaje de cobertura.

De las 13 proteínas identificadas 1 es significativa en las tres comparaciones de grupos de estudio, Alúmina sérica. En la comparación entre las muestras del grupo tumoral de ameloblastoma encontramos algunas muestras coincidentes en más de una muestra, tal es el caso de: albúmina sérica y lumican. (Tabla 2)

Proteina	Peso Molecular (KDa)	Muestra Tumoral	Secretoma	Saliva
Serum Albumin	69	Presente	Presente	Presente
ESSBP	77	Presente	-	-
Pesada de inmunoglobulina constante alfa	38	-	-	Presente
Alfa amilasa 1	58	-	-	Presente
Periostina de isoforma 2	87	Presente	-	-
Lumican	38	Presente	-	-
Pesada de inmunoglobulina constante alfa 2	37	-	-	Presente
Prolargina	44	Presente	-	-
Queratina tipo 2 Citoesquelal	66	Presente	-	-
Complemento C3	187	Presente	-	-
Glicoproteina pg160	-	Presente	-	-
Proteina P(fragmento)		Presente	-	-
BPIFB1	49	-	-	Presente

TABLA 2 Identificación proteica de acuerdo al grupo de estudio.

6.7. Albumina

6.7.1. Características y funciones.

Se trata de una proteína cuya longitud es de 609 aa, peso molecular teórico de 69,367 Da (Figura14). Su función principal es de transporte (agua, Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , ácidos grasos, hormonas, bilirrubina y fármacos), también, es responsable de la regulación de la presión osmótica coloidal de la sangre y se expresa en el núcleo, aparato de Golgi y región extracelular. (Figura 14)

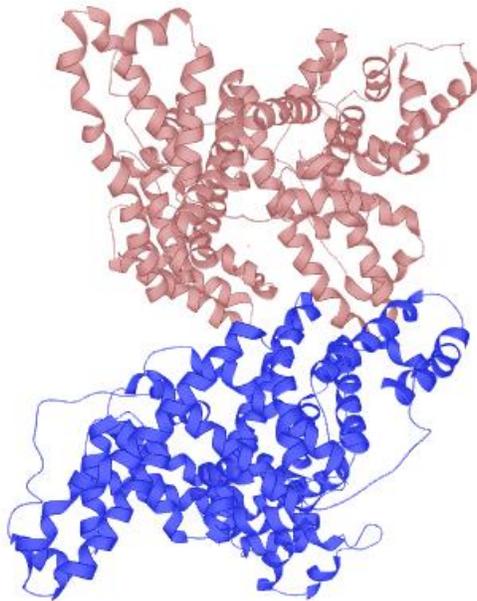


FIGURA 14 Estructura de albumina sérica (ALB).

Los niveles de albúmina sérica han sido tomados como una de las principales herramientas para la medición del estado nutricional de los pacientes, puesto que proporciona un método simple de estimación de la función visceral proteica; también se encontró que la malnutrición e inflamación suprimen la síntesis de albúmina.(Yeun & Kaysen, 1998)

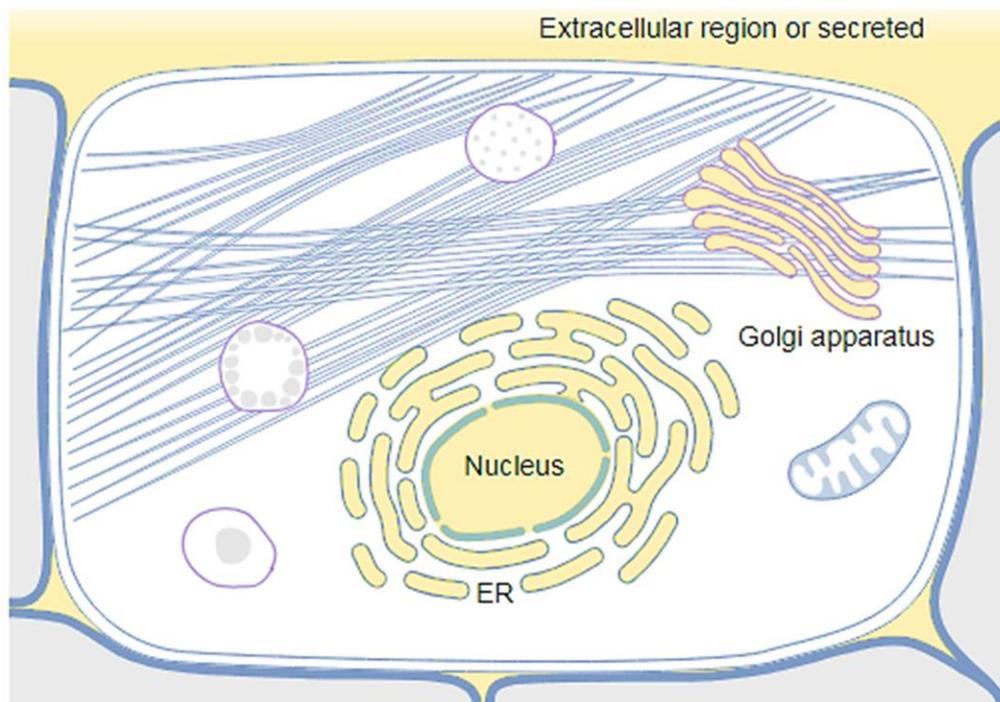


FIGURA 15 Esquema de localización de albúmina, Se muestran en amarillo las zonas donde se localiza albúmina que son el núcleo y en la región extracelular lo que implica la secreción de la misma.

6.7.2. Análisis in silico de la red de interacción proteica de la albúmina

En la Figura 16 se presenta el interactoma de ALB elaborado mediante la secuencia FASTA

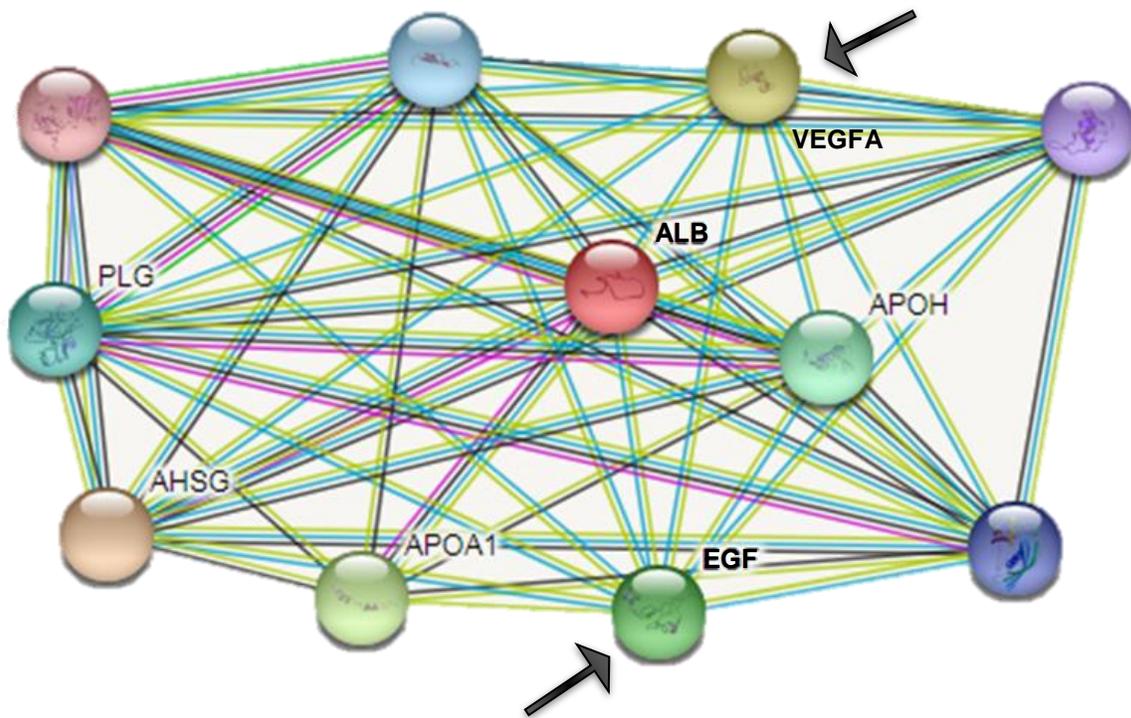


FIGURA 16 Interactoma albúmina. Análisis in silico realizado mediante STRING en el cuál se realizó un análisis bioinformático de las interacciones proteicas de albúmina con otras proteínas para explicar la posible relevancia y el papel de albúmina dentro de los ameloblastomas.

6.8. Periostin

La proteína Periostina (POSTN) también llamada factor osteoblástico específico 2 (OSF2) pertenece al grupo de proteínas de la matriz celular.(Takeshita, Kikuno, Tezuka, & Amann, 1993)

Se trata de una proteína con una longitud de 836 aa y un peso molecular teórico de 93,314 (Da), cuya función consiste en la unión, diseminación y adhesión celular (PubMed: 12235007)(Figura 17).

POSTN es una proteína producida y secretada por los fibroblastos como componente de la matriz extracelular (MEC, donde se encuentra involucrado en la regulación de la adhesión intercelular. (Figura 18)

Esta proteína juega un importante papel en el proceso fisiológico de transición epitelial-mesenquimal, la cual es necesaria para el desarrollo propio del embrión. Se encuentra involucrada también en la formación y mantenimiento de estructuras normales, huesos y dientes. (Lindsley et al., 2007)

POSTN interactúa con proteínas de la MEC como fibronectina, tenascina-C y colágeno tipo V, como parte del proceso de remodelación de la MEC.(Ruan, Bao, & Ouyang, 2009)(Figura 18)

POSTN fue identificada por primera vez como una célula putativa de la adhesión celular por los osteoblastos en líneas celulares osteoblásticas de ratones.(Takeshita et al., 1993)

También ha sido identificad POSTN en una variedad de tejidos y órganos sanos como glándula mamaria, pulmón, tiroides, piel, placenta, ovario, periostio y ligamento periodontal.(Litvin et al., 2004)(Horiuchi et al., 1999)

La periostina se expresa principalmente en tejidos conectivos fibrosos ricos en colágeno, incluido las válvulas cardiacas, tendones, córneas, el pericondrio y el ligamento periodontal, que se someten a constantes tensiones mecánicas durante el desarrollo embrionario o patogénesis.(Bonnet et al., 2009; Norris et al., 2007; Rios et al., 2005)

POSTN participa también en procesos como la angiogénesis, linfangiogénesis, metastásis, remodelación de la matriz extracelular.(Ratajczak-wielgomas & Dziegiel, 2015)

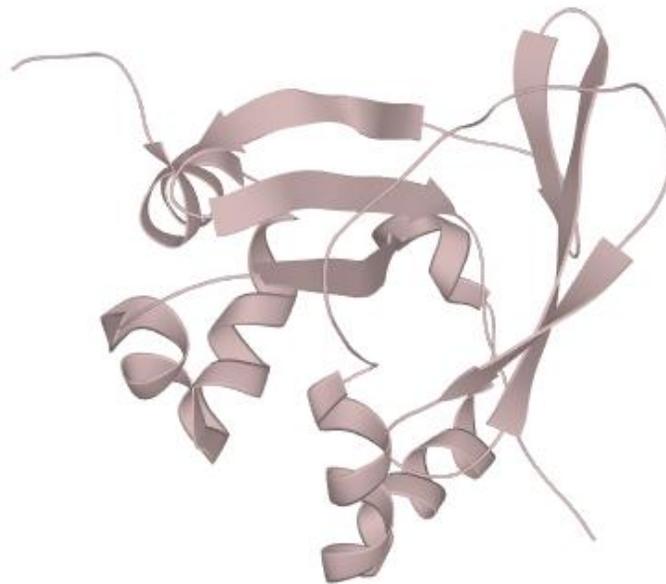


FIGURA 17 Estructura de periostina (POSTN).

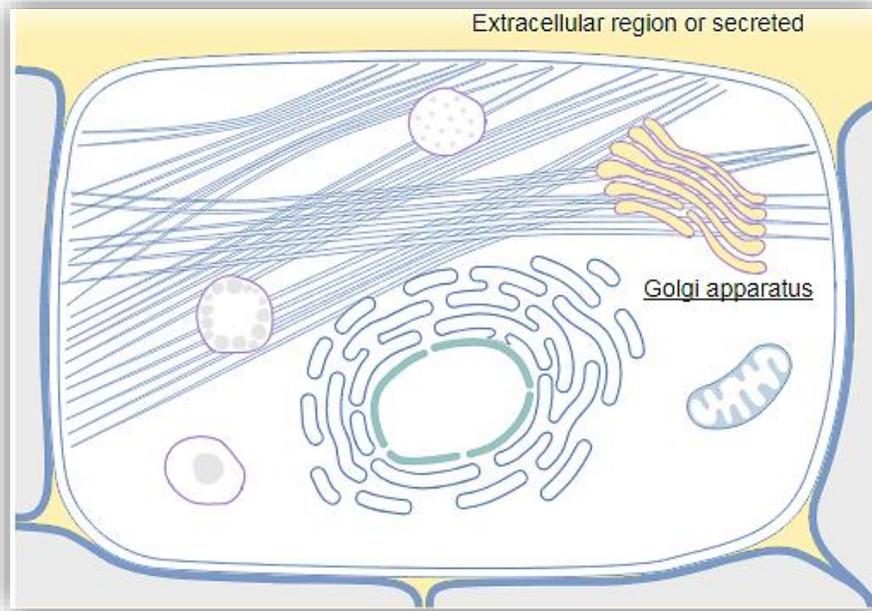


FIGURA 18 Esquema de localización de POSTN. Se muestran en amarillo las zonas donde se localiza POSTN: aparato de Golgi y región extracelular, lo que implica la secreción de la misma.

6.8.1. Análisis in silico de la red de interacción proteica de periostin

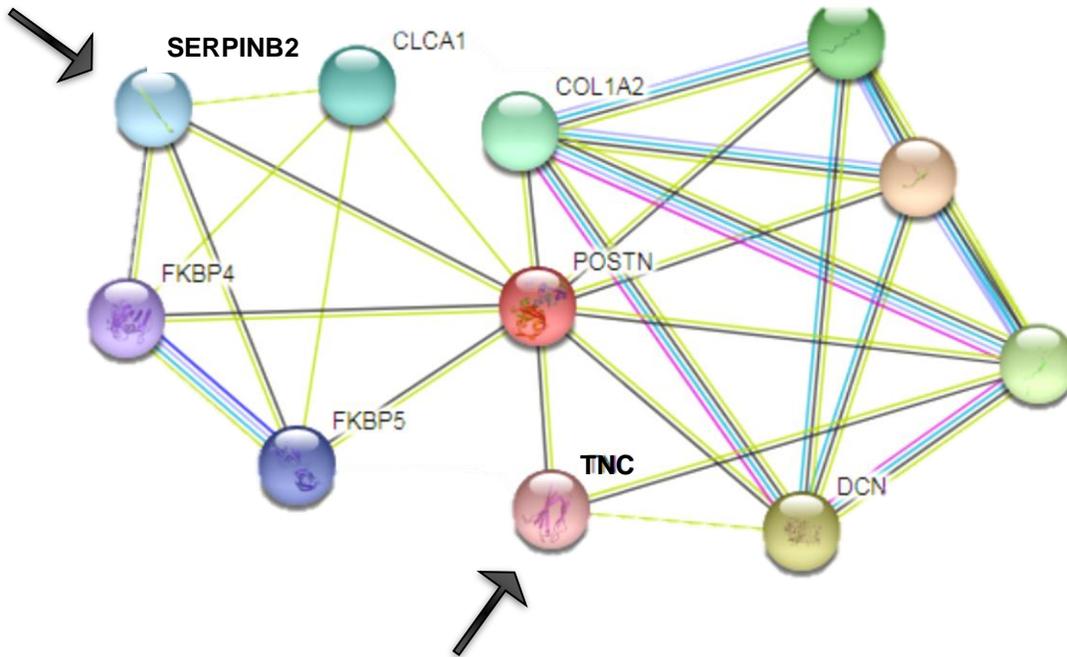


FIGURA 19 Interactoma periostina. Análisis in silico realizado mediante STRING en el cuál se realizó análisis bioinformático de las interacciones proteicas de POSTN con otras proteínas para explicar el papel de esta dentro de los ameloblastomas.

CAPÍTULO VII DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos por la espectrometría de masas para conocer la identidad de los péptidos de nuestro interés fueron coincidentes con albúmina sérica humana, en el caso de la banda protéica cuya muestra corresponde a los secretomas, en el caso de las muestras tumorales se encontró además de albúmina sérica, otras proteínas tales como: periostina, prolargina y complemento C. Sin embargo nos enfocaremos en tratar de describir la correlación existente entre la albúmina y los ameloblastomas esto debido a la presencia de esta proteína tanto en el secretoma como en la muestra tumoral, por otra parte, intentaremos establecer la correlación entre periostina y los ameloblastomas dado que es una proteína cuyas características han sido descritas anteriormente y relacionadas en distintos tipos tumorales con mal pronóstico, metástasis y un bajo índice de supervivencia por parte de los pacientes.

7.1. Albúmina

En el caso de TO no se han realizado pruebas o estudios que determinen el papel de la albúmina sérica dentro del pronóstico de dichas lesiones, sin embargo, en nuestro estudio la albúmina sérica se ha expresado como uno de los posibles marcadores presentes en los secretomas provenientes de cultivos celulares de explantes primarios de ameloblastoma sólido.

Lo anterior podría considerarse como un indicador del pronóstico de este ameloblastoma sólido, cabe señalar que en este caso el tratamiento fue altamente invasivo y se precisó realizar una hemimaxilectomía debido al alto grado de invasión y extensión de la lesión.

Ahora bien, al realizar un análisis más detenido del interactoma obtenido del análisis in silico sobre las interacciones proteicas que presenta la albúmina, podemos observar su relación con proteínas cuyas funciones principales son de factores de crecimiento, tal es el caso de VEGFA y EGF (por sus siglas en inglés, factor de crecimiento endotelial vascular y factor de crecimiento epidérmico, respectivamente) podemos especular sobre el porqué de la alta invasión y el amplio desarrollo y crecimiento de la lesión.

La desnutrición y caquexia en pacientes con cáncer suelen ser problemas significativos debido a los diversos mecanismos involucrados en el tumor, la respuesta del huésped al tumor y la terapia contra el cáncer.(von Meyenfeldt, 2005)

Por lo que se refiere a desnutrición, ha sido asociada con una serie de consecuencias clínicas, incluyendo calidad de vida deteriorada, disminución de la respuesta al tratamiento, mayor riesgo de toxicidad inducida por la quimioterapia y una reducción en la supervivencia del cáncer.(Dewys et al., 1980)

Estudios recientes han reportado cierta asociación de los niveles albúmina sérica con el diagnóstico y pronóstico en varios tipos de lesiones tumorales, de manera puntual ha sido descrita la disminución en niveles de albúmina sérica como un factor de pronóstico independiente de supervivencia en diversos tipos de cáncer (Maltoni et al., 2005) como pulmón (Lam, Leung, & Tse, 2007), páncreas (Siddiqui, Heinzerling, Livingston, & Huerta, 2007), gástrico (Oñate-Ocaña et al., 2007), colorectal (Boonpipattanapong & Chewatanakornkul, 2006) y mama (Lis, Grutsch, Vashi, & Lammersfeld, 2003),. Al tratar de explicar esta asociación, encontramos como parte de la respuesta inflamatoria sistémica la liberación de citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento que tienen un efecto catabólico sobre el metabolismo del huésped. La interleucina-6, producida por el tumor o células circundantes estimulan la producción hepática de proteínas de reacción de fase aguda (como la proteína C reactiva (CRP) y el fibrinógeno. La menor concentración de albúmina sérica puede deberse a la producción de citoquinas como la IL-6, que modula la producción de albúmina por parte de los hepatocitos.(Barber, Ross, & Fearon, 1999)

La principal ventaja en caso de que el nivel de albúmina sérica pueda ser utilizado como factor pronóstico previo al tratamiento en pacientes con cáncer es que es un método económico, reproducible y potente. (Sun et al., 2009)

Por otra parte, se han realizado estudios experimentales que proponen el uso de albúmina como medio transportador de nanopartículas de quimioterapia en distintas lesiones como cáncer de mama (Wan et al., 2015), carcinoma escamocelular de cavidad oral y orofarínge (Damascelli et al., 2007) y carcinoma escamocelular en lengua (Damascelli et al., 2003).

Estos tratamientos proponen el uso de quimioterapia a través de catéter intraarterial utilizando albúmina sérica como transportador del medicamento haciendo más factible la llegada a la lesión tumoral gracias al proceso de permeabilidad y retención mejorada (EPR enhanced permeability and retention por sus siglas en inglés) que presentan los tumores. (Matsumura & Maeda, 1986)(Greish, 2007).

Visto desde la perspectiva anterior la expresión de albúmina además de ser considerada como un indicador del pronóstico de las lesiones tumorales puede utilizarse unido a tratamientos de quimioterapia específicos para lograr una mejor captación y por consiguiente aumentar el efecto sobre la lesión y reducir efectos secundarios sobre células sanas.

7.2. Periostina

Su expresión se ha visto incrementada en distintos tipos tumorales incluyendo mama, NSCLC, cáncer colorectal, pancreático, de próstata y cáncer de ovarios, glioblastomas.(Ratajczak-wielgomas & Dziegiel, 2015)

POSTN humano, codificada por el gen POSTN localizado en cromosoma 13. Tiene 4 isoformas distintas, la isoforma 1 fue encontrada en osteosarcoma, la isoforma 2 en placenta y carcinoma epitelial de ovario y finalmente la isoforma 4 se ha detectado en tejido normal y tejido canceroso de vejiga. (Nuzzo et al., 2014)

Entre sus características estructurales moleculares contiene dominios de unión con integrina, capaz de unirse a múltiples receptores de integrina, afectando de esta manera las vías de señalización asociadas con las kinasas (PI3K/AKT) Y kinasa de adhesión focal (FAK), debido a estas posibles interacciones POSTN podría ser un factor influyente en el proceso de adhesión y migración celular implicado en la metástasis y en la transición epitelio-mesenquimal de las células tumorales.(Ratajczak-wielgomas & Dziegiel, 2015) (Figura 17)

Curiosamente, como factor crítico de desarrollo y proteína secretada por la MEC, la periostina es considerada como un oncogen en diversos cánceres humanos, incluyendo mama, próstata, colon, esófago y páncreas, contribuye a la tumorigénesis y metástasis; mientras actúa como un supresor de tumores en el

cáncer de vejiga. (Bao et al., 2004; Kikuchi et al., 2014; Malanchi et al., 2012; Ruan et al., 2009; Wang et al., 2013)

En los últimos años ha sido descrito el papel de la POSTN dentro del proceso de oncogénesis. Aún se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual POSTN es responsable de la progresión del cáncer y metástasis, por ello sigue siendo objeto de estudio.

Se cree que uno de los principales mecanismos responsables de la invasión y metástasis de las células cancerígenas es también el proceso de transición epitelio-mesenquimal. (Guarino, 2007)

La MEC se caracteriza por la pérdida de la expresión de marcadores celulares epiteliales como E-caderina y por sobreexpresión de marcadores de células mesenquimales como vimetina, fibronectina, N-caderina, α -SMA, como también incrementa la actividad de las metaloproteinasas como MMP-2, MMP-3, MMP-9, previamente asociadas a un fenotipo de invasión. (Sarrió et al., 2008) Lo anterior podría explicar la capacidad de migrar e invadir estroma circundante. (Guarino, 2007)(Figura 18)

Vinculado a lo expuesto anteriormente y debido a la relación de periostina con factores de crecimiento endotelial vascular, podría explicarse la disminución de los niveles de albúmina sistémica en los pacientes y una mayor concentración en la lesión tumoral.

Finalmente cabe señalar que tampoco se han realizado estudios sobre el papel o la expresión de periostina en TO.

De las evidencias anteriormente expuestas podemos especular sobre el papel de POSTN en los ameloblastomas sólidos; es bien sabido que POSTN es una proteína crucial en el proceso de reorganización de la matriz extracelular lo cual en dicha entidad patológica podría traducirse a la capacidad de invasión por parte de las células neoplásicas e incluso metástasis en la variante de ameloblastoma metastatizante. Respecto a la interacción que se lleva a cabo con metaloproteinasas y kinasas de la membrana celular esto podría derivar en la capacidad de evadir apoptosis, promoción de la proliferación celular y regulación de la migración e invasión.

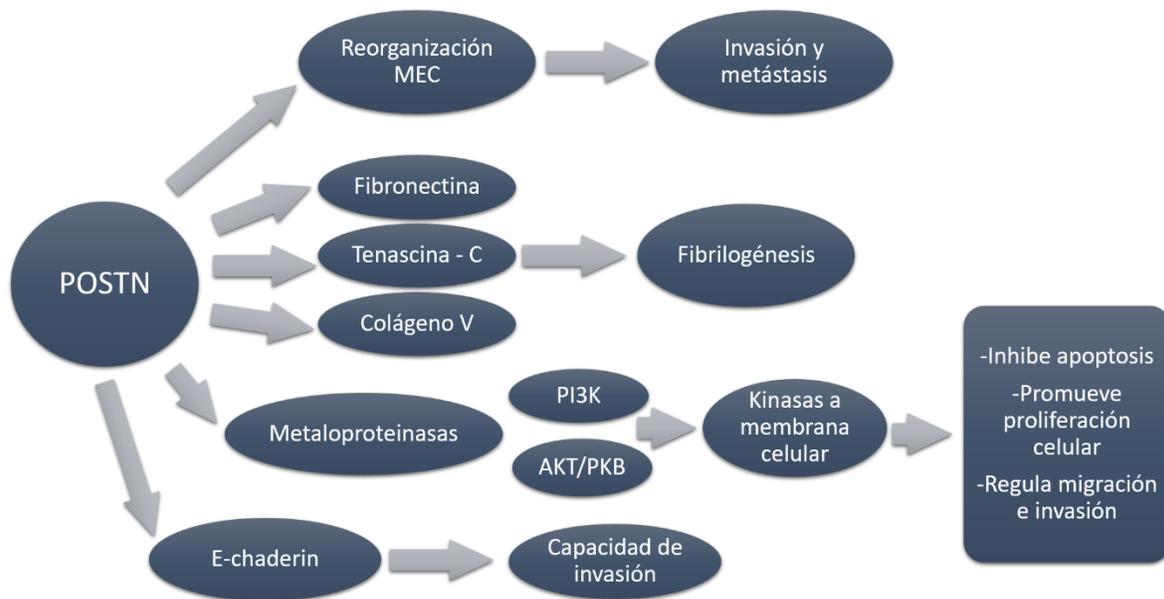


FIGURA 20 Esquema interacciones POSTN.. Se muestran las interacciones de periostina con otras proteínas y el posible papel que tienen dentro del desarrollo tumoral.

El análisis teórico anteriormente expuesto podría tener una corroboración clínica con la lesión y el alto grado de invasión y crecimiento, sin embargo, faltaría comprobar si existe metástasis ya que posterior al tratamiento quirúrgico el paciente no ha tenido un seguimiento puesto que no se ha presentado a consultas para revisión.



FIGURA 21 Esquema hipotético del papel de Periostina dentro de la tumorigénesis

En el esquema representa el papel potencial de periostina para la regulación de la transformación de células normales a células tumorales y su progresión a malignas. Periostina se encuentra altamente expresada en diversas neoplasias malignas, interactuando con integrinas y gran variedad de receptores, como es el caso de serpina y TNC, que inducen una variedad de eventos celulares. Reportes recientes revelan la contribución de periostina a la malignización principalmente por la evasión de la apoptosis, por promover la angiogénesis, invasión hacia otros tejidos y metástasis. (Ruan et al., 2009)

CAPÍTULO VIII CONCLUSIONES

- Es posible la identificación de proteínas a partir del secretoma de células de explantes tumorales, sin embargo, es necesario estandarizar una técnica para obtener mayor cantidad de proteínas.
- Es poco lo que se conoce sobre la correlación entre la albúmina y el cáncer, el papel que tiene esta para su desarrollo y si está o no realmente involucrada con el grado de malignidad o como un factor determinante e indicativo de mal pronóstico. Tendrían que realizarse estudios específicos para determinar el rol de la albúmina en el desarrollo de lesiones tumorales y el comportamiento que confiere a estos.
- Existen proteínas, tales como: periostin que han sido estudiadas y relacionadas con tumores sólidos, malignidad, metástasis y un bajo índice de supervivencia de los pacientes. Sin embargo, deben realizarse más estudios de proteómica en tumores odontogénicos para poder establecer una correlación y determinar los rasgos típicos que confiere esta proteína en las lesiones tumorales.

PERSPECTIVAS

Con este estudio se establecen las bases para la caracterización de secretomas tumorales, se sugiere el uso posterior como biomarcadores o indicadores del estadio biológico de las lesiones tumorales; con lo cual se pretende establecer bases de predictibilidad del comportamiento tumoral y pronóstico.

En el caso de proteínas como Periostina podría hablarse de marcadores que indiquen la posibilidad de recidiva. El siguiente paso sería la búsqueda de estos marcadores expresados de manera conjunta en secretoma y saliva o suero sanguíneo logrando así hacer pruebas de predictibilidad mediante un método mínimamente invasivo.

Deberán realizarse mayores estudios sobre la expresión de Periostina para establecer si se trata de una proteína específica de los ameloblastomas sólidos, o bien, si se encuentra en otras lesiones tumorales y cuáles son los rasgos típicos de las lesiones que expresan esta proteína.

Deberán realizarse experimentos funcionales de silenciamiento genético y sobreexpresión para establecer la correlación entre la expresión de Periostina y el papel que tiene en el comportamiento tumoral.

BIBLIORAFÍA

- Ackermann, G. L., Altini, M., & Shear, M. (1988). The unicystic ameloblastoma: a clinicopathological study of 57 cases. *Journal of Oral Pathology*, 17(9–10), 541–546. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3150441>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Appel, B., & Verbin, R. (1985). *Odontogenic tumors. In: Barnes EL. ed. Surgical pathology of head and neck.* New York.
- Askonas, B. A. (1975). Immunoglobulin formation in B lymphoid cells. *Journal of Clinical Pathology. Supplement (Association of Clinical Pathologists)*, 6, 8–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/802875>
- Avelar, R. L., Primo, B. T., Pinheiro-Nogueira, C. B., Studart-Soares, E. C., De Oliveira, R. B., Romulo De Medeiros, J., & Hernandez, P. A. G. (2011). Worldwide incidence of odontogenic tumors. *Journal of Craniofacial Surgery*, 22(6), 2118–2123. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3182323cc7>
- Bao, S., Ouyang, G., Bai, X., Huang, Z., Ma, C., Liu, M., ... Wang, X.-F. (2004). Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*, 5(4), 329–339. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00081-9](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00081-9)
- Barber, M. D., Ross, J. A., & Fearon, K. C. H. (1999). Changes in Nutritional, Functional, and Inflammatory Markers in Advanced Pancreatic Cancer. *Nutrition and Cancer*, 35(2), 106–110. https://doi.org/10.1207/S15327914NC352_2
- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(4), 349–356. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh037>
- Bjellqvist, B., Ek, K., Giorgio Righetti, P., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., & Postel, W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 6(4), 317–339. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(82\)90013-6](https://doi.org/10.1016/0165-022X(82)90013-6)
- Bonnet, N., Standley, K. N., Bianchi, E. N., Stadelmann, V., Foti, M., Conway, S. J., & Ferrari, S. L. (2009). The matricellular protein periostin is required for sost inhibition and the anabolic response to mechanical loading and physical activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(51), 35939–35950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060335>
- Boonpipattanapong, T., & Chewatanakornkul, S. (2006). Preoperative carcinoembryonic antigen and albumin in predicting survival in patients with

- colon and rectal carcinomas. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(7), 592–595. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16917399>
- Bouck, N., Stellmach, V., & Hsu, S. C. (1996). How tumors become angiogenic. *Advances in Cancer Research*, 69, 135–174. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791681>
- Buchner A, Merrell PW, C. W. (2006). Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. *J Oral Maxillofac Surg*, 64, 1343–1352.
- Chenau, J., Michelland, S., & Seve, M. (2008). Le sécrétome : définitions et intérêt biomédical. *Revue de Medecine Interne*, 29(7), 606–608. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2007.12.011>
- Damascelli, B., Patelli, G. L., Lanocita, R., Tolla, G. Di, Frigerio, L. F., Marchianò, A., ... Cantù, G. (2003). A Novel Intraarterial Chemotherapy Using Paclitaxel in Albumin Nanoparticles to Treat Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Tongue: Preliminary Findings. *American Journal of Roentgenology*, 181(1), 253–260. <https://doi.org/10.2214/ajr.181.1.1810253>
- Damascelli, B., Patelli, G., Tichá, V., Di Tolla, G., Frigerio, L. F., Garbagnati, F., ... Zunino, F. (2007). Feasibility and Efficacy of Percutaneous Transcatheter Intraarterial Chemotherapy with Paclitaxel in Albumin Nanoparticles for Advanced Squamous-Cell Carcinoma of the Oral Cavity, Oropharynx, and Hypopharynx. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 18(11), 1395–1403. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2007.06.009>
- Dewys, W. D., Begg, C., Lavin, P. T., Band, P. R., Bennett, J. M., Bertino, J. R., ... Tormey, D. C. (1980). Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *The American Journal of Medicine*, 69(4), 491–497. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7424938>
- Dyrløv Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340(4), 783–795. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.028>
- El-Naggar, A. K., Chan, J. K. C., Rubin Grandis, J., Takata, T., Slootweg, P. J., & International Agency for Research on Cancer. (n.d.). *WHO classification of head and neck tumours*. Retrieved from <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Who-Classification-Of-Head-And-Neck-Tumours-2017>
- Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1317–1322. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721090>

- Friis, L. M., Pin, C., Pearson, B. M., & Wells, J. M. (2005). In vitro cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiological Methods*, 61(2), 145–160. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2004.12.003>
- Giancotti, F. G., & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5430), 1028–1032. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446041>
- Graves, P. R., & Haystead, T. A. J. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 66(1), 39–63; table of contents. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11875127>
- Greish, K. (2007). Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *Journal of Drug Targeting*, 15(7–8), 457–464. <https://doi.org/10.1080/10611860701539584>
- Guarino, M. (2007). Epithelial–mesenchymal transition and tumour invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(12), 2153–2160. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.011>
- Gupta, V., Harkin, D. P., Kawakubo, H., & Maheswaran, S. (2004). Transforming Growth Factor-beta superfamily: evaluation as breast cancer biomarkers and preventive agents. *Current Cancer Drug Targets*, 4(2), 165–182. <https://doi.org/10.2174/1568009043481542>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
- Harris, C. C. (1996). p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17(6), 1187–1198. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681432>
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry. Biokhimiia*, 62(11), 1180–1190. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9467840>
- Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., ... Kudo, A. (1999). Identification and Characterization of a Novel Protein, Periostin, with Restricted Expression to Periosteum and Periodontal Ligament and Increased Expression by Transforming Growth Factor β . *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(7), 1239–1249. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.7.1239>
- Hortin, G. L., Carr, S. A., & Anderson, N. L. (2010, February 1). Introduction: Advances in protein analysis for the clinical laboratory. *Clinical Chemistry. Clin*

Chem. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.132803>

- Khwaja, F.W., Svoboda, P., Reed, M., Poh, J., Pyrzynska, B., Van Meir, E. (n.d.). Proteomic identification of the wt-p53-regulated tumor cell secretome. *Oncogene*, 7, 7650–61.
- Kikuchi, Y., Kunita, A., Iwata, C., Komura, D., Nishiyama, T., Shimazu, K., ... Kashima, T. G. (2014). The Niche Component Periostin Is Produced by Cancer-Associated Fibroblasts, Supporting Growth of Gastric Cancer through ERK Activation. *The American Journal of Pathology*, 184(3), 859–870. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2013.11.012>
- Kramer, I. R., Pindborg, J. J., & Shear, M. (1993). The World Health Organization histological typing of odontogenic tumours. Introducing the second edition. *European Journal of Cancer. Part B, Oral Oncology*, 29B(3), 169–171. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8298419>
- Lam, P. T., Leung, M. W., & Tse, C. Y. (2007). Identifying prognostic factors for survival in advanced cancer patients: a prospective study. *Hong Kong Medical Journal = Xianggang Yi Xue Za Zhi*, 13(6), 453–459. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18057434>
- Lindsley, A., Snider, P., Zhou, H., Rogers, R., Wang, J., Olaopa, M., ... Conway, S. J. (2007). Identification and characterization of a novel Schwann and outflow tract endocardial cushion lineage-restricted periostin enhancer. *Developmental Biology*, 307(2), 340–355. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.04.041>
- Lis, C., Grutsch, J., Vashi, P., & Lammersfeld, C. (2003). Is serum albumin an independent predictor of survival in patients with breast cancer? *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 27(1), 10–15. <https://doi.org/10.1177/014860710302700110>
- Litvin, J., Selim, A.-H., Montgomery, M. O., Lehmann, K., Rico, M. C., Devlin, H., ... Safadi, F. F. (2004). Expression and function of periostin-isoforms in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(5), 1044–1061. <https://doi.org/10.1002/jcb.20115>
- Lotem, J., & Sachs, L. (1996). Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia*, 10(6), 925–931. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8667646>
- Lukashev, M. E., & Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in Cell Biology*, 8(11), 437–441. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9854310>
- Luo, H. Y., & Li, T. J. (2009). Odontogenic tumors: A study of 1309 cases in a Chinese population. *Oral Oncology*, 45(8), 706–711.

<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.11.001>

- Main, D. M. (1985). Epithelial jaw cysts: 10 years of the WHO classification. *Journal of Oral Pathology*, 14(1), 1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3918149>
- Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., & Huelsken, J. (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, 481(7379), 85–89. <https://doi.org/10.1038/nature10694>
- Mallick, J. A. (2002). Ameloblastoma - Management and Review of Literature, 0–4.
- Maltoni, M., Caraceni, A., Brunelli, C., Broeckaert, B., Christakis, N., Eychmueller, S., ... Kaasa, S. (2005). Prognostic factors in advanced cancer patients: Evidence-based clinical recommendations - A study by the steering committee of the european association for palliative care. *Journal of Clinical Oncology*, 23(25), 6240–6248. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.866>
- Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, 46(12 Pt 1), 6387–6392. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2946403>
- Minami, M., Kaneda, T., Yamamoto, H., Ozawa, K., Itai, Y., Ozawa, M., ... Sasaki, Y. (1992). Ameloblastoma in the maxillo-mandibular region: MR imaging. *Radiology*, 184(2), 389–393. <https://doi.org/10.1148/radiology.184.2.1620834>
- Miyamoto, C. T., Brady, L. W., Markoe, A., & Salinger, D. (1991). Ameloblastoma of the jaw. Treatment with radiation therapy and a case report. *American Journal of Clinical Oncology*, 14(3), 225–230. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2031509>
- Moses, H. L., Yang, E. Y., & Pietenpol, J. A. (1990). TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, 63(2), 245–247. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2208284>
- Mosqueda-Taylor, A., Ledesma-Montes, C., Caballero-Sandoval, S., Portilla-Robertson, J., Rivera, L. M. R. G., & Meneses-García, A. (1997). Odontogenic tumors in Mexico: A collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 84(6), 672–675. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(97\)90371-1](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(97)90371-1)
- Müller, H., & Slootweg, P. J. (1985). The ameloblastoma, the controversial approach to therapy. *Journal of Maxillofacial Surgery*, 13(2), 79–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3858399>
- Nickel, W. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on

- cargo proteins and potential export routes. *European Journal of Biochemistry*, 270(10), 2109–2119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752430>
- Norris, R. A., Damon, B., Mironov, V., Kasyanov, V., Ramamurthi, A., Moreno-Rodriguez, R., ... Markwald, R. R. (2007). Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(3), 695–711. <https://doi.org/10.1002/jcb.21224>
- Nuzzo, P. V., Buzzatti, G., Ricci, F., Rubagotti, A., Argellati, F., Zinoli, L., & Boccardo, F. (2014). Periostin: A Novel Prognostic and Therapeutic Target For Genitourinary Cancer? *Clinical Genitourinary Cancer*, 12(5), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2014.02.005>
- Ochsenbein, A. F. (2002). Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Therapy*, 9(12), 1043–1055. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700540>
- Oñate-Ocaña, L. F., Aiello-Crocifoglio, V., Gallardo-Rincón, D., Herrera-Goepfert, R., Brom-Valladares, R., Carrillo, J. F., ... Mohar-Betancourt, A. (2007). Serum Albumin as a Significant Prognostic Factor for Patients with Gastric Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 14(2), 381–389. <https://doi.org/10.1245/s10434-006-9093-x>
- Philipsen, H. P., & Reichart, P. A. (1998). Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. *Oral Oncology*, 34(5), 317–325. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(98\)00012-8](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(98)00012-8)
- Philipsen, Hans Peter, & Reichart, P. A. (2006). Classification of odontogenic tumours. A historical review. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 35(9), 525–529. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2006.00470.x>
- Pinsolle, J. Michelet, V. T. of ameloblastoma of the jaws. (1995). Treatment of ameloblastoma of the jaws. *Arch. Otolaryngol. Head and Neck Surg.*, 121, 994–96.
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., & Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(36), 13368–13373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>
- Ratajczak-wielgomas, K., & Dziegiel, P. (2015). The role of periostin in neoplastic processes, 53(2), 120–132.
- Regezi, J. A., Kerr, D. A., & Courtney, R. M. (1978). Odontogenic tumors: analysis of 706 cases. *Journal of Oral Surgery (American Dental Association : 1965)*, 36(10), 771–778. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/280645>
- Reichart, P. (Peter), & Philipsen, H. P. (Hans P. . (2004). *Odontogenic tumors and*

- allied lesions.* Quintessence Pub. Retrieved from http://www.quintpub.com/display_detail.php3?psku=B8823#.W9JBOUsza00
- Rios, H., Koushik, S. V, Wang, H., Wang, J., Zhou, H.-M., Lindsley, A., ... Conway, S. J. (2005). periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Molecular and Cellular Biology*, 25(24), 11131–11144. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.11131-11144.2005>
- Robinson, L., & Martinez, M. G. (1977). Unicystic ameloblastoma: a prognostically distinct entity. *Cancer*, 40(5), 2278–2285. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/922668>
- Ruan, K., Bao, S., & Ouyang, G. (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(14), 2219–2230. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0013-7>
- Sarrió, D., Rodríguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., & Palacios, J. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Relates to the Basal-like Phenotype. *Cancer Research*, 68(4), 989–997. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2017>
- Siddiqui, A., Heinzerling, J., Livingston, E. H., & Huerta, S. (2007). Predictors of early mortality in veteran patients with pancreatic cancer. *The American Journal of Surgery*, 194(3), 362–366. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2007.02.007>
- Speight, P. M., & Takata, T. (2018). New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. *Virchows Archiv*, 472(3), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2182-3>
- Sun, L.-C., Chu, K.-S., Cheng, S.-C., Lu, C.-Y., Kuo, C.-H., Hsieh, J.-S., ... Wang, J.-Y. (2009). Preoperative serum carcinoembryonic antigen, albumin and age are supplementary to UICC staging systems in predicting survival for colorectal cancer patients undergoing surgical treatment. *BMC Cancer*, 9(1), 288. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-288>
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., & Van Dyke, T. (1994). p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 78(4), 703–711. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069917>
- Takeshita, S., Kikuno, R., Tezuka, K., & Amann, E. (1993). Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *The Biochemical Journal*, 294 (Pt 1)(1), 271–278. <https://doi.org/10.1042/BJ2940271>
- Taylor, B. (1968). Ameloblastoma. *CA Cancer J Clin*, 18(4), 205–207.

- Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1312–1316. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721091>
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S., & van Dijk, J. M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(3), 515–547. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974125>
- Twyman, R. M. (2004). *Principles of proteomics*. Oxford : BIOS Scientific. Retrieved from <https://catalogue.nlb.gov.sg/cgi-bin/spydu.exe/ENQ/WPAC/BIBENQ?SETLVL=&BRN=11935856>
- von Meyenfeldt, M. (2005). Cancer-associated malnutrition: An introduction. *European Journal of Oncology Nursing*, 9, S35–S38. <https://doi.org/10.1016/j.ejon.2005.09.001>
- Wan, X., Zheng, X., Pang, X., Zhang, Z., Jing, T., Xu, W., & Zhang, Q. (2015). The potential use of lapatinib-loaded human serum albumin nanoparticles in the treatment of triple-negative breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 484(1–2), 16–28. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2015.02.037>
- Wang, X., Liu, J., Wang, Z., Huang, Y., Liu, W., Zhu, X., ... Ouyang, G. (2013). Periostin Contributes to the Acquisition of Multipotent Stem Cell-Like Properties in Human Mammary Epithelial Cells and Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8(8), e72962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072962>
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)
- Williams, T. P. (1993). Management of ameloblastoma: a changing perspective. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery : Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 51(10), 1064–1070. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8410443>
- Wu, W. W., Wang, G., Baek, S. J., & Shen, R.-F. (2006). Comparative Study of Three Proteomic Quantitative Methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, Using 2D Gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of Proteome Research*, 5(3), 651–658. <https://doi.org/10.1021/pr050405o>
- Yeun, J. Y., & Kaysen, G. A. (1998). Factors influencing serum albumin in dialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 32(6 Suppl 4), S118-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892378>

