

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Tesis para la obtención de título de Licenciatura en Cirujano Dentista

Análisis del perfil de expresión proteico del ameloblastoma sólido

Nombre del alumno:

Samuel Mendoza Alvarez

Director de tesis:

Dr. Alejandro García Muñoz

Asesores y sinodales:

Dr. José Francisco Gómez Clavel

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

CD. CMF. Madeleine Vélez Cruz

Dra. Febe Elena Cazáres Raga

Proyecto realizado gracias el apoyo y financiamiento PAPCA 2016 – 18

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

1. Introducción.....	2
2. Clasificación de los tumores.....	3
3. Epidemiología de los tumores en general.....	4
4. Tumores Odontogénicos.....	6
5. Epidemiología de los tumores odontogénicos.....	8
6. Odontogénesis.....	10
7. Ameloblastoma.....	16
7.1 Epidemiología del Ameloblastoma.....	16
7.2 Tipos de Ameloblastoma.....	17
8. Ameloblastoma sólido.....	18
8.1 Características Clínicas.....	19
8.2 Localización.....	20
8.3 Histología.....	20
8.4 Ameloblastoma maligno y carcinoma ameloblástico.....	23
9. Vías de señalización en el Ameloblastoma.....	24
10. Antecedentes directos.....	26
11. Justificación.....	28
12. Hipótesis.....	28
13. Objetivos.....	28
14. Materiales y métodos.....	29
15. Resultados.....	32
16. Discusión.....	44
17. Perspectivas.....	45
18. Conclusión.....	45
19. Referencias.....	46

1. Introducción

Desde el punto de vista molecular, el cáncer se define como el conjunto de trastornos que comparten una acusada desregulación del crecimiento; es *un trastorno genético* causado por mutaciones del DNA que son (en su mayor parte) adquiridas espontáneamente o inducidas por factores ambientales [1].

Con frecuencia, los cánceres muestran variaciones epigenéticas que alteran la expresión o la función de genes clave que regulan los procesos celulares fundamentales, como el crecimiento y la supervivencia [1]. Esas alteraciones genéticas son hereditarias, de modo que se transmiten a las células hijas en cada división celular [1].

La acumulación de mutaciones da lugar a un conjunto de propiedades que se han denominado *características distintivas del cáncer*, entre ellas se encuentran; la autosuficiencia en las señales de crecimiento, la ausencia de respuesta a las señales inhibitorias del crecimiento, la evasión de la muerte celular, el potencial de replicación ilimitado, el desarrollo de angiogenia, la capacidad de invadir los tejidos localmente y la capacidad de escapar al sistema inmunitario. [1].

A esto se añade que las principales dianas de las lesiones genéticas son 4 clases de genes reguladores normales: los protooncogenes que estimulan el crecimiento (ciclo celular), los genes supresores del cáncer que inhiben el crecimiento, los genes que regulan la muerte celular programada o apoptosis y genes que regulan la reparación de DNA (corte y empalme)

La acumulación de estas alteraciones celulares da como resultado el desarrollo de tumores benignos o malignos los cuales discutiremos a continuación.

2. Clasificación de los tumores

Las neoplasias se definen como: una masa de tejido, con crecimiento que sobrepasa al de los tejidos normales. Al utilizar el término neoplasia hacemos referencia tanto a las benignas como a las malignas.

Los tumores benignos parecen ser genéticamente «simples», presentan menos mutaciones que los cánceres y son genéticamente estables, es decir su genotipo se modifica poco con el tiempo. Existen cuatro características básicas con las que es posible distinguir los tumores benignos, y son: diferenciación y anaplasia, velocidad de crecimiento, invasión local y metástasis [1].

En cambio los tumores malignos se conocen en conjunto como *cánceres*, dicha palabra deriva del latín para “cangrejo”; es decir, se adhieren a cualquier parte donde crecen de forma pertinaz, de forma parecida al comportamiento observado en los cangrejos, destruyendo estructuras adyacentes [1].

Todos los tumores, benignos y malignos, tienen dos componentes básicos:

1) el *parénquima*, formado por células transformadas o neoplásicas, y 2) el *estroma* de soporte, formado por tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y células inflamatorias derivadas del huésped. El parénquima de la neoplasia determina, en gran medida, su comportamiento biológico y es de este componente del que deriva el nombre del tumor [1].

En general, los tumores benignos se denominan añadiendo el sufijo *oma* al tipo celular del que se origina el tumor. Las neoplasias malignas originadas en tejidos mesenquimatosos «sólidos» o sus derivados se conocen como *sarcomas* y aunque los epitelios corporales derivan de las tres capas de líneas germinales, las neoplasias malignas de células epiteliales se denominan *carcinomas* [1].

3. Epidemiología de los tumores en general

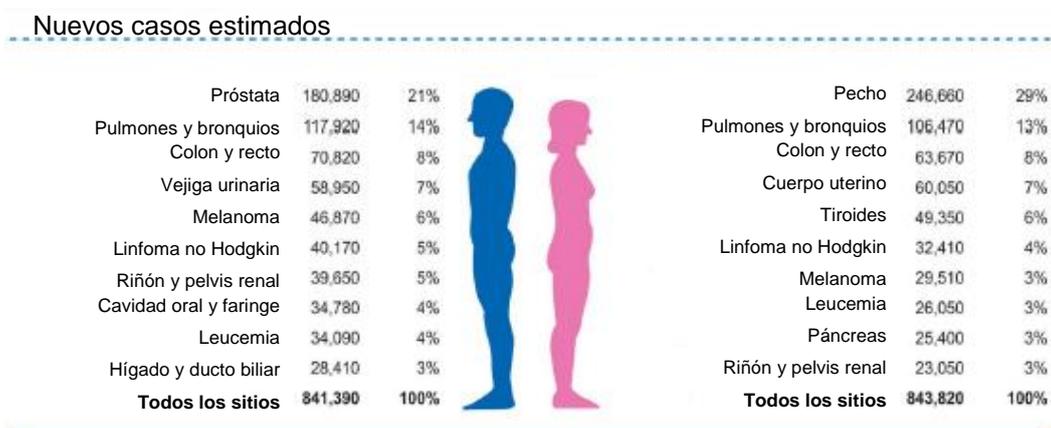
La epidemiología nos puede ayudar en gran medida a conocer el origen de las neoplasias a partir de estudios que relacionen influencias concretas ambientales, raciales (posiblemente hereditarias) y culturales con la aparición de neoplasias concretas. Cabe mencionar que los factores ambientales son la causa principal de los cánceres esporádicos más comunes. Este concepto se confirma con las diferencias geográficas en las tasas de mortalidad de formas específicas de cáncer [1]. Entre las posibles influencias ambientales, las más importantes en términos de prevención son las relacionadas con los hábitos personales, especialmente el tabaquismo y el consumo crónico de alcohol [1].

Con base en estos datos podemos visualizar que ciertas neoplasias se presenten de manera más frecuentes en una población, por ejemplo, un estudio realizado en Estados Unidos nos muestra el número de casos de cáncer estimados para el 2016. Se espera que se diagnostiquen aproximadamente 61.000 casos de carcinoma de mama femenino in situ y 68.480 casos de melanoma in situ [2].

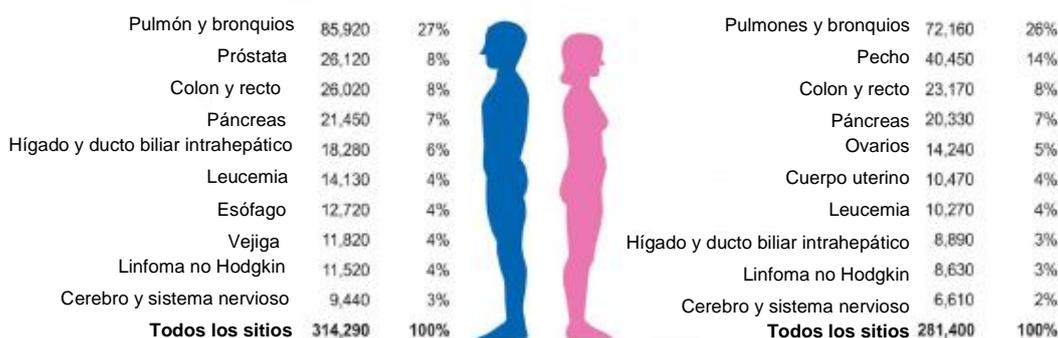
Así mismo, la tasa general de mortalidad por cáncer aumentó durante la mayor parte del siglo XX, en gran medida impulsada por el rápido aumento de las muertes por cáncer de pulmón entre los hombres como consecuencia de la epidemia de tabaco. El 80% de las muertes por cáncer de pulmón y la mitad de todas las muertes por cáncer de la cavidad oral, esófago y vejiga urinaria son causadas por el tabaquismo [2].

En contraste, estudios indican que las tasas de incidencia de ciertos subtipos de cáncer de estómago están aumentando para algunos subconjuntos de la población de EE.UU. por razones que siguen siendo desconocidas [2].

A continuación se muestran dos imágenes que representan el número y porcentaje de nuevos casos estimados y muertes estimadas en el 2016 respectivamente.



Muertes estimadas



Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016

Para avanzar en la lucha contra las neoplasias será necesario continuar la investigación clínica y básica, que depende de la financiación, así como la aplicación de los conocimientos existentes en todos los segmentos de la población, haciendo hincapié en los grupos desfavorecidos [2].

4. Tumores Odontogénicos

Los tumores odontogénicos son extremadamente raros, constituyen menos del 1% de todos los tumores. La mayoría de los tumores odontogénicos son benignos, sin embargo algunos de ellos muestran crecimiento localmente agresivo y alto grado de recidiva. Los tumores odontogénicos son derivados de las células formadoras de los dientes y sus remanentes, por lo tanto son exclusivos de los maxilares. Ambos tumores, benignos y malignos, se encuentran subclasificados en tumores epiteliales, tumores mixtos y tumores mesenquimales [4].

Estos tumores se pueden generar en cualquier etapa de la vida de un individuo y el conocimiento de las características clínicas básicas, tales como la edad, el género, y la ubicación puede ser extremadamente valiosa en el desarrollo de diagnósticos diferenciales de los tumores odontogénicos [3].

La clasificación utilizada en el 2005 se basaba en clasificar la lesión por su comportamiento, dividiéndolas en benignas, malignas y no neoplásicas.

Debido a que la clasificación de tumores odontogénicos es en general un tema muy debatido, se han intentado simplificar la clasificación lo más posible, dejando fuera cualquier referencia no probada a la histogénesis o lesiones precursoras [4].

Actualmente la nueva clasificación los organiza en tres grandes grupos; tumores epiteliales, tumores mixtos, y tumores mesenquimatosos, tanto para los tumores benignos como para los malignos. A continuación se presenta la clasificación completa.

Clasificación OMS de tumores odontogénicos 2017

<p>Carcinomas odontogénicos Carcinoma ameloblástico Carcinoma intraóseo primario Carcinoma odontogénico esclerosante Carcinoma odontogénico de células claras Carcinoma odontogénico de células fantasmas</p> <p>Carcinosarcoma odontogénico</p> <p>Sarcomas odontogénicos</p> <p>Tumores odontogénicos epiteliales benignos Ameloblastoma Ameloblastoma uniuístico Ameloblastoma extraóseo/periférico Ameloblastoma metastasico Tumor odontogénico escamoso Tumor odontogénico epitelial calcificante Tumor odontogénico adenomatoide</p> <p>Tumores odontogénicos benignos mixtos epiteliales y mesenquimatosos Fibroma ameloblástico Tumor odontogénico primordial</p> <p>Odontoma Odontoma tipo compuesto Odontoma tipo complejo Tumor de células fantasmas dentinógenas</p> <p>Tumores odontogénicos mesenquimales benignos Fibroma odontogénico Mixoma/mixofibromaodontogénico Cementoblastoma Fibroma cemento-osificante</p> <p>Quistes odontogénicos de origen inflamatorio Quiste radicular Quiste inflamatorio colateral</p> <p>Quistes de desarrollo odontogénicos y no odontogénicos Quiste dentígero Queratoquiste odontogénico Quiste periodontal lateral y quiste odontogénico botrioide Quiste gingival Quiste odontogénico glandular Quiste odontogénico calcificante Quiste odontogénico ortoqueratinizado Quiste del conducto nasopalatino</p>	<p>Tumores maxilofaciales malignos de hueso y de cartílago Condrosarcoma Condrosarcoma grado1 Condrosarcomagrado 2/3 Condrosarcomamesenquimal Osteosarcoma, NOS Osteosarcoma central de bajo grado Osteosarcomacondroblástico Osteosarcomaparosteal Osteosarcomaperiosteal</p> <p>Tumores maxilofaciales benignos de hueso y de cartílago Condroma Osteoma Tumor neuroectodérmicomelanótico de la infancia Condroblastoma Fibroma condromixóide Osteoma osteoide Osteoblastoma Fibroma desmoplásico</p> <p>Lesiones fibro-óseas y osteocondromatosas Fibroma osificante Cementomagigantiforme familiar Displasia fibrosa Displasia cemento-ósea Osteocondroma</p> <p>Lesiones de células gigantes y quistes óseos Granuloma central de células gigantes Granuloma periférico de células gigantes Querubismo Quiste óseo aneurismático Quiste óseo simple</p> <p>Tumores hematolinfoideos Plasmocitoma solitario de hueso</p>
---	--

5. Epidemiología de los tumores odontogénicos

Existen numerosos estudios alrededor del mundo que hablan de la incidencia de los tumores odontogénicos, todos ellos coinciden en que el Ameloblastoma es uno de los más comunes.

Por ejemplo; de acuerdo con el estudio realizado por Avelar RL en la República Popular China (RPC), el tumor odontogénico más frecuente fue el ameloblastoma, tipo sólido/multiquístico (AS/M, 58,6%) comparable a la que se encuentra en Hong Kong (59,4%), Japón (57%) y en dos países de África (Zimbabwe y Nigeria), 79,1% y 58,5%, respectivamente [12].

Esto contrasta con las tasas de poblaciones en los EE.UU. y Canadá, donde el tumor más frecuente fue el odontoma (73,8% y 56,4%, respectivamente) y donde el AS representó solamente el 12,2% y 14,8%, respectivamente [12].

Parece que una de las razones de estas discrepancias puede encontrarse en la fuente de los datos. Pacientes con tumores odontogénicos de la República Popular China, Hong Kong, Japón y varios países africanos son diagnosticados y tratados en Unidades maxilofaciales de Hospitales, mientras que los pacientes de los EE.UU. y Canadá en general, son monitoreados en las escuelas dentales u hospitales en donde los odontomas con frecuencia se diagnostica en las imágenes panorámicas de rutina realizadas en la consulta de un dentista o en una Facultad de Odontología sin biopsia previa. En varios casos los países en desarrollo no están registrados o enviados para su confirmación histológica. Por lo tanto, la frecuencia de los odontomas notificados de estos países es probablemente subestimada. El Ameloblastoma, por otro lado necesita una biopsia para confirmar el diagnóstico y el tratamiento radical se realiza a menudo en un hospital Médico [12].

Se ha sugerido que los Ameloblastomas son más comunes en la raza negra que en los caucásicos, aunque aún no se ha demostrado que la variación geográfica sugerida por los datos anteriormente mencionados también puede estar basada en las diferencias étnicas [12].

Estadísticamente los tumores odontogénicos oscilan en edades entre los 7 años y 82 años (media, 29 años) con un punto máximo entre la segunda y tercera décadas de vida [13].

Se ha observado un ligero predominio general masculino (59%). La mandíbula y el maxilar estaban involucrados en el 66,7% y el 29,6% de los casos de tumores odontogénicos, respectivamente, y el área más frecuentemente afectada fue la mandíbula posterior (48,9%), seguida del maxilar anterior (22,9%) [13].

De igual manera un estudio realizado en Brasil arrojó una edad media de 29 años, con una relación hombre/mujer de 1: 1,1. El tumor odontogénico adenomatoide fue el menos frecuente que en la mayoría. La mayoría de los tumores odontogénicos en niños y en el maxilar anterior fueron odontomas, mientras que los ameloblastomas en maxilares fueron raros [14].

En cuanto a México existen dos estudios estadísticos sobre tumores odontogénicos. El primero de carácter retrospectivo, realizado en 1977 el cual reveló que en un total de 349 tumores odontogénicos; 345 fueron benignos (98,8%) y 4 (1,1%) malignos (3 fueron carcinomas intraóseos primarios y 1 ameloblastoma maligno). Los tumores más frecuentes fueron odontoma (34,6%), ameloblastoma (23,7%), mixoma (17,7%), tumor odontogénico adenomatoide (7,1%) y quiste odontogénico calcificante (6,8%) [15].

Años más tarde Gaitán-Cepeda LA y colaboradores, en 2010 obtuvieron una muestra de 154 casos, de los cuales; el 45% fueron odontomas; el 22% fueron ameloblastomas; y 14,9% tuvieron un diagnóstico de mixoma odontogénico.

Con base en los antecedentes presentados podemos observar las diferencias y similitudes en la prevalencia de los tumores odontogénicos entre diferentes países y continentes. Dichos tumores, aunque relativamente raros, siguen siendo una causa importante de procedimientos quirúrgicos extensos en México y en el mundo, por lo que este estudio ayudará de manera importante en su terapia y detección temprana.

Dado que nuestro estudio es aplicado a tumores derivados de células formadoras de órganos dentales; a continuación presentamos una revisión del proceso de odontogénesis.

6. Odontogénesis

Durante en desarrollo embrionario, las estructuras de la cabeza y cuello se derivan de la porción cefálica del tubo neural, dando lugar a los arcos braquiales. Al llegar la 4ª semana de vida intrauterina, las células de la cresta neural craneal, aunque de origen ectodérmico, sufren "mesenquimalización", un proceso que justifica su designación como células ectomesenquimales [5] y migran lateralmente y ventralmente para llenar las prominencias faciales con mesénquima [6].

El mesénquima (ectomesénquima) derivado de la cresta neural forma eventualmente los esqueletos faciales y mandibulares, así como La mayoría de los tejidos blandos y duros de los dientes, incluyendo la dentina, la pulpa dental, el hueso alveolar y el ligamento periodontal. Dando como resultado dos fuentes principales en el desarrollo de los dientes; el epitelio que se deriva del ectodermo oral y el endodermo potencialmente faríngeo [7] y el mesénquima que se deriva de las células de la cresta neural craneal.

Las interacciones complicadas, secuenciales y recíprocas entre el epitelio dental y el ectomesénquima dental que se requieren para la formación de los dientes están mediadas por la expresión espaciotemporal de aproximadamente 300 genes que se transcriben y la secreción aproximadamente de 100 factores de crecimiento y transcripción que regulan en desarrollo del diente [5].

La iniciación del desarrollo dental comienza al final de la quinta semana de gestación humana.

La primera indicación morfológica del desarrollo de los dientes es la lámina dental, que es la formación de placas ectodérmicas, es decir, espesamientos epiteliales embrionarios que preceden a la aparición local de un órgano ectodérmico, llamada banda epitelial primaria [5], tal como se muestra en la figura 1.

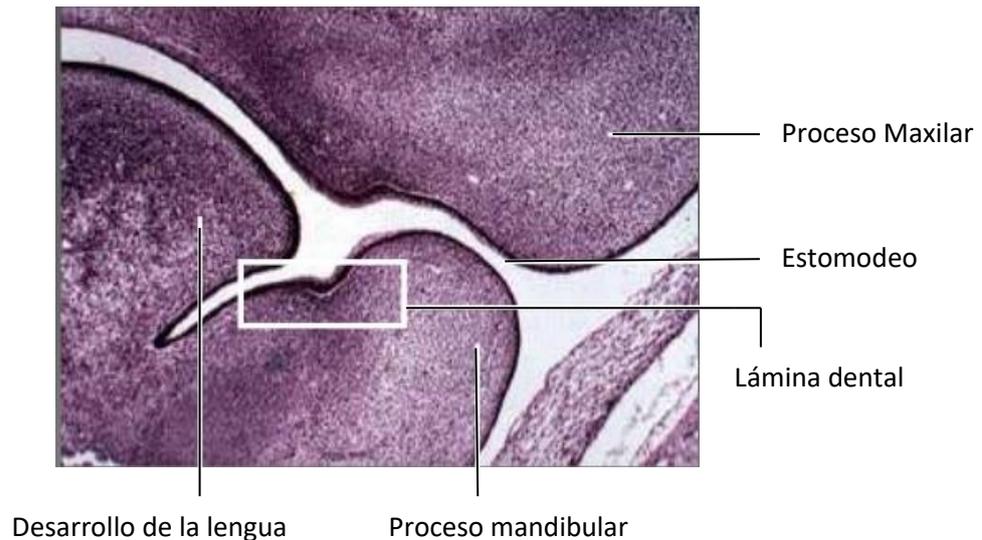


Figura 1. Fotografía de microscopía óptica en la que se observa el estadio de iniciación: etapa donde en el ectomodeo oral prolifera una banda gruesa de epitelio llamada banda epitelial primaria (Nanci, 2007)

La banda epitelial primaria segrega moléculas de las cuatro familias de crecimiento y factor de transcripción (BMPs, FGFs, SHH y WNTs), que inducen la expresión de muchos genes. Específicamente, la BMP4 (a través de MSX1) induce la producción de BMP4 mesenquimal. En 20 posiciones de la lámina dental de embrión humano, las células epiteliales, bajo la influencia de BMP4 y activina β A, comienzan a proliferar dando lugar a los brotes o yemas dentarias para los 20 dientes primarios [5] (figura 2).

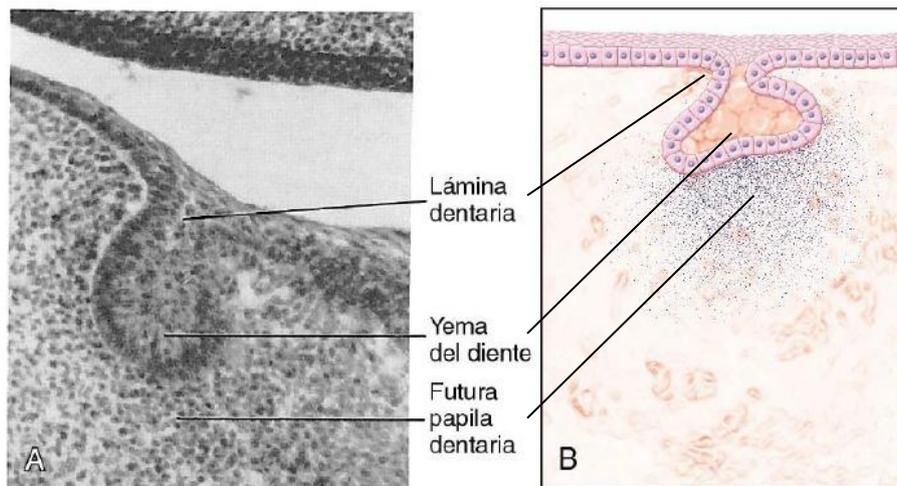


Figura 2. Esquema del estadio de brote o yema: se muestra la invaginación de las células de la lámina dentaria en el mesénquima oral [10].

Estadio de casquete

Alrededor de la 9ª semana de vida la expresión de los genes RUNX-2 Y FGF-3 inducen que el borde dental se invagine y adquiera un aspecto de casquete. Su concavidad central da lugar al órgano del esmalte y debajo de esta estructura las células mesenquimatosas proliferan y se condensan para formar la papila dental, que dará origen al complejo dentinopulpar. A su vez, las células mesenquimatosas que rodean la papila dental y al órgano del esmalte componen el saco dental [8].

En esta etapa las células de la papila dental expresan las vías de señalización de BMP, FGF y WNT e inducen al órgano del esmalte a formar un nodo o nudo que regulará la morfología y el crecimiento del esmalte y cuyas células expresan la proteína p21, esta proteína está asociada con la salida del ciclo celular e indican la expresión de las vías FGF, BMP, WNT y SHH, que a su vez inducen el desarrollo del órgano del esmalte así como induce el desarrollo del órgano del esmalte así como induce a la papila dental para que sus células formen esmalte y dentina [9] (figura 3).

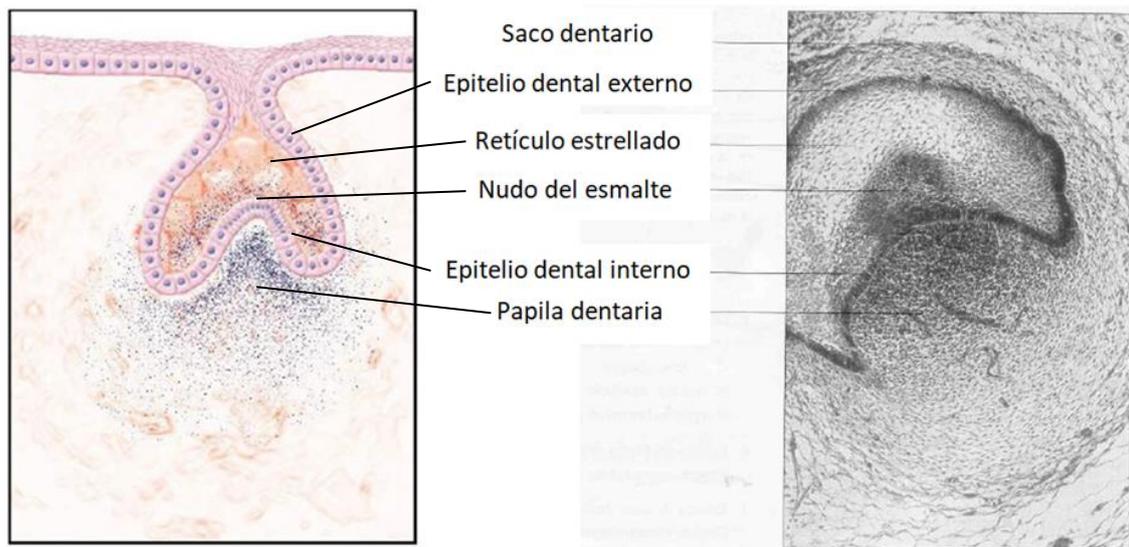


Figura 3. Esquema del estadio de casquete: en este estadio se forma el nodo dentario el cual induce el desarrollo del órgano del esmalte, adquiriendo forma de casquete [8], [10].

Estadio de campana

Después del crecimiento de la papila y del órgano del esmalte, el diente alcanza el estadio de morfodiferenciación e histodiferenciación, en donde se acentúa la invaginación del epitelio interno adquiriendo el aspecto típico de una campana (figura 4).

En este estadio las células del epitelio interno del esmalte se caracterizan por tener la forma del diente que crearán. Además, las células del órgano del esmalte también se han diferenciado en las células del epitelio externo del esmalte, que cubren el órgano del esmalte, y las células del epitelio interno del esmalte, que se convierten en los *ameloblastos* que forman el esmalte de la corona del diente. Entre estas dos capas celulares se sitúan las células del retículo estrellado, que poseen forma de estrella con prolongaciones que las unen entre sí [10].

En esta etapa, en la lámina dental que une al órgano del esmalte con epitelio de la cavidad oral se comienza a formar el brote del diente permanente.

Posteriormente la lámina dental desaparece y el diente permanente continúa su desarrollo [8].

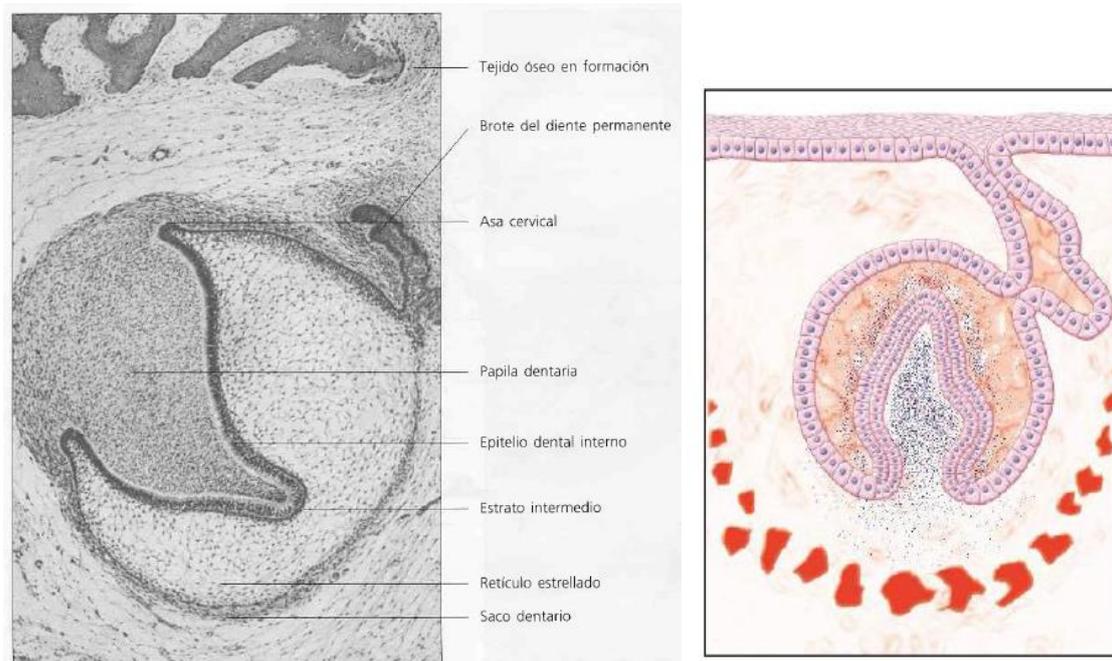


Figura 4. Esquema del estadio de campana: se acentúa la invaginación del epitelio dental interno adquiriendo un aspecto típico de campana, en este estadio hay una similitud con la histología del ameloblastoma sólido [8], [10].

Durante el estadio de campana las células de la periferia de la papila dentaria se convierten en odontoblastos. Después de que los odontoblastos se alargan y adquieren una morfología cilíndrica, forman una matriz extracelular (MEC) de un 90% de fibras de colágeno tipo I y un 10% de proteínas no colágenas, denominada predentina.

Después de que se completa la forma específica de una corona dentaria, el epitelio que forma el borde exterior del órgano de esmalte en forma de campana se alarga, formando la forma y longitud de las raíces.

Este epitelio forma una fina membrana transitoria denominada vaina de raíz de Hertwig. En este lugar, los odontoblastos se forman para producir la dentina necesaria para la formación de raíces. La dentina estimula estas células a diferenciarse en cementoblastos. Los cementoblastos son responsables de generar la capa calcificada sobre la dentina, conocida como cemento.

El cemento sirve para anclar las fibras de colágeno del folículo dental y ligamento periodontal a la raíz del diente y para sellar el lado exterior del túbulo dentinario. Los restos epiteliales de la vaina de la raíz de Hertwig permanecen en el ligamento periodontal después de que la formación del diente está completa y se denominan restos de Malassez (figura 5).

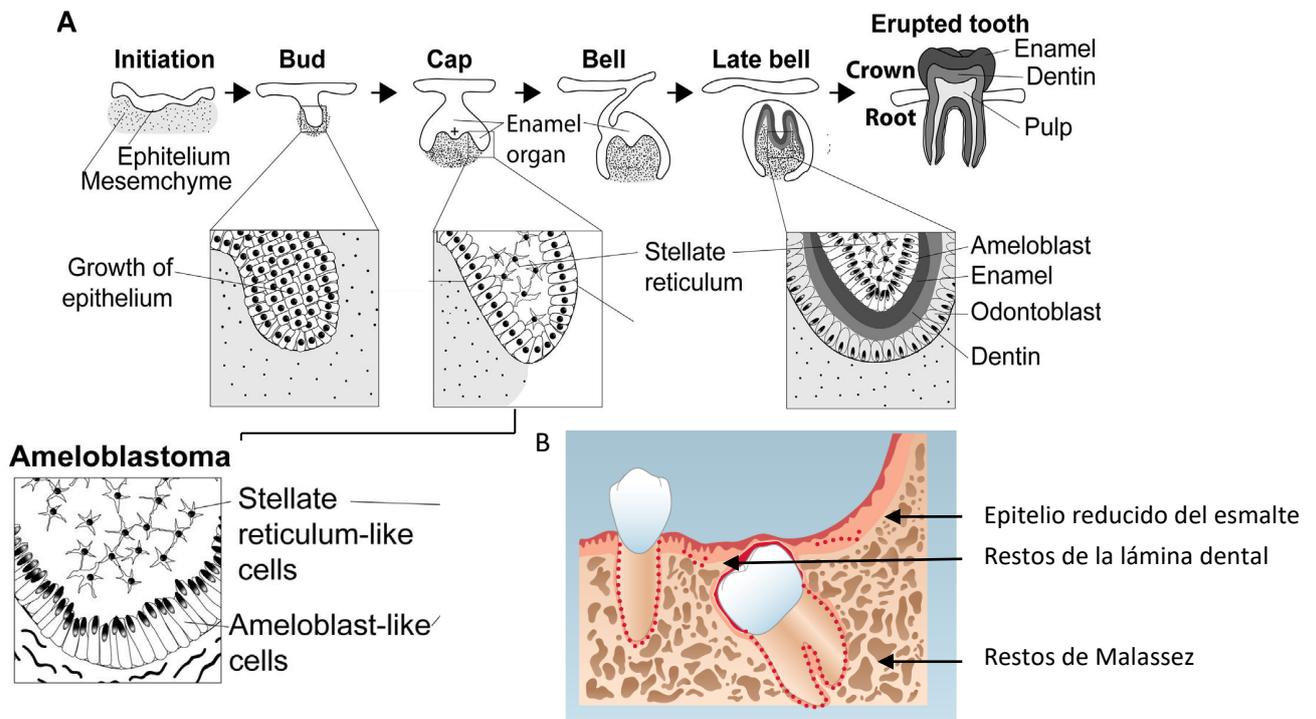


Figura 5. Esquema de la odontogénesis en donde podemos ver: A) el ameloblastoma es una lesión que presenta células tipo ameloblasto con núcleos de polarización inversa y células tipo retículo estrelladas parecidas a la etapa de campana de la odontogénesis [11]. B) Se sugiere que el origen del ameloblastoma, es a partir de los restos de la lámina dental, epitelio reducido del esmalte y restos de Malassez.

Una vez finalizado del proceso de odontogénesis los restos de las células formadoras de esmalte y la raíz permanecen dentro de los maxilares pudiendo ocasionar tumores en cualquier momento de la vida.

7. Ameloblastoma

7.1 Epidemiología del Ameloblastoma

Mundialmente solamente cinco estudios podrían ser recuperados desde la literatura escrita en inglés en los últimos cuarenta años que se ocupan de la verdadera incidencia de ameloblastoma [16]

En estos cinco estudios realizados, la edad media en el momento del diagnóstico fue de 44,1 años, con un pico de incidencia entre la segunda y la sexta década [16]. Por otro lado un estudio de 121 casos en Brasil, la edad media fue de 33,2 años [17]. En el estudio por Reichart et al, la edad promedio varió de 30,4 años en África a 42,3 años en Europa [17]. Al parecer, los ameloblastomas son diagnosticados a una edad menor en África que en otras partes del mundo (Tabla 1).

Tabla 1. Edad al momento del diagnóstico y género (m/f).

	Edad (años)	Proporción masc-fem
Reichart PA, <i>et al.</i> , 1995	33.9	1.14:1
Dhanuthai <i>et al.</i> , 2012	38.3	1.05:1
Marjolijn A.E.M. Oomens, 2014	44.1	1.40:1

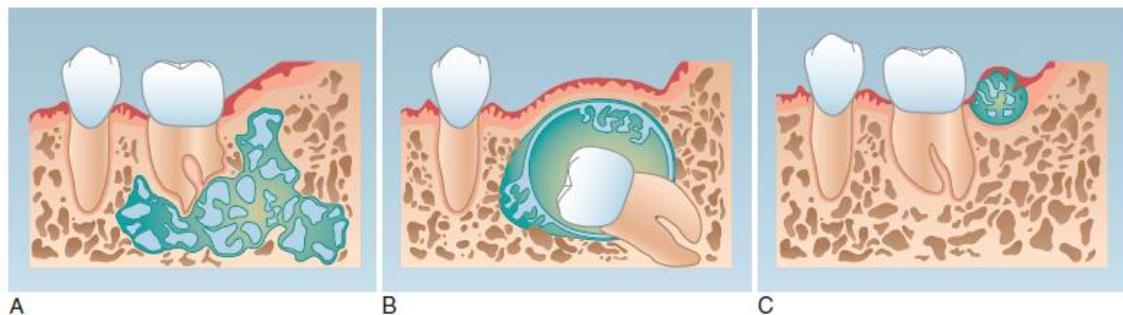
Oomens MA, Van der Waal I. Epidemiology of ameloblastoma of the jaws; a report from the Netherlands 2014.

En la tabla 2 se observó una edad algo menor, pero significativa de 4-5 años en las mujeres en comparación con los hombres [16]. No hay una explicación adecuada para esta diferencia [18].

En Latinoamérica, AS y AU son los subtipos más comunes. Los AUs presentan algunas características de los quistes odontogénicos; que son menos agresivas que las AS y tienden a ocurrir a una edad más temprana. Los ameloblastomas componen 22,7% de todos los tumores odontogénicos y rara vez se encuentran casos en pacientes menores a 20 años [19].

7.2 Tipos de Ameloblastoma

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasificación histológica de los tumores de 2017, el ameloblastoma se clasifican en cuatro variantes: sólido/multiquístico (AS/M), unikuístico (AU), extraóseo/periférico (AE/P) y desmoplásico (AD) [4] (figura 6).



Phillip Sapp, Contemporary Oral and Maxilofacial Pathology, second edition.

Figura 6. Esquema de las variantes del ameloblastoma. A, sólido/multiquístico. B, unikuístico. C, periférico/extraóseo

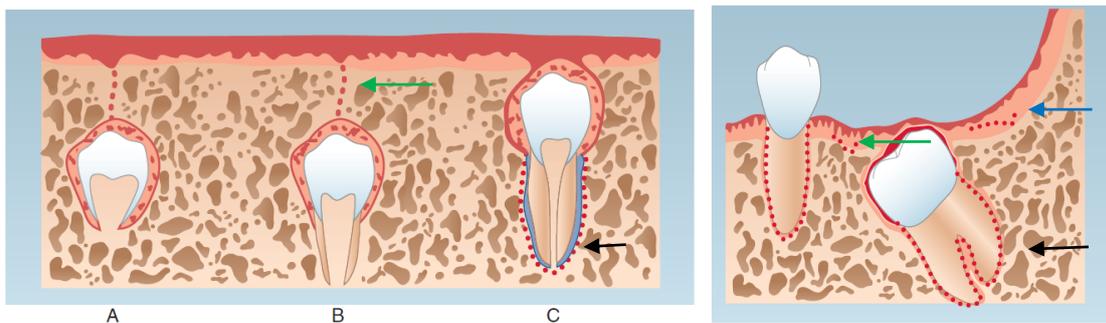
Los tipos más comunes de ameloblastoma son el sólido / multiquístico (SA) y el ameloblastoma unikuístico (UA); este último considerado como una entidad mucho menos agresiva en comparación con el Ameloblastoma Sólido

8. Ameloblastoma sólido

El presente estudio está enfocado al Ameloblastoma Sólido el cual, como ya se mencionó, representa mundialmente la neoplasia odontogénica más común de la mandíbula [20]

El Ameloblastoma Sólido es un tumor benigno que puede surgir de cualquiera de las múltiples fuentes de epitelio odontogénico que permanecen dentro del tejido blando alveolar y el hueso.

Cuatro de estas fuentes son: restos de la lámina dental (restos de Serres), epitelio reducido del esmalte y restos de la vaina epitelial de Hertwig (restos de Malassez) [21] (figura 7).



Phillip Sapp, Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology, second edition.

Figura 7. Esquema de los posibles orígenes epiteliales del ameloblastoma restos de la lámina dental (restos de Serres), ← epitelio reducido del esmalte ← y restos de la vaina epitelial de Hertwig (restos de Malassez) ← [21].

8.1 Características clínicas

Generalmente se presentan como una hinchazón indolora de crecimiento lento, localmente invasivo con expansión de los huesos de la mandíbula, perforación de placas corticales e infiltración en el tejido blando circundante mandibular o estructura nasosinusal [22].

Las complicaciones asociadas al gran tamaño incluyen: pérdida de dientes, maloclusion, parestesia, deformación facial, limitación de la apertura bucal, dificultad para masticar y obstrucción de la vía aérea. Expansión de las corticales vestibulares y linguales es observada frecuentemente, así como la resorción de las raíces. [4].

Radiográficamente presenta un patrón de “pompas de jabón o panal de abeja” (figura 9).



J. Sloomwed, Dental Pathology a Practical Introduccion, 2013

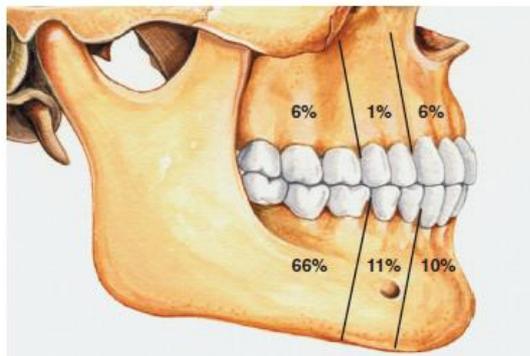
Figura 9. Esquema del aspecto radiográfico como pompas de jabón o panal de abeja del AS. Tratamiento: resección en bloque con márgenes de seguridad

Según la OMS, el pico de incidencia en el diagnóstico es entre la cuarta y la quinta década de vida sin predilección sexual. Para los casos con mutaciones de BFRAF V600E, el promedio de pacientes notificados es de unos 34 años, en comparación con unos 54 años para los casos tipo BRAF [4.]

8.2 Localización

Según la OMS, el 80% de todos los Ameloblastomas se encuentran en la mandíbula [4.] Un diente no erupcionado puede estar asociado al Ameloblastoma Sólido y la reabsorción de las raíces de los dientes adyacentes no es común.

El diagnóstico definitivo del AS no puede hacerse radiológicamente, puesto que las características son similares al tumor odontogénico queratoquístico, mixoma u odontoma [3].



Brad Neville, Oral and Maxilofacial Pathology, 4th edition.

Figura 8. Imagen que muestra la relativa distribución del ameloblastoma en las mandíbulas.

8.3 Histología

El tipo más común es el tipo folicular, que se asemeja al componente epitelial del órgano del esmalte dentro de un estroma fibroso; las células periféricas son columnares o cuboildales (se asemejan a ameloblastos presecretores) con núcleos hipercromáticos dispuestos en un patrón de empalizada con polaridad inversa. El núcleo central recuerda al retículo estrellado, con células angulares sueltas que a menudo sufren cambios de quísticos [4] (figura 10 y 11).

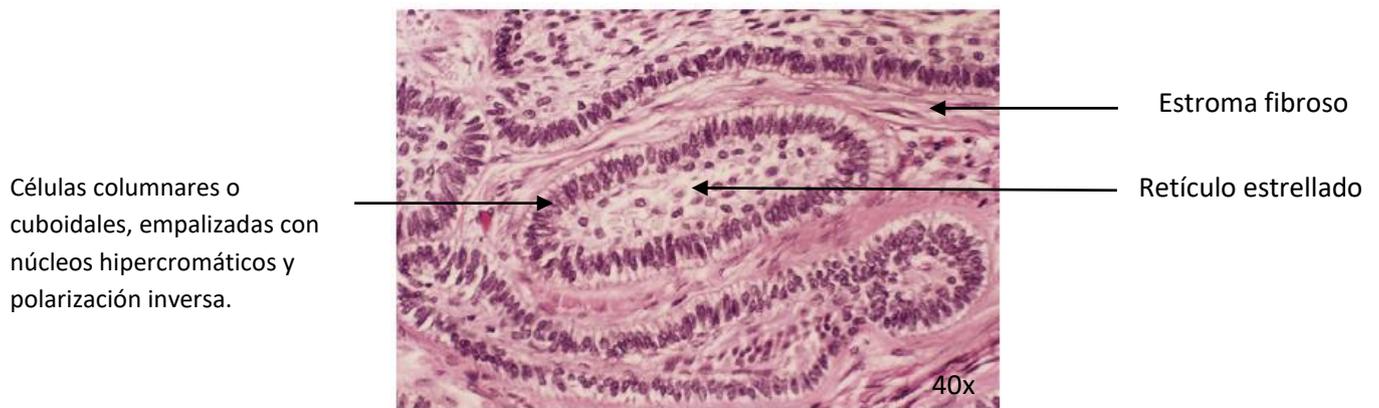


Figura 10. Fotografía tomada en microscopía óptica teñida con H&E donde se muestran las características clásicas del tipo folicular (Imagen tomada de Phillip Sapp Patología Oral)

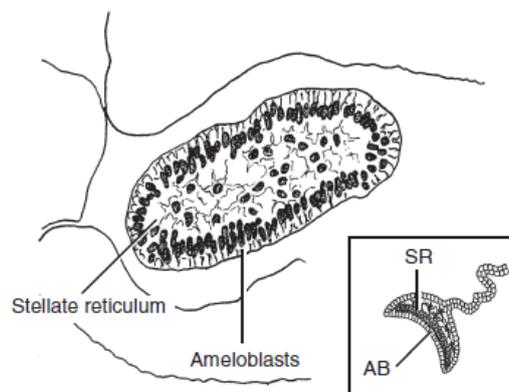


Figura 11. Dibujo en el que se muestra como el tumor recapitula la fase temprana de la campana de la odontogénesis (Imagen tomada de Phillip Sapp Patología Oral)

El segundo tipo más común es el tipo plexiforme, compuesto de hilos anastomozados de epitelio ameloblástico con sutil retículo estrellado y degeneración estromal quística [4] (figura 12).

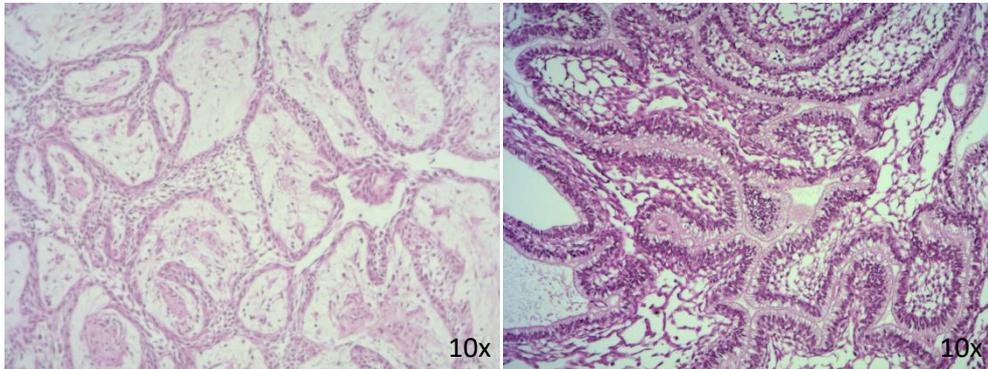


Figura 12. Fotografía tomada en microscopía óptica teñida con H&E donde se muestra el patrón plexiforme, obsérvese como se anastomosan los hilos de epitelio ameloblástico formando una especie de red o malla. (Imagen tomada en el Laboratorio de Investigación Odontológica Almaraz)

El patrón acantomatoso se asocia a menudo con la formación de la queratina, ocurre en las porciones centrales de las islas epiteliales de un ameloblastoma folicular.

Este cambio no indica un curso más agresivo para la lesión, histopatológicamente; sin embargo, tal lesión puede confundirse con carcinoma de células escamosas o tumor odontogénico escamoso [23] (figura 13). Finalmente debemos mencionar que también existen otros dos tipos menos comunes, el granular y el basiloide.

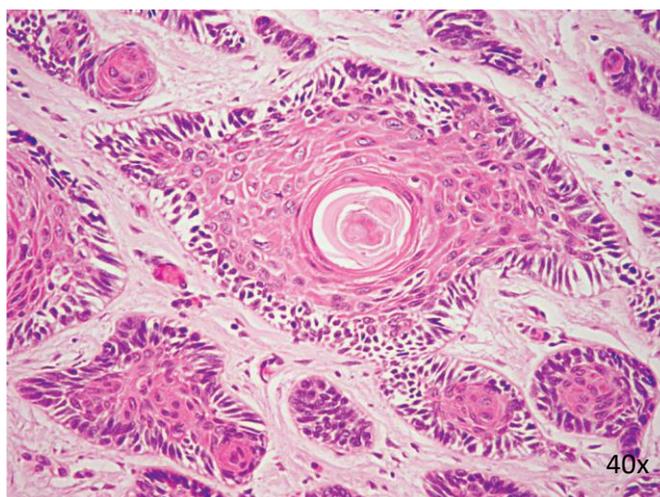


Figura 13. Fotografía tomada en microscopía óptica teñida con H&E donde se muestra el patrón acantomatoso de ameloblastoma, obsérvese las formaciones de queratina (Imagen tomada de Phillip Sapp Patología Oral) [23].

8.4 Ameloblastoma maligno y carcinoma ameloblástico

La frecuencia del comportamiento maligno en los ameloblastomas es difícil de determinar, pero probablemente ocurre en mucho menos del 1% de todos los ameloblastomas [23].

El término **ameloblastoma maligno** se utiliza para un tumor que muestra las características histopatológicas del ameloblastoma, tanto en el tumor primario como en los depósitos metastáticos. Se trata de una neoplasia muy rara, con menos de 30 casos bien documentados descritos en la literatura [23].

El término **carcinoma ameloblástico** debe reservarse para un ameloblastoma que tenga características citológicas de malignidad en el tumor primario, en una recurrencia o en cualquier depósito metastático. Esta es también una condición poco frecuente, aunque se han reportado aproximadamente 200 casos. Estas lesiones pueden seguir un curso local marcadamente agresivo, pero las metástasis no necesariamente ocurren [23].

Se han observado **ameloblastomas malignos** en pacientes con edades comprendidas entre los 6 y los 61 años (edad media, 30 años) y no se observa predilección sexual. En casi un tercio de los casos, las metástasis no se hacen aparentes hasta 10 años después del tratamiento del tumor primario. Los **carcinomas ameloblásticos**, por el contrario, tienden a desarrollarse más adelante en la vida, con la edad media en el diagnóstico típicamente en la sexta década de vida [23].

Los hombres se ven afectados dos veces más que las mujeres. Las metástasis de los ameloblastomas se encuentran con mayor frecuencia en los pulmones. Éstos se han considerado a veces como metástasis por aspiración o por implantación. Sin embargo, la localización periférica de algunas de estas metástasis pulmonares sugiere que deben haber ocurrido por vía sanguínea o linfática en lugar de aspiración. Los ganglios linfáticos cervicales son el segundo sitio más común para la metástasis de un ameloblastoma [23].

El pronóstico de los pacientes con ameloblastomas malignos parece ser pobre, pero la escasez de casos documentados con seguimiento a largo plazo no permite hacer suposiciones precisas. Alrededor del 50% de los pacientes con metástasis documentadas y seguimiento a largo plazo han muerto de su enfermedad [23].

9. Vías de señalización en el Ameloblastoma

Como se mencionó, los cambios y variantes histológicas no arrojan datos acerca de la patogenicidad, agresividad o recurrencia del ameloblastoma sólido.

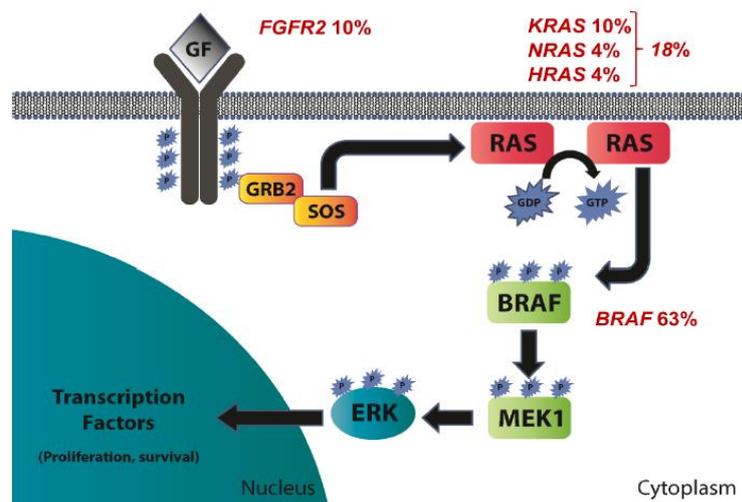
Por el contrario, es de gran utilidad conocer los cambios moleculares y genéticos asociados con el desarrollo y la progresión del ameloblastoma sólido, como son, oncogenes, genes supresores de tumores, factores de crecimiento, la telomerasa, control de los factores del ciclo celular, los factores relacionados

con la apoptosis, moléculas de adhesión celular, las proteinasas de la matriz, los factores angiogénicos y citoquinas osteolíticas [24].

Uno de los ejemplos de estos avances son los estudios realizados que comprueban que la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y sus componentes incluyendo la estimulación con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) 7 y de factores crecimiento de fibroblástico 7 y 10, juegan un papel destacado en la patogénesis del ameloblastoma. [26]

En 2014, tres informes separados identificaron mutaciones recurrentes de MAPK en el ameloblastoma [24, 25, 26] (figura 14).

La mutación más común identificada por primera vez fue BRAF V600E. Además de esta mutación en BRAF, dos estudios identificaron mutaciones que afectan a otros genes en la vía MAPK corriente arriba de BRAF (*KRAS*, *NRAS* y *HRAS*) [27, 28, 29].



Brown NA, Betz BL, Ameloblastoma: A Review of Recent Molecular Pathogenic Discoveries, 2015.

Figura 14. Esquema de la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) con frecuencias de mutación en el ameloblastoma basado en todos los estudios en los que se evaluó cada gen.

Otras vías de señalización destacadas en la expresión génica y los hallazgos inmunohistológicos de proteínas expresadas en los Ameloblastomas son la vía hedgehog, BRAF/RAS/MAPK, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), vías de señalización WNT y AKT. [30]

Por otro lado ciertas proteínas expresadas en los Ameloblastomas tales como Wilm's tumor 1 (WT1), GLUT-1, GLUT-3, carbonicanhydrase IX (CA IX), P63, ki-67, Syndecan-1 y α -SMA se han analizado y juegan un papel importante en la patogénesis, regulación metabólica, desarrollo, malignización, agresividad y recurrencia de los ameloblastomas. [31,32, 33, 34]

Se espera que el mejor conocimiento de estos cambios moleculares relacionados contribuirán a la comprensión de la evolución de los tumores odontogénicos y conducir al desarrollo de nuevos conceptos de manejo terapéutico [25].

A continuación se mostrarán los antecedentes de las herramientas moleculares para la realización del proyecto los cuales tienen sus bases en tecnologías de proteómica aplicadas a cáncer.

10. Antecedentes directos

Actualmente no existen antecedentes que caractericen el perfil proteico del Ameloblastoma Sólido sin embargo el acercamiento más acertado fue hecho por García Muñoz A, quien en 2014 analizó el perfil de expresión de proteínas en el Carcinoma Ameloblastico (ameloblastoma maligno), debido a que la mayoría de los casos de Carcinoma Ameloblastico se desarrollan a partir de un ameloblastoma benigno pre-existente, se tomó como tejido de control a tres ameloblastomas sólidos a los cuales se les aplico el mismo estudio [35].

Los objetivos de dichos estudio fueron identificar las proteínas diferencialmente expresadas en el Carcinoma Ameloblastico [25]. Ya que algunas de estas proteínas podrían estar situadas no sólo en el tumor, sino también podría quizás ser secretada al suero e incluso saliva, abriendo la posibilidad de nuevas herramientas de diagnóstico utilizando estos fluidos.

Además de proponer la posibilidad de analizar nuevas estrategias terapéuticas [35].

Para que esto se pueda llevar a cabo, la proteómica basada en la cromatografía multidimensional con espectrometría de masas (MS / MS) representa la tecnología principal usada para la identificación de las proteínas de la saliva [26].

Una revisión bibliográfica actualizada nos ha mostrado que hasta la fecha, se han compilado un total de 740 proteínas identificadas a partir de muestras de saliva total y ductal, de las cuales un total de 597 también están presentes en el proteoma del plasma humano [36].

Ryu O, Hu S y colaboradores aportan un antecedente importante de este avance científico en el que documentaron que los enfoques proteómicos basados en MS también han sido utilizado para identificar biomarcadores de saliva para el síndrome de Sjögren (SS), que es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por sequedad de los ojos y sequedad de boca [37, 38]

De igual manera Hu S, Streckfus, C. F y colaboradores utilizaron la proteómica para analizar saliva, en la búsqueda de biomarcadores para el cáncer oral (carcinoma escamocelular) y de mama encontrando así nuevos métodos no invasivos de diagnóstico y posibles blancos terapéuticos [39, 40].

11. Justificación

El ameloblastoma es una neoplasia benigna que rara vez causa metástasis, sin embargo es localmente invasiva y su agresividad es una de sus principales características, por esta razón los tratamientos para el ameloblastoma consisten en abordajes invasivos y resecciones en bloque que merman la calidad de vida del paciente.

En este estudio se realizó un perfil de moléculas expresadas en el ameloblastoma sólido usando electroforesis en una dimensión, que podrá ser utilizado en futuros proyectos con perspectivas de diagnósticos por medio de fluidos tales como saliva y plasma.

12. Hipótesis

Dados los distintos comportamientos observados entre Ameloblastomas Sólidos y Ameloblastomas Uniquísticos, se piensa que si se expresarán diferentes moléculas entre los distintos patrones histológicos del Ameloblastoma, debido a que ciertas moléculas pueden ser las responsables del comportamiento agresivo y la infiltración a tejidos adyacentes.

13. Objetivos

Objetivo General

- Obtener el perfil de proteínas expresadas en el ameloblastoma sólido y ameloblastoma uniquístico.

Objetivos Específicos:

- Obtener muestras de los tumores
- Extraer las proteínas de las muestras
- Obtener los perfiles de expresión en geles de poliacrilamida
- Examinas la expresión diferencial de proteínas en cada uno de los tumores
- Determinar si existe relación cualitativa y cuantitativa entre el comportamiento agresivo de estos tumores y las moléculas diferencialmente expresadas.

14. Materiales y Métodos

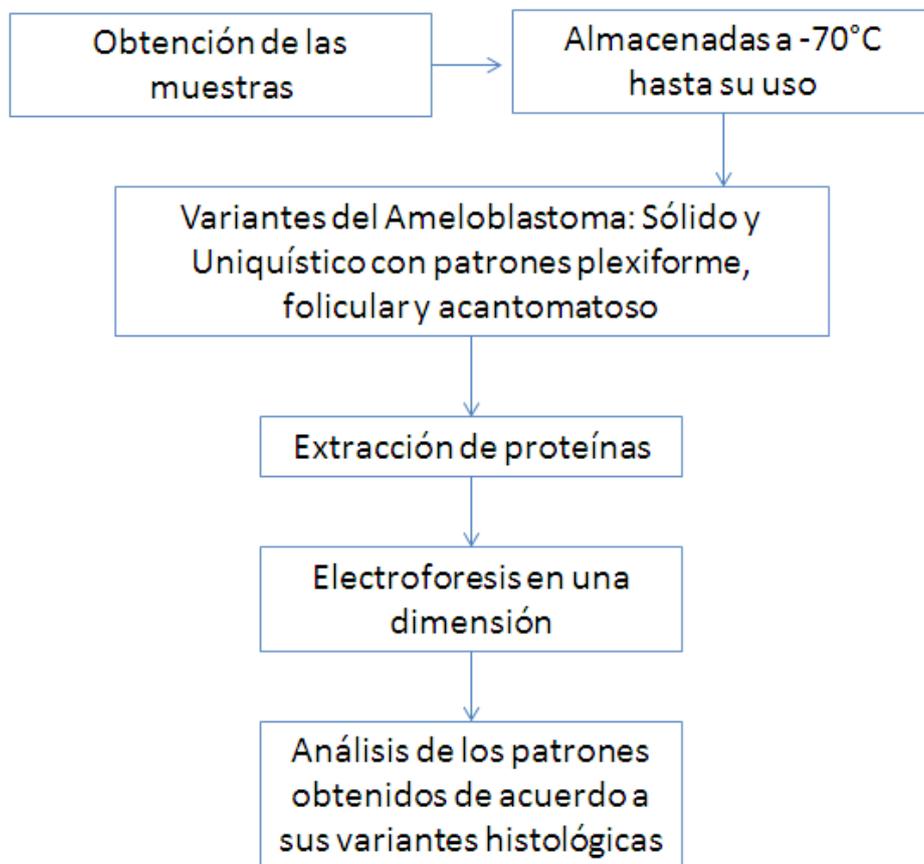


Figura 15. Esquema que muestra los pasos que se siguieron en el diseño experimental.

Obtención de las muestras

La recolección de muestras se realizó bajo el protocolo del comité de ética de la institución bajo el número de registro HJM1996/11.0308.

Dichas muestras de Ameloblastomas sólidos y uniuquisticos, fueron proporcionadas por el departamento de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

Muestras de tejido tumoral

Las muestras tumorales fueron tomadas inmediatamente después de que el tumor fue extirpado, para posteriormente ser lavadas con solución fisiológica con el fin de eliminar sangre y residuos contaminantes. Luego, las muestras se colocaron en nitrógeno líquido y se conservarán almacenadas a -80°C hasta su uso. Cabe mencionar que estas muestras fueron previamente diagnosticadas mediante biopsia por un especialista en diagnostico histopatológico del Hospital Juárez de México.

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Para obtener fotos de las muestras se realizaron cortes de 3 um de espesor con un micrótopo rotatorio; obteniendo cortes de cada una, estos cortes fueron montados en porta objetos previamente silanizados y codificados. Después se realizó el desparafinado de las muestras mediante incubación durante 20 minutos a 60°C en estufa.

Después de que se realizó la hidratación se colocó en solución de Hematoxilina por 5 minutos, a continuación se lavó con agua corriente y se realizaron de 15 a 20 baños en solución Scott (3.5g de bicarbonato de sodio, 20g de sulfato de magnesio, 1L de agua destilada) y después se colocó en agua corriente.

A continuación se colocó la solución de Eosina por 8 minutos y se continuó con la deshidratación.

Por último se montaron con Entella (medio de montaje para preparaciones), y se dejaron secar por una noche a temperatura ambiente y se observaron al microscopio óptico (Zeiss Lab. A1 Axio).

Procesamiento de las muestras para realizar el mapa proteómico

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

Electroforesis de las muestras en 1D

Para analizar el perfil proteico de las diferentes muestras, las proteínas se separaron por su peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS al 12% utilizando un sistema estándar de electroforesis vertical (15 cm × 13 cm) (Gibco BRL V16). La electroforesis se llevó a cabo manteniendo constante el voltaje a 100 voltios hasta que el frente de corrida alcance el borde inferior del gel. Finalmente, los geles se tiñieron con azul de Coomassie coloidal G250 (BIO-RAD).

Para comparar los patrones proteicos, se obtuvo una imagen digital de los geles mediante el software Image Melanie 2D viewer 7.0. La comparación de los perfiles proteicos que se realizó, fue entre las variantes del ameloblastoma (sólido y multiquístico).

Meta análisis de las proteínas expresadas en el Ameloblastoma

Por otro lado, se realizó una revisión en el laboratorio de investigación odontológica Almaraz de la FES Iztacala UNAM, de la literatura en idioma inglés de la plataforma de PubMed, de los genes expresados en el Ameloblastoma.

Se revisó el total de moléculas reportadas en artículos desde 1975 hasta marzo del 2017, agrupando cada una de ellas por su localización en los siguientes grupos: Nucleares, membrana plasmática, citoplasma y extracelulares. Posteriormente se hicieron 10 subgrupos de acuerdo a las funciones que realizan.

15. Resultados

Los resultados obtenidos en esta investigación se tienen gracias a que logramos aportar lo suficiente desde el punto de vista metodológico, principalmente la estandarización de la extracción y la purificación de proteínas, ya que al ser un experimento poco realizado el protocolo no se encontraba definido.

Teniendo las proteínas de la muestra exitosamente purificada y aislada mediante electroforesis en una dimensión, se corrieron en geles de poliacrilamida al 10%, un total de 4 ameloblastomas sólidos y tres ameloblastomas Uniquísticos las cuales fueron amablemente proporcionadas por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México. Cabe mencionar que teniendo estos dos tipos de ameloblastoma, también se clasificaron las muestras por su patrón histológico. Obteniendo así: Ameloblastoma Sólido patrón plexiforme, Ameloblastoma Sólido patrón Acantomatoso, Ameloblastoma Sólido patrón folicular, Ameloblastoma Sólido, Ameloblastoma Uniquístico mural patrón plexiforme, Ameloblastoma Uniquístico intraluminal patrón plexiforme, Ameloblastoma Uniquístico (figura 17).

Así mismo lo obtenido en nuestro meta análisis arrojó como resultado la identificación de 140 proteínas expresadas que juegan papeles sumamente importantes en el comportamiento clínico de este tumor. Del total de las proteínas identificadas; 46 se encontraron localizadas en el medio extracelular, 40 en la membrana plasmática, 33 en el núcleo y 25 en el citoplasma. Los subgrupos en los cuales fueron clasificadas fueron los siguientes: factores de transcripción, ciclo celular, proliferación, crecimiento, diferenciación, invasión, migración celular, adhesión celular, apoptosis, angiogénesis, involucradas en la recurrencia y la agresividad (figura 16).

Extracelulares	Membrana	Nucleo	Citoplasma	Extracelulares	Membrana	Nucleo
TGF-β1	p75 (NGF-R)	AEG-1	Braf	BMP-4	Perlecan	c-fos
TGF-α	Syndecan 1	Ki-67	p53	CCN2	UPA-R	APC
RANK-L	Podoplanin	Bcl-2	HSPs	Syndecan	CD133	Msx
BM4	RANK	PCNA	MEK	Ameloblastin	BMP-R	Dlx
VEGF-A	α-SMA	Ciclin D1	ERK	HGF	IGF- R	NOTCH ICD
WNT5	EGF-R	c-Myc	MDM2-3	SHH	FAS-L	RECK
EGF	PTCH	Sanail	AKT	IL1-IL6	Nestin	p16
NOTCH	SMO	Slug	JNK		Carbonic	
TRAIL	AMF-R	Twist	β-Catenin	Heparanase	Anhydrase ix	
Midkine	CD44	p38 MAPK	MAPK	SPAR	CD63	
Orosomucoid-1	Discoidin 1-2	c-Jun	SMAD-R	AMF	Integrins	
Braf-V600E	CD166	p63	Mtor	Kallikrenin	Disintegrins	
MMP'S	CD68	p53	HIF-1α	PDGF	HER	
vatP	CD34	p73	GLUT 1-3	FGF-L	C-MET	
CONTACTIN	CD10	PITX-2	COX-2	Von Willebrand		
TIMP'S	GLUT-1-3	SOX2	PTEN	Factor	E-CADHERIN	
Osteoprotegerin	N-WASP	β-Catenin	Vimentin	Nitric Oxide	Rho GTPase	
Vimentin	INVADOPODIA	HOX	Thymosin β4	HB-EGF	TNF-R II	
TNF-α	WIP	SMAD	Bcl2	FAS	CD56	
IFN-γ	Cytokeratin 18, 14	HIF-1α	Metallothionein		TSLC1	
HSPG	Glypicans	HIF-β	BH3 only		CD31	
Tenascin	Caveolin-1	Maspin	Cytochrome c		CD105	
Fibronectin	s-100	P16	AIF			
Type I collagen	Type IV Collagen	PTEN				

Mendoza Alvarez S, Laboratorio de investigación Odontológica Almaraz, 2017

Figura 16. Esquema que presenta las moléculas que se expresan en el ameloblastoma en donde el color amarillo muestra las moléculas extracelulares, el color azul las moléculas localizadas en la membrana celular, el color rojo las moléculas localizadas en el núcleo y en color gris las moléculas del citoplasma.

Como pudimos observar existen moléculas con papeles importantes para el desarrollo del AS, en este estudio observamos que las moléculas localizadas en la membrana plasmática las cuales se encargan de regular vías de señalización se encuentran mayoritariamente activas, representando un 32% de todas, por otro lado, el momento en que las moléculas ya se lograron trasladar al núcleo como son los factores de transcripción que regulan la expresión génica, pueden dar lugar a la expresión de otras proteínas extracelulares que activan ciertas funciones que en el ameloblastoma se traducen en agresividad, alta tasa de recurrencia e invasión local, así mismo éstas podrían ser dianas de diagnóstico, tratamiento, comportamiento biológico y pronóstico.

Por lo tanto podemos sugerir que las proteínas NOTCH-4 (209621.86), Osteoprotegerin (45996.08) y Syndecan-1 (32476.60), por sus pesos moleculares, podrían estar expresadas en nuestras muestras. Sin embargo hacen falta ensayos que validen estas teorías ya que no se conoce el perfil de expresión proteico de las variantes del ameloblastoma sólido.

A continuación explicaremos el análisis hecho en cada una de las muestras. En las bandas expresadas en los geles de poliacrilamida se pudo observar que si existe expresión diferencial de proteínas entre los distintos tipos de tumor y variante histológica, así mismo estas diferencias también están relacionadas con el tiempo de evolución del tumor y con la agresividad del mismo.

La primera muestra (panel 1) es de un AS plexiforme un tipo histológico que se caracteriza por ser más agresivo que otros, en el podemos observar 25 bandas de proteínas que van desde los 250kd a 25kd, dentro de esas 25 bandas encontramos que 5 de ellas se encuentran expresadas en mayor cantidad, la primera la ubicamos cerca de los 145kd, la segunda cerca de los 60kd, la tercera cerca de los 50kd, la cuarta cerca de los 43kd y la quinta cerca de los 30kd (Panel 1) (figura 17).

La segunda muestra (panel 2) es de un AS acantomatoso, en el podemos observar 24 bandas de proteínas que van desde los 250kd a 25kd, dentro de esas 24 bandas encontramos que el 90% de las bandas son anchas, esto nos dice que las proteínas se encuentran ligeramente sobreexpresadas (Panel 2).

La tercer muestra (panel 3) es de un AS folicular, el cual posee 20 bandas que representan las proteínas expresadas en el tumor que van de 250kd a 25kd, en esta muestra se puede apreciar que las proteínas que se encuentran por debajo de los 40kd se encuentran marcadas de manera más tenue que en las otras muestras, esto quiere decir que se encuentran subexpresadas.

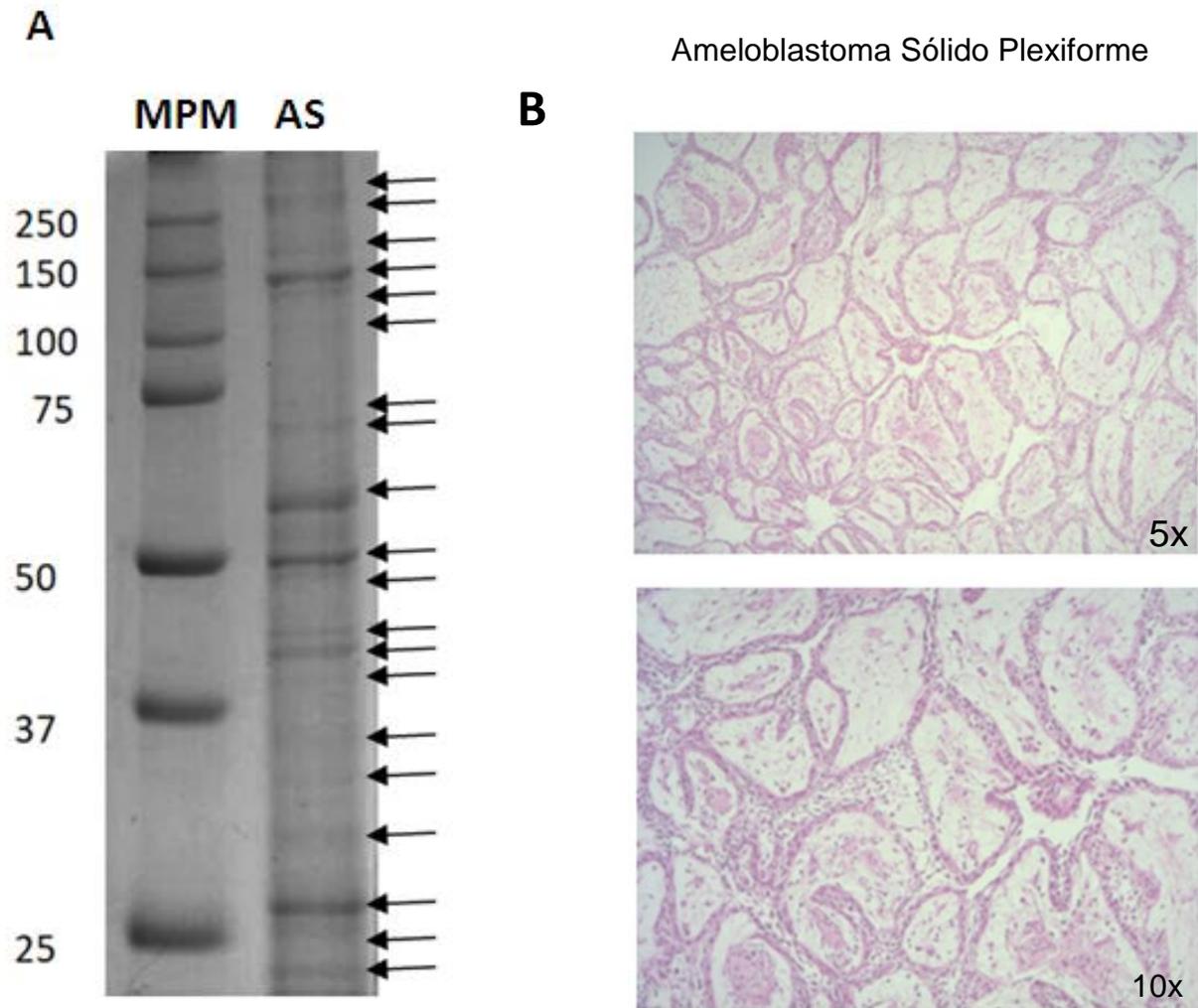
En la cuarta muestra (panel 4) podemos observar otro AS con la presencia de 20 bandas expresadas dentro del rango de 250kd a 25kd, en estas bandad podemos notar la presencia de 5 bandas características, la primera a la altura de los 44kd, la segunda cerca de los 40kd, la tercera cerca de los 32kd, la cuarta cerca de los 28kd y la quinta cerca de los 24kd (Panel 4).

En la quinta muestra podemos observar a un AU de tipo mural plexiforme que expresa 19 bandas, las cuales el 90% de ellas se encuentran sobre expresadas, estas bandas sobre expresadas se comparten también con el AS plexiforme a excepción de la que se encuentra a la altura de los 50kd, es probable que estas similitudes estén relacionadas a que comparten el mismo patrón histológico (Panel 5) (figura 17).

En la sexta muestra de AU intraluminal plexiforme (panel 6) podemos observar que se están expresando 19 bandas, cabe mencionar que también esta muestra comparte las mismas bandas con el AS plexiforme, con un patrón muy parecido que probablemente se debe a que comparten el mismo patrón plexiforme (Panel 6) (figura 17).

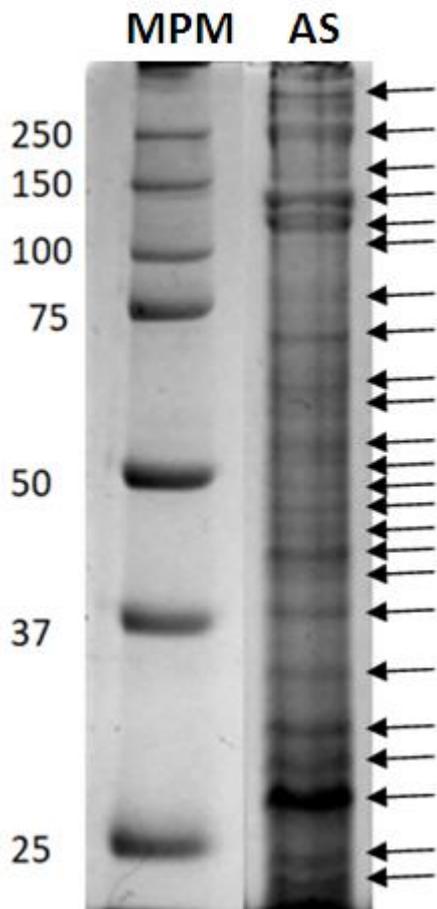
En la séptima y última muestra de AU se observan solo 17 bandas de las cuales solo el 50% se encuentran sobre expresadas, también podemos observar que las bandas no coinciden con los otros dos patrones anteriores.

Con base en los resultados obtenidos podemos darnos cuenta que existe una correlación entre los patrones histológicos del ameloblastoma que se discutirá a continuación.



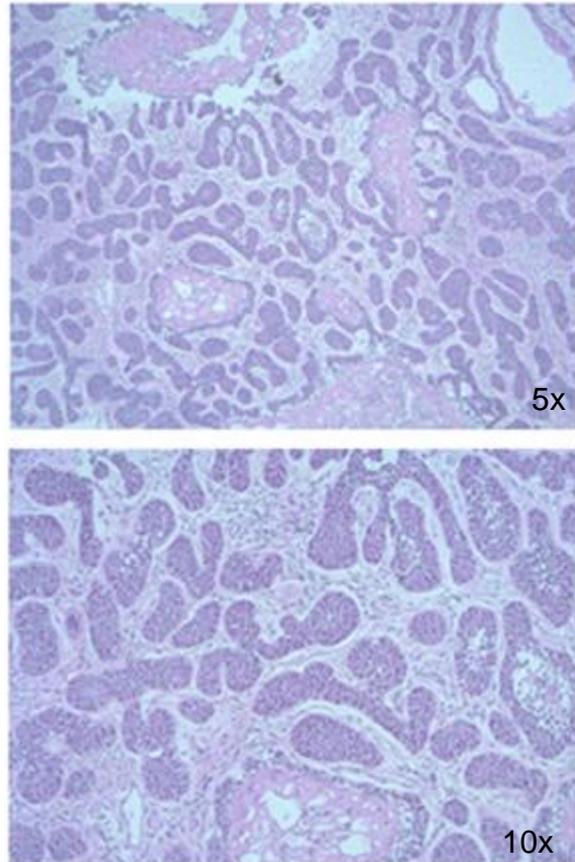
Panel 1. Ameloblastoma Sólido de tipo Plexiforme. A) Se aprecia el corrimiento electroforético de la muestra, en el primer carril (lado izquierdo) se muestra el marcador de peso molecular con pesos de 250kd a 25kd, en el segundo carril (lado derecho) se encuentran marcadas por las flechas las 20 bandas que representan las proteínas expresadas del tumor. B) Se muestra el corte histológico con tinción de hematoxilina y eosina de la misma muestra, pudiendo apreciar el patrón plexiforme del Ameloblastoma.

A

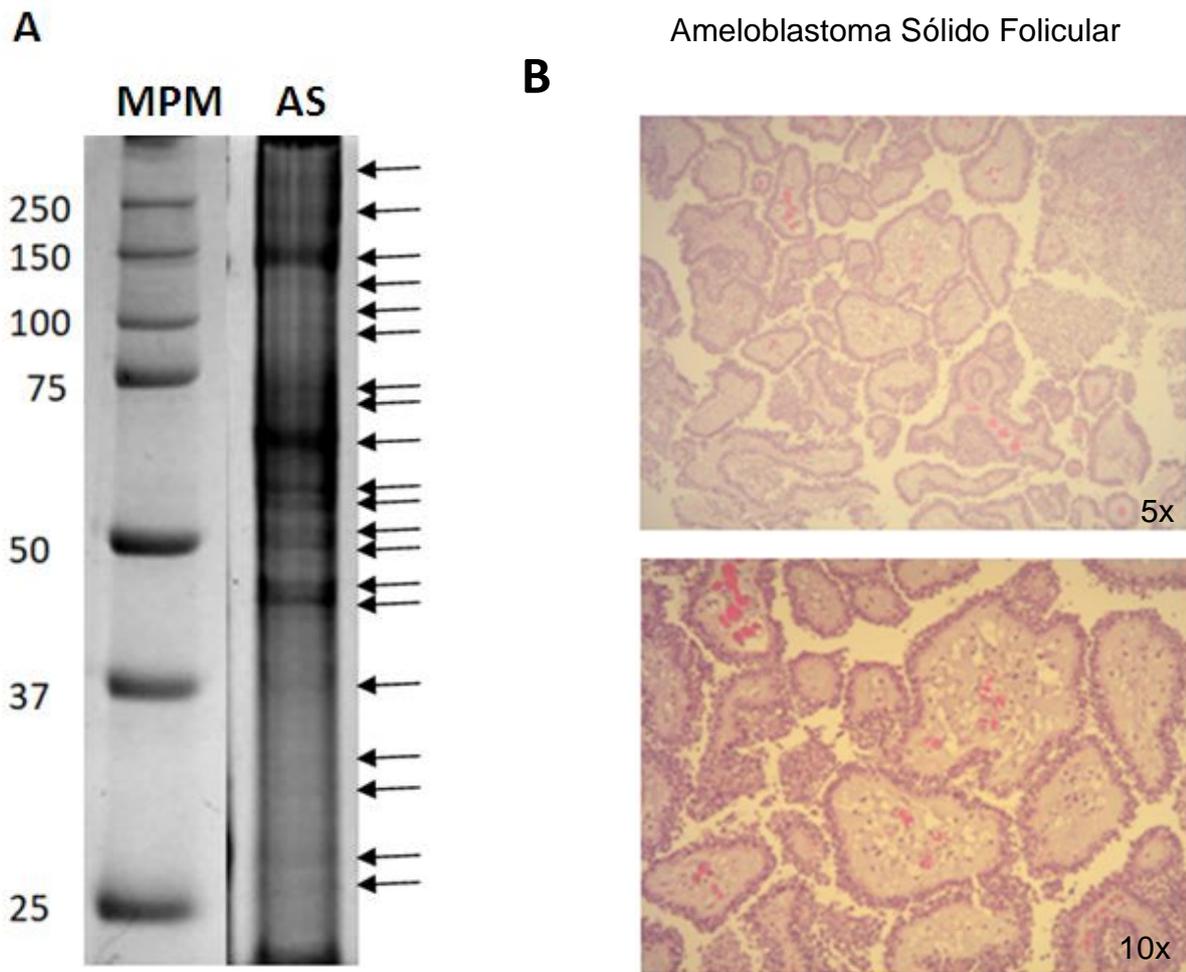


Ameloblastoma Sólido Acantomatoso

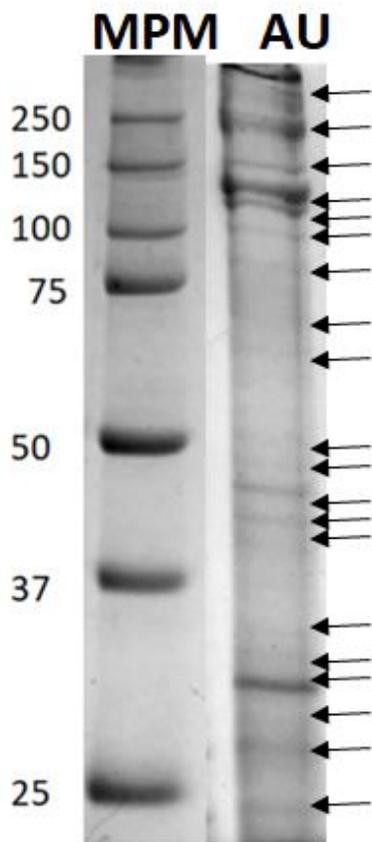
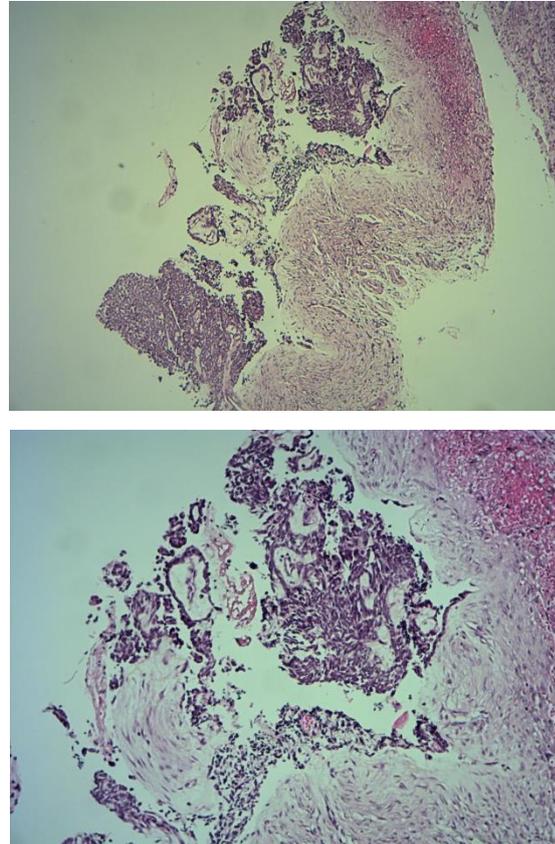
B



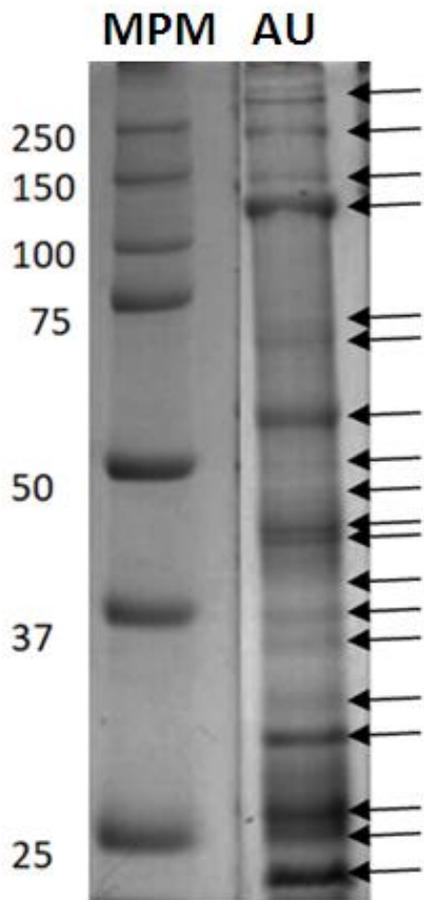
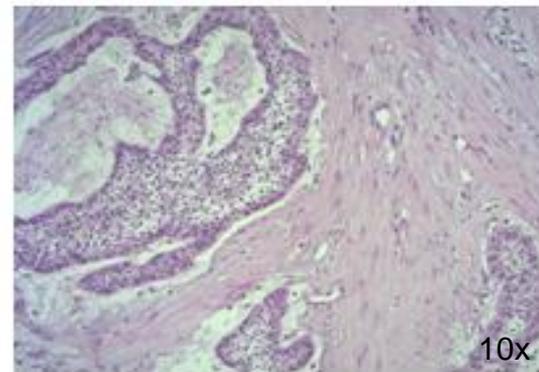
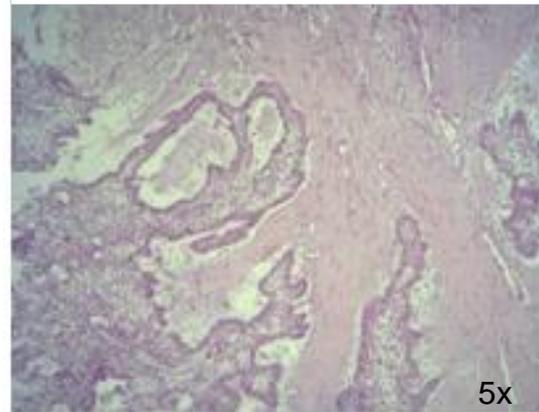
Panel 2. Ameloblastoma Sólido de tipo acantomatoso. A) Se aprecia el corrimiento electroforético de la muestra, en el primer carril (lado izquierdo) se muestra el marcador de peso molecular con pesos de 250kd a 25kd, en el segundo carril (lado derecho) se encuentran marcadas por las flechas las 24 bandas que representan las proteínas expresadas del tumor. B) Se muestra el corte histológico con tinción de hematoxilina y eosina de la misma muestra, pudiendo apreciar el patrón acantomatoso del Ameloblastoma.



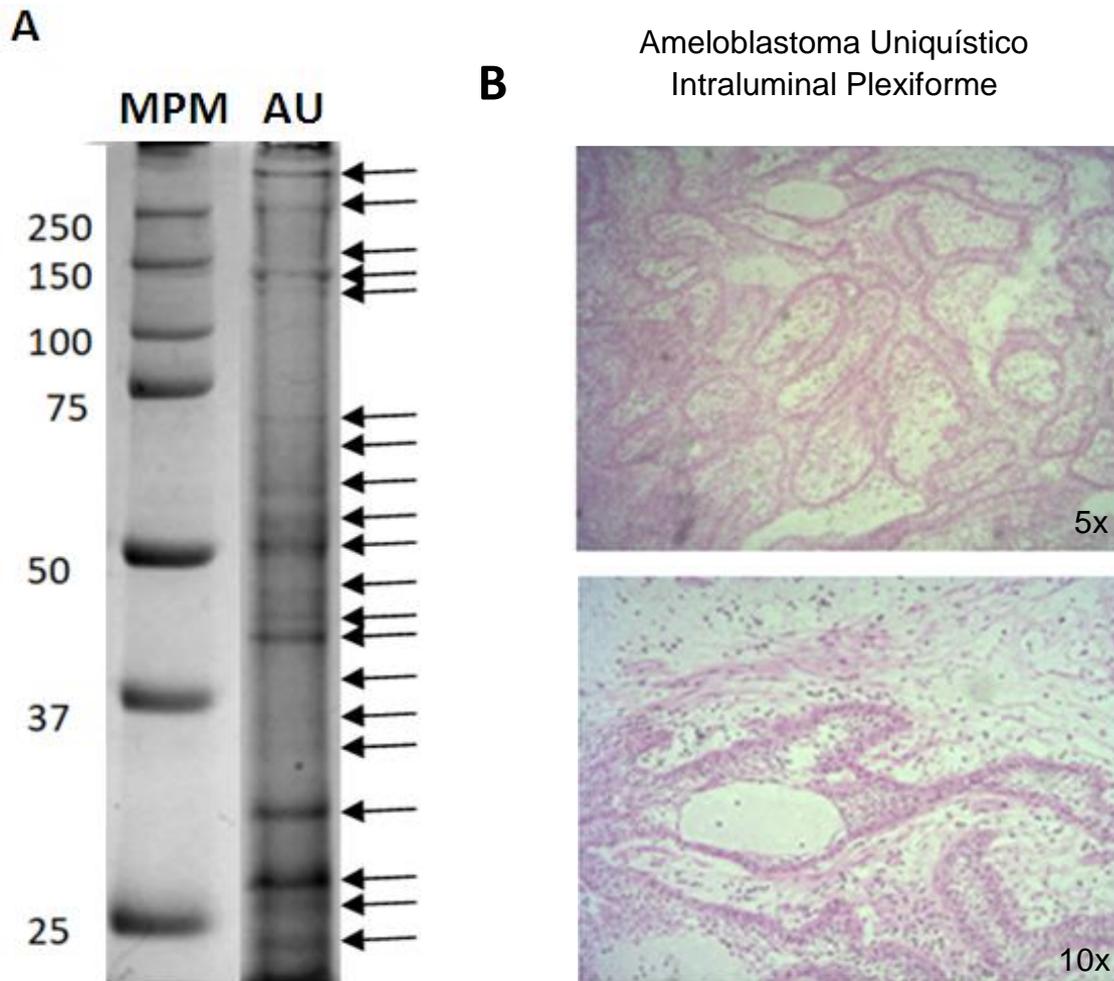
Panel 3. Ameloblastoma Sólido de tipo folicular. A) Se aprecia el corrimiento electroforético de la muestra, en el primer carril (lado izquierdo) se muestra el marcador de peso molecular con pesos de 250kd a 25kd, en el segundo carril (lado derecho) se encuentran marcadas por las flechas las 20 bandas que representan las proteínas expresadas del tumor. B) Muestra el corte histológico con tinción de hematoxilina y eosina de la misma muestra, pudiendo apreciar el patrón folicular del Ameloblastoma.

A**Ameloblastoma Sólido****B**

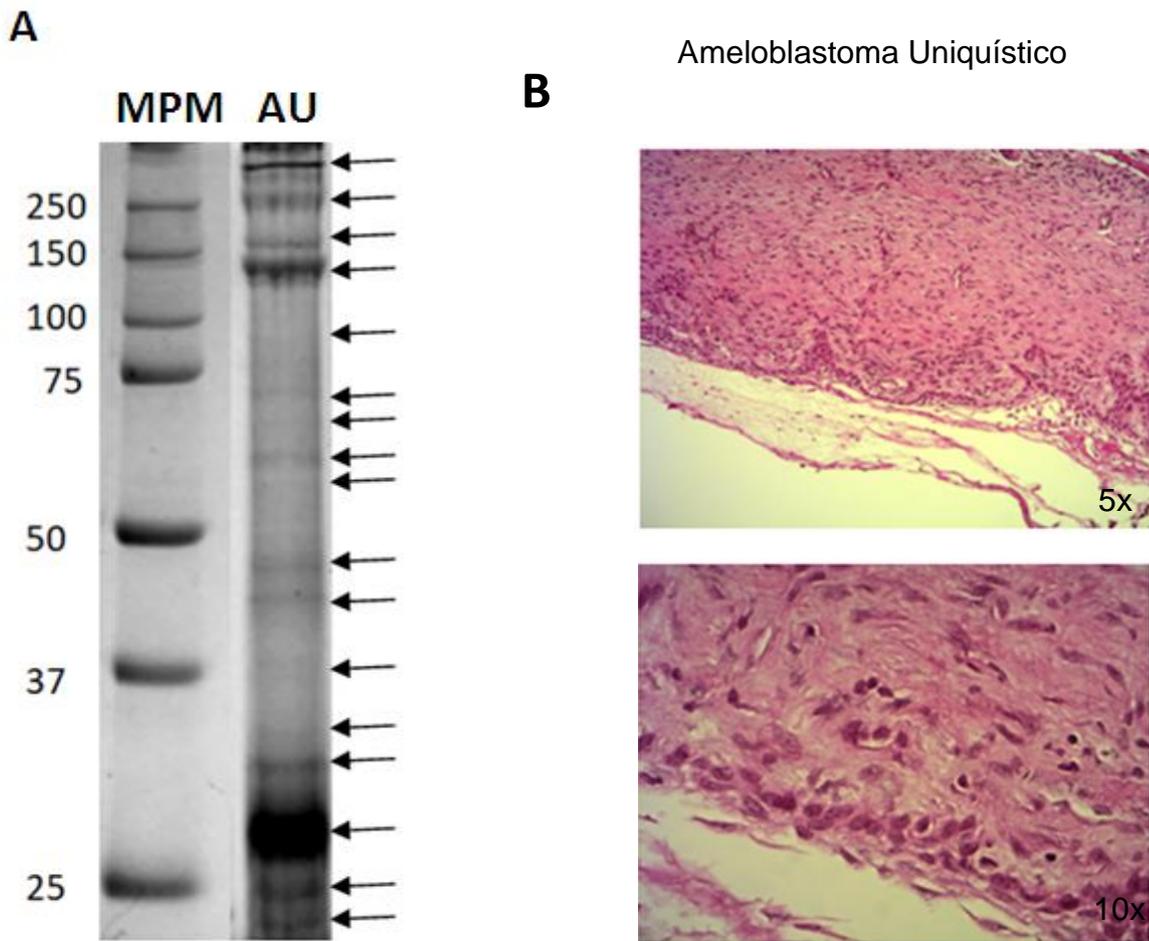
Panel 4. Ameloblastoma Sólido. A) Se aprecia el corrimiento electroforético de la muestra, en el primer carril (lado izquierdo) se muestra el marcador de peso molecular con pesos de 250kd a 25kd, en el segundo carril (lado derecho) se encuentran marcadas por las flechas las 20 bandas que representan las proteínas expresadas del tumor. B) Muestra el corte histológico con tinción de hematoxilina y eosina de la misma muestra, pudiendo apreciar el patrón Sólido Ameloblastoma.

A**B**Ameloblastoma Uniquístico Mural
Plexiforme

Panel 5. Ameloblastoma Uniquístico Mural de tipo plexiforme. A) Se aprecia el corrimiento electroforético de la muestra, en el primer carril (lado izquierdo) se muestra el marcador de peso molecular con pesos de 250kd a 25kd, en el segundo carril (lado derecho) se encuentran marcadas por las flechas las 19 bandas que representan las proteínas expresadas del tumor. B) Se muestra el corte histológico con tinción de hematoxilina y eosina de la misma muestra, pudiendo apreciar el patrón plexiforme del Ameloblastoma Uniquístico.



Panel 6. Ameloblastoma Uniquístico Intraluminal de tipo plexiforme. A) Se aprecia el corrimiento electroforético de la muestra, en el primer carril (lado izquierdo) se muestra el marcador de peso molecular con pesos de 250kd a 25kd, en el segundo carril (lado derecho) se encuentran marcadas por las flechas las 19 bandas que representan las proteínas expresadas del tumor. B) Muestra el corte histológico con tinción de hematoxilina y eosina de la misma muestra, pudiendo apreciar el patrón intraluminal del Ameloblastoma Uniquístico.



Panel 7. Ameloblastoma Uniquístico. A) Se aprecia el corrimiento electroforético de la muestra, en el primer carril (lado izquierdo) se muestra el marcador de peso molecular con pesos de 250kd a 25kd, en el segundo carril (lado derecho) se encuentran marcadas por las flechas las 17 bandas que representan las proteínas expresadas del tumor. B) Muestra el corte histológico con tinción de hematoxilina y eosina de la misma muestra donde se aprecia su tipo Uniquístico.

Una vez obtenidos los geles en una dimensión se analizaron los patrones proteicos con el software Image Melanie 2D viewer 7.0.

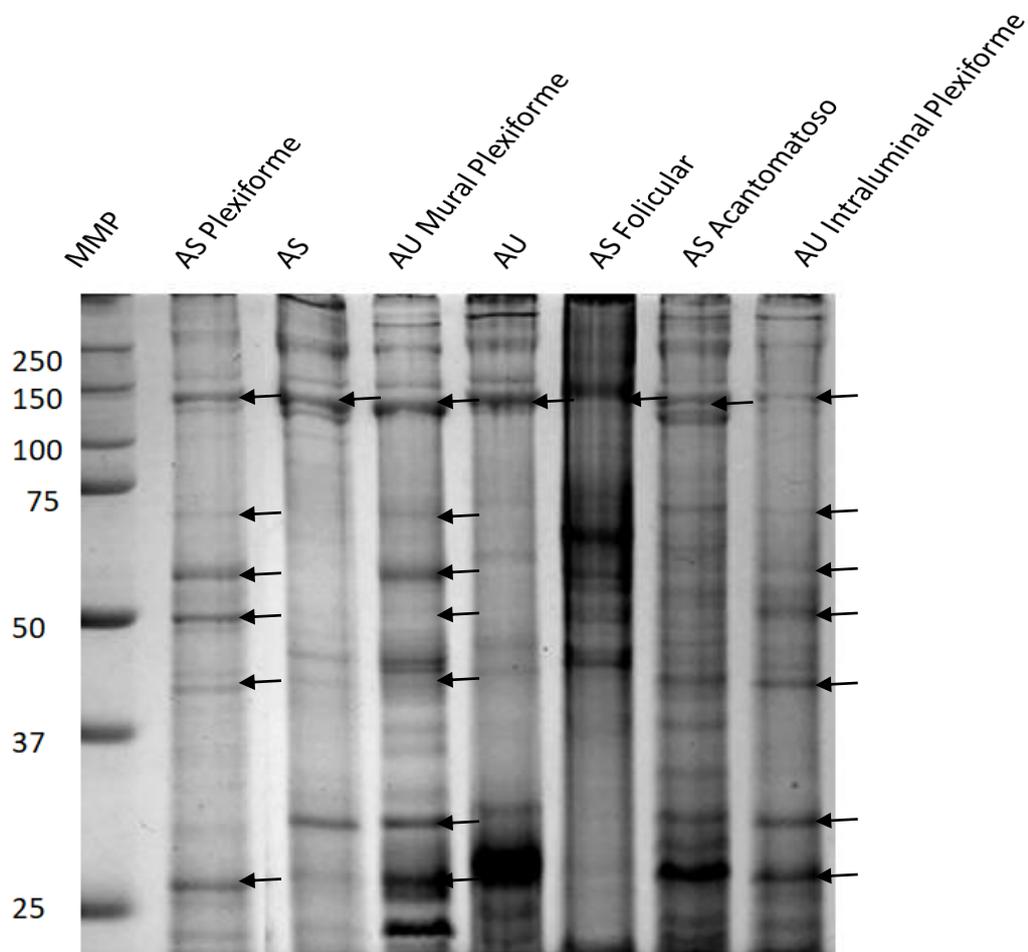


Figura 17. Gel de poliacrilamida donde se observan las diferentes proteínas expresadas en las 7 muestras, (AS) Ameloblastoma Sólido, (AU) Ameloblastoma Uniquístico, los cuales muestran los patrones plexiforme, folicular, acantomatoso y demoplásico. Nótese las similitudes entre los patrones plexiformes de los Ameloblastomas, además de las proteínas de alto peso molecular que comparten todas las muestras.

16. Discusión

Como ya se mencionó, las variantes más comunes del ameloblastoma son; la variante sólido/multiquístico y la variante Uniquístico, esta dos variantes cuentan con diferencias histológicas y clínicas tales como: agresividad, invasión local y potencial de malignidad.

Estas diferencias han sido observadas a lo largo de los años por los investigadores, sin embargo se desconocen los mecanismos moleculares que promueven estas características.

Desde la primera descripción del ameloblastoma (antes adamantioma) hecha por Broca, los investigadores se han sentido intrigados por este tumor, comenzando así a estudiarlo primeramente por microscopía en el año de 1946. [41].

En de década de los 80 se implementó una técnica de inmunofluorescencia y autores como Vedtofte P (1981) la utilizaron para estudiar el ameloblastoma [42]. También Knapp y colaboradores, en 1982 se utilizaron por primera vez la herramienta inmunohistoquímica para tratar de describir el ameloblastoma metastásico [43]. Pero no fue hasta 1985 que Sauk y colaboradores, utilizaron la herramienta inmunohistoquímica para la identificación de componentes de la membrana basal y filamentos intermedios en un tumor odontogénico [44].

Desde entonces los investigadores han tratado de dilucidar el comportamiento del Ameloblastoma desde el punto de vista molecular, hallando e identificando ciertas moléculas específicamente expresadas en el tumor.

En el presente estudio se encontraron todas proteínas expresadas en un rango de 250kD a 25kD, en los diferentes tipos de ameloblastomas, es decir, se obtuvo un mapa molecular mucho más amplio, por lo tanto se sugiere que estas moléculas encontradas en mayor o menor cantidad pueden ser las responsables de la agresividad, invasión y potencial maligno.

Estas moléculas fueron localizadas gracias a las técnicas de proteómica implementadas por primera vez a tumores odontogénicos en 2012 por García-Muñoz y colaboradores las cuales en ese momento se utilizaron para comparar

el perfil proteico de la proteína en los mixomas odontogénicos frente a los folículos dentales [45]. Gracias a esto también nosotros pudimos hacer comparaciones proteicas en Ameloblastoma Sólido y Ameloblastoma Uniquístico.

Las moléculas expresadas en el presente estudio, como ya se mencionó, creemos que pueden estar jugando un papel importante en invasión, la agresividad y potencial maligno del tumor, así mismo están relacionadas con los patrones histológicos de las muestras. Por lo cual consideramos importante seguir realizando este tipo de ensayos que enriquezcan los resultados obtenidos.

17. Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta investigación podrán servir como referencia para futuras investigaciones debido a que logramos aportar lo suficiente desde el punto de vista metodológico, principalmente la estandarización de la extracción y purificación de proteínas ya que al ser un experimento poco realizado el protocolo no se encontraba definido. Así mismo los resultados arrojaron proteínas diferencialmente expresadas que en un futuro deben ser analizadas para encontrar su identidad e identificar el papel que tienen en la patogenicidad del ameloblastoma. Por otro lado nuestra investigación es una de las muchas que, se realizarán para elucidar el mapa proteómico de los tumores odontogénicos con el fin de obtener diagnósticos oportunos por medio de fluidos corporales como la saliva y componentes como la sangre.

18. Conclusión

Los perfiles proteicos de los diferentes tipos de Ameloblastomas que obtuvimos nos sugieren que se están expresando las mismas proteínas en los patrones desmoplásicos sin importar si son AS o AU, pudiendo ser posible que estas proteínas sean las responsables de la agresividad y alto grado de invasión que caracteriza a este tumor, aún más específico, a este patrón histológico, además de ser uno de los tumores odontogénicos más comunes. Aun así se requiere

de más estudios que validen los ya realizados, así mismo las herramientas moleculares enfocadas a la proteómica deben ser consideradas ya que son de suma importancia para el progreso de las perspectivas ya mencionadas.

19. Bibliografía

- [1] Kumar V, Abbas AK and Aster JA. Robbins Basic Pathology, 9th edition, Elsevier, Philadelphia 2012.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan-Feb
- [3] Leon Barnes, John W. Eveson. World Health Organization, OMS, Classification of Tumors - Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors (Lyon 2005), pp 296.
- [4] Adel K. El-Naggar, John K.C. Chan, Jennifer R. Grandis, Takashi Takata, Pieter J. Slootweg. WHO Classification of Head and Neck Tumours. International Agency for Research on Cancer. 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France (2017)
- [5] Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci.* 2009;5(3):226-43
- [6] Noden DM, Schneider RA. Neural crest cells and the community of plan for craniofacial development: historical debates and current perspectives. *Adv Exp Med Biol.*
- [7] Ohazama A, Haworth KE, Ota MS, Khonsari RH, Sharpe PT. Ectoderm, endoderm, and the evolution of heterodont dentitions. *Genesis.* 2010;48:382-389), (Soukup V, Epperlein HH, Horacek I, Cerny R. Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature.* 2008;455:795-798
- [8] Gómez de Ferraris, M. E. (2009) *En e. e Histología. México: Médica Panamericana.* (Zohrabian, V. M. (2015). Embriology and anatomy of the jaw and dentition. In *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* (vol. 36, No. 5, pp. 397-406) WB Saunders
- [9] Avery, J. K. (2017) *Principios de histología y embriología bucal con orientación clínica*
- [10] Daniel J. Chiego Jr. *Principios de Histología y Embriología Bucal con Orientación Clínica, Cuarta Edición, 2014 Elsevier España.*
- [11] Diniz MG, Gomes CC, de Sousa SF, Xavier GM, Gomez RS. Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncol.* 2017 Sep;72:165-173. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.07.021.

- [12] Avelar RL, Primo BT, Pinheiro-Nogueira CB, Studart-Soares EC, de Oliveira RB, Romulo de Medeiros J, Hernandez PA. Worldwide incidence of odontogenic tumors. *J Craniofac Surg*. 2011 Nov;22
- [13] Al Sheddi MA, Al Senani MA, Al Dosari AW. Odontogenic tumors: analysis of 188 cases from Saudi Arabia. *Ann Saudi Med*. 2015 Mar-Apr;35(2):146-50.
- [14] Servato JP, Prieto-Oliveira P, de Faria PR, Loyola AM, Cardoso SV. Odontogenic tumours: 240 cases diagnosed over 31 years at a Brazilian university and a review of international literature. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Feb;42(2):288-93.
- [15] Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruíz-Godoy Rivera LM, Meneses-García A. Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod*. 1997 Dec; 84(6):672-5.
- [16] Oomens MA, van der Waal I. Epidemiology of ameloblastomas of the jaws; a report from the Netherlands. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014 Nov
- [17] Fregnani ER, da Cruz Perez DE, de Almeida OP, Kowalski LP, Soares FA, de Abreu Alves F. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39:145-9.
- [18] Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M, *Histological typing of odontogenic tumours*, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin, 1992, pp 11.
- [19] Ledesma-Montes C, Mosqueda-Taylor A, Carlos-Bregni R, et al. Ameloblastomas: a regional Latin-American multicentric study. *Oral diseases* 2007;13:303-7.
- [20] Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995;31B:86-99
- [21] Reichart PA, Philipsen HP. *Odontogenic Tumours and Allied Lesions*. London: Quintessence Publishing Co Ltd; 2004. pp.17.
- [22] Ghandhi D AA, Pogrel MA, MacDonald G, Brocklebank LM, Moos KF. Ameloblastoma: A surgeon's dilemma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006;64:1010-14.
- [23] Neville, Damm, Allen, Chi. *Oral and Maxillofacial Pathology*. Fourth edition. ELSEVIER. 2016.
- [24] Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K, *p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14 proteins in ameloblastomas*, *J Oral Pathol Med*, 2004, 33(5):292-299.
- [25] ALMA FLORESCU, CRISTIANA SIMIONESCU, P53, Bcl-2 and Ki67 immunoexpression in follicular solid ameloblastomas, *Rom J MorpholEmbryol*2012, 53(1):105-109

- [26] Nakao Y, Mitsuyasu T, Kawano S, Nakamura N, Kanda S, Nakamura S. Fibroblast growth factors 7 and 10 are involved in ameloblastoma proliferation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol.* 2013;43(5): 1377–1384.
- [27] Kurppa KJ, Catón J, Morgan PR, et al. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol.* 2014; 232(5):492–498.
- [28] Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, et al. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat Genet.* 2014; 46(7):722–725.
- [29] Brown NA, Rolland D, McHugh JB, et al. Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20(21):5517–5526.
- [30] Amm HM, MacDougall M, Molecular Signaling in Benign Odontogenic Neoplasia Pathogenesis, *Curr Oral Health Rep.* 2016 Jun.
- [31] Bologna-Molina R, Takeda Y, Kuga T, Chosa N, Kitagawa M, Takata T, Ishisaki A, Mikami T. Expression of Wilms' tumor 1 (WT1) in ameloblastomas. *J Oral Sci.* 2016;58(3):407-13.
- [32] Vasconcelos RC, de Oliveira Moura JM, Lacerda Brasileiro Junior V, da Silveira ÉJ, de Souza LB. Immunohistochemical expression of GLUT-1, GLUT-3, and carbonicanhydrase IX in benign odontogenic lesions. *J Oral Pathol Med.* 2016Oct;45(9):712-717.
- [33] Jaafari-Ashkavandi Z, Geramizadeh B, Ranjbar MA. P63 and Ki-67 Expression in Dentigerous Cyst and Ameloblastomas. *J Dent (Shiraz).* 2015 Dec;16(4):323-8.
- [34] Safadi RA, Quda BF, Hammad HM. Immunohistochemical expression of K6, K8, K16, K17, K19, maspin, syndecan-1 (CD138), α -SMA, and Ki-67 in ameloblastoma and ameloblastic carcinoma: diagnostic and prognostic correlations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016 Apr;121(4):402-11.
- [35] Alejandro GarcíaMuñoz, Ronell Bologna Molina, Beatriz Aldape Barrios, Carlos Liceaga Escalera, Identification of Proteins With Increased Levels in Ameloblastic Carcinoma, *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons J Oral Maxillofac Surg* 72:1183-1196, 2014
- [36] Gregory J. Seymour, Mary P. Cullinan, Nicholas C.K. Heng. *Oral Biology, Molecular Techniques and Applications.* Springer Science+Business Media, LLC 2010
- [37] Ryu, O. H., Atkinson, J. C., Hoehn, G.T., Illei, G. G., and Hart, T. C. (2006) Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference
- [38] Hu, S., Wang, J., Meijer, J., Jeong, S., Xie, Y., Yu, T., Zhou, H., Henry, S., Vissink, A., Pijpe, J., Kallenberg, C., Elashoff, D., Loo, J. A., and Wong, D. T. (2007) Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 56, 3588–3600.

- [39] Hu, S., Arellano, M., Boontheung, P., Wang, J., Zhou, H., Jiang, J., Elashoff, D., Wei, R., Loo, J. A., and Wong, D. T. (2008) Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6246–6252
- [40] Streckfus, C. F., Mayorga-Wark, O., Arreola, D., Edwards, C., Bigler, L., and Dubinsky, W. P. (2008) Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Invest.* 159–167.
- [41] Thoma KH, Goldman HM. Odontogenic Tumors: A Classification Based on Observations of the Epithelial, Mesenchymal, and Mixed Varieties. *Am J Pathol.* 1946 May;22(3):433-71
- [42] Vedtofte P, Dabelsteen E. Receptors for the lectins wheat germ. Ricinus communis I and soybean in ameloblastomas and normal oral mucosa. *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1981 Nov;89(6):439-49.)(Vedtofte P, Dabelsteen E. Distribution of blood group antigens A, B and H in ameloblastomas. *Scand J Dent Res.* 1981 Oct;89(5):424-32.
- [43] Knapp RH, Wick MR, Scheithauer BW, Unni KK. Adamantinoma of bone. An electron microscopic and study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1982;398(1):75-86
- [44] Sauk JJ, Cocking-Johnson D, Warings M. Identification of basement membrane components and intermediate filaments in calcifying epithelial odontogenic tumors. *J Oral Pathol.* 1985 Feb;14(2):133-40
- [45] García-Muñoz A, Rodríguez MA, Bologna-Molina R, Cázares-Raga FE, Hernández-Hernández FC, Farfán-Morales JE, Trujillo JJ, Licéaga-Escalera C, Mendoza-Hernández G. The orosomuroid 1 protein (α 1 acid glycoprotein) is overexpressed in odontogenic myxoma. *Proteome Sci.* 2012 Aug 13;10(1):49.