



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES ECTODÉRMICOS Y
ECTOMESENQUIMALES DE CÉLULAS DE ODONTOMA COMPUESTO Y
COMPLEJO.**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

C. D. DAVID ALONSO TREJO REMIGIO

TUTORES: DR. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

Coordinador del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial

DR. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

División de Estudios de Posgrado e Investigación, F. O. UNAM

CDMX.

NOVIEMBRE DE 2017

Proyecto PAPIIT IN223414.



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.

1 Resumen	4
2 Abstract	5
3 Introducción	6
4 Marco teórico	9
4.1 Antecedentes históricos	9
4.2 Definición odontoma	10
4.3 Clasificación	10
4.4 Generalidades	10
4.5. Epidemiología	11
4.6 Características clínicas	12
4.7 Características radiográficas	13
4.8 Características histológicas	14
4.9 Etiología	16
4.10 Métodos de diagnóstico	20
4.11 Diagnósticos diferenciales	20
4.12 Tratamiento	21
4.13 Investigación básica y su aplicación actual	22
5 Planteamiento del problema	29
6 Pregunta de investigación	29
7 Justificación	30
8 Hipótesis	31
9 Objetivos	31
9.1 Objetivo general	31
9.2 Objetivo general	31
10 Variables	32
10.1 Variables independientes	32
10.2 Variable dependiente	32
11 Operacionalización de las variables	33
12 Criterios de inclusión y exclusión	35
13 Recursos	35
14 Equipo e infraestructura	35
15 Recursos humanos	36
16 Materiales	37
17 Metodología	38
17.1 Muestras	38
17.2 Línea celular de fibroblastos	38
17.3 Cuantificación y dilución límite	39
17.4 Extracción de ARN	39
17.5 Amplificación	41
17.6 Análisis de resultados	43

18 Resultados	44
18.1 Líneas celulares y odontomas incluidos en parafina	44
18.2 Experimento de validación	49
19 Discusión	51
20 Conclusión	58
21 Referencias	59

Índice de Figuras

Fig. 1 Odontoma Compuesto y dentículos de un odontoma	12
Fig. 2 Odontoma Complejo	12
Fig. 3 Odontoma compuesto maxilar y odontoma compuesto mandibular	13
Fig. 4 Odontoma complejo mandibular	13
Fig. 5 Corte histológico OdCj H&E a 40X	14
Fig. 6 Corte histológico OdCm H&E 40X	15
Fig. 7 Odontoma mixto H&E 40X	15
Fig. 8 Ortopantomografía de paciente con síndrome de Gardner que presenta múltiples osteomas, odontomas y dientes sin erupcionar	18
Fig. 9 Proceso de odontogénesis	28
Fig. 10 Nivel de expresión de marcadores ectomesenquimales y ectodérmicos en líneas celulares de odontoma compuesto y complejo en experimento in vitro y de odontomas incluidos en parafina	47
Fig. 11 Análisis comparativo entre las tres líneas celulares. *CD34 (p=0.046), *OPN (p=0.028), marcadores con diferencias estadísticamente significativas	48
Fig. 12 Análisis comparativo entre las tres líneas celulares	50

Índice de tablas

Tabla 1 Operacionalización de las variables	33
Tabla 2 Set de Primers RT-PCR	42
Tabla 3 Características clínicas del odontoma para cultivo primario	44
Tabla 4 Características clínicas de los odontomas incluidos en parafina	44
Tabla 5 Tabla de datos normalizados con GAPDH, línea celular de odontoma compuesto (OdCm), línea celular de odontoma complejo (OdCj) y línea celular de fibroblastos (LPD).	45
Tabla 6 Tabla de datos normalizados con GAPDH, línea celular de odontoma compuesto (OdCm), línea celular de odontoma complejo (OdCj) incluidos en parafina.	49

1.- Resumen

El Odontoma es un tumor odontogénico con características de hamartoma clasificado como compuesto y complejo. Nuestro objetivo fue el de caracterizar el perfil ectodérmico y ectomesenquimal de distintos marcadores en cultivos celulares primarios de odontomas complejos y compuestos.

Material y métodos: Se obtuvieron cuatro muestras de odontoma compuesto (OdCm) y 3 de odontoma complejo (OdCj) de pacientes atendidos en la Clínica de Medicina Bucal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se usaron células de ligamento periodontal como control. Se realizaron ensayos de RT-PCR a AMEL, AMB, EDAR, p21, MSX1, MSX2, CD34, SOX2, PAX9, RUNX2, BSP, OPN, BARX1 y GAPDH (control). En la estadística inferencial se utilizó la mediana de los grupos utilizando la prueba de Kruskal Wallis.

Resultados: El OdCm exhibe un mayor perfil ectomesenquimal con expresión predominante de AMEL, BSP, PAX9, EDAR, BARX y MSX2; en OdCj predomina SOX2, CD34, RUNX2 y OPN. Nuestro análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) para OPN y CD34.

Conclusión: Los resultados sugieren un comportamiento heterogéneo para OdCm y OdCj, nuestros hallazgos proponen que en el odontoma compuesto predominan los biomarcadores relacionados con el nudo del esmalte y la etapa tardía de la odontogénesis indicando que una interacción ectomesenquimal es necesaria para el desarrollo de estas lesiones. Una mayor y significativa expresión de OPN y CD34 podría ser responsable de la mineralización y la estructuración amorfa del odontoma complejo.

Palabras clave: Odontoma, ameloblastina, OPN, CD34.

2. - Abstract

Objective: Odontoma is an odontogenic tumor with hamartoma-like characteristics, it is classified as compound and complex. The aim of the present research project was to characterize ectodermal and ectomesenchymal profiles of different markers in primary cell cultures of complex and compound odontomas.

Material and Methods: Four samples of compound odontoma were obtained (CpOd) as well as three samples of complex odontoma (CxOd). Samples were harvested from patients treated at the Oral Medicine Clinic of the Graduate and Research Division, National School of Dentistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM).

Periodontal ligament cells were used as control. RT-PCR assays to AMEL, AMB, EDAR, p21, MSX1, MSX2, CD34, SOX2, PAX9, RUNX2, BSP, OPN, BARX1 and GAPDH (control) were performed. Measurements of mean, standard deviation and Kruskal-Wallis test were conducted.

Results CpOd exhibited greater ectomesenchymal profile with predominant expression of AMEL, BSP, PAX9, EDAR, BARX,

And MSX2; in CxOd predominance of SOX2, CD34, RUNX2 and OPN was found. Our statistical analysis revealed significant differences ($p < 0,05$) for OPN and CD34.

Conclusion: Results suggest an heterogeneous behavior for CpOd and CxOd, findings of the present study might suggest that in compound odontoma biomarkers related to the enamel knot and late odontogenic stages predominate; this would indicate that ectomesenchymal interaction is required for the development of these lesions. Greater and more significant OPN and CD34 expression might be responsible for compound odontoma's mineralization and amorphous structuration.

Keywords: Odontoma, ameloblastin, OPN, CD34

3.- Introducción

Debido a las exigencias del mundo actual, el cirujano dentista no debe limitar su conocimiento solo en cuestiones teóricas, debe desarrollar la habilidad de detectar alteraciones y situaciones anormales en su práctica diaria ya que esto puede ser vital para la supervivencia del paciente así como para un planeamiento correcto del tratamiento y la resolución del problema.

Entre las lesiones bucales más recurrentes se encuentran los tumores odontogénicos que se forman a partir de los tejidos asociados al desarrollo de los dientes. Estas neoplasias se desarrollan en el área de maxilares y la mandíbula, se forman a partir de la proliferación de tejidos mesenquimales, ectodérmicos o ambos durante la formación del diente. Este tipo de lesiones generalmente tienen un comportamiento benigno o pueden llegar a malignizarse comprometiendo la calidad y la vida del paciente.

Los odontomas son neoplasias odontológicas benignas compuestas de los tejidos que conforman al diente: dentina, esmalte, pulpa y cemento. Es uno de los tumores odontológicos más frecuentes y se le considera realmente un hamartoma. La OMS los clasifica en dos subtipos el odontoma compuesto y el odontoma complejo y algunos autores han propuesto un tercer tipo mixto, una combinación de compuesto y complejo.

Se desconoce la etiología del odontoma, se atribuye a diferentes factores como traumatismos, procesos infecciosos o inflamatorios, anomalías hereditarias o alteraciones en el gen de desarrollo dentario. Suelen ser lesiones asintomáticas, aunque pueden aparecer signos y síntomas relacionados tales como infecciones, retención dentaria y dientes supernumerarios. Se detecta con frecuencia en el examen radiográfico, su ubicación más frecuente es en el maxilar y existe mayor frecuencia en niños y adolescentes observando que hay poca diferencia en su incidencia entre hombres y mujeres.

Gracias a las técnicas de investigación actual, se ha avanzado en el estudio de la patogénesis del odontoma, se han considerado nuevas técnicas para establecer

modelos de estudio adecuados para estudiar esta lesión, ya que en últimos años se ha propuesto al odontoma como una fuente de estudio para establecer un modelo que nos permita estudiar a los tumores odontogénicos y considerarlo como una entidad base para que en un futuro se establezcan técnicas de regeneración tisular.

Estas técnicas de estudio alternativas podrían lograrse si se soluciona la carencia de modelos experimentales de estudio in vivo o in vitro, capaces de reproducir las características de esta lesión. El cultivo celular primario se considera una opción viable para el establecimiento de los modelos de estudio para los odontomas. El cultivo celular primario es un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células in vitro, permitiendo que las células conserven sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se considera que los cultivos primarios derivados de lesiones, mantienen sus características lo más parecido al entorno natural de la lesión

Durante el proceso de odontogénesis existen interacciones moleculares necesarias para el completo desarrollo y formación del diente. Son muchos los genes implicados en este proceso y se han seleccionado para este trabajo los que consideramos que podrían darnos un parámetro para comprender el porque durante la formación de este tumor se diferencian hacia un tipo compuesto o hacia un tipo complejo.

Estudios previos sugieren que el odontoma complejo podría tener una inclinación hacia un linaje celular ectodérmico mientras que el odontoma compuesto presenta más expresión de tipo ectomesenquimal esto puede aportar información nueva en cuanto el estudio del desarrollo y la formación de tumores odontogénicos. A través del cultivo celular primario, por lo que se obtuvieron líneas celulares derivadas de odontomas compuesto y complejo, posteriormente se cultivaron y estabilizaron con medios adecuados para su crecimiento, proliferación y análisis génico.

Este trabajo propone un nuevo enfoque en el estudio de los tumores odontogénicos, es un trabajo original ya que no hay estudios comparativos previos entre ambas lesiones que nos explique su comportamiento biológico y comprensión del momento biológico en que se dan esas alteraciones y las diferencias que determinan la formación del odontoma.

4.- Marco teórico

4.1 Antecedentes históricos

Los tumores odontogénicos son neoplasias producidas a partir de los tejidos formadores de los órganos dentarios ⁽¹⁾. Se originan del ectodermo y del ectomesénquima odontogénico, mostrando grados variables de interacción inductiva entre estos componentes embrionarios del germen dental en desarrollo ⁽¹⁾. El primero en utilizar el término de “odontoma” fue el francés Paul Pierre Broca en 1867 y se refería al odontoma como un tumor completo de tejido dental ⁽²⁾.

En 1914 Gabell, James y Payne agruparon a los odontomas según su origen evolutivo: el tejido epitelial, tejido compuesto (ectodérmico y mesodérmico) y de tejido conjuntivo.

En 1946 Thoma y Goldman formulan una clasificación para odontomas:

- Odontoma germinado: que contiene dos o más dientes más o menos bien formados.
- Odontoma compuesto: que contiene gran número de dientes más o menos rudimentarios.
- Odontoma complejo: cuyas estructuras calcificadas no tienen semejanza con la disposición anatómica del tejido dental.
- Odontoma dilatado: muy raro, en la cual la parte de la raíz de un diente muestra notable agrandamiento.
- Odontoma quístico: en el cual el odontoma que esta encapsulado por el tejido fibroso, está contenido en un quiste o en la pared de un quiste.

En 1952 Cahn los clasificó en duros y blandos ⁽³⁾.

Ries Centeno en 1973 los definió como tumores formados por tejidos dentarios calcificados, mezclados en diferente sentido y proporciones ⁽⁴⁾.

4.2 Definición odontoma

Los odontomas son malformaciones tumorales mixtas epiteliales y mesenquimatosas (hamartomas) compuestas por tejidos dentales duros y blandos ⁽⁵⁾.

4.3 Clasificación

La OMS actualmente clasifica a los odontomas en compuesto y complejo ⁽⁵⁾. Se considera que los odontomas compuestos son malformaciones con alteraciones en todos los tejidos dentales normales y tienen numerosas estructuras similares a dientes (con tamaño y forma alterados) conocidas como dentículos. El otro tipo, conocido como odontoma complejo, son tumores bien formados con tejidos dentales en distribución desorganizada y de tamaño variable ⁽⁵⁾.

4.4 Generalidades

Los odontomas han sido considerados como malformaciones tumorales o hamartomas de tejidos dentales o anomalías del desarrollo en lugar de verdaderas neoplasias odontogénicas ⁽⁶⁾. Los odontomas principalmente son lesiones que se localizan en forma intraósea, aunque se han descrito localizados en tejidos blandos gingivales y son más frecuentes en la dentición permanente y menos en la dentición primaria. Las localizaciones más comunes son en el maxilar anterior, seguido por la mandíbula anterior y las regiones postero-inferiores ⁽⁶⁾.

4.5 Epidemiología

Generalmente los odontomas se detectan durante la segunda y tercera década de la vida y constituyen alrededor del 10 al 22% de todos los tumores odontogénicos ⁽⁷⁾. La mayoría de los odontomas que se presentan en el segmento anterior de los maxilares son compuestos (61%), mientras que los localizados en el segmento posterior son del tipo complejo (34%). El odontoma compuesto (OdCm) se presenta más frecuentemente en la región de los incisivos en el maxilar superior en contraste con el odontoma complejo (OdCj) que se encuentran comúnmente en la región molar y premolar de la mandíbula ⁽⁷⁾.

En nuestro conocimiento hay pocos estudios sobre la frecuencia de los odontomas, siendo la mejor fuente de información los registros de servicios de diagnóstico histopatológico. La información obtenida de estos archivos es valiosa y probablemente representa la única fuente de estos datos actualmente disponibles ⁽⁸⁾.

En México se reportan como el tumor odontogénico más frecuente seguido por el ameloblastoma y el mixoma odontogénico ⁽⁹⁾.

En el Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial División de Estudios de Posgrado e Investigación, F. O. UNAM se realizó un estudio sobre la frecuencia de odontomas en un periodo de 10 años (del 2004 al 2014) registrados en el servicio de diagnóstico, valorando su distribución por sexo, edad, localización anatómica y el tipo de odontoma, se obtuvo un total de 126 casos, 74 mujeres (58.7%), y 52 hombres (41.3%) siendo la edad más común de 9 años. El OdCj representó el 50%, el OdCm se presentó con el 34.9% y el mixto con el 15.1%. La región más afectada fue el maxilar con el 58.7% de las lesiones ⁽¹⁰⁾.

4.6 Características clínicas

Clínicamente, los odontomas pueden estar asociados a dientes permanentes retenidos y a menudo con exfoliación retardada de los dientes primarios. Puede presentarse inflamación en mandíbula o maxilar con dolor leve a la palpación, dependiendo del tamaño, el tipo y la ubicación. Los odontomas por lo general son asintomáticos y regularmente son diagnosticados accidentalmente en radiografías de rutina ⁽⁶⁾. (Fig. 1 y 2)



Fig. 1.- Odontoma Compuesto y dentículos de un odontoma ⁽¹¹⁾.

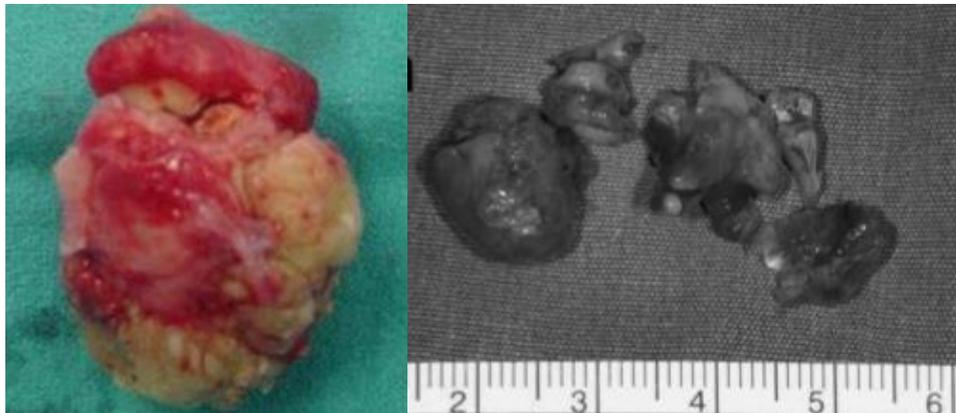


Fig. 2.- Odontoma Complejo ⁽¹¹⁾.

4.7 Características radiográficas

El odontoma compuesto se observa como una imagen mixta con múltiples radiopacidades debido a los múltiples dentículos, (estructuras que adoptan una configuración similar a dientes), rodeados por un halo radiolúcido. Pueden contener de 2 a 3 hasta 20 a 30 dentículos. (Fig. 3)

El odontoma complejo se observa como una masa radiopaca irregular, única o múltiple, con un halo radiolúcido. Las lesiones son uniloculares y están separadas del hueso normal por una línea nítida de corticación. No se observan estructuras con aspecto de diente ⁽⁶⁾. (Fig. 4)

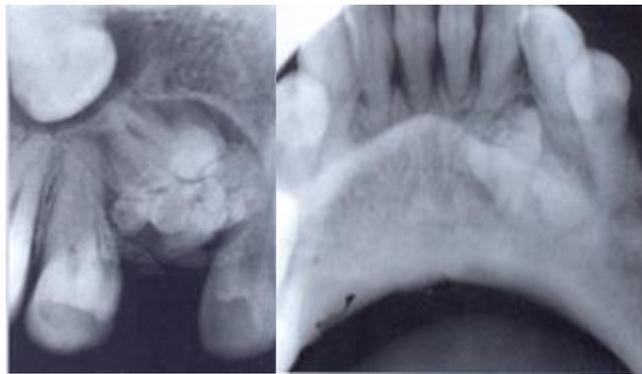


Fig. 3.- Odontoma compuesto maxilar ⁽¹²⁾ y odontoma compuesto mandibular ⁽¹³⁾.

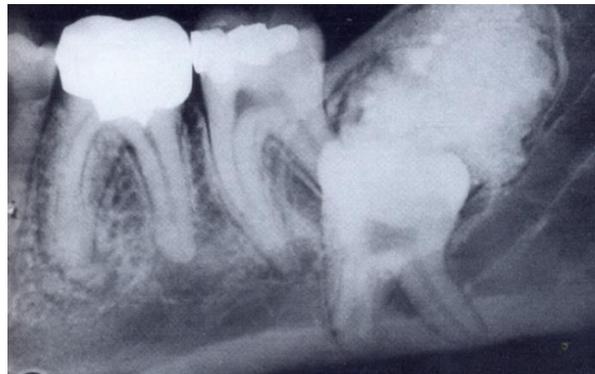


Fig. 4.- Odontoma complejo mandibular ⁽¹²⁾.

Aunque el diagnóstico de odontomas en la mayoría de los casos puede ser emitido provisionalmente por examen radiográfico, el diagnóstico diferencial incluye otros tumores odontogénicos como el fibroma y fibroodontoma ameloblástico, así como el odontoameloblastoma ⁽⁶⁾.

4.8 Características histológicas

Odontoma complejo (OdCj)

En los OdCj maduros la cápsula de tejido blando consiste en tejido conjuntivo laxo que contiene cordones o islas de epitelio odontogénico. En OdCj en desarrollo la parte exterior consta de una zona rica de células de tejido blando con la formación de dentina y esmalte, no se asemeja a la morfología del diente. La lesión se observa como una masa de dentina tubular primaria que encierra estructuras circulares u ovas con espacios vacíos de esmalte descalcificado maduro, matriz del esmalte, epitelio y tejido conjuntivo. La estructura del tejido dental duro puede variar. El cemento es escaso. El tejido pulpar suele mostrar finas ramificaciones, con lo que la tumoración aparece perforada por pequeñas ramas de la pulpa que producen una imagen esponjosa ⁽¹⁴⁾. (Fig. 5)

Pueden estar presentes células fantasmas dispersas, la cuales se consideran células epiteliales anucleadas ⁽¹⁴⁾.

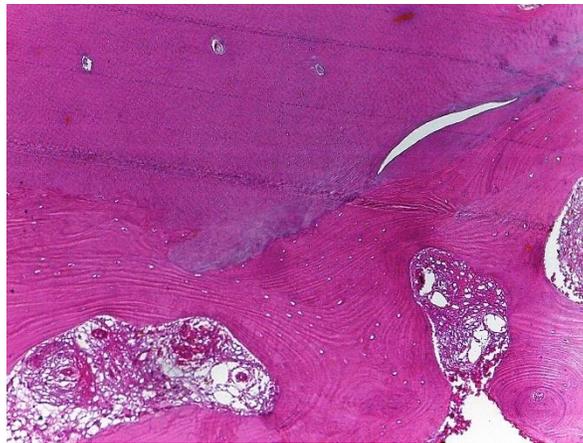


Fig. 5.- OdCj H&E a 40X. Fuente directa Servicio de Diagnóstico de Patología Bucal, DEPeI, FO-UNAM.

Odontoma compuesto (OdCm)

Se compone esencialmente de tejidos dentales maduros como el esmalte, dentina, cemento y tejido pulpar conformando dentículos. La mayor parte del tumor consiste en dentina que es normal en apariencia. Hay una cápsula fibrosa y una pequeña cantidad de tejido de soporte fibroso. En esta cápsula se puede observar la presencia de "células fantasma". Los odontomas compuestos en desarrollo muestran varios gérmenes dentales dismórficos en un tejido conjuntivo laxo con cordones e islas de epitelio odontogénico, gran parte de la matriz de esmalte se conserva a pesar de la descalcificación ⁽¹⁴⁾. (Fig. 6 y 7)

La distinción entre el OdCj y compuesto se basa principalmente en la presencia de estructuras en forma de dientes en odontomas compuestos ⁽¹⁴⁾.



Fig. 6.- OdCm H&E 40X. Fuente directa: Servicio de Diagnóstico de Patología Bucal, DEPeI, FO-UNAM.

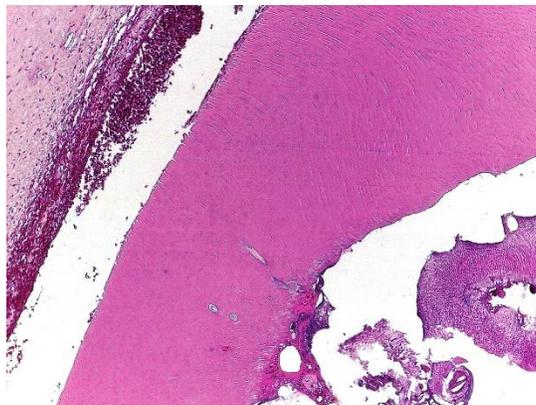


Fig. 7.- Odontoma mixto H&E 40X. Fuente directa: Servicio de Diagnóstico de Patología Bucal, DEPeI, FO-UNAM.

4.9 Etiología

La etiología de los odontomas es incierta, se relaciona con: trauma local, infección, factores hereditarios como el Síndrome de Garden y Hermann, hiperactividad odontoblástica y problemas en el crecimiento ⁽¹⁵⁾.

Se han postulado teorías que proponen explicar el origen de la formación de los odontomas, partiendo del hecho de que son el resultado de la protrusión de células epiteliales odontogénicas suplementarias procedentes de la lámina dental. La teoría de Malassez nos habla que los odontomas se forman a expensas de los restos paradentales de Malassez, la teoría de Rywkind plantea una histogénesis análoga al mecanismo de la odontogénesis ⁽¹⁶⁾. Se ha sugerido que los odontomas tienen predisposición genética y se deben a un gen mutado o interferencia posiblemente postnatal del control genético del desarrollo de los dientes ⁽⁷⁾.

Causas locales

Satish ⁽⁷⁾ postula que los odontomas pueden desarrollarse en zonas anatómicas con espacio inadecuado y debido a las presiones ejercidas durante el crecimiento, tiene diversos efectos durante el desarrollo del diente y sugiere que las presiones ejercidas durante el crecimiento pueden ser importantes en algunos odontomas compuestos. Esta idea surge al observar los efectos en el desarrollo de los premolares a los cuales las raíces de los molares deciduos ejercen una presión constante durante su desarrollo ⁽⁷⁾.

También considera a procesos infecciosos en los dientes predecesores como un factor, aunque parece no influir si deriva de un predecesor deciduo; pero una infección generalizada si puede ser de importancia. Los efectos sobre la dentición de una infección prenatal con *treponema pallidum* en niños cuyas madres han sido infectadas con sífilis durante el embarazo, en infecciones agudas en maxilares durante la infancia, donde la infección piogénica de todo el maxilar se produce poco después del nacimiento se han identificado OdCm años después. Se sugiere que la infección piógena causó la división de un germen dental, esto puede estar patológicamente relacionado o afectar el control genético del desarrollo de los

dientes ⁽⁷⁾. Otra causa sugiere a los ameloblastos maduros y restos de Serres pues se cree tienen su origen de ameloblastos maduros y explica que estas células especializadas tienen potencial de desarrollar tumores con una amplia variación en apariencia y contenido ⁽⁷⁾ que los restos celulares de Serres retenidos sufren proliferación para convertirse en odontomas, mientras que otros se degeneran y forman una cavidad quística ⁽⁷⁾. También en el epitelio odontogénico se sugiere que cuando los brotes se dividen, pueden desarrollarse individualmente para convertirse en numerosos dientes mal formados posicionalmente cercanos o estructuras similares a dientes. Cuando los brotes se desarrollan sin esa división poco común y consiste en conglomerados al azar de los tejidos dentales, pueden convertirse en OdCj. Sin embargo, la transición de un tipo a otro se asocia comúnmente con un grado variable de morfo-diferenciación, histodiferenciación o ambas a menudo es difícil diferenciar entre ambos tipos cuando se combinan ⁽⁷⁾.

El trauma ha sido implicado en la génesis de la lesión. Se ha descrito al odontoma, como la malformación del germen dental permanente, debido a luxación intrusiva o avulsión del diente primario. Esta malformación es una secuela rara en las lesiones en la dentición primaria. Este mecanismo se basa en un antecedente de un traumatismo pre-eruptivo permanente del diente. Una fuerza dirigida verticalmente a través del eje largo del incisivo deciduo es transmitida al germen dental permanente causando un daño extenso. De acuerdo con esta teoría, la malformación ocurre durante la fase temprana de la odontogénesis y afecta las etapas morfogénicas del desarrollo ameloblástico del germen dental permanente. Se ha descrito un gran nódulo de esmalte que se desarrolla después de un traumatismo en un germen dental. Existen reportes de casos de odontoma que parecen ser debidos al desprendimiento de una parte de un germen dental que puede ser de la vaina epitelial de Hertwig o del órgano del esmalte, considerando entonces que el proceso de formación del odontoma se inicia sólo después de la amelogénesis ⁽⁷⁾.

También se ha relacionado el origen del odontoma a factores hereditarios, mutaciones o interferencias posiblemente posnatales en el control genético del desarrollo del diente. El odontoma puede ocurrir debido a una o más de estas tres maneras:

- Por interferencia con el mecanismo por el cual los genes controlan la formación y forma del diente.
- Por una mutación en los genes afectados.
- Por herencia de esos genes anormales.

Mutaciones en las células epiteliales del germen dental pueden cambiar la capacidad inherente del epitelio odontogénico remanente para inducir su morfodiferenciación en etapa de casquete o campana, conservando su capacidad para estimular la diferenciación ectomesenquimal necesaria en la formación de ameloblastos y odontoblastos funcionales en este germen odontogénico neoformado, lo que conduciría al desarrollo de un odontoma o diente supernumerario ⁽⁷⁾.

La diferenciación de células odontogénicas normales y tumorales va acompañada de la expresión de moléculas, como amelogenina, citoqueratina, vimentina, fibronectina, colágena tipo III y IV, osteonectina y osteocalcina ⁽¹⁷⁾. Se considera que en los tumores existe la recapitulación de los programas genéticos expresados durante el odontogénesis normal con patrones de expresión anormales para estos genes ⁽⁷⁾.

La presencia de odontomas se ha relacionado a algunos síndromes tales como el síndrome de Gardner, el cual es una variante de la poliposis adenomatosa familiar que es una enfermedad hereditaria autosómica dominante caracterizada por la presencia combinada de múltiples pólipos intestinales y manifestaciones extraintestinales que incluyen osteomas múltiples, tumores del tejido conjuntivo, carcinoma de tiroides, hipertrofia del epitelio pigmentado de la retina, dientes supernumerarios retenidos y odontomas ⁽¹⁸⁾. (Fig. 8)

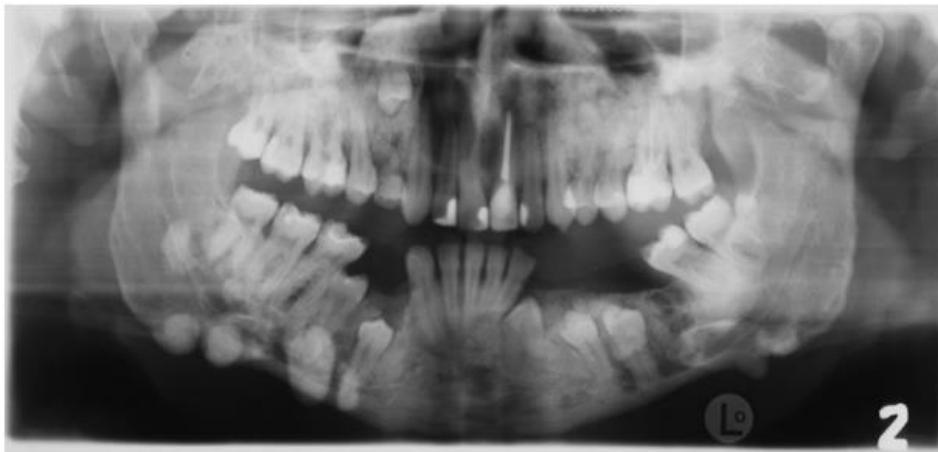


Fig. 8.- Ortopantomografía de paciente con síndrome de Gardner que presenta múltiples osteomas, odontomas y dientes sin erupcionar ⁽¹⁸⁾.

4.10 Métodos de diagnóstico

Los métodos comunes para el diagnóstico de odontomas son: el examen radiográfico de rutina y la confirmación mediante el estudio histopatológico, esto derivado de algún hallazgo clínico como puede ser la ausencia de erupción de un diente. A nivel radiológico pueden existir problemas al momento de identificarlo debido a la falta de mineralización, razón por la cual, siempre debe existir la confirmación histopatológica para el diagnóstico definitivo.

4.11 Diagnósticos diferenciales

El diagnóstico diferencial clínico incluye otros tumores odontogénicos de origen mixto como el fibroma ameloblástico, el cementoblastoma y el tumor odontogénico adenomatoide debido a que contienen una combinación de elementos de tejido epitelial y conjuntivo que se encuentran en todas las etapas de la odontogénesis ⁽¹⁴⁾.

Su diagnóstico radiográfico se debe realizar cuidadosamente, puesto que lesiones de gran tamaño pueden semejar lesiones fibroósas como la displasia fibrosa, fibroma osificante, odontofibroma ameloblástico, defecto calcificante postquirúrgico, osteítis condensante, osteoma y cementoblastoma. Estas lesiones debido a su extensión y localización pueden generar daños graves en las estructuras maxilofaciales adyacentes ⁽¹⁹⁾. Ante la presencia de una imagen radiográfica de estas características y localizada a nivel interradicular, será necesario establecer un diagnóstico diferencial con otras lesiones de similar localización y características, como una osteítis residual focal, un cementoma, un tumor odontogénico adenomatoide, un diente supernumerario, un fibroma cementificante o un osteoblastoma benigno. Cuando la lesión se localiza a nivel pericoronar, debe diferenciarse de un tumor odontogénico adenomatoide, un tumor odontogénico epitelial calcificante, un fibrodentinoma ameloblástico, o un odontoameloblastoma. Cuando la lesión se asienta en el seno maxilar, se debe diferenciar de una sinusitis, una infección periapical con pólipos antrales, una

micosis antral, un diente o una raíz desplazada, un cuerpo extraño, un osteoma periférico, una neoplasia benigna mesenquimal, un papiloma invertido o un carcinoma o sarcoma antral. Un odontoma en desarrollo puede fácilmente ser confundido con un ameloblastoma o un odontoameloblastoma por la presencia de una cantidad significativa de epitelio odontogénico. La característica distintiva es que ese epitelio está en relación normal a los tejidos odontogénicos y no se observa un componente invasivo ⁽²⁰⁾.

4.12 Tratamiento

El odontoma tiene un potencial de crecimiento limitado, pero debe eliminarse porque puede predisponer al cambio quístico, interferir con la erupción de los dientes permanentes y causar una destrucción considerable del hueso. El tratamiento de elección es la extirpación quirúrgica de la lesión bajo anestesia local.

Como se trata de un tumor capsulado, su extirpación es un procedimiento quirúrgico relativamente simple, pero se debe tomar especial cuidado para eliminarlo totalmente a fin de evitar una recidiva especialmente en OdCj inmaduros. Los dientes adyacentes que pudieron haber sido desplazados por el odontoma rara vez son dañados en la escisión quirúrgica ya que normalmente están separados por un septum de hueso aunque pueden existir excepciones. Cuando el paciente se encuentra en dentición mixta, al enuclear un odontoma es recomendable dar seguimiento al proceso de erupción. El diagnóstico y tratamiento oportuno nos ayuda a:

- 1) Adoptar un tratamiento menos complejo y menos costoso
- 2) Asegurar un mejor pronóstico
- 3) Evitar la reincidencia de la lesión
- 4) Evitar el desplazamiento o la desvitalización del diente adyacente ⁽⁷⁾.

4.13 Investigación básica y su aplicación actual

La investigación básica de los odontomas, tumores odontogénicos y la odontogénesis misma es variada. En años recientes, los modelos de estudio *in vitro* por medio del cultivo de células primarias ha brindado información adicional importante y complementaria a la obtenida de estudios histológicos e inmunohistoquímicos. En el año de 2012 Hatano y colaboradores ⁽¹⁹⁾. obtuvieron a partir de un odontoma humano en desarrollo una línea celular primaria mesenquimal, caracterizando su perfil osteogénico, odontogénico así como potencial proliferativo, observando la viabilidad de estas células, considerándolas candidatas para la investigación en la patogénesis del tumor, estudio de la odontogénesis, análisis de la síntesis de matriz extracelular e incluso pruebas de farmacotoxicidad ⁽¹⁹⁾. Xavier Guilherme M y colaboradores, observaron el papel de la vía WNT/ β -catenina y del factor de transcripción SOX2 en la interacción epitelio-mesénquima en células de odontoma, observando que este último marcador es fundamental en el proceso de inducción y desarrollo del odontoma ⁽²¹⁾.

Gracias a estas y otras investigaciones se ha planteado la idea de establecer un cultivo celular estable derivado de células de odontoma, como forma de entender la patogénesis de los tumores odontogénicos, estudiar su aplicación en la regeneración tisular, así como la odontogénesis misma ⁽²²⁻²³⁾. Los marcadores biológicos que se han considerado como responsables o participes de estos procesos son diversos, incluyendo moléculas tales como p21, p27, p57, p16, LHX8, y telomerasa entre otros.

Los marcadores de odontogénesis han sido importantes en el estudio de los diversos tipos de lesiones incluidos los tumores odontogénicos. Estos marcadores moleculares son de utilidad para detectar, diferenciar y determinar pronóstico y evolución de una lesión ⁽²⁴⁻²⁵⁾. Dentro de los marcadores mayormente estudiados se encuentran los siguientes:

Amelogenina

La amelogenina (AMEL) es una proteína de matriz de esmalte de bajo peso molecular ubicada en: Xp22.1 y tiene un peso molecular de 24 kDa. Se expresa en el epitelio reducido del esmalte, estrato intermedio y el retículo estrellado del órgano del esmalte. Participa en la organización de los prismas y mineralización del esmalte. En un estudio realizado por Mori M. y col., la expresión de amelogenina fue positiva en ameloblastomas, tumor odontogénico adenomatoide, tumor odontogénico epitelial calcificante, fibroma ameloblástico, ameloblastoma maligno y carcinoma ameloblástico. Los ameloblastos reducidos en el odontoma compuesto mostraron la expresión de amelogenina más intensa ⁽²⁴⁾.

Ameloblastina

La ameloblastina (AMB) es una proteína específica encontrada en los dientes. Esta proteína es formada por los ameloblastos durante la etapa temprana de secreción hasta las etapas tardías de la amelogénesis. Está ubicada en el cromosoma 4q13.3 y pesa 48 kDa. Se cree que su función es la organización de cristales de esmalte y su mineralización cuya expresión ha sido positiva en diversos tipos de tumores odontogénicos. Los ameloblastos reducidos en el odontoma mostraron la expresión de ameloblastina más intensa. Por lo tanto, el uso de este marcador es una herramienta valiosa para segregar otros tipos de lesiones epiteliales que pueden desarrollarse dentro de la región oral y maxilofacial ⁽²⁴⁾.

EDAR

El receptor para la ectodisplasia A, es un receptor miembro de la familia TNF: Es una proteína transmembrana tipo receptor para el ligando soluble ectodisplasia A, y puede activar las vías de muerte celular por medio de factor nuclear-kappa B, JNK y caspasa-independiente. Se localiza en 2q13 con peso de 49 kDa. Es necesario para el desarrollo del cabello, dientes y otros derivados ectodérmicos. Las mutaciones en este gen producen formas autosómicas dominantes y recesivas de displasia ectodérmica hipohidrótica ⁽²⁶⁾.

Durante el desarrollo de los dientes, EDAR se expresa en el centro de señalización del nudo del esmalte, una estructura epitelial transitoria que se encuentra en los gérmenes del diente temprano. La pérdida de EDAR, conduce a defectos en el nudo del esmalte ⁽²⁷⁾.

p21

Este gen codifica un potente inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDKN1A, por sus siglas en inglés cyclin-dependent kinase inhibitor 1A). Ubicada en 6p21.2 y un peso molecular de 21 kDa. La proteína codificada se une e inhibe la actividad de los complejos de quinasa dependientes de ciclina-ciclina-2 o -ciclina-dependiente, y por lo tanto funciona como un regulador de la progresión del ciclo celular en G1. La expresión de este gen está estrechamente controlada por la proteína supresora de tumores p53, a través de la cual esta proteína media p53-dependiente del ciclo celular G1 fase de detención en respuesta a una variedad de estímulos de estrés ⁽²⁸⁾.

Se ha descrito que p21 es expresado en células de nudo de esmalte, implicado en la formación del nudo del esmalte y en la morfogénesis del diente mediante la regulación de la proliferación de células epiteliales ⁽²⁹⁾.

MSX1

Este gen codifica un miembro de la familia de genes homeobox del segmento muscular. Esta localizado en 4p16.2 y pesa 31 kDa. La proteína codificada funciona como un represor transcripcional durante la embriogénesis a través de interacciones con componentes del complejo de transcripción del núcleo y otras homeoproteínas. También puede tener participación en la formación del desarrollo craneofacial, odontogénesis, e inhibición del crecimiento tumoral. Las mutaciones en este gen, que se conocía como homeobox 7, se han asociado con labio fisurado no sindrómico con o sin paladar hendido, síndrome de Witkop, síndrome de Wolf-Hirschorn y hipodoncia dominante autosómica ⁽³⁰⁾.

Mutaciones en este gen se han relacionado a hipodoncia; hasta la fecha, la mayoría de las mutaciones responsables de la agenesia dental se han identificado a MSX1 y PAX9 como los genes que codifican factores de transcripción cruciales durante la odontogénesis ⁽³¹⁾.

MSX2

MSX2 msh homeobox 2, este gen codifica un miembro de la familia de genes homeobox del segmento muscular. Está ubicado en 5q35.2 y pesa 29 kDa. La proteína codificada es un represor transcripcional cuya actividad normal puede establecer un equilibrio entre la supervivencia y la apoptosis de las células derivadas de la cresta neural necesarias para la morfogénesis craneofacial adecuada ⁽³²⁾.

Se expresan en el complejo craneofacial en desarrollo, incluyendo los arcos branquiales, especialmente en las regiones de organogénesis epiteliales-mesenquimales incluyendo los dientes en desarrollo. MSX2 se expresa en subpoblaciones de epitelio y mesénquima, lo que sugiere que puede desempeñar un papel en la regulación de las interacciones epitelio-mesenquimales. Las mutaciones en el gen MSX2 también dan lugar a alteraciones, como ausencias de órganos dentales ⁽³³⁾.

CD34

La proteína codificada por este gen puede jugar un papel en la unión de células madre a la matriz extracelular de médula ósea o a células estromales ⁽³⁴⁾. CD34 es una proteína transmembrana altamente glucosilada codificada por un gen localizado en el cromosoma 1q32.2 y con un peso molecular de 90-120 kDa. Se expresa en células madre hematopoyéticas, fibroblastos fetales y células endoteliales vasculares. Además, esta proteína se expresa en el endotelio vascular de la mucosa nasal, oral, faríngea y laríngea de los fetos ⁽³⁵⁾. CD34 se localiza en el embrión dental en el endotelio de los vasos encontrados en la papila dental durante las semanas 9-10, en la capa externa de la papila dental durante las semanas 12-13 y

13-16, y en la pulpa dental durante las semanas 21-24. Asimismo, se ha demostrado su presencia en el epitelio externo del esmalte ⁽³⁵⁾.

SOX2

La proteína SOX2, también conocida como SRY-box 2 (Sex determining Region Y-box 2), es un factor de transcripción expresado en células madres embrionarias y adultas. Ubicada en el cromosoma 3q26.33 y con un peso de 34 kDa. Ejerce funciones clave en el mantenimiento de la pluripotencia y es uno de los factores utilizados en la reprogramación de células madre pluripotentes inducidas. Recientemente descubrieron que SOX2 marca específicamente las células madre epiteliales en el incisivo de ratón de crecimiento continuo, así como la lámina dental, dando lugar a los dientes de reemplazo. SOX2 se asoció con la formación de dientes supernumerarios en los tumores de tipo odontoma inducida por la activación de la señal Wnt en ratones ⁽³⁶⁾.

PAX9

Este gen es un miembro de la familia de factores de la transcripción de la caja pareada (PAX). Localizado en el cromosoma 14q13.3 con un peso molecular de 35 kDa. PAX9 es necesaria para el desarrollo craneofacial y dental. PAX9 juega un papel importante en la ausencia de terceros molares ⁽³⁷⁾. Las mutaciones en el gen PAX9 podrían influir seriamente en el número, posición y morfología de los dientes en un individuo afectado. PAX9 es activo en la formación de los molares así como de los segundos premolares e incisivos mandibulares. Es esencial para promover la capacidad inductiva del mesénquima del diente y se ha demostrado que tiene una relación funcional con MSX1 durante el desarrollo de los dientes ⁽³⁸⁾.

RUNX2

Este gen es un miembro de la familia de factores de transcripción RUNX. Está ubicado en el cromosoma 6p21.1 con un peso molecular de 55 kDa. Esta proteína es esencial para la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis esquelética y

actúa como un andamio para el ADN y los factores reguladores implicados en la expresión del gen esquelético ⁽³⁹⁾.

El gen RUNX2 es un factor de transcripción maestro del hueso y desempeña un papel en todas las etapas de la formación ósea. Es esencial para el compromiso inicial de las células mesenquimales con el linaje osteoblástico y también controla la proliferación, diferenciación y mantenimiento de estas células. RUNX2 también es esencial para las etapas posteriores de la formación de los dientes. Está íntimamente involucrado en el desarrollo del tejido dental calcificado y ejerce una influencia sobre la proliferación de la lámina dental. Además, RUNX2 regula el proceso de remodelación alveolar esencial para la erupción dental y puede jugar un papel en el mantenimiento del ligamento periodontal ⁽⁴⁰⁾.

Sialoproteína ósea (BSP)

La proteína codificada por este gen es una proteína estructural principal de la matriz ósea. Está localizado en el cromosoma 4q22.1 y tiene un peso molecular de 35 kDa. La BSP es un componente significativo de la matriz extracelular ósea y se ha sugerido que constituye aproximadamente el 8% de todas las proteínas no colágenas que se encuentran en el hueso y el cemento radicular ⁽⁴¹⁾. Tiene un papel muy importante para la formación del esmalte en la diferenciación de los cristales de hidroxiapatita, durante la odontogénesis ayuda a la diferenciación de osteoblastos, osteoclastos, odontoblastos y cementoblastos. Se ha demostrado su expresión en algunos tumores odontogénicos como el ameloblastoma ⁽⁴¹⁾.

Osteopontina (OPN)

La proteína codificada por este gen está implicada en la unión de osteoclastos y osteoblastos a la matriz ósea mineralizada. Está localizada en el cromosoma 4q22.1 y tiene un peso molecular de 66 kDa. La proteína codificada se secreta y se une a la hidroxiapatita con alta afinidad ⁽⁴²⁾. OPN se identificó de forma independiente, junto con la sialoproteína ósea (BSP), como una sialoproteína con mayor presencia en la matriz extracelular de hueso. La osteopontina es una proteína de la matriz extracelular que se encuentra casi exclusivamente en los tejidos conjuntivos

mineralizados y está asociada con la diferenciación y mineralización de los osteoblastos, se encuentra expresada durante el estadio secretorio en odontoblastos en etapas tempranas de odontogénesis, predentina y dentina y durante el desarrollo de la raíz se expresa en odontoblastos, predentina, dentina, cemento, cementoblastos y el ligamento periodontal ⁽⁴³⁾.

BARX1

Este gen codifica un miembro de la subclase Bar de los factores de transcripción homeobox. Está ubicada en el cromosoma 9q22.32 y tiene un peso molecular de 24 kDa. Se sugiere que esta proteína codificada puede desempeñar un papel en el desarrollo de los dientes y el mesénquima craneofacial del origen de la cresta neural ⁽⁴⁴⁾. Durante la odontogénesis temprana se expresa en las zonas de desarrollo de molares.

BARX1 se expresa fuertemente en áreas del mesénquima de cabeza y cuello y en la pared del estómago en desarrollo. BARX1 se expresa en el mesénquima del primer y segundo arco branquial, durante las etapas avanzadas del desarrollo, el gen se expresa exclusivamente en el mesénquima de los primordios molares ⁽⁴⁴⁾. En la Fig. 9 se observa el papel de los distintos marcadores durante el proceso normal de la odontogénesis.

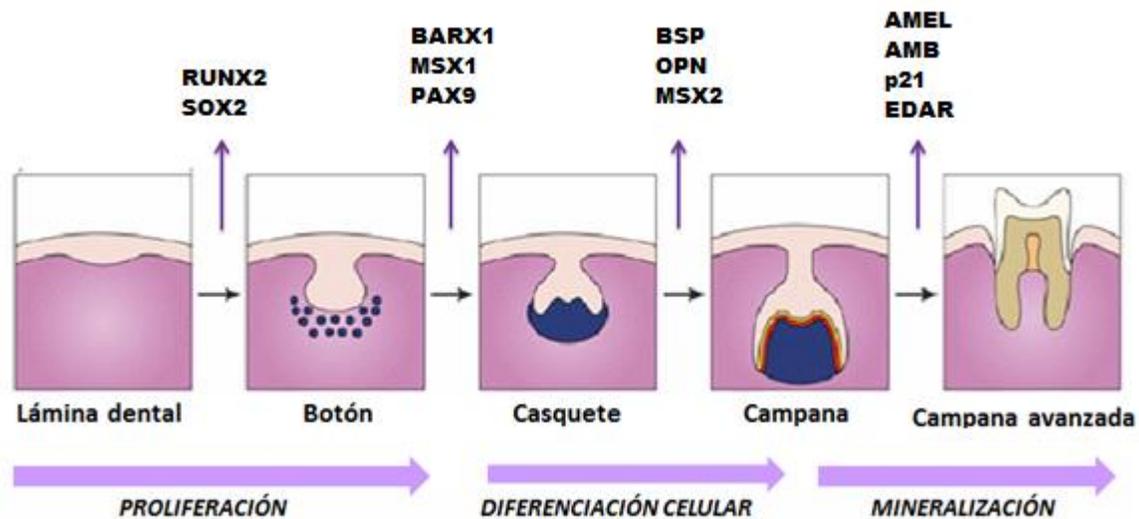


Fig. 9.- Proceso de odontogénesis (fuente directa Fuente directa Laboratorio de Patología Bucal, DEPeI, FO-UNAM.).

5.- Planteamiento del problema

En la actualidad no se conoce la causa y/o factores involucrados en el desarrollo de los odontomas que explique el porque se desarrollan dos subtipos OdCm Y OdCj aunado a que se desconocen los factores involucrados en esta diferenciación.

Una limitante en la investigación de los tumores odontogénicos es la escasez de modelos de estudios, ya que la mayoría se desarrollan en modelos animales que difícilmente pueden extrapolarse a un modelo de estudio humano o bien se determina alguna característica mediante su análisis del espécimen extraído. Específicamente en el estudio del odontoma no se han realizado estudios comparativos entre los diferentes subtipos que puedan aclarar la interrogante planteada. Estudiar al odontoma a nivel histológico y molecular representa captar un instante fijo de un proceso que es continuo y cambiante.

Si encontramos diferencias significativas se podría identificar los factores relacionados con la diferenciación morfológica de estas lesiones, es decir, estaríamos más cerca de entender el desarrollo su formación así como el porque de las diferencias de los dos tipos, aportando más información al estudio de otros tumores odontogénicos.

6.- Pregunta de investigación

En consideración a los marcadores propuestos por su actividad en el proceso de la odontogénesis: ¿Qué marcadores moleculares de tipo ectodérmico y de tipo ectomesenquimal, tendrán una expresión diferencial en las líneas celulares cultivadas de los dos tipos de odontoma y la línea celular de fibroblastos?

7.- Justificación

El conocimiento de los tumores odontogénicos es de importancia fundamental en Odontología y especialmente en Patología Bucal. El estudio de estas lesiones con los avances científicos y tecnológicos permite nuevos enfoques para entender mejor su histogénesis y comportamiento biológico. El odontoma es un hamartoma que su estudio molecular puede proporcionar información de su tumorigénesis y, en un futuro poder desarrollar biomarcadores entre otros avances. El análisis in vitro de esta lesión ha demostrado ser una alternativa factible y válida para explicar las causas por las cuales esta lesión forma un tipo con tejidos ordenados en denticulos y en el otro los tejidos se forman desordenadamente.

Los marcadores que usamos en este estudio fueron seleccionados considerando su función en el proceso de la odontogénesis, algunos estudios los han reportado como blancos importantes que pueden ser representativos para comprender el desarrollo de esta lesión.

El uso de muestras obtenidas directamente de pacientes así como el uso de técnicas de cultivo, nos permitirán hacer una evaluación más completa de los marcadores propuestos, emulando parcialmente lo que podría ocurrir durante el desarrollo de un odontoma in vivo.

Es la primera vez que se hace un estudio comparativo entre ambos subtipos, por lo cual consideramos que este diseño nos acercara un poco más en el entendimiento del proceso de patogénesis de esta lesión. Enfatizando que el poder comprender la histogénesis de los tumores odontogénicos es el punto de partida para poder establecer teorías y procesos involucrados en su desarrollo y transformación maligna.

8.- Hipótesis

H₁.- La línea celular de OdCm tendrá una mayor expresión de marcadores tipo ectomesenquimal que la línea de OdCj.

9.- Objetivos

9.1.- Objetivo general

Obtención y caracterización de la expresión de marcadores ectodérmicos y mesodérmicos odontogénicos en células primarias estables de OdCm y OdCj.

9.2.- Objetivos específicos

- Obtener las líneas celulares primarias de OdCm y OdCj, así como su posterior estabilización.
- Comparar y analizar la expresión de CD34, SOX2, AMEL, AMB, BSP, OPN, p21, MSX2, EDAR, BARX1, MSX1, PAX9 y RUNX2 en células primarias de OdCj y OdCm a través de RT-PCR así como un posterior análisis estadístico.

10.- Variables

10.1.- Variables independientes

- Línea celular primaria de OdCm.
- Línea celular primaria de OdCj.
- Línea celular primaria de fibroblastos.

10.2.- Variable dependiente

- El nivel de expresión de: CD34, SOX2, AMEL, AMB, p21, EDAR, MSX1, MSX2, PAX9, RUNX2, BSP, OPN, BARX1.

11.- Operacionalización de las variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de medición	Categoría
Línea celular primaria de OdCm Variable independiente	Son aquellas que son aisladas inmediatamente después de la obtención de la muestra y suelen tener una duración limitada de cultivo.	Obtención por medio de cultivo celular y estabilización de la línea celular.	Proporción de crecimiento 0-100%	Cualitativo nominal
Línea celular primaria de OdCj Variable independiente	Son aquellas que son aisladas inmediatamente después de la obtención de la muestra y suelen tener una duración limitada de cultivo.	Obtención por medio de cultivo celular y estabilización de la línea celular.	Proporción de crecimiento 0-100%	Cualitativo nominal
Línea celular primaria de fibroblastos de ligamento periodontal Variable independiente	Son aquellas que son aisladas inmediatamente después de la obtención de la muestra y suelen tener una duración limitada de cultivo.	Obtención por medio de cultivo celular y estabilización de la línea celular.	Proporción de crecimiento 0-100%	Cualitativo nominal
CD34 Variable dependiente	Proteína transmembranal expresada en células hematopoyéticas.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (número de pixeles)	Cuantitativo continua
SOX2 Variable dependiente	Proteína encontrada en la autorregulación de células madre.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (pixeles)	Cuantitativo continua
Amelogenina (AMEL) Variable dependiente	Proteína producida por los ameloblastos durante el desarrollo del esmalte dental.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (pixeles)	Cuantitativo continua
Ameloblastina (AMB) Variable dependiente	Glicoproteína que regula la diferenciación ameloblástica.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (pixeles)	Cuantitativo continua
Sialoproteína ósea (BSP) Variable dependiente	Fosfoproteína ósea de los tejidos mineralizados, se relaciona a los cristales de hidroxiapatita.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (pixeles)	Cuantitativo continua

Osteopontina (OPN) Variable dependiente	Proteína de la matriz extracelular encargada del metabolismo óseo.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Cuantitativo continua
PAX9 Variable dependiente	Proteína codificada por el gen pax9 necesaria para el desarrollo craneofacial.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Cuantitativo continua
EDAR Variable dependiente	Proteína transmembrana que codifica a miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Cuantitativo continua
RUNX2 Variable dependiente	Este gen es un miembro de la familia de factores de transcripción RUNX. Esta proteína es esencial para la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis esquelética.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Cuantitativo continua
BARX1 Variable dependiente	Este gen codifica un miembro de la subclase Bar de los factores de transcripción homeobox, desempeña un papel en el desarrollo de los dientes y el mesénquima craneofacial.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Cuantitativo continua
MSX1 Variable dependiente	Proteína que trabaja como represor transcripcional, codifica un miembro de la familia de genes homeobox del segmento muscular.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Cuantitativo continua
MSX2 Variable dependiente	Este gen codifica un miembro de la familia de genes homeobox del segmento muscular. La proteína codificada es un represor transcripcional cuya actividad normal puede establecer un equilibrio entre la supervivencia y la apoptosis de las células derivadas de la cresta neural.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (píxeles)	Cuantitativo continua
p21 Variable dependiente	Este gen codifica un potente inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, funciona como un regulador de la progresión del ciclo celular en G1.	Extracción de ácidos nucleicos por trizol, RT-PCR para la amplificación de los marcadores moleculares, electroforesis, medición y normalización con el uso de un control y análisis mediante el sistema de fotodocumentación de geles.	Unidades de densidad óptica (Píxeles).	Cuantitativo Continua

Tabla 1.- Operacionalización de las variables.

12.- Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión

- Líneas celulares primarias estables derivadas de OdCj y compuesto. Con una confluencia mayor o igual a 70%.

Exclusión

- Cultivos celulares con una confluencia menor del 70%.

Eliminación

- Cultivos celulares contaminados.

13.- Recursos

Este proyecto fue financiado mediante el programa PAPIIT IN223414.

14.- Equipo e infraestructura

Los ensayos y experimentos fueron realizados en el Departamento de Patología y Medicina Bucal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología de la UNAM con los siguientes equipos:

- Incubadora (Queue, Stabil Therm Modelo: QWJ300TABB, EU).
- Baño María (Thermo scientific Modelo 2242 EU).
- Campana de flujo laminar (Baker, Edge Gard, Maine, EU).
- Microscopio invertido (ZEISS Modelo: 37881, EU).
- Agitador Orbital (Sea star Modelo: Sea star).
- Auto Clave (EVAR Modelo: 0223, MEX).
- Báscula analítica (Adam Modelo: 17250 EU).
- Ultracongelador (Thermo Scientific 88000 series, Modelo: 88300A, US).

- Refrigerador (Cool lab Modelo 3767 Hertz, EU).
- Refrigerador (Tor Rey, Modelo: MEX).
- Centrífuga SORVALL ST8 (Thermo Fisher Scientific, Modelo: 7200130900363, China).
- Centrífuga SORVALL LEGEND MICRO 17R (Thermo Scientific, Modelo: 41511463, Alemania).
- Unidad de filtración (Thermo Scientific, Smart2Pure 3 UV/UF, Hungría).
- Digital block heater (Select Bio Products, Modelo: SBD110, Taiwán).
- Termociclador (Axygen Maxigene II, Modelo: 1402025, EU).
- Sistema de documentación de geles (Axygen, Modelo: Axigen Gel Documentation System-BL, GD-1000, EU).
- Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Laptop Acer Aspire V-5 431-26-39.

15.- Recursos humanos

- Especialistas en patología bucal.
- Especialistas en cirugía maxilofacial.
- Asesor de cultivo celular.
- Asesor de técnica de PCR.
- Asesor en el sistema de fotodocumentación de geles.

16.- Materiales

- Equipo de filtración al vacío (Corning 500ml Bottle Top Filter, EU).
- Filtro (Corning Incorporate, 25 mm Syring Filter 431222 Alemania).
- Hematocitómetro (Sigma – Aldrich, Bright-Line E.U).
- Cajas Petri 100mm.
- Pipetas 10 ml, 5 ml, 1ml (Exacta Cruz TM Technology, INC.CHINA).
- Micropipetas 1µl,- 10µl, 10µl-100µl, 100µl- 1000µl (Exacta Cruz, Technology).
- Placas de cultivo celular (Corning incorporate, EU).
- Puntas para micropipeta de 10µl-100µl, 100µl- 1000µl (Bio Centrix, EU).
- Tubos 15 ml (UltraCruz, Santa Cruz biotechnology).
- Tubos 50 ml (UltraCruz, Santa Cruz Technology).
- Tubos de criopreservación.
- Tubos Ependorf.
- Probetas graduadas.
- Vasos de precipitado.
- Solución de albúmina al 2%.
- Alcohol al 70%.
- Azul De Tripán.
- Medio de cultivo DMEM with 4.5g/L Glucose y L-Glutamine, without Sodium Pyruvate (sc -224478 Santa Cruz Biotechnology).
- MTT (Vibrant MTT Molecular Porbes, Invitrogen, EU).
- Suero Fetal bovino 500ml (Gibco Life technologies LOT: 1606662 EU).
- Solución de PBS 1X, 10X.
- Tripsina 0.25%–EDTA 1X (Gibco Life technologies LOT: 1391607 EU).
- Tritón al 20%.
- Kit Promega Access (Madisson, USA. Cat. A1250).
- Agua DEPC (MiliQ AM9906 USA).
- Marcador de peso molecular (Blue/Orange 6x Loading Dye 84147 Promega).
- Solución de Bromuro de Etidio, molecular 10 ml.
- Agarosa SIGMA, A9539-100g.
- Primers Eurofins genomics.

17.- Metodología

17.1.- Muestras

Se obtuvieron cuatro muestras de OdCm y tres de OdCj, provenientes de la Clínica de Medicina Bucal de la DEPEl de la FO-UNAM, en el periodo comprendido de enero de 2015 a diciembre de 2016.

Las muestras fueron removidas mediante cirugía, se hizo la disección de tejidos duros y blandos, conservando dos fragmentos de tejido blando preservando una parte en formol al 10% para su posterior análisis histológico y diagnóstico definitivo. El otro fragmento fue lavado en solución PBS-antibiótico/antimicótico (penicilina 100 unidades/ml, estreptomina 100 µg/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml) durante 10 minutos, se microdisecionaron en pequeños fragmentos de 1-5 mm, después se colocó en tripsina al 0.25% y colagenasa IV en tubos de 15 ml estériles. Después de media hora se colocaron 9 ml de DMEM SFB 10%, antibiótico-antimicótico para centrifugar a 1800 rpm por 3 minutos. El botón o pellet fue resuspendido en 10 ml de SFB 10% antibiótico/antimicótico para posteriormente ser colocado en una caja de cultivo de 75cm² a 37°C con 5% CO₂ para obtener el cultivo celular primario durante una semana, las células se adhirieron de manera correcta a la superficie de la caja formando un cultivo en monocapa.

Adicionalmente se utilizaron seis muestras de odontoma (tres complejos y tres compuestos) incluidas en parafina obtenidas en la Clínica de Medicina Bucal para realizar experimentos complementarios de validación.

17.2.- Línea celular de fibroblastos

Se utilizó una línea de fibroblastos del ligamento periodontal para usarse como grupo control para los ensayos in vitro, estos fueron donados por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, DEPEl, Facultad de Odontología.

17.3.- Cuantificación y dilución límite

Después de una semana de cultivo se retiraron los fragmentos de tejido blando remanentes y se cambió el medio de cultivo por fresco. Las células se separaron por medio de tripsina 3ml de la caja de cultivo y se neutralizo 7ml de medio de cultivo DMEM F12/SFB al 10%. Se tomó 10 μ l de la muestra y 90 μ l de azul tripano para su cuantificación usando un hematocitometro (cámara de Neubauer). Se colocó 10 μ l a cada lado de la cámara donde se realizó el conteo de los cuatro cuadrantes, obteniendo el promedio celular por ml de disolución.

Posterior a esto se realizó el ensayo de dilución límite, donde se estandarizó nuestra solución madre a una cantidad 1×10^6 células a través de diluciones seriadas y se obtuvo una dilución final de 1×10^{-1} células, realizándolo por triplicado ajustando un volumen final de 100 μ l por pozo en una caja de 96 pocillos. Después de una semana de crecimiento, se seleccionó la clona capaz de proliferar subcultivando a una caja de 24 pozos y posteriormente a caja de 25 cm^2 siendo considerado este el tercer subcultivo; a partir de este momento las células fueron analizables. En los ensayos subsecuentes se utilizaron las células del tercer al décimo subcultivo.

17.4.- Extracción de ARN

Al obtener una confluencia mayor al 70% de las diferentes líneas (OdCm - OdCj -fibroblastos) se procedió a la extracción del total de ARN, mediante la técnica de trizol (Ambiom, 15596, CA) agregando 2.5 ml del reactivo. Se usó 0.5 ml de cloroformo (Fluka 25668, SWZ), agitando la mezcla para homogenizar, se esperó tres minutos, se recuperó el contenido en tubos estériles de 15 ml. Se dejó incubar a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ (Sorval Legend Micro 17R centrifuge Thermo Scientific), se recuperó la fase incolora colocando isopropanol al 100%. Se hizo una segunda centrifugación a 12,000 rpm por 10 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se lavó el pellet con etanol al 75%, se hizo una última

centrifugación a 7,500 rpm por 15 min a 4 C°, se dejó secar el pellet y por último se resuspendió en agua DEPC (MiliQ AM9906 USA). Se evaluó la cantidad y calidad de ARN usando un Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific), las muestras cumplieron con el criterio de calidad (269/280 >1.8).

Para las seis muestras de odontoma (3 compuestos y 3 complejos) incluidos en parafina se utilizó el kit ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System de Promega (Promega Z1002, Madison, WI). Para la recuperación del ARN, se agregó 500 µl de aceite mineral a las muestras y se incubó en un termobloque a 80° durante un minuto hasta que se derritió la parafina, posteriormente se agitó en vortex.

A cada muestra se agregó 100 µl del buffer de lisis y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 segundos. Se hizo la separación en dos fases, una oleosa y una acuosa (azul). Posteriormente agregamos 10 µl de proteinasa K directamente a la fase acuosa pipeteando suavemente. Se dejó incubar durante 15 minutos a 56 °C y después a 80 °C durante una hora. Una vez terminado el tiempo colocamos las muestras en hielo durante un minuto y después se dejó 2 minutos a temperatura ambiente.

Una vez pasados los dos minutos, se colocaron 30 µl de DNasa mezclándola directamente con la fase inferior mediante pipeteado. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se prosiguió con la unión de ácidos nucleicos, colocando 325 µl de buffer BL, después agregamos 200 µl de isopropanol y agitamos suavemente. Centrifugamos a 10,000 rpm durante 15 segundos, separando en dos fases. Para cada una de las muestras procesada, utilizamos un tubo de recolección/columna de unión. Transferimos la fase acuosa (inferior) a la columna de recolección, centrifugando a 10,000 rpm por 30 segundos, eliminando el remanente para proseguir con el lavado de la columna y la elución.

Se agregó 500 µl de solución de lavado 1X con etanol a la columna de unión, tapamos y centrifugamos a 10,000 rpm durante 30 segundos eliminando el remanente, esto fue realizado dos veces. Posteriormente se centrifugó a 16,000 rpm por tres minutos para secar la columna. Transferimos la columna de unión a un tubo

de elución y agregamos 50 µl de agua libre de nucleasas, centrifugando a 16,000 rpm por un minuto. Su cuantificación fue realizada como ya fue descrito anteriormente.

17.5.- Amplificación

Para la amplificación del cDNA, se utilizaron 400 ng del total del ARN obtenidos de las líneas celulares y 40 ng de ARN obtenido de los odontomas incluidos en parafina. Se usaron las primers de la marca Eurofins Genomics para los marcadores: CD34, SOX2, amelogenina (AMEL), ameloblastina (AMB), p21, EDAR, MSX1, MSX2, PAX9, RUNX2, sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), BARX1 y GAPDH como control (Tabla 2).

Tabla 2. RT-PCR set de primers

Marcador	Secuencia de aminoácidos	Tamaño del producto (bp) y número de registro
BSP	up 5'-GAACCACTTCCCCACCTTTT-3' ds:5'TCTGACCATCATAGCCATCG-3'	248 NM 004967.3
OPN	up 5'-CCAAGTAAGTCCAACGAAAG-3', ds, 5'-GGTGATGTCCTCGTCTGTA-3',	162 NM 000582.2
AMEL	us 5'-GGCTGCACCACCAAATCATCC-3' ds 5'- CCGCTTGGTCTTGTCTGTTCG-3'	247 NM 001142.2
SOX2	us 5-AGAACCCCAAGATGCACAAC-3' ds, 5'-ATGTAGGTCTGCGAGCTGGT-3	224 NM 003106.3
CD34	us 5'- GGAATTCGAGGCCCAACAAACATCAC-3' ds, 5'-GGAATTCGCAGATCCCTGAGTCAATT-3	206 NM 001025109.1
AMBN	us 5'-AGAGGCCAAGAGAACATGAAACT-3' ds 5'-CTGGAACATGGCTCCATAG-3'	172 NM 016519.5
p21	us 5'-GACACCACTGGAGGGTGACT-3' ds 5'-CCCTAGGCTGTGCTCACTTC-3'	174 NM 000389.4
EDAR	us 5'-CTGGGACTGAAGCTGACCTC-3' ds 5'-CAGAGGGCTTTGTCTTCAGG-3'	224 NM 022336.3
MSX1	us 5'-TCCTCAAGCTGCCAGAAGAT-3' ds 5'-TACTGCTTCTGGCGAACTT-3'	190 NM 002448.3
MSX2	us 5'-TAGACCTGTGCTTCCCATCC-3' ds 5'-GAGGGAGAGGAAACCCTTTG-3'	173 NM 002449.4
PAX9	us 5'-TGCAACGTCCTTGTCTCTG-3' ds 5'-GGCTGAGATTGCGAACACA-3'	209 NM 006194.3
RUNX2	us 5'-TTTGCCTGGGTTCATGTGTT-3' ds 5'-TGGCTGCATTGAAAAGACTG-3'	230 NM 001015051.3
BARX1	us 5'-AACGCTTCGAGAAAGCCAGAAG-3' ds 5'-TTTTGGGTCTGTGCCTTCC-3'	241 NM 021570.3
GAPDH	us 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' ds 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	231 NM 001289745.1

ds: downstream; us: upstream. BSP, sialoproteína ósea; OPN, osteopontina; AMEL, amelogenina; SOX2, SRY-box 2; AMBN, ameloblastina; p21, inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A; EDAR, receptor de ectodisplasina A; MSX1, msh homeobox 1; MSX2, msh homeobox 2; PAX9, paired box 9; RUNX2, runt related transcription factor 2; BARX1, BARX homeobox 1; GAPDH, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

Tabla 2. - Set de Primers RT-PCR

Se utilizó el kit Promega Access RT-PCR system (Madisson, USA. Cat. A1250) siguiendo las instrucciones del fabricante. Nuestra mezcla de amplificación se constituyó de agua libre de nucleasas, AMV/Tfl 5X buffer de reacción, Mix dNTP, primer downstream, primer upstream, MgSO₄, transcriptasa reversa AMV, Tfl DNA Polimerasa y muestra de ARN. Para la amplificación se realizó 1 ciclo de 45 minutos

a 45 °C (transcripción reversa), 1 ciclo de 2 minutos a 94 °C (inactivación de AMV RT y desnaturalización del primer) 40 ciclos de desnaturalización (94 °C por 30 segundos), alineamiento (60 °C por 1 minuto) y extensión (68 °C por 2 minutos), y un ciclo de 7 minutos a 68 °C (extensión final). Los productos amplificados se colocaron en geles de agarosa a una concentración de 4% en buffer TBE 1X. Se corrieron en una cámara de electroforesis (Select Bioproducts) a una corriente constante de 80 v durante una hora. Se colocó un marcador de peso molecular (Blue/Orange 6x Loading Dye 84147 Promega Access) y bromuro de etidio para poder hacer la visualización del producto. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Cada gel se analizó en el sistema de fotodocumentación (Axygen gel Fotodocumentation System) con luz UV a 302nm. La cuantificación de la densidad de pixeles se realizó a través del software GelCuantNet (Ver. 1.82, BiochemLabSolutions.com).

Usamos el mismo procedimiento de amplificación para las muestras de OdCm y OdCj incluidas en parafina.

17.6.- Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se hizo una base de datos en el programa Excel. Se obtuvo la media y desviación estándar de las unidades de densidad óptica para cada marcador, se realizó normalización del nivel de expresión empleando GADPH. Posteriormente se efectuó un estudio de análisis comparativo entre las tres líneas celulares de estudio usando la prueba Kruskal Wallis considerando una $p < 0.05$ como significativa, con el programa IBM SPSS Statistics 22 (Armonk, NY).

17.7 Consideraciones bioéticas

Este estudio no representa riesgo alguno ya que se trabajó con las muestras obtenidas de los pacientes empleando el consentimiento informado de la Clínica de Medicina Bucal y Cirugía Maxilofacial.

18.- Resultados

18.1.- Líneas celulares y odontomas incluidos en parafina

Se obtuvieron cuatro muestras de OdCm, tres muestras de OdCj y dos líneas celulares de fibroblastos gingivales (Tabla. 3). La mayoría de nuestras muestras provinieron de pacientes femeninos (5 muestras) que masculinos (2 muestras). Se realizó la medición de la cantidad de ARN total de cada línea celular (Tabla 3).

Edad	Género	Subtipo	Zona anatómica	Cantidad de ARN total
9	Femenino	Compuesto	Mandíbula	410.7 ng/ml
11	Masculino	Compuesto	Mandíbula	362 ng/ml
14	Femenino	Compuesto	Maxilar	309 ng/ml
34	Femenino	Compuesto	Maxilar	345.4 ng/ml
16	Femenino	Complejo	Maxilar	346 ng/ml
31	Masculino	Complejo	Maxilar	332 ng/ml
42	Femenino	Complejo	Mandíbula	345 ng/ml
Fibroblastos ligamento periodontal				353.2 ng/ml
Donados por el Dr. Marco Álvarez Pérez				
Fibroblastos ligamento periodontal				511.9 ng/ml

Tabla 3.- Características clínicas del odontoma para cultivo primario.

Edad	Género	Subtipo	Zona anatómica	Cantidad de ARN
36	Femenino	Compuesto	Maxilar	31.5 ng/ml
33	Femenino	Compuesto	Mandibular	47.1 ng/ml
19	Femenino	Compuesto	Maxilar	24.8 ng/ml
27	Femenino	Complejo	Maxilar	64 ng/ml
8	Masculino	Complejo	Mandibular	14.5 ng/ml
17	Masculino	Complejo	Maxilar	13.7 ng/ml

Tabla 4.- Características clínicas de los odontomas incluidos en parafina.

Línea celular	Muestra	AMEL	AMB	BSP	OPN	PAX9	EDAR	RUNX2	BARX1	MSX1	MSX2	SOX2	P21	CD34
OdCm	Muestra 1	1.54	0.33	1.72	0.11	6.2	1.03	1.27	1.03	1.7	1.76	1.76	1.63	0.13
	Muestra 2	2.13	0.65	2.8	0.2	2.39	1.76	0.83	0.75	0.34	0.02	0.34	2.55	0.82
	Muestra 3	2.04	1	0.56	0	4.93	0.37	0.52	0.83	0.67	1.99	4.09	0.78	0.42
	Muestra 4	0.39	0.67	2.21	0	5.74	1.36	0.43	0.17	0.41	0	1.14	0.76	0.41
	Promedio	1.52	0.66	1.82	0.07	4.81	1.13	0.76	0.43	0.61	0.92	1.83	1.43	0.44
	Desvest	0.79	0.27	0.95	0.09	1.69	0.58	0.37	0.41	0.31	1.06	1.61	0.84	0.28
	Mediana	1.79	0.66	1.96	0.05	5.33	1.19	0.67	0.79	0.54	0.89	1.45	1.20	0.41
OdCj	Muestra 1	0.49	0	2.75	0.4	0.18	0.04	2.55	0	0.5	0.03	0.29	0.44	0.63
	Muestra 2	0.78	0.67	0.11	3.06	6.37	1.1	1.05	0.56	0.56	0.13	6.48	2.07	1.08
	Muestra 3	0.95	1.25	0.13	0.49	0.19	1	0.12	0.35	0.57	0.21	0.48	1.62	0.41
	Promedio	0.74	0.64	0.99	1.31	2.24	0.71	1.24	0.30	0.54	0.12	2.41	1.37	0.70
	Desvest	0.23	0.62	1.51	1.51	3.57	0.58	1.22	0.28	0.03	0.09	3.52	0.84	0.34
	Mediana	0.78	0.67	0.13	0.49	0.19	1.00	1.05	0.35	0.56	0.13	0.48	1.62	0.63
	LPD	Muestra 1	0.41	1.13	2.44	0	4.61	0.77	1.23	0.81	0.63	0.25	4.42	0.95
Muestra 2	0.45	0.87	2.58	0	4.47	0.84	1.02	0.72	0.44	0.26	3.75	0.77	2.25	
Muestra 3	0.61	1	3.86	0	4.03	0.58	1.07	0.6	0.74	0.18	3.44	0.84	2.02	
Promedio	0.49	1	2.96	0	4.37	0.73	1.10	0.71	0.60	0.23	3.87	0.85	2.32	
Desvest	0.10	0.13	0.78	0	0.30	0.13	0.10	0.10	0.15	0.04	0.50	0.09	0.34	
Mediana	0.61	0.87	2.58	0.00	4.03	0.84	1.05	0.60	0.56	0.18	3.44	0.84	2.02	

Tabla 5.- Tabla de datos normalizados con GAPDH, línea celular de odontoma compuesto (OdCm), línea celular de odontoma complejo (OdCj) y línea celular de fibroblastos (LPD).

La expresión de AMEL fue mayor en la línea celular OdCm en comparación con OdCj (Fig. 10), no se observó ninguna diferencia significativa. La expresión de AMB fue similar para ambas líneas celulares, no obstante fue inferior comparado a células LPD. La expresión de sialoproteína ósea fue mayor en OdCm, sin embargo, ambas líneas de odontoma fueron inferiores comparadas a células LPD. Para OPN, la expresión fue significativamente mayor en células OdCj ($p=0.028$); en células LPD no se observó expresión. PAX9 fue mayor en células OdCm, guardando similitud con células LPD. EDAR fue levemente mayor en células OdCm. Para RUNX2 la

expresión fue mayor en células OdCj, seguido por células LPD. En BARX1 para ambas líneas celulares de odontoma la expresión fue similar, no obstante fue menor a la presentada por células LPD. Para MSX1 se observó expresión levemente superior en células OdCm, no obstante para MSX2 se observó expresión predominante para células OdCm. Respecto a SOX2 su expresión fue mayor para células OdCj, comparado a OdCm, sin embargo las células LPD predominaron en la expresión para este marcador. La expresión de p21 fue levemente superior en OdCm. CD34 presentó mayor expresión en células OdCj comparado a OdCm, no obstante las células LPD presentaron la mayor expresión estadísticamente significativa ($p=0.046$) (Fig. 11).

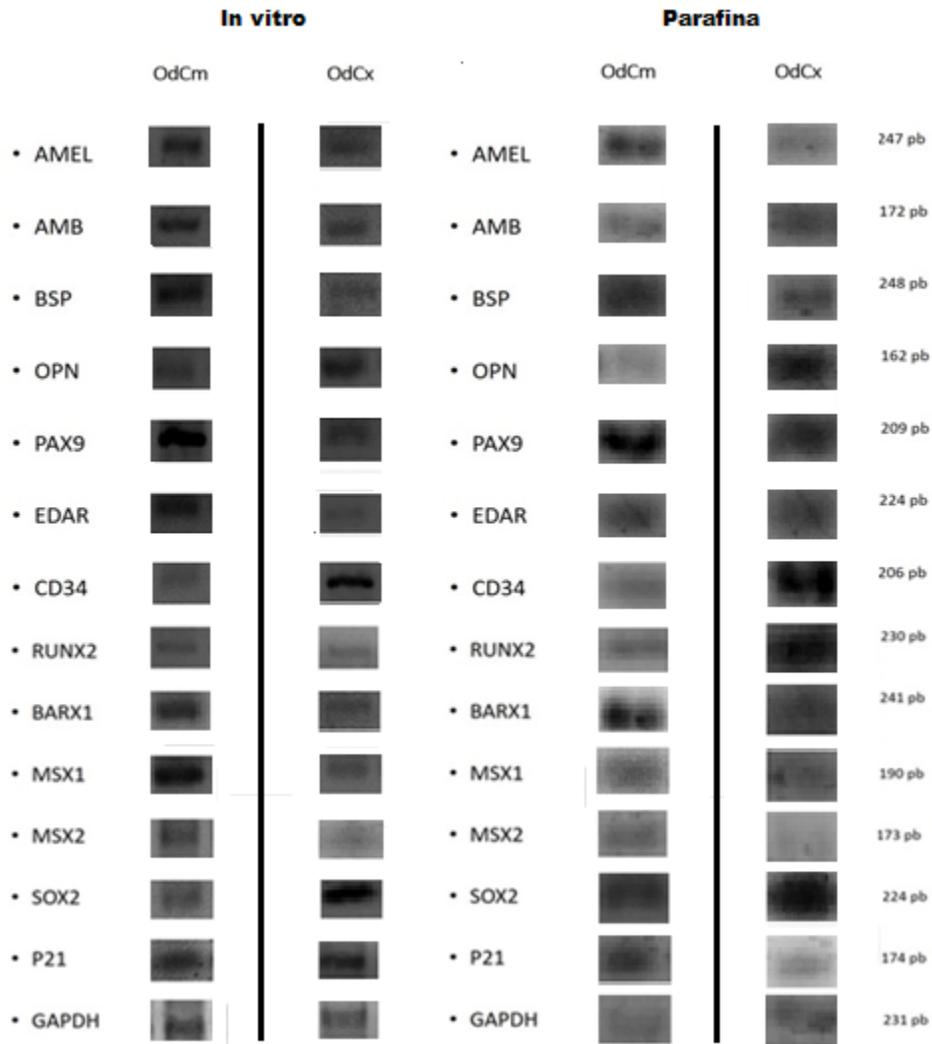


Fig. 10.- Nivel de expresión de marcadores ectomesenquimales y ectodérmicos en líneas celulares de odontoma compuesto y complejo en experimento in vitro y de odontomas incluidos en parafina.

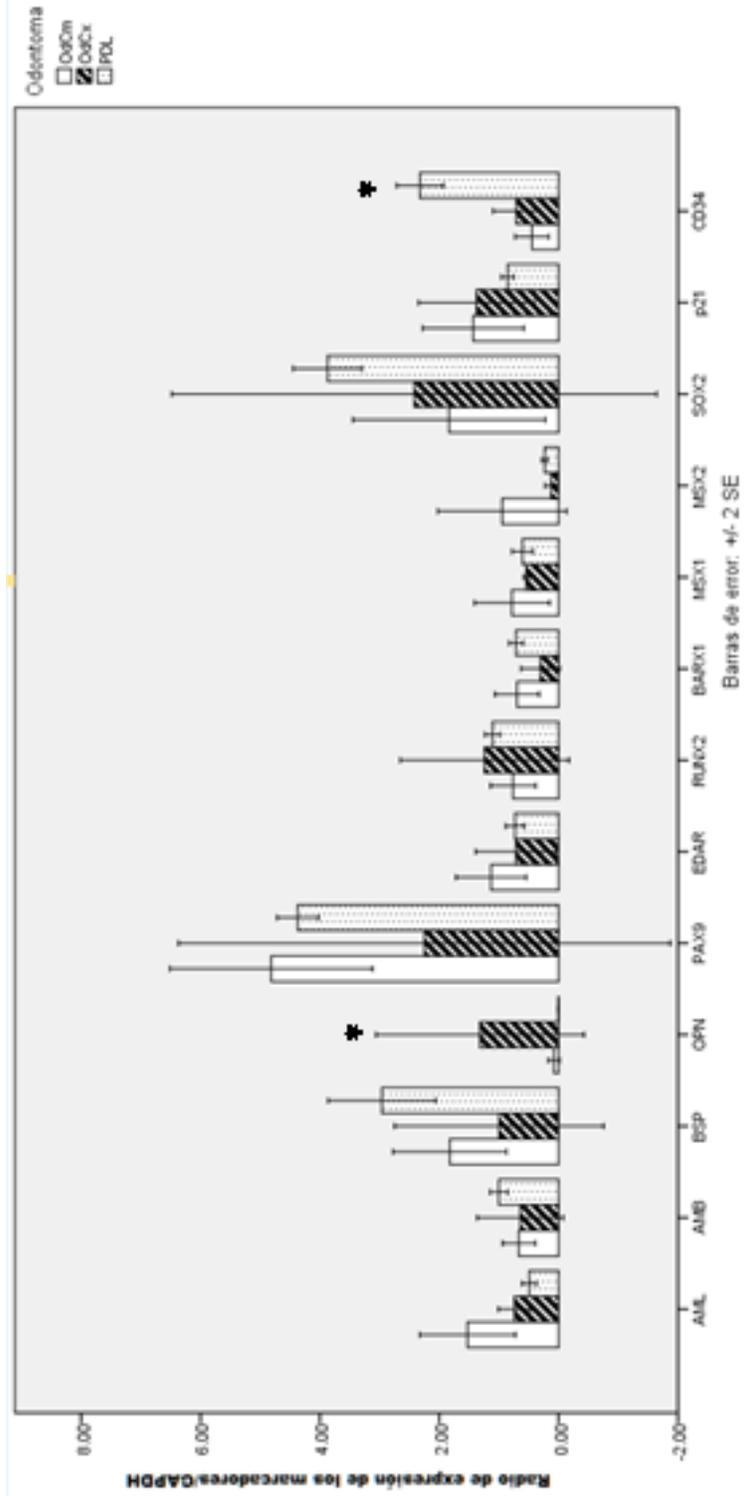


Fig. 11.- Análisis comparativo entre las tres líneas celulares. *CD34 (p=0.046), *OPN (p=0.028), marcadores con diferencias estadísticamente significativas.

18.2.- Experimento de validación

Se realizaron experimentos de validación para sustentar los resultados. Usando diferentes muestras de odontoma provenientes del Servicio de Diagnóstico del Departamento de Patología y Medicina Bucal Oral de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Odontología. Las muestras fueron especímenes de odontoma incluidos en parafina las cuales se sometieron a un proceso de recuperación y medición de la calidad del ARN (Tabla 4).

Los resultados de este experimento no demostraron diferencias significativas estadísticas en cuanto a los niveles de expresión de cada marcador se realizó la misma prueba estadística Kruskal Wallis ($p=0.05$) en SPSS (Tabla 6). La mayoría de los niveles de expresión entre cada marcador y la línea celular de odontomas coincidieron con los experimentos anteriormente realizados (Fig. 12).

Tipo de odontoma		AMEL	AMB	BSP	OPN	PAX9	EDAR	RUNX2	BARX1	MSX1	MSX2	SOX2	P21	CD34
Complejo	Prom	0.0011	0.0003	0.0061	0.1074	0.29078	0.9056	0.9138	0.4453	0.0013	0.0006	0.4279	0.0005	0.4005
	Desvest	0.0002	0.0001	0.0041	0.02874	0.251	0.0509	0.48	0.3397	0.0001	0.0002	0.097	0.0001	0.096
	Mediana	0.00	0.00	0.00	0.10	0.23	0.92	0.99	0.39	0.00	0.00	0.39	0.00	0.40
Compuesto	Prom	0.4209	0.0001	0.0097	0.03857	0.051	0.7668	0.1261	0.0171	0.1355	0.0457	0.3122	0.1193	0.0875
	Desvest	0.1462	0.021	0.0022	0.0195	0.009	0.1544	0.0726	0.0065	0.0492	0.0054	0.4778	0.1193	0.0307
	Mediana	0.42	0.10	0.00	0.03	0.05	0.83	0.09	0.18	0.15	0.04	0.09	0.12	0.10

Tabla 6.- Tabla de datos normalizados con GAPDH, línea celular de odontoma compuesto (OdCm), línea celular de odontoma complejo (OdCj) incluidos en parafina.

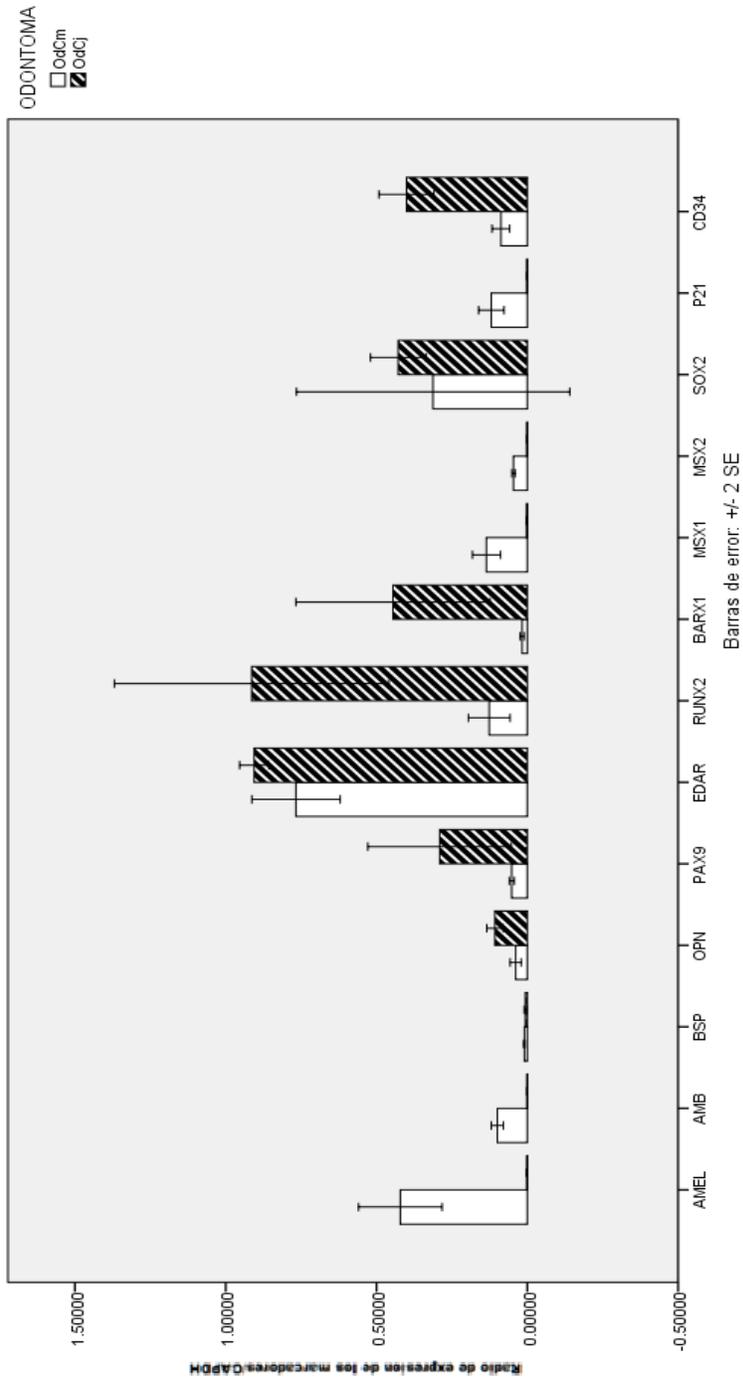


Fig. 12.- Análisis comparativo entre las tres líneas celulares.

Para los odontomas incluidos en parafina observamos predominio en EDAR, BARX1 y PAX9 aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

19.- Discusión

El odontoma es un tumor odontogénico mixto que se considera un hamartoma, la OMS lo clasifica en dos tipos diferentes: el odontoma compuesto y el odontoma complejo ⁽¹⁾. Su etiología es desconocida actualmente, pero se ha sugerido que se debe a diferentes causas como un trauma local, infecciones, factores genéticos y a moléculas blanco en el proceso de la odontogénesis. Generalmente se encuentran como hallazgos radiográficos con mayor frecuencia durante la segunda década de la vida, pueden llegar a afectar la calidad de vida de algunos pacientes y causar alteraciones por presión a tejidos vecinos. Estudiar las características del odontoma en un modelo celular in vitro, nos ha dado una mejor comprensión de la biología del diente, su fisiología y su patología. El modelo celular in vitro se considera útil para el estudio a detalle de los mecanismos de proliferación y de diferenciación. La elucidación de los factores asociados con la inducción del odontoma es importante para clarificar solamente el desarrollo del tumor, pero también el mecanismo asociado con la odontogénesis normal. Por lo tanto, el establecimiento de una línea celular permanente se considera importante para facilitar los estudios de proliferación, diferenciación y regeneración del odontoma ⁽¹⁹⁾.

Se han aislado células madre de diferentes tejidos dentales, incluyendo la pulpa, ligamento periodontal, la vaina epitelial de Hertwig, dientes deciduos exfoliados y cemento. La identificación de las células madre dentales capaces de regenerar todos los componentes del diente aún sigue en curso. El odontoma siendo una malformación compuesta de los tejidos dentales en forma desorganizada, se cree podría contener las poblaciones de células madre con la habilidad única de regenerar los diferentes componentes dentales ⁽²³⁾. Dentro de un odontoma, hay una rica red de células indiferenciadas que no han sido claramente definidas. La capacidad de estas células para formar estructuras dentales complejas y las relaciones espaciales directas entre el esmalte, la dentina y el cemento aún no están claras.

Para que el proceso de odontogénesis se lleve a cabo es necesario una serie de interacciones entre el epitelio oral y el ectomesénquima mandibular, maxilar y los

procesos frontonasaes. Durante el desarrollo de los dientes, el proceso de inducción, morfogénesis y diferenciación guían al diente a una identidad y forma definida. Las células del ectodérmo dan lugar a ameloblastos, y las células craneales del mesénquima derivadas de la cresta neural (ectodérmo) conducen a la formación de odontoblastos y cementoblastos en dientes de mamíferos ⁽⁴⁵⁾.

El desarrollo de los distintos tipos de órganos dentales se da en una capa aparentemente uniforme de ectodérmo oral y el ectomesénquima subyacente. Los mecanismos moleculares que proporcionan un código posicional para la morfogénesis de los dientes se basa en un código de genes provenientes de la capa ectodérmica y del ectomesénquima que son necesarios para las interacciones necesarias para el desarrollo dental. Los tumores odontogénicos se relacionan al proceso de la odontogénesis, y por mucho tiempo se han buscado los genes blanco para identificar las causas de su formación. Los marcadores fueron seleccionados por su importancia en el proceso de la odontogénesis así como el origen embriológico y la etapa en el proceso de la odontogénesis donde se expresan.

En nuestro estudio marcadores como el CD34, un marcador que se ha utilizado ampliamente en estudios como asistente en la identificación de células hematopoyéticas y se ha propuesto que promueve la diferenciación y bloquea la diferenciación de células progenitoras ⁽⁴⁶⁾, es expresado con mayor intensidad y significancia en la línea de odontoma complejo. CD34 ha sido encontrado expresándose en la etapa de brote del desarrollo dentario y va decreciendo conforme va pasando el tiempo ⁽³⁵⁾. Se ha relacionado la presencia de esta molécula a tumores odontogénicos. Al analizar nuestros resultados es posible que su expresión predominante en líneas OdCj pueda deberse al estadio de mayor inmadurez y poca diferenciación, lo que indicaría mayor presencia de células indiferenciadas con una gran capacidad o potencial de proliferación ante los estímulos adecuados.

La expresión del factor de transcripción SOX2, se ha localizado en células progenitoras no diferenciadas y en células del desarrollo dentario, así como en varios tumores odontogénicos como el ameloblastoma ⁽⁴⁸⁾. SOX2 se expresa en la lámina dental que dará origen al órgano dentario. En estudios previos se ha

relacionado la presencia de SOX2 con el desarrollo de dientes supernumerarios y en tumores tipo odontoma por medio de la activación de la vía de señalización Wnt en ratones ⁽³⁶⁾. En un estudio reciente reportado por Guilherme M. Xavier, se ha demostrado que se pueden formar tumores tipo odontoma alterando la vía de señalización Wnt/ β -catenina en células positivas a SOX2 en ratones e inducir el proceso de odontogénesis de novo una vez acabado el proceso de formación dentaria ⁽²¹⁾. La línea celular de OdCj tuvo una mayor expresión de SOX2, esto nos confirma la presencia e importancia de SOX2 en la formación de un odontoma, presentándose con mayor intensidad en el OdCj debido a la gran cantidad de células progenitoras indiferenciadas o bien de mayor cantidad de epitelio odontogenico. Adicionalmente es importante mencionar que en nuestro análisis SOX2 y CD34 presentar un patrón similar, lo que refuerza y valida en cierta manera la naturaleza OdCj.

PAX9 es un factor de transcripción importante en el desarrollo dentario, así como en el desarrollo craneofacial y se cree que juega un papel importante en la agenesia dental ⁽⁴⁷⁾. PAX9 es ampliamente expresado en la cresta neural derivada del mesénquima así como en el mesénquima de dientes en desarrollo especialmente en el estadio de campana y brote. Su interacción con MSX1 es determinante en el desarrollo de incisivos y molares influyendo esta relación en su tamaño y simetría ⁽⁴⁸⁾. La línea celular de OdCm tuvo una mayor expresión de PAX9 comparada con la de OdCj y con los demás marcadores moleculares en general. Este gen es esencial en el proceso de inicio de la odontogénesis por lo que una mutación en él mismo podría alterar el proceso de la odontogénesis y causar la formación de odontomas. Se ha postulado que su presencia determina el tamaño y forma de los dientes, esto podría indicar que su presencia en OdCm podría llevar a la formación de dentículos con forma y tamaño determinados.

RUNX2 es un factor de transcripción esencial para la diferenciación de osteoblastos y odontoblastos, se encuentra en células troncales mesenquimales durante el desarrollo embriológico temprano. RUNX2 es necesario para formación de hueso membranoso y endocondral ⁽⁴⁹⁾. La expresión de RUNX2 se regula positivamente en el mesénquima dental condensado y se regula negativamente en

odontoblastos diferenciados ⁽⁵⁰⁾. Se ha asociado la presencia de RUNX2 a algunos tumores odontogénicos como el ameloblastoma y el tumor odontogénico adenomatoide donde presenta una regulación negativa ⁽⁵¹⁾. La línea celular de OdCj presenta una mayor expresión de RUNX2, se ha postulado que mutaciones de este gen puede llegar a ocasionar deficiencias en la maduración dental provocando alteraciones en la forma de los dientes. Es decir, en un OdCj RUNX2 podría jugar un papel importante en el proceso de maduración de la lesión dejándolo en un estado intermedio e inmaduro.

La BSP ha sido implicada en la deposición mineral y las interacciones celulares durante el desarrollo de la raíz dentaria. Se expresa de manera normal en osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos y se cree que puede participar en la formación de tejidos mesenquimales mineralizados ⁽⁵²⁾. También se encuentra en muchos tipos de tumores odontogénicos, lo que sugiere que esta proteína desempeña un papel en su mineralización patológica ⁽⁵³⁾. En la línea celular OdCm se observó mayor expresión de sialoproteína ósea y esto se puede deber a la formación de estructuras mineralizadas mejor estructuradas y diferenciadas que presentan los odontomas compuestos.

La OPN al igual que la BSP se relaciona a la deposición mineral y se expresa en una variedad de células como osteoblastos, fibroblastos y odontoblastos así como en tejidos incluidos hueso, dentina y cemento ⁽⁵⁴⁾. En un estudio previo mediante inmunohistoquímica se ha localizado la presencia de OPN en células mesenquimales derivadas de un fibro-odontoma ⁽⁵⁵⁾. En este estudio la OPN fue uno de los marcadores que presento una diferencia significativa entre los distintos tipos de odontoma. El OdCj presento una mayor expresión de OPN. Esto podría estar relacionado con la conducta del odontoma complejo que al contener una mayor proporción de mediadores de la mineralización puede iniciar este proceso antes de permitir la morfogénesis y/o diferenciación. En este estudio es la primera vez que se reporta la diferencia en OPN, lo cual es un avance en el entendimiento de la patogénesis del odontoma.

BARX1 es un gen homeobox que actúa como un factor de transcripción asociado como regulador de la morfogénesis específica de los molares. Se ha

encontrado expresado en el mesénquima de los molares en desarrollo durante la formación de la corona ⁽⁵⁶⁾. En el estudio ambas líneas celulares lo expresan, sin embargo, en OdCm fue un poco más intenso que OdCj. Considerando lo anterior, si BARX1 es necesario para la correcta morfogénesis de los dientes, es coherente que se exprese con mayor proporción en la línea celular de OdCm, también nos confirma que para poder alcanzar la morfología correcta, se debe requerir mayor número de genes reguladores, como es el caso de PAX9 y los genes MSX1 y MSX2.

La expresión de MSX1 se observa durante el desarrollo dental temprano y las mutaciones de este gen están relacionadas a la agenésis dental en humanos y alteraciones como el labio y paladar hendido ⁽⁵⁷⁾. Como se mencionó antes las interacciones con PAX9 son necesarias para activar las vías de señalización necesarias que influirán en el tamaño y forma de los órganos dentales ⁽⁴⁸⁾.

En este estudio MSX1 se expresó en niveles semejantes en ambas líneas de odontoma predominando levemente en OdCm, lo cual nos sugiere que al igual que PAX9, si este marcador se expresa en niveles bajos puede ser el responsable una mala morfo-diferenciación en el órgano dentario provocando alteraciones en estructura y forma.

La expresión de MSX2 al igual que MSX1 se da en lugares de interacción epitelio-mesénquima y su expresión es crucial en la morfogénesis craneofacial y de los dientes. En seres humanos la mutación de MSX2 causa defectos en las suturas craneofaciales, por lo que se puede alterar el desarrollo de las estructuras craneofaciales óseas ⁽⁵⁸⁾. Se ha propuesto que MSX2 controla varias etapas del ciclo de vida de los ameloblastos, por lo tanto MSX2 tiene un papel central en la restricción espacio-temporal de la producción del esmalte así como en la calidad del mismo ⁽⁵⁹⁾. MSX2 está presente a lo largo del proceso de diferenciación / maduración de ameloblastos aunque su expresión disminuye durante la etapa secretora y puede modular la expresión del gen del esmalte de manera diferente dependiendo de la combinación de factores de transcripción presentes. ⁽⁵⁹⁾. MSX2 mostro una mayor expresión en la línea OdCm, si valoramos que el odontoma compuesto forma dentículos con un esmalte con una estructura casi normal

explicaría porque predomina en esta línea celular, mientras que el tejido desorganizado del OdCj presenta una muy pobre expresión de MSX2.

La expresión de AMEL se detecta por primera vez en los ameloblastos secretorios situados en la cúspide del diente durante la deposición temprana de la matriz del esmalte, es el mayor componente proteico del esmalte, con alrededor de 180 aminoácidos los cuales tienen la habilidad de autoensamblarse formando estructuras en forma de nanoesferas, las cuales actúan como acarreadores de otros factores secretados por otras células en el ambiente local, lo que contribuye a la biomineralización del ⁽⁶⁰⁾. Se ha evaluado la presencia de AMEL en tumores odontogénicos, a través de técnicas como la inmunohistoquímica en tumores odontogénicos adenomatoideos, quiste odontogénico calcificante y odontomas, este último teniendo una fuerte inmunoreacción en su matriz de esmalte ⁽⁶¹⁾. La AMEL estuvo presente en ambas líneas celulares de odontoma; no obstante, predominó en la línea celular de OdCm, lo cual puede deberse a que estos odontomas presentan una forma definida y más organizada en la matriz de esmalte de sus diversos dentículos.

La AMB es una glicoproteína específica del diente secretada por ameloblastos en la capa formadora de esmalte durante la fase formativa de la amelogénesis. Perdigo y cols., en el 2004 demostraron que las mutaciones del gen de la AMB está asociado con el desarrollo de ameloblastoma, tumor odontogénico adenomatoide, tumor odontogénico escamoso y tumor odontogénico epitelial calcificante. Las mutaciones en el gen AMB son responsables de la tumorigénesis de tumores odontogénicos epiteliales sin ectomesénquima odontogénico ⁽²⁴⁾. Este gen fue expresado en ambas líneas celulares, con niveles levemente mayores en el OdCm, lo cual se podría relacionar con la naturaleza y conducta de este subtipo.

p21 es un gen que se sabe que codifica a un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina, es una proteína que funciona regulando el avance de la fase S del ciclo celular. La expresión de p21 es regulada por el gen supresor tumoral p53 ⁽²⁸⁾. Se ha demostrado que p21 es inducida por la proteína BMP-4 y que contribuye a la formación del nudo del esmalte a través de la inhibición del ciclo celular ⁽⁶¹⁾. p21 ha sido encontrada en tumores odontogénicos como el ameloblastoma, fibromas

ameloblásticos y mixomas odontogénicos ⁽⁶²⁾. En la línea celular OdCm fue expresada con mayor intensidad, y esto debe de ser por la capacidad de p21 para la formación del esmalte. Esta es la primera vez que se reporta la presencia de p21 en odontomas.

Durante la odontogénesis EDAR es expresado en el nudo del esmalte y las alteraciones en este gen están relacionadas a anomalías en la forma y número de las cúspides en los órganos dentales. La formación de dientes supernumerarios también se ha relacionado a la expresión activa de EDAR ⁽²⁷⁾. EDAR mantuvo un nivel de expresión en ambas líneas celulares de odontoma, predominando en el OdCm. Las alteraciones en esta molécula influyen en la correcta formación de la estructura dentaria, que se encuentre más en OdCm puede ser indicativo que en la formación de los dentículos contenidos en el OdCm alteran la correcta formación de los dientes provocando anomalías en estos.

Tomando en cuenta estos resultados, observamos que para poder inducir la formación de un odontoma compuesto, genes tales como AMEL, AMBN, BSP, PAX9, BARX1, MSX1, MSX2 y p21 deben tener un papel predominante.

En el experimento de validación notamos que los marcadores tuvieron un nivel de expresión similar al de los primeros experimentos, hubo variaciones en EDAR, BARX1 y PAX9, aunque no hubo una diferencia estadística significativa, notamos que la OPN conservo su predominio en odontomas complejos. Que no se haya dado esta diferencia puede estar relacionado a varios factores, el tamaño del espécimen o bien las condiciones de conservación en que se encontraban los odontomas de donde se extrajo el ARN. Cabe señalar que los especímenes de odontoma se obtuvieron directamente de pacientes y se sometieron al procedimiento experimental de cultivo primario inmediatamente después de la remoción quirúrgica. Los odontomas incluidos para validación a pesar de ser muestras recientes, el proceso de fijación y almacenaje limitan su potencial para obtener mayores cantidades de ARN. Sin embargo, a pesar de eso observamos concordancia con los resultados de cultivo primarios.

20.- Conclusiones

Estos resultados nos sugieren un comportamiento heterogéneo en cada línea celular de OdCm y OdCj debido a la expresión diferencial entre los distintos marcadores. El estudio in vitro representa una herramienta útil en el estudio de estas lesiones, nos da un panorama real del comportamiento de la lesión y un mejor entendimiento entre los diferentes subtipos de odontoma. En el OdCm determinamos una mayor expresión de marcadores relacionados a etapas tardías del proceso de la odontogénesis, como EDAR, p21, o AMEL; genes que están relacionados a la correcta diferenciación de las estructuras dentarias en el último estadio de la odontogénesis. Mientras que en la línea celular de OdCj predominaron marcadores de odontogénesis temprana y de células progenitoras tales como SOX2, CD34, RUNX2; los cuales son indicativo del estado inmaduro de esta lesión y que contienen una gran cantidad de células indiferenciadas. En este estudio a OPN y CD34 tuvieron una diferencia significativamente estadística, estas moléculas puede estar relacionadas con el proceso de diferenciación entre un odontoma compuesto y un odontoma complejo. Sería recomendable realizar más estudios en un futuro analizando el comportamiento de estos genes específicamente.

Debemos considerar las propiedades únicas de esta lesión, como lo postulan algunos autores en estudios previos, la población celular que podemos encontrar en este tumor puede ser clave en un futuro para entender la regeneración tisular dentaria.

21. - Referencias

1. - Gupta A., Vij H., Vij R. An erupted compound odontoma. N Y State Dent J. 2010; 76(5):52-3.
2. - Lawal A., Adisa A., Olusanya. A. Odontogenic tumours: A review of 266 cases. J Clin Exp Dent. 2013; 5(1):e13-7.
3. - Meet K., Parwinder K. Odontoma Associated With Non-Syndrome Multiple Supplemental Supernumerary Teeth. JCDR. 2011; 5(1):142-145.
4. - Bhaskar S., Ries C. Patología Bucal. 2da Edición. Buenos Aires: El Ateneo; 1979 Pp: 92-94.
5. - El-Naggar A.K., Chan JK. Grandis C. WHO Classification of Head and Neck Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. 4th Edition. Lyon: IARC Press; 2017.
6. - Iatrou I., Vardas E., Theologie-Lygidakis N. A retrospective analysis of the characteristics, treatment and follow-up of 26 odontomas in Greek children. IJOS. 2010; 52(3): 439-447.
7. - Satish V., Maganur C., Sharma R. Odontome: A Brief Overview. IJPCD. 2011; 4(3):177-185.
- 8.- Cuesta A., Gallardo A., Escoda G. Revisión de 61 casos de odontoma. Presentación de un odontoma complejo erupcionado. Med Oral. 2003; 8:366-73.
- 9.- Gaitán L., Quezada D., Tenorio F., Leyva E. Reclassification of odontogenic keratocyst as tumor. Impact on the odontogenic tumors prevalence. Oral Dis. 2010; 16(2): 185-187.
- 10.- Trejo D., Jacinto L. Frecuencia del odontoma compuesto y complejo en el Laboratorio de Patología Bucal de la Facultad de Odontología, DEPeI. [Tesina Licenciatura]. Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Odontología; 2014.
11. - Yépez J., Castillo JL., Molina M. Odontoma mandibular. MedULA. 2009; 18(2): 138-143.
- 12.- Alfaro L. Atlas de Patología de los Maxilares. 1Ed. España: Ripano; 2011.

13. - Regezi J., Sciubba J. Oral Pathology Clinical Pathologic Correlations. Sixth Edition. USA: Elsevier; 2012.
14. - Olech E. Complex composite odontoma, A Clinical and Histologic Report. Complex composite odontoma, A Clinical and Histologic Report. 1970; 16(8): 960-964.
15. - Santosh P., Ramesh D., Kalla A. Complex odontoma: report of two unusual case. Braz J Oral Sci. 2012; 11(4): 509-512.
16. - Douglas R. Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck. Second Edition. China: Elsevier; 2009.
17. – Papagerakisl P., Peuchmaur M., Hottont D. Gene Expression in Epithelial Cells of Mixed Odontogenic Tumors. JDR. 1999; 78(1): 20-30.
18. - Brucoli M., Giarda M., Benech A. Gardner Syndrome: Presurgical Planning and Surgical Management of Craniomaxillofacial Osteomas. J Craniofac Surg. 2011; 22(3): 946-948.
19. - Hatano H., Kudo Y., Ogawa I. Establishment of mesenchymal cell line derived from human developing odontoma. Oral Dis. 2012; 18(8): 756–762.
20. - Tyagi P., Singla S. Complex Composite Odontoma. IJCPD. 2010; 3(2):117-120.
21. - Guilherme X., Patist A., Healy C. Activated WNT signaling in postnatal SOX2-positive dental stem cells can drive odontoma formation. Sci Rep. 2015; 5:1-7.
22. - K. Uzawa., Kasamatsu A., Saito T. Long-term culture of human odontoma-derived cells with a Rho kinase inhibitor. Exp Cell Res. 2016; 347(1):232-240.
23. - Jin-Seon S., Stefanik D., Damek-Poprawa M. Differentiation and regenerative capacities of human odontoma-derived mesenchymal cells. Exp Cell Res. 2009; 77(1):29-37.
24. - Premalatha B., Patil S., Rao R. Odontogenic Tumor Markers - An Overview. J Int Oral Health. 2013; 5(2):59-69.
- 25.- Solís L., Andrade A. ¿Qué son los marcadores moleculares?. RDCTUV. 2005; 8(1): 30-37.

26. – NCBI [Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine; 2017. [Actualizado abril 2017; fecha de acceso marzo 2017]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10913>.
27. - Tucker D., Courtney M., Overbeek P. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev Biol.* 2004; 268: 185– 194.
28. - NCBI [Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine; 2017. [Actualizado abril 2017; fecha de acceso marzo 2017]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1026>.
29. - Ishida K., Yuge Y., Hanaoka M. Gadd45g regulates dental epithelial cell proliferation through p38 MAPK-mediated p21 expression. *Genes Cells.* 2013; 18: 660–671.
30. - NCBI [Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine; 2017. [Actualizado abril 2017; fecha de acceso marzo 2017]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4487>.
31. - Mostowska A., Biedziak B., Jagodzinski P. Novel MSX1 mutation in a family with autosomal-dominant hypodontia of second premolars and third molars. *Arc Oral Biol.* 2012; 57: 790-795.
32. - NCBI [Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine; 2017. [Actualizado abril 2017; fecha de acceso marzo 2017]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4488>.
33. - Jowett A., Vainio S., Ferguson M. Epithelial-mesenchymal interactions are required for msx 1 and msx 2 gene expression in the developing murine molar tooth. *Development.* 1993; 117: 461-470.
34. - NCBI [Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine; 2017. [Actualizado abril 2017; fecha de acceso marzo 2017]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/947>.
35. - Muica N., Pap Z., Denes L. Immunohistochemical study of Ki67, CD34 and p53 expression in human tooth buds. *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55(1):43–48.
36. - Juuri E., Isaksson S., Jussila M. Expression of the stem cell marker, SOX2, in ameloblastoma and dental epithelium. *Eur J Oral Sci.* 2013; 121: 509–516.

37. - NCBI [Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information, National /Library of Medicine; 2017. [Actualizado abril 2017; fecha de acceso marzo 2017]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5083>.
- 38.- Sedano HO., Ocampo-Acosta F., Naranjo-Corona RI. Multiple dens invaginatus, mulberry molar and conical teeth. Case report and genetic considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009; 14 (2): 69-72.
39. - NCBI [Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information, National /Library of Medicine; 2017. [Actualizado abril 2017; fecha de acceso marzo 2017]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/860>.
40. - Camilleri S., McDonald F. Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 361–373.
41. - NCBI [Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information, National /Library of Medicine; 2017. [Actualizado abril 2017; fecha de acceso marzo 2017]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3381>.
- 42.-Chen J., Sasaguri C., Aufdemorte S. Enamel epithelium expresses Bone sialoprotein. *Eur J Oral Sci*. 1998; 1:331-336.
43. - Hirata A., Sugahara T., Nakamura H. Localization of Runx2, Osterix, and Osteopontin in Tooth Root Formation in Rat Molars. *J Histochem Cytochem*. 2009; 57(4): 397–403.
44. - NCBI [Internet]. USA: National Center for Biotechnology Information, National /Library of Medicine; 2017. [Actualizado abril 2017; fecha de acceso marzo 2017]. URL disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56033>.
45. - Schwabea G., Opitzc C., Tinschertd S. Molecular Mechanisms of Tooth Development and Malformations. *Oral Biosci Med*. 2004; 1: 77-9.1.
46. - Nielsen J., McNagny K. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci*. 2008; 122(21): 3683-3692.
47. - Paixa V., Tatiana Braga., Salzano F. PAX9 and MSX1 transcription factor genes in non-syndromic dental agenesis. *Arch Oral Biol*. 2011; 56(4): 337–344.
48. - Nakatomi M., Wang X., Key D. Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol*. 2010; 340(2): 438 –449.

49. - Jonason J., Xiao G., Zhang M. Post-translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage. *J Dent Res.* 2009; 88(8): 693-703.
50. - Miyazaki T., Baba T., Mori M. Microtubule-associated protein tau (Mapt) is expressed interminally differentiated odontoblasts and severely down-regulated in morphologically disturbed odontoblasts of Runx2 transgenic mice. *Cell Tissue Res.* 2015; 361(2):457–466.
51. - Keun Lee S., Kim Y. Current Concepts and Occurrence of Epithelial Odontogenic Tumors: I. Ameloblastoma and Adenomatoid Odontogenic Tumor. *Korean J Pathol.* 2013; 47(3): 191-202.
52. - Bosshardt D., Salzal S., Mckee M. Developmental Appearance and Distribution of Bone Sialoprotein and Osteopontin in Human and Rat Cementum. *Anat Rec.* 1998; 250(1):13–33.
53. - Kumamoto H., Molecular pathology of odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35(2): 65–74.
54. - Sodek J., Ganss B., McKeel M. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(3): 279-203.
55. - Matsuzaka K., Inoue T., Nashimoto M. A case of an ameloblastic fibro-odontoma arising from a calcifying odontogenic cyst. *Bull. Tokyo dent. Coll.* 2001; 42(1): 51-55.
56. - Kim SH., Kim S., Shin Y. Comparative Gene Expression Analysis of the Coronal Pulp and Apical Pulp Complex in Human Immature Teeth. *J Endod.* 2016; 42(5): 752-759.
57. - Tatematsu T., Kimura M., Nakashima M. An Aberrant Splice Acceptor Site Due to a Novel Intronic Nucleotide Substitution in MSX1 Gene Is the Cause of Congenital Tooth Agenesis in a Japanese Family. *PLoS One.* 2015; 10(6):1-11.
58. - Simon Y., Marchadier A., Riviere M. Cephalometric assessment of craniofacial dysmorphologies in relation with Msx2 mutations in mouse. *Orthod Craniofac Res.* 2014; 17(2): 92–105.
59. - Babajko S., De la Dure M., Jedeon K. MSX2 in ameloblast cell fate and activity. *Front Physiol.* 2015; 510(5): 1-10.

- 60.- Lang C. Proteínas de matriz de esmalte (AMELOGENINA) Revisión Bibliográfica. Rev C Odont. 2005; 1(1): 27-3.
61. - Nakatomi C., Nakatomi M., Saito K. The enamel knot-like structure is eternally maintained in the apical bud of postnatal mouse Incisors. Arch Oral Biol. 2015; 60(8):1122-30.
62. - Sandros J., Heikinheimo K., Happonen R. Expression of p21RAS in odontogenic tumors. APMIS, 99: 15–20.