



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

“Microarreglo y análisis bioinformático de
ameloblastoma convencional”

Trabajo de investigación

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Especialista en Patología Bucal

P R E S E N T A:

C.D. LUIS ALBERTO MARTÍNEZ MARCIAL

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN
ASESORA: Mtra. CARLA MONSERRAT RAMÍREZ MARTÍNEZ

Cd. Mx. Junio de 2022



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

Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Objetivo	6
Materiales y método	6
Selección de casos ameloblastoma convencional.	6
Extracción RNA y microarreglo de ADNc.	7
Análisis de enriquecimiento funcional	8
Interacción proteína-proteína (IPP)	8
Selección y análisis de hub para genes	8
Ensayo e interpretación de inmunohistoquímica	9
Análisis estadístico	10
Resultados	11
Identificación de la ontología de genes expresados diferencialmente (GED) y análisis de la ruta de genes y genomas de Kyoto (KEGG)	11
Red de IPP y análisis modular	13
Análisis de genes centrales usando Kaplan-Meier plotter y GEPIA	14
Análisis de expresión génica e inmunohistoquímica y de IL2RA y PDGFA	16
Discusión	17
Conclusión	21
Referencias	22

Resumen

Antecedentes: El ameloblastoma es un tumor odontogénico benigno localmente invasivo, con potencial de recurrencia clasificado como un tumor agresivo. **Objetivo:** Identificar genes críticos del ameloblastoma convencional utilizando análisis de microarreglos y bioinformática. **Materiales y métodos:** Se realizó un análisis de microarreglos de expresión génica para ameloblastoma convencional, posteriormente utilizamos el software DAVID para su enriquecimiento de ontología génica y rutas del KEGG. Las interacciones proteína-proteína (IPP) entre genes sobre expresados diferencialmente se visualizaron utilizando STRING. La red IPP se analizó utilizando Cytoscape, para sus subsecuentes análisis con Kaplan-Meier online y GEPIA determinando su relación con supervivencia. Para validar los genes candidatos resultantes se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en una población independiente. **Resultados:** Un total de 376 genes estaban regulados positivamente, con enriquecimiento asociado con división celular, regulación de señalización fosfatidilinositol 3-cinasa y regulación de actividad MAP cinasa. El análisis IPP mostró 14 genes agrupados, los cuales a ser analizados mediante Kaplan-Meier y GEPIA, se identificó al factor de crecimiento derivado de plaquetas A (PDGFA) y subunidad alfa del receptor de interleucina 2 (IL2RA). El análisis inmunohistoquímico mostró expresión intensa para IL2RA en parénquima y estroma tumoral, mientras PDGFA mostró expresión moderadamente localizada en parénquima. **Conclusión:** A través del empleo de métodos de microarreglos génicos y bioinformáticos integrados logramos identificar a PDGFA e IL2RA como genes diferencialmente expresados significativamente asociados a mal pronóstico en ameloblastoma convencional. Su inmunoexpresión reveló que PDGFA es un mejor blanco terapéutico. Por lo cual investigaciones relacionadas son necesarias para determinar el alcance de este nuevo conocimiento.

Palabras clave: Ameloblastoma, bioinformática microarreglo, IL2RA y PDGFA

Abstract

Background: Ameloblastoma is a locally invasive benign odontogenic tumor with recurrence potential as an aggressive tumor. **Objective:** To identify critical genes of conventional ameloblastoma using microarray analysis and bioinformatics. **Materials and methods:** An analysis of gene expression microarrays for conventional ameloblastoma was carried out, later we used the DAVID software for its enrichment of gene ontology and KEGG. Protein-protein interactions (PPI) between differentially overexpressed genes were visualized using STRING. The PPI network was analyzed using Cytoscape, for subsequent analyzes with Kaplan-Meier online and GEPIA, determining its relationship with survival. To validate the resulting candidate genes, immunohistochemical assays were performed on an independent population. **Results:** A total of 376 genes were upregulated, with enrichment associated with cell division, regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling, and regulation of MAP kinase activity. The PPI analysis showed 14 clustered genes, which, upon analysis by Kaplan-Meier and GEPIA, identified platelet-derived growth factor A (PDGFA) and interleukin 2 receptor alpha subunit (IL2RA). Immunohistochemical analysis showed intense expression for IL2RA in tumor parenchyma and stroma, while PDGFA showed moderately localized expression in parenchyma. **Conclusion:** By integrated gene microarray and bioinformatics methods, we were able to identify PDGFA and IL2RA as differentially expressed genes significantly associated with poor prognosis in conventional ameloblastoma. Its immunoexpression revealed that PDGFA is a better therapeutic target. Therefore, related research is necessary to determine the scope of this new knowledge.

Key Words: Ameloblastoma, Bioinformatic, microarray, IL2RA and PDGFA

Introducción.

Los tumores odontogénicos (TO) son lesiones orales que impactan significativamente la calidad de vida de los pacientes, ya que afectan no solo a los dientes sino también al maxilar y la mandíbula. Los TO constituye un grupo heterogéneo de enfermedades que van desde lesiones hamartomatosas hasta neoplasias benignas y malignas con potencial metastásico. Estos se derivan del epitelio, ectomesénquima y/o elementos mesenquimales del aparato encargado de la odontogénesis (1).

La epidemiología de los TO varía en diferentes regiones del mundo; en algunos países el TO más frecuente es el ameloblastoma (Hong Kong, Japón, Zimbabue y Nigeria), mientras que en otros (Estados Unidos de América, Brasil y Canadá) el tumor más frecuente es el odontoma (1,2). En México, el TO más común es el odontoma, seguido del ameloblastoma, el mixoma, los tumores odontogénicos adenomatoideos y los quistes odontogénicos calcificantes (3).

El ameloblastoma es un TO benigno localmente invasivo de crecimiento lento con diferentes variantes histológicas, que puede localizarse en la zona posterior de la mandíbula o el maxilar. Debido a su potencial de recurrencia, a menudo se clasifica como un tumor agresivo. Se estima que la incidencia mundial de ameloblastoma es de 0.5 casos por millón de personas por año, con una edad de diagnóstico que oscila entre los 30 y los 60 años. El ameloblastoma convencional (AC) es la variante más frecuente, seguida del ameloblastoma uniuístico, periférico y desmoplásico. Aunque se desconoce la etiología precisa de la AC, se especula que la desregulación de varios genes asociados con la odontogénesis juega un papel importante en su histogénesis (2,4). Se ha postulado que algunos cambios en la expresión o mutaciones en genes como BRAF, Ras, FGFR2 y SMO, entre otros, pueden estar asociados a su histogénesis (5,6). Debido a la complejidad en

su histogénesis, los ensayos de alto rendimiento ofrecen una alternativa para el análisis de esta neoplasia de manera integral. La tecnología de microarreglos se ha utilizado para obtener información sobre las alteraciones genéticas que ocurren en varias enfermedades, incluidas neoplasias como AC. Los métodos bioinformáticos integrados a los microarreglos permiten explorar e identificar biomarcadores que podrían ayudarnos a seguir estudiando y desentrañar los mecanismos subyacentes a la patogenia de las enfermedades (7,8).

Objetivo

Identificar nuevos genes candidatos útiles como blancos terapéuticos utilizando tecnología de microarreglos y análisis bioinformático para el pronóstico y tratamiento del AC.

Materiales y método

Selección de casos ameloblastoma convencional.

Las muestras de AC se recuperaron del archivo histopatológico desde el año 2009 al 2018 a partir de bloques de parafina del Departamento de Patología y Medicina Bucal, de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, de la Facultad de Odontología, UNAM. El diagnóstico se confirmó con base en la clasificación histológica de TO de la OMS de 2017 (2). Se obtuvieron un total de 15 AC y 16 muestras de folículos dentales los cuales se emplearon como grupo control. De todas las muestras se obtuvieron datos de edad, género y zona anatómica. Los AC fueron evaluados para determinar su patrón histológico.

Extracción RNA y microarreglo de ADNc.

Se obtuvieron cortes de parafina con el tejido muestra del estudio a un espesor de 50 μm para cada muestra y grupo control. La extracción de ARN se realizó con el kit Miniprep System ReliaPrep™ FFPE (Z1002, Promega, Madison, WI, EE. UU.) según instrucciones del fabricante. Se realizó la desparafinación con aceite mineral a 80 °C durante 1 min, seguido de la adición de 100 μL de Buffer de lisis, para ser centrifugado a 10.000 $\times\text{g}$ durante 15 segundos, posteriormente se adiciono 10 μL de proteinasa K, para llevarlo a incubación con 56 °C durante 15 min, e incubación a 80 °C durante 1 hora. A continuación, se agregaron 30 μL de Mix DNAasa directamente al sedimento y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron un total de 325 μL de Buffer BL y 200 μL de isopropanol con una concentración al 100 % en la muestra lisada antes de agitar en vórtex y centrifugar a 10 000 $\times\text{g}$ durante 15 segundos. Toda la fase inferior (acuosa) se transfirió a una columna de unión colocada en un tubo y el ensamblaje se centrifugó a 10 000 $\times\text{g}$ durante 30 segundos, se realizaron dos lavados con 500 μL de solución de lavado 1 X y se centrifugó a 10 000 $\times\text{g}$ durante 30 segundos. La columna se centrifugo a 16 000 $\times\text{g}$ durante 3 minutos para secar, el ARN se eluyó en 50 μl de agua libre de nucleasas mediante centrifugación a 16 000 $\times\text{g}$ durante 1 min. La concentración y la pureza del ARN se determinaron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher, Rochester, NY, EE. UU.) acorde a lo reportado (9). Para obtener una mayor concentración de ARN, las muestras de AC y folículo fueron agrupadas en dos muestras, una muestra problema y un control, alcanzando la concentración de 1 μg para cada una.

Se utilizó el servicio de microarreglos de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (10). El ADNc del grupo control compuesto por los folículos dentales se marcó con Alexa 555, y el de AC se marcó con Alexa 647, seguido de su mezcla e hibridación mediante

GeneChip Human Mapping 10K Array (CHIP H10KA_07_38, AFFYMETRIX, Santa Clara, CA). Los datos de cuantificación para el microarreglo de las imágenes del chip se analizaron utilizando el software genArise, y se identificaron los genes sobrerregulados en AC respecto al control. Se utilizó un valor de corte Z-Score de > 2.0 .

Análisis de enriquecimiento funcional

La lista de genes se analizó en la plataforma DAVID 6.8, disponible en línea: <https://david.ncifcrf.gov> (11). Para analizar las funciones de los genes expresados diferencialmente (GED), se realizaron análisis de enriquecimiento y ontología de genes mediante la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) y la ontología de genes (GO), que incluyeron principalmente el proceso biológico (PB), la función molecular (FM) y componente celular (CC). La significancia estadística se fijó en $p < 0.05$.

Interacción proteína-proteína (IPP)

La herramienta de búsqueda para la recuperación de genes que interactúan entre sí (STRING) versión 11.0, <http://string-db.org/>; se utilizó para predecir las redes de interacción proteína-proteína (IPP) de los GED (12). A continuación, se utilizó el software Cytoscape para analizar la interacción combinada de > 0.4 (<http://cytoscape.org>). Finalmente, se utilizó la detección complementaria de complejos moleculares (MCODE) para seleccionar el módulo más significativo en las redes de IPP con la puntuación MCODE $>$, corte de grado = 2, corte de puntuación de nodo = 0.2, k-core 2 y profundidad máxima = 100.

Selección y análisis de genes centrales

Los genes centrales se seleccionaron a partir de los genes agrupados con una puntuación en MCODE ≥ 2.5 , posteriormente se analizó el efecto de estos genes centrales sobre el tiempo de supervivencia total con ayuda de

Kaplan-Meier plotter (KM plotter, <http://kmplot.com/analysis>) ajustando el umbral de seguimiento a 60 meses conforme lo reportado (13).

Para la validación los genes significativamente relacionados con la supervivencia, utilizamos el análisis interactivo de perfiles de expresión génica (GEPIA Online: <http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) (14) para analizar datos relacionados con la expresión de ARN en miles de muestras dentro de los proyectos Genotype-Tissue Expression (GTEx) y The Cancer Genome Atlas (TCGA). Las bases de datos del carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello empleadas para el comparativo de los genes candidatos (14).

Ensayo e interpretación de inmunohistoquímica

En una muestra independiente de 5 casos de AC, se realizó los ensayos de inmunohistoquímica para PDGFA e IL2RA. De cada espécimen se obtuvieron cortes a 4 μ m colocados en tres portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Se desparafino y rehidrato de manera convencional en lavados con xilol y alcohol. La recuperación de antígenos se realizó en buffer de citrato 10 mM incubados en microondas a 700 W durante 3 min y 30 s. La peroxidasa endógena se inhibió con peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 min (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). El fondo inespecífico se bloqueó con 100 μ l de albúmina al 2 % durante 20 min (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), a continuación, se agregaron 100 μ l de X-100 Triton al 0.2 % durante 20 min (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Se incubó con anticuerpos primarios para PDGFA (Santa Cruz Biotechnology, sc-9974, Santa Cruz, California, EE. UU.) y para IL2RA (Santa Cruz Biotechnology, sc-665) en concentraciones ajustadas de 1:200 durante la noche a 4 °C en cámara húmeda. Los controles negativos se produjeron por omisión de anticuerpos primarios y se sustituyeron con PBS (9).

Después de la incubación se eliminaron los anticuerpos primarios lavando con PBS para posteriormente adicionar el inmunodetector biotinilado e incubar durante 10 minutos (Bio SB, BSB 0007, Santa Bárbara, California, EE. UU.). A continuación, se lavó con PBS e incubó con Inmunodetector HRP durante 10 min. Los inmunocomplejos se visualizaron a través de la incubación con diaminobencidina (DAB) durante 1 min, contrastando por 1 min con hematoxilina de Mayer. Los especímenes se observaron utilizando un microscopio Leica DM750.

Para el análisis de cada marcador, se obtuvieron fotomicrografías de 5 campos ópticos a 400x de cada muestra utilizando una cámara Leica ICC50 HD. La intensidad de la tinción se obtuvo mediante el método semicuantitativo considerando la gradificación como: negativo, leve, moderada y intensa a nivel de parénquima y estroma tumoral.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los genes sobrerregulados por medio del programa GenArise se empleó la prueba de Benjamini & Hochberg considerando Z-Score de > 2.0 , con una $P < 0.05$. Las variables clínicas demográficas de edad, género y zona anatómica fueron analizadas descriptivamente, obteniendo media y desviación estándar para la edad.

Resultados

La distribución por género fue de 9 hombres y 6 mujeres. La edad media se estableció en 37.8 ± 17.7 años. Doce ameloblastomas convencionales presentaron patrón folicular y 3 plexiformes. Todos los especímenes se ubicaron en mandíbula.

Aunque se encontró que la calidad de las muestras de ARN era alta, la cantidad de ARN era insuficiente para realizar análisis de microarreglos independientes. Por lo tanto, las muestras de ARN de ameloblastoma y folículo dental se agruparon en un concentrado particular, es decir, un concentrado de ameloblastoma y otro de folículo dental.

Identificación de la ontología de GED

Se identificaron un total de 376 genes regulados al alza. Todos los genes fueron analizados mediante el software DAVID y los resultados del análisis GO indicaron que los procesos biológicos (PB) se enriquecieron particularmente en la regulación positiva de la división celular, regulación de la señalización de fosfatidilinositol 3-cinasa, morfogénesis de las glándulas salivales, regulación positiva de actividad MAP cinasa, regulación positiva de la proliferación de células mesenquimales, entre otros. Las funciones moleculares (FM) se enriquecieron principalmente en actividad de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa, actividad de factor de intercambio de guanil-nucleótido Ras, actividad de factores de crecimiento, actividad de proteína tirosina cinasa y actividad de heterodimerización de proteína, entre otros. Por último, respecto a los componentes celulares (CC)

enriquecieron bioinformaticamente la región extracelular, la membrana, el espacio extracelular, el complejo del factor de transcripción y el complejo de flotilina (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de genes diferenciales expresados asociados con ameloblastoma

Ontología	Descripción	Conteo	Valor P	FDR
PB	GO:0051781~regulación positiva de ciclo celular	6	4.12E-06	0.0022802
PB	GO:0014066~ regulación de la señalización de fosfatidilinositol 3-cinasa	22	3.13E-05	0.00865839
PB	GO:0060445~ ramificación implicada en la morfogénesis de las glándulas salivales	4	2.85E-04	0.03155322
PB	GO:0043406~ regulación positiva de la actividad MAP-cinasa	15	3.44E-04	0.03171901
PB	GO:0002053~ regulación positiva de la proliferación de células mesenquimales	4	0.00164912	0.13028075
PB	GO:0000122~ regulación negativa de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	8	0.00592798	0.36424165
PB	GO:0060665~ regulación de la ramificación involucrada en la morfogénesis de las glándulas salivales mediante señalización mesenquimatosa-epitelial	3	0.00925865	0.45943785
PB	GO:0009611~ respuesta positiva a las heridas	4	0.00938832	0.45943785
PB	GO:0001525~angiogenesis	5	0.0148601	0.5106253
PB	GO:0008543~ vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos	4	0.01552901	0.5106253
CC	GO:0005576~región extracelular	17	6.48E-04	0.04653223
CC	GO:0016020~membrana	19	7.45E-04	0.04653223
CC	GO:0005615~espacio extracelular	15	0.00258885	0.10786879
CC	GO:0005667~ complejo del factor de transcripción	9	0.00927696	0.28990486
CC	GO:0016600~complejo de flotilin	7	0.02007113	0.50177824
FM	GO: 0046934 ~ actividad de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa	7	1.11E-05	0.00162983
FM	GO: 0005088 ~ Actividad del factor de intercambio de nucleótido de guanilo Ras	7	1.26E-04	0.00927298
FM	GO:0008083~actividad del factor de crecimiento	7	4.68E-04	0.02292204
FM	GO: 0004713 ~ actividad de la proteína tirosina cinasa	6	0.00329741	0.1082232
FM	GO:0046982~actividad de heterodimerización de proteínas	8	0.00368106	0.1082232
FM	GO:0008201~unión de heparina	6	0.00552787	0.13543269

FM	GO: 0019903 ~ unión a proteína fosfatasa	3	0.008	0.185
			83842	60683
FM	GO: 0019904 ~ unión específica de dominio de proteína	6	0.011	0.208
			32918	1737
FM	GO:0008134~unión del factor de transcripción	6	0.025	0.404
			76728	42461
FM	GO:0051393~unión alfa-actinina	4	0.028	0.404
			8818	42461

El análisis KEGG, indicó que las vías de genes regulados al alza estaban particularmente enriquecidos en las vías relacionadas con cáncer, señalización de PI3K-Akt y Jak-STAT (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de vías génicas de diferenciales expresados asociados con ameloblastoma mediante KEGG

Termino	Con teo	Valor de P	Genes	FDR
hsa05215: Cáncer de próstata	7	0.0033 7144	PDGFA, CTNNB1, ERBB2, FGFR1, FOS, DVL2, FZD4	0.15462 207
hsa04015: Vía de señalización de Rap1	6	0.0055 4887	PDGFA, CTNNB1, VEGFD, FGF7, FGFR1, PAK1	0.15462 207
hsa04151: Vía de señalización de PI3K-Akt	9	0.0059 47	IL2RA, GH1, PDGFA, VEGFD, FGF7, FGFR1, NDP, IKBKG, AKT3	0.15462 207
hsa05200: Vías de señalización en cáncer	12	0.0102 2767	PDGFA, CTNNB1, VEGFD, FGF7, FGFR1, ERBB2, POU5F1, GREM1, NBL, FZD4, GRB2	0.19943 962
hsa04630: Vía de señalización Jak-STAT	9	0.0134 2465	IL2RA, GH1, IL13, IL11RA, MPL, THPO, THBD, STAT1, JAK3	0.20942 45
hsa05218: Melanoma	4	0.0250 4124	PDGFA, FGF7, FGFR1, PIN1	0.27903 096
hsa04520: Uniones adherentes	3	0.0250 4124	CTNNB1, ERBB2, CD70	0.27903 096
hsa04510: Adhesión focal	8	0.0337 1729	PDGFA, CTNNB1, FGFR1, VEGFD, ERBB2, THPO, THBD, MRC2	0.32874 36
hsa04014: Vía de señalización de Ras	5	0.0426 0335	PDGFA, VEGFD, FGF7, FGFR1, TIAM	0.36922 906

Red de IPP y análisis modular

Se importaron un total de 31 GED derivados de las vías de señalización enriquecidas (Fig. 1a). Estos genes se incluyeron en 29 nodos y 68 bordes,

generando el complejo de red IPP. El posterior análisis de la red IPP por Cytoscape-MCODE reveló 25 nodos y 68 bordes, con 20 genes agrupados (Fig. 1b).

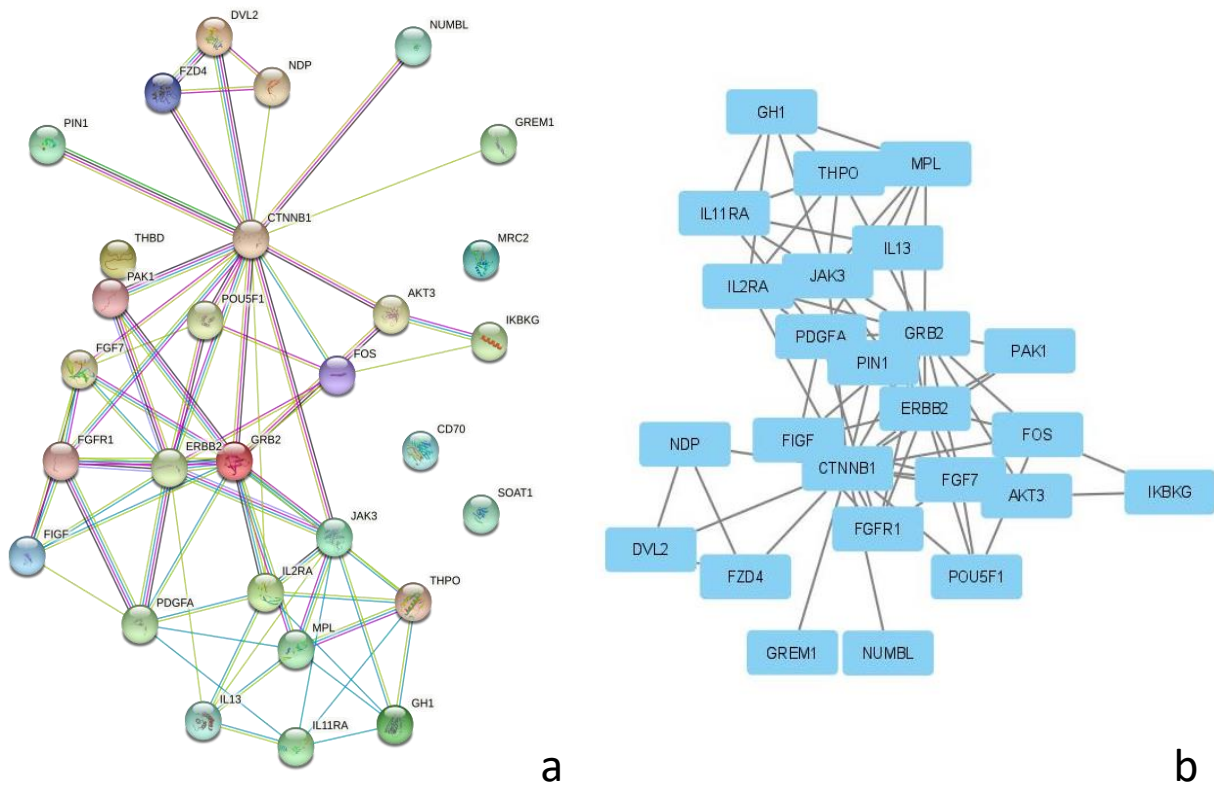


Figura 1. IPP de los genes expresados diferencialmente. a) Red de GED por STRING y b) análisis del software Cytoscape.

Análisis de genes centrales usando Kaplan-Meier plotter y GEPIA

Se utilizó un trazador de Kaplan-Meier plotter para identificar datos de supervivencia de los 20 genes agrupados por MCODE. Solo nueve genes se asociaron significativamente con una supervivencia total. Posteriormente, mediante la plataforma GEPIA se validó estos nueve genes, identificando únicamente al factor de crecimiento derivado de plaquetas A (PDGFA) y a

la subunidad alfa del receptor de interleucina 2 (IL2RA) con una correlación significativa (Fig.3 y Tabla 3).

Figura 3. Análisis de supervivencia de genes centrales. a) Curvas Kaplan Meier significativas de supervivencia global y b) Análisis de validación mediante GEPIA de genes centrales.

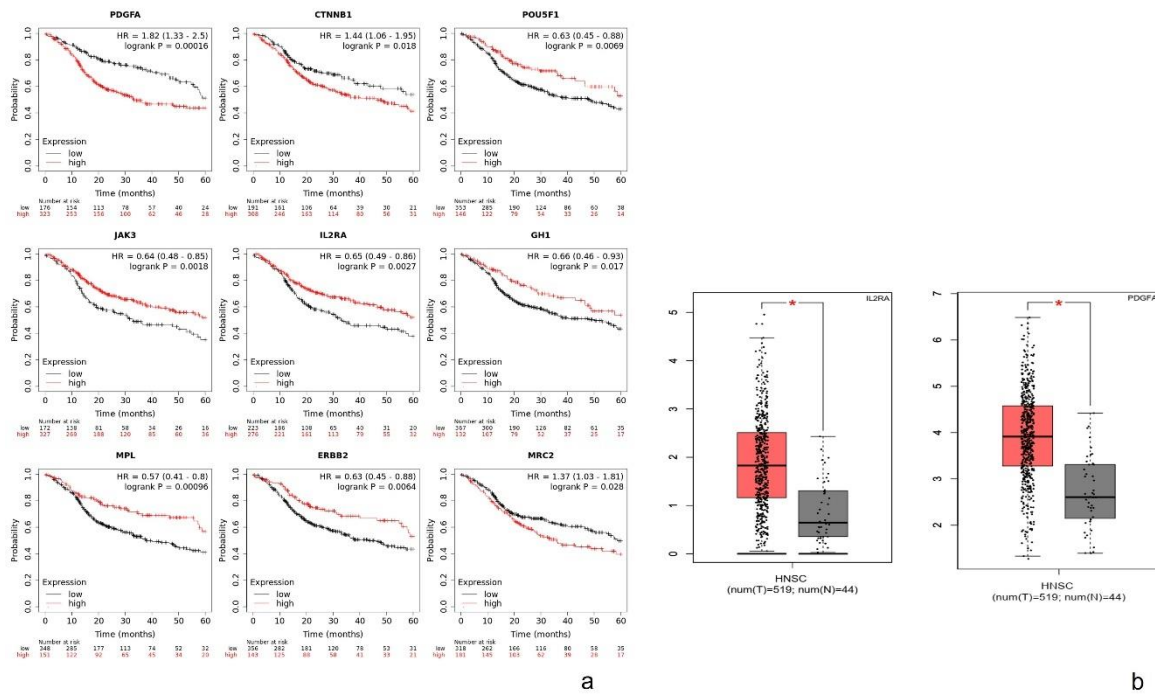


Tabla 3. Selección de genes centrales

Categoría	Genes
Información de 20 genes centrales candidatos analizados por KM plotter respecto a supervivencia global	
Genes de significativamente peor supervivencia (P<0.05)	PDGFA, CTNNB1, POU5F1, JAK3, MPL, ERBB2, IL2RA, GH1, MRC2
Genes que no presentan significativamente, pero supervivencia (P>0.05)	FGF7, VEGFD, FGFR1, FZD4, DVL2, NDP, FOS, NBL, THBD, AKT3, PAK1
Validación de 9 genes centrales KM significativos mediante GEPIA	
Genes con una alta expresión en ameloblastoma convencional (P<0.05)	PDGFA, IL2RA
Genes sin una alta expresión en ameloblastoma convencional (P>0.05)	CTNNB1, POU5F1, JAK3, MPL, ERBB2, GH1, MRC2

Análisis de expresión inmunohistoquímica y de IL2RA y PDGFA

El análisis de inmunoexpresión mostró que IL2RA presentó una intensa expresión en el parénquima y el estroma del AC, principalmente en el patrón folicular. El PDGFA mostró una expresión que va de moderada a intensa en un patrón plexiforme y folicular respectivamente.

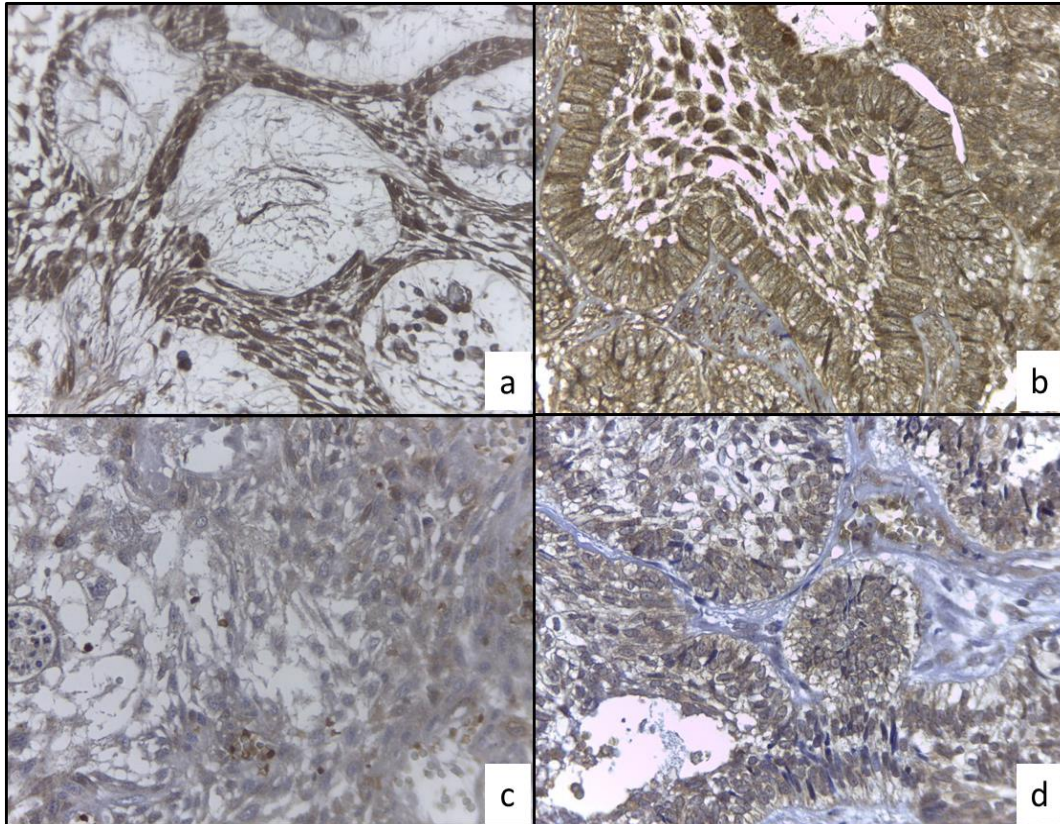


Figura 4. Análisis de inmunoexpresión de IL2RA y PDGFA. a&b) Fotomicrografías de IL2RA a 40x y 100x, respectivamente. Se muestran una expresión intensa para ILR2A tanto en parénquima como en estroma; c&d) Inmunoexpresión de PDGFA a 40x y 100x, respectivamente mostrando una expresión localmente de moderada a intensa, con localización principalmente en parénquima tumoral.

Discusión

Los AC son tumores odontogénicos epiteliales benignos que se diagnostican con frecuencia en adultos jóvenes con una mediana de edad de 35 años sin ninguna tendencia específica de género. Las AC a menudo progresan lentamente siendo aun así localmente invasivos. Los tumores no tratados

generan una reabsorción ósea en la placa cortical y se extienden al tejido adyacente (15). Las muestras utilizadas en nuestros análisis de microarreglos génicos se obtuvieron de 15 pacientes (seis mujeres y nueve hombres) con una edad media de $37,2 \pm 17,8$ años, lo que coincide con lo informado anteriormente. Las AC comúnmente se diagnostican en etapas avanzadas debido a la ausencia de síntomas, lo que resulta en efectos perjudiciales sobre el tejido óseo complicando el tratamiento y el pronóstico para el paciente. Para lograr una mejor en el pronóstico de los pacientes que cursan con AC, es importante aumentar nuestro conocimiento de los mecanismos que subyacen a la patogenia del ameloblastoma. Las vías de señalización de WNT, Akt y FGFR1, los efectos sobre la remodelación ósea a través de RANK-RANKL y OPG, la degradación de la matriz extracelular por MMP y las mutaciones en BRAF y SMO son todos eventos moleculares asociados con la patogénesis de AC.

La aplicación de métodos bioinformáticos en un conjunto de datos correspondiente a microarreglos génicos representa una estrategia importante para identificar biomarcadores terapéuticos y/o pronósticos de ameloblastoma los cuales puedan resultar en una mayor utilidad para el paciente. Se identificaron un total de 376 genes regulados al alza ($\log FC > 2$). Al realizar el análisis de función GO y de la vía KEGG con la información previa en la plataforma DAVID tiene como finalidad comprender la relevancia funcional de estos GED. En los procesos biológicos (PB), los genes regulados al alza se encontraban enriquecidos en regulación positiva de división celular, señalización de fosfatidilinositol 3-cinasa y regulación de actividad MAP cinasa. Estos resultados tienen congruencia con lo encontrado para funciones moleculares (FM) y componente celular (CC), lo cual confirma que al ser un tumor cuenta con potencial proliferativo relevante lo cual le da ese potencial invasor propio.

Para poder ampliar y dar utilidad a esta información es necesario emplear herramientas bioinformáticas adicionales que nos ayuden a aplicar este conocimiento a parámetros clínicamente importantes, tales como el pronóstico de supervivencia ante una enfermedad neoplásica. Para llegar a este rubro es necesario obtener cuales son los genes determinantes o centrales para una neoplasia. En nuestro análisis bioinformático se construyó un complejo o red de IPP a través de los softwares STRING y Cytoscape-MCODE. Un total de veinte genes regulados al alza fueron seleccionados, sin embargo, para asociarlos con su utilidad como marcador de supervivencia mediante los análisis Kaplan-Meier y GEPIA solo PDGFA e IL2RA son considerados bioinformáticamente aptos para su empleo como biomarcadores de AC.

El PDGF es un factor de crecimiento que promueve la proliferación, supervivencia y migración celular. Se han observado alteraciones en la señalización de este gen en procesos como cáncer, fibrosis y aterosclerosis. PDGF es un factor importante en la patogenia del ameloblastoma, la expresión de la cadena de PDGF es significativamente mayor en los tumores ameloblásticos que en los folículos dentales y junto con su receptor afín (PDGFRA), se expresa a un nivel variable en los ameloblastomas (16,17).

La señalización de PDGF es importante para el crecimiento y la diferenciación de las células multipotenciales, en particular las células mesenquimales. Su dimerización promueve la autofosforilación en diez sitios, que pueden interactuar con las proteínas de señalización que contienen el dominio SH2. Las proteínas de señalización activadas incluyen fosfolipasa C, PI3K, Grb2 entre otras. La unión de estas proteínas conduce a la activación de varias vías de señalización como las vías MAP cinasa, PI3-cinasa-Akt y la vía PLC (18).

Existen tres enfoques principales para inhibir la vía de PDGF/PDGFR:

1. Secuestrar el ligando con anticuerpos neutralizantes
2. Bloquear el receptor con anticuerpos específicos del receptor o inhibidores de moléculas pequeñas
3. Bloquear la actividad cinasa de PDGFR usando anticuerpos de bajo peso molecular.

Inhibidores como el olaratumab, nilotinib, dasatinib, ponatinib, sunitinib, imatinib y otros fármacos anti-PDGF han mostrado resultados clínicos significativos en diversas neoplasias malignas. Se ha desarrollado una estrategia similar para los ameloblastomas positivos para la mutación BRAF V600E, en los que el tratamiento con vemurafenib mostró resultados clínicos significativos (19). Diversos estudios postulan que la agresividad y frecuencia del ameloblastoma BRAF V600E positivo es alta (20–22). El uso combinado de ambos como dianas terapéuticas debe considerarse con cautela y emplearse localmente para lograr la posibilidad de un mejor resultado clínico.

Las citoquinas son las principales mediadoras de la respuesta inmune. Los ligandos y receptores de citoquinas controlan diversas funciones celulares, incluidas la proliferación, diferenciación y supervivencia celular/apoptosis de leucocitos; sin embargo, también se encuentran involucrados en varios procesos fisiopatológicos. El receptor de interleucina-2 está involucrado en la regulación de la tolerancia inmune al controlar la actividad de las células T reguladoras (CTREG). El receptor de interleucina 2 (IL2) alfa (IL2RA), beta (IL2RB) y cadena gamma (IL2RG) constituyen receptores de IL2 de alta afinidad. Las cadenas alfa homodiméricas (IL2RA) dan como resultado un receptor de baja afinidad, mientras que las cadenas beta homodiméricas (IL2RB) producen un receptor de afinidad media (23). Las células de ameloblastoma y las células estromales circundantes, como los fibroblastos, pueden contribuir a la patogénesis del ameloblastoma (8). De igual forma Chantravekin et al. 2014 (24) ha planteado la hipótesis de que las

ameloblasticas y los fibroblastos del estroma pueden activarse recíprocamente mediante citoquinas como IL-6, IL-8, IL-1a y recientemente se ha asociado de igual forma a IL33, para crear un microambiente tumoral que promueva la formación de tumores (8,25). En otros estudios Damoiseaux J ha informado que la fracción IL2RA puede funcionar de manera diversa para conducir a la activación de leucocitos a través de formas paracelulares o incluso solubles, lo que puede afectar la funcionalidad de células como los linfocitos T citotóxicos CD4 y CD8 a nivel tumoral (26). Este es el primer informe que identifica a IL2RA como un posible participante en el mecanismo subyacente al desarrollo del ameloblastoma.

Esta información es una aproximación significativa en la búsqueda de genes centrales de la patogénesis tumoral o bien de blancos terapéuticos, no obstante, su comprobación en poblaciones independientes a las que dieron origen a su postulación es un parámetro que permite detallar y hasta confirmar hipótesis respecto a la utilidad planteada. Nuestro análisis inmunohistoquímico mostró que tanto IL2RA como PDGFA pueden expresarse en el parénquima y el estroma de AC, por lo tanto, para mejorar la comprensión de la interacción entre el tumor y las células del estroma, es necesario desarrollar estrategias terapéuticas mejoradas más efectivas que permitan considerar como un solo elemento a todo el componente tumoral y no solo el parénquima residual.

Conclusión

En conjunto, nuestro análisis bioinformático identificó dos genes centrales (PDGFA e IL2RA) en AC y los folículos dentales. Los resultados mostraron que estos dos genes juegan un papel clave en la patogénesis, progresión y pronóstico del AC. Para considerarlas como dianas terapéuticas, es

necesario identificar cómo podemos intervenir en el AC de forma específica; sin embargo, estos resultados brindan información útil para probar los nuevos biomarcadores.

Referencias

1. Zheng L, Ehardt L, Mc Alpm B, About I, Kim D, Papagerakis S, et al. The tick tack of Odontogenesis. *Experimental cell research*. 2014;325:83-89.
2. El-Naggar AK CJGJTSP. WHO Classification of Head and Neck Tumours (4th edition). IARC: Lyon 2017 296 p.
3. Gaita L, Quezada-Rivera D, Tenorio-Rocha F, Leyva-Huerta E. Reclassification of odontogenic keratocyst as tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. *Oral Diseases* [Internet]. 2010;16:185–7. Available from: <http://www.blackwellmunksgaard.com>

4. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. REVIEW ARTICLE: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *Journal of Oral Pathology & Medicine* [Internet]. 2010 Sep 1;39(8):585–91. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00908.x>
5. Laborde A, Nicot R, Wojcik T, Ferri J, Raoul G. Ameloblastoma of the jaws: Management and recurrence rate. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases* [Internet]. 2017;134(1):7–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879729616301624>
6. Bell DW. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *The Journal of Pathology* [Internet]. 2010 Jan 1;220(2):231–43. Available from: <https://doi.org/10.1002/path.2645>
7. Brown NA, Betz BL. Ameloblastoma: A Review of Recent Molecular Pathogenetic Discoveries. *Biomarkers in Cancer* [Internet]. 2015 Jan 1;7s2:BIC.S29329. Available from: <https://doi.org/10.4137/BIC.S29329>
8. Fuchigami T, Ono Y, Kishida S, Nakamura N. Molecular biological findings of ameloblastoma. *Japanese Dental Science Review* [Internet]. 2021;57:27–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1882761621000041>
9. Trejo-Remigio DA, Jacinto-Alemán LF, Leyva-Huerta ER, Navarro-Bustos BR, Portilla-Robertson J. Ectodermal and ectomesenchymal marker expression in primary cell lines of complex and compound odontomas: a pilot study. *Minerva Stomatol.* 2019;68(3):132-141.
10. Tecalco-Cruz AC, Macías-Silva M, Ramírez-Jarquín JO, Méndez-Ambrosio B. Identification of genes modulated by interferon gamma in breast cancer cells. *Biochemistry and Biophysics Reports* [Internet]. 2021;27:101053. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580821001473>
11. DAVID Bioinformatics Resources 6.8 [Internet]. 2021 [consulted 17 September 2021]. Available in: <https://david.ncifcrf.gov/>.
12. STRING [Internet]. 2021 [consulted 17 September 2021]. Available in: <https://string-db.org/>.
13. Nagy Á, Munkácsy G, Győrffy B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. *Scientific Reports |* [Internet]. 2021;11(1)(6047). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84787-5>
14. GEPIA [Internet]. 2021 [citado 17 septiembre 2021]. Disponible en: <http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>.
15. Masthan KM, Anitha N, Krupaa J, Manikkam S. Ameloblastoma. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015;7(Suppl 1):S167-70.
16. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factors, platelet-derived growth factor, and their receptors in ameloblastic tumors. *Journal of Oral Pathology & Medicine* [Internet]. 2007 Apr 1;36(4):198–206. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00516.x>

17. Sulzbacher I, Wick N, Pichlhofer B, Mazal PR. Expression of platelet-derived growth factor-AA and platelet-derived growth factor- α receptor in ameloblastomas. *Journal of Oral Pathology & Medicine* [Internet]. 2008 Apr 1;37(4):235–40. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00637.x>
18. Papadopoulos N, Lennartsson J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Molecular Aspects of Medicine* [Internet]. 2018;62:75–88. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299717301401>
19. Fernandes GS, Girardi DM, Bernardes JPG, Fonseca FP, Fregnani ER. Clinical benefit and radiological response with BRAF inhibitor in a patient with recurrent ameloblastoma harboring V600E mutation. *BMC Cancer* [Internet]. 2018;18(1):887. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4802-y>
20. Seki-Soda M, Sano T, Ito K, Yokoo S, Oyama T. An immunohistochemical and genetic study of BRAFV600E mutation in Japanese patients with ameloblastoma. *Pathology International* [Internet]. 2020 Apr 1;70(4):224–30. Available from: <https://doi.org/10.1111/pin.12899>
21. Oh KY, Cho SD, Yoon HJ, Lee JI, Ahn SH, Hong SD. High prevalence of BRAF V600E mutations in Korean patients with ameloblastoma: Clinicopathological significance and correlation with epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Oral Pathology & Medicine* [Internet]. 2019 May 1;48(5):413–20. Available from: <https://doi.org/10.1111/jop.12851>
22. Derakhshan S, Aminishakib P, Karimi A, Saffar H, Abdollahi A, Mohammadpour H, Kharazi Fard MJ, Memarha A. High frequency of BRAF V600E mutation in Iranian population ameloblastomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25(4):e502-e507.
23. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Science* [Internet]. 2019 Jul 1;110(7):2080–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/cas.14069>
24. Yosananda Chantravekin, Sittichai Koontongkaew. Effects of ameloblastoma-associated fibroblasts on the proliferation and invasion of tumor cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2014;10(4):1082–7.
25. Chen L, Wang G, Qiao X, Wang X, Liu J, Niu X, et al. Downregulated miR-524-5p Participates in the Tumor Microenvironment of Ameloblastoma by Targeting the Interleukin-33 (IL-33)/Suppression of Tumorigenicity 2 (ST2) Axis. *Medical Science Monitor* [Internet]. 2020;26. Available from: www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/921863
26. Damoiseaux J. The IL-2 – IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor. *Clinical Immunology* [Internet]. 2020;218:108515. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661620303910>