



**Cinvestav**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Análisis de la expresión de ODAM en ameloblastoma, tumor  
odontogénico queratoquístico y quiste dentífero”**

**TESIS**

Que presenta

**C.D. ANA LAURA MARTÍNEZ RICARDEZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

Director de Tesis:

**Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez**

México, D.F.

ENERO, 2016

Este trabajo se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), en el laboratorio 2 de Biología Molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV bajo la dirección del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis, el Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, por la dedicación y apoyo brindado en todo momento; pero sobre todo, por siempre acrecentar la confianza en mí, demostrándome día a día el gran ser humano que es.

A mis asesores, la Dra. Patricia Talamás Rohana y el Dr. José Luis Rosales, por brindarme su tiempo y proporcionarme sugerencias que enriquecieran mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y a Mario, por tratar de resolver la mayoría de mis dudas y por soportar mis cantos, gritos y estruendosa voz.

Al gran número de trabajadores que realizan de manera comprometida sus labores, quienes me apoyaron sin oposición alguna.

A todas las personas que de algún modo, formaron parte de esta etapa; a aquellos que tuvieron algún gesto de amabilidad y que me hicieron recobrar la fe cuando la veía perdida.

A mi querido Carlos Vázquez, por ser una persona llena de sabiduría y de luz.

A mi profesor Marcos Agustín, por ser quien dio inicio a mi camino en la investigación, por siempre compartir su conocimiento sin límite alguno; por su paciencia, por su compromiso con la ciencia y sobre todo, por formar parte de las personas que me llevo en el corazón.

## **DEDICATORIAS**

A mi hermosa madre, Silvia Ricardez, quien con todo el amor y anhelo, siempre ha impulsado todos los aspectos de mi vida; por ser digna de admirar siendo mi mayor ejemplo de lucha y dedicación. Te amo con todo mí ser.

A mi hermana Diana, por siempre ayudarme en las mañanas que se me hace tarde, por cada uno de los desayunos preparados, por las sonrisas cuando no está enojada; porque a pesar de ser la “hermanita” menor, siempre tiene un completo compromiso por brindar estabilidad a nuestra pequeña familia.

A mi hermana Erika, quien ha respetado y apoyado cada una de mis decisiones, tanto profesionales como personales; por demostrar que, aunque puedo ser muy molesta, ella estará a mi lado en los momentos más importantes.

A mis sobrinos Sebastián y Leonardo, que con sus risas y berrinches, me regalan la mayor felicidad de mi día; por ser capaces de enseñarme algo nuevo cada instante y por siempre ser un motor en mi vida.

A mi familia, que con su imperfección, crean momentos inigualables.

A mi pequeña Isabella, quien sin duda, estará presente en cada paso de éxito y fracaso que dé; por representar el más bello e importante recuerdo de esta etapa...Y te amaré, aunque no estés.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. ABSTRACT</b> .....	2
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
3.1 AMELOBLASTOMA .....	5
3.1.1 <i>Etiología y Epidemiología</i> .....	5
3.1.2 <i>Histología</i> .....	7
3.1.3 <i>Clasificación clínica</i> .....	7
3.1.4 <i>Consideraciones terapéuticas</i> .....	9
3.2 TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO (TOQ) .....	11
3.2.1 <i>Etiología y Epidemiología</i> .....	12
3.2.2 <i>Histología</i> .....	14
3.3 QUISTE DENTÍGERO (QD).....	14
3.3.1 <i>Etiología y Epidemiología</i> .....	15
3.3.2 <i>Histología</i> .....	15
3.3.3 <i>Complicaciones</i> .....	16
3.3.4 <i>Consideraciones Terapéuticas</i> .....	17
3.4 PROTEÍNA ODONTOGÉNICA ASOCIADA A AMELOBLASTOS (ODAM) ..	17
3.4.1 <i>ODAM en la mineralización del esmalte</i> .....	18
3.4.2 <i>ODAM en el desarrollo de tumores</i> .....	21
3.4.3 <i>Expresión de ODAM en el ameloblastoma</i> .....	25
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	28

<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	30
<b>VIII. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	30
<b>IX. RESULTADOS</b> .....	35
9.1 ANÁLISIS IN SILICO .....	35
9.1.1 <i>Predicción in silico de proteínas homólogas y dominios conservados..</i>	35
9.1.2 <i>Predicción in silico de modificaciones postraduccionales y secuencia péptido señal</i> .....	36
9.1.3 <i>Predicción in silico de la estructura secundaria</i> .....	37
9.1.4 <i>Predicción in silico de la estructura terciaria</i> .....	39
9.1.5 <i>Predicción in silico de ODAM como proteína intrínsecamente desordenada</i> .....	40
9.2 EXPRESIÓN DE ODAM EN BIOPSIAS DE TEJIDO DE QD, AMELOBLASTOMA Y TOQ .....	42
9.3 ENSAYO CON LECTINA <i>SAMBUCUS NIGRA</i> (SNA) .....	45
9.4 INMUNOHISTOFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS CON MICROSCOPIA CONFOCAL .....	47
9.4.1 <i>Localización de ODAM en corte histológico de QD</i> .....	47
9.4.2 <i>Localización de ODAM en corte histológico de TOQ</i> .....	49
9.4.3 <i>Localización de ODAM en corte histológico de Ameloblastoma</i> .....	51
9.4.4 <i>Cuantificación de la inmunofluorescencia</i> .....	53
<b>X. DISCUSIÓN</b> .....	55
<b>XI. CONCLUSIÓN</b> .....	60

<b>XII. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>61</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>61</b>

## I. RESUMEN

Los tumores odontogénicos (TO's) son lesiones que surgen de los tejidos embrionarios del desarrollo dentario o de sus remanentes. Además de los TO's, existen otras lesiones dentales también de tipo odontogénico, consideradas no neoplásicas, entre las cuales se encuentran los quistes. El ameloblastoma (Amelo) y el tumor odontogénico queratoquístico (TOQ), son TO's benignos de origen epitelial que exhiben un comportamiento localmente agresivo con un alto nivel de recurrencia, mientras que el quiste dentígero (QD), es una lesión relacionada a la corona de un diente retenido, puede expandir pero no infiltrar y raramente presenta recidiva, mostrando un patrón mucho menos agresivo que los TO's. Para una mayor comprensión del comportamiento clínico de estas lesiones, es necesario entender los mecanismos biológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de ellas. El objetivo del presente estudio fue analizar y comparar la expresión de la proteína odontogénica asociada a ameloblastos (ODAM), la cual fue descubierta en el año 2003 en un TO y ha sido implicada en diversos procesos, incluyendo la tumorigénesis y metástasis.

En este estudio se encontró que ODAM presentó mayor expresión en QD que en TOQ y Amelo, tanto en el análisis densitométrico de los ensayos de Western Blot como al cuantificar la inmunofluorescencia de dichas lesiones. Por lo tanto, los resultados concuerdan con el hecho observado en la literatura, donde la expresión de ODAM es mayor en tejidos sanos que en los que presentan un patrón tumoral o metastásico. En cuanto a su localización celular, se tuvo como resultado la señal de ODAM citoplasmática, perinuclear y nuclear de QD y TOQ. En cuanto a Amelo, la entidad más agresiva de las tres patologías estudiadas, el marcaje se observó de menor intensidad con una localización casi exclusiva en citoplasma. Por otro lado, nuestro análisis de la estructura sugiere que ODAM tiene características propias del tipo de proteínas denominadas intrínsecamente desordenadas, lo cual tiene una implicación importante, ya que este tipo de proteínas tienen un papel altamente regulatorio. Los resultados reflejados en nuestro estudio, proveen evidencia de que ODAM, podría ser una



molécula importante implicada en el comportamiento biológico de las lesiones odontogénica.

## II. ABSTRACT

Odontogenic tumors (OT's) are lesions that derived from embryonic tissues of tooth development or its remnants. Addition to OT's, exist other dental lesions also odontogenic type consider no-neoplastic among which are the cysts. The ameloblastoma (Amelo) and keratocyst odontogenic tumour (KCOT) are benign OT's of epithelial origin with an aggressive biological behavior and high level of recurrence, while the dentigerous cyst (DC) is a lesion related to the crown of an impacted tooth that can expand but no infiltrate and rarely have recurrence, showing a much less aggressive pattern that OT's. For a better understanding of the clinical behavior of these lesions it is necessary understand the biological and molecular mechanisms involved in the development of these. The aim of this study was to analyze and compare the expression of odontogenic ameloblast associated protein (ODAM), which was discovered in 2003 in a OT and has been implicated in various processes, including tumorigenesis and metastasis.

This study has found the increased expression ODAM in DC compared with Amelo and KCOT in both, densitometric analysis of the Western Blot assays and quantification of immunofluorescence in these lesions. Therefore, the results are consistent with the fact observed in the literature, where the expression of ODAM in healthy tissues is greater than in those with a tumor or metastatic pattern. As for its cellular location, ODAM signal was found in cytoplasmic, perinuclear and nuclear of DC and KCOT. As for Amelo that is the most aggressive of the three studied entity, the signal was observed with lower intensity with an almost exclusive localization in cytoplasm. Furthermore, our structure analysis suggests that ODAM has characteristics of proteins called intrinsically disordered, which has an important implication because such proteins have a highly regulatory role. The findings from our study provide evidence that ODAM, could be an important molecule involved in the biological behavior of odontogenic lesion

### III. INTRODUCCIÓN

Los tumores odontogénicos constituyen un grupo diverso de lesiones, que surgen de los tejidos embrionarios del desarrollo dentario o de sus remanentes (1) Estas lesiones son neoplasias benignas o malignas con agresividad y potencial variable para desarrollar metástasis (2). Los tumores odontogénicos son lesiones raras de la mandíbula y del maxilar que se deben considerar como parte del diagnóstico diferencial de las lesiones que se producen en todo el esqueleto maxilofacial (3). En seres humanos, los tumores de tejidos odontogénicos son relativamente raros, ya que comprende aproximadamente el 1% de todos los tumores de los maxilares (4); aunque su frecuencia puede variar dependiendo la región de estudio.

La distribución geográfica de los pacientes que presentan estas lesiones es variable, principalmente debido a la gran diversidad genética y cultural a nivel mundial (5). La etiología de los tumores odontogénicos es desconocida y la mayoría se desarrolla sin una causa aparente, pudiéndose generar en cualquier etapa de la vida de un individuo (6).

El primer sistema de clasificación aceptado internacionalmente para los tumores odontogénicos, fue publicado en 1971 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cual fue revisado y actualizado en 1992 y en 2005 (2,5). La Tabla 1 muestra la clasificación actual de los tumores odontogénicos.

---

## TUMORES BENIGNOS

### *1.1 Epitelio odontogénico con estroma fibroso maduro sin ectomesénquima odontogénico*

#### Ameloblastoma

- Uniquístico
- Sólido/Multiquistico
- Extraóseo/Periférico
- Tumor odontogénico escamoso

#### TOEC/Pindborg

#### Tumor odontogénico adenomatoide

#### Tumor odontogénico queratoquistico

### *1.2 Epitelio odontogénico con ectomesénquima odontogénico con o sin formación de tejido dentario duro*

#### Fibroma ameloblástico

#### Fibro dentinoma ameloblástico

#### Fibro odontoma ameloblástico

#### Odontoma

- Compuesto
- Complejo

#### Odontoameloblastoma

#### Tumor odontogénico quístico calcificante

#### Tumor dentinogénico de células fantasmas

### *1.3 Mesénquima y/o ectomesénquima odontogénico con/sin epitelio odontogénico*

#### Fibroma odontogénico

#### Mixofibroma

#### Cementoblastoma

## TUMORES MALIGNOS

### *1.4 Carcinomas Odontogénicos*

#### Ameloblastoma metastatizante (maligno)

#### Carcinoma ameloblástico –primario

#### Carcinoma ameloblástico –secundario (intraóseo)

#### Carcinoma ameloblástico –secundario (periférico)

#### Carcinoma escamo celular intraóseo primario –sólido

#### Carcinoma escamo celular intraóseo primario

#### derivado de tumor odontogénico queratoquistico

#### Carcinoma escamocelular intraóseo primario

#### derivado de quistes odontogénicos

#### Carcinoma odontogénico de células claras

#### Carcinoma odontogénico de células fantasmas

### *1.5 Sarcomas Odontogénicos*

#### Fibrosarcoma ameloblástico

#### Fibro dentino y fibroodontosarcoma ameloblástico

### *1.6 Lesiones relacionadas con el hueso*

#### -Fibroma osificante

#### -Displasia fibrosa

#### -Displasia ósea

#### -Querubismo

#### -Granuloma central de células gigantes

#### -Quiste óseo aneurismático

#### -Quiste óseo simple

## OTROS TUMORES

#### Tumor neuroectodérmico melanótico de la infancia

---

Tabla 1. Clasificación de Tumores Odontogénicos, Tomado de Barnes y col., 2005.

Además de los tumores odontogénicos, existen otras lesiones dentales consideradas no neoplásicas, entre las cuales se encuentran los quistes, los cuales son importantes de estudiar porque se ha visto que éstos pueden ser el origen de algunos tumores odontogénicos (7,8). Un quiste se define como una bolsa conectivo-epitelial, tapizada en su interior por epitelio y recubierta en su cara externa por tejido conectivo, que encierra un contenido líquido o semilíquido (9,10).

Con base en la clasificación de la OMS hecha en 1992, los quistes de los maxilares se dividen de acuerdo a su patogenia, clasificándose como lesiones del desarrollo o de tipo inflamatorio (9).

Tanto los quistes del desarrollo como los inflamatorios, son regularmente asintomáticos y se descubren en estudios radiográficos de rutina; se caracterizan por un crecimiento lento y una tendencia expansiva (9,11). Sin embargo, a pesar de ser entidades con un comportamiento benigno y no neoplásico, pueden alcanzar un tamaño considerable si no se diagnostican y se tratan a tiempo (11,12) y como se mencionó anteriormente, pueden ser el origen de algunos tumores odontogénicos.

### **3.1 AMELOBLASTOMA**

La OMS define al ameloblastoma como una neoplasia polimórfica localmente invasiva que comúnmente tiene un patrón folicular o plexiforme, constituida por una proliferación de epitelio odontogénico en un estroma fibroso y se clasifica dentro de los tumores benignos de epitelio odontogénico con estroma fibroso maduro sin ectomesénquima odontogénico (6).

#### **3.1.1 Etiología y Epidemiología**

El ameloblastoma deriva principalmente del epitelio que se relaciona con la formación de los dientes, es decir de células potencialmente capaces de formar tejido dental. Las posibles fuentes epiteliales incluyen restos celulares del órgano del esmalte (restos de Malassez), epitelio de quistes odontogénicos (en especial el quiste dentífero), alteraciones del órgano del esmalte en desarrollo (epitelio reducido del esmalte), células basales del epitelio de los maxilares y remanentes epiteliales de la lámina dental (7,13) (Fig.1). Se desconocen los factores desencadenantes o los estímulos necesarios para que se produzca la transformación neoplásica de estas estructuras epiteliales (6). La desregulación de

varios genes durante el desarrollo normal de los dientes, puede jugar un papel en su histogénesis (14).

El ameloblastoma se manifiesta prevalentemente durante la cuarta y quinta década de vida. Si bien puede presentarse a cualquier edad, la mayor incidencia es entre los 30 y 50 años, con un promedio de 40 años, salvo la variedad uniuística que se diagnostica generalmente entre los 20 y 30 años (15,16). No existen diferencias de incidencia según sexo o raza, aunque algunos autores indican que puede existir una mayor tendencia a la aparición en varones de raza negra (16). Según Small (17) se presenta con una incidencia particularmente elevada en África del este; sin embargo, Paikkatt (18) menciona una mayor incidencia en individuos caucásicos, afroamericanos y asiáticos, con preferencia en chinos. Estos tumores se localizan en un 80% en la mandíbula y en un 20% en el maxilar (6,19). De los de localización maxilar, un 47% se sitúa en la región molar, 15% en el antro y suelo de la nariz, 9% en la región canina y 2 %en el paladar; además, del 10 al 15 % de los tumores se asocian a un diente no erupcionado (6, 9,19).

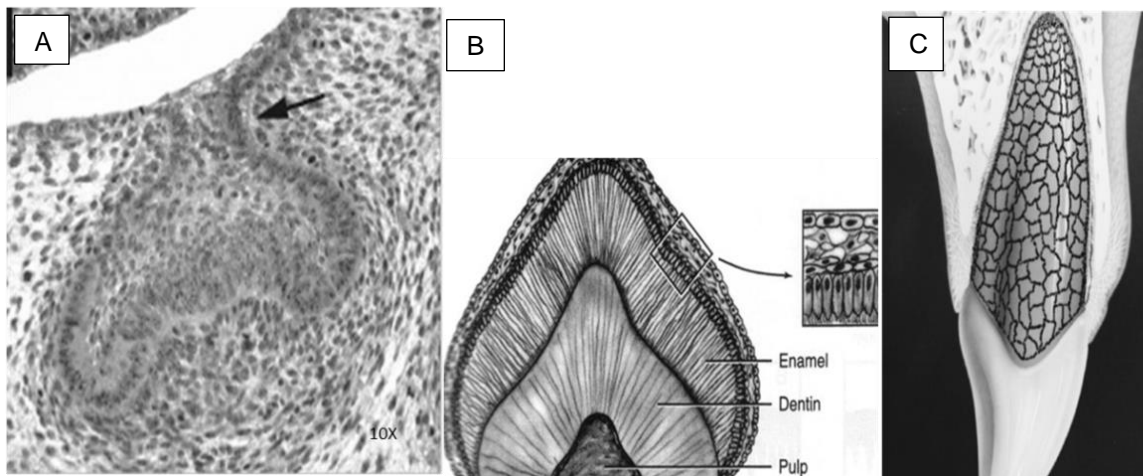


Figura 1. Posible origen del ameloblastoma. (A) El ameloblastoma puede derivar de cualquier epitelio odontogénico que involucra desde la lámina dental dentro de la pre-odontogénesis (señalada por la flecha). (B) Epitelio reducido del esmalte en la post-odontogénesis (mostrado por el recuadro). (C) Restos epiteliales de Malassez como parte de la post-erupción (malla alrededor de la raíz del diente).

### 3.1.2 Histología

Histológicamente, el ameloblastoma es muy parecido al órgano del esmalte y existen varios tipos histológicos, siendo el más frecuente el folicular, con islotes epiteliales entre tejido conjuntivo. Estos islotes tienen células similares a los ameloblastos en la periferia y al centro tejido que recuerda el retículo estrellado (6). Otras variedades histológicas son: i) el plexiforme, con cordones y redes epiteliales que dejan espacios donde se encuentra el estroma conjuntivo; ii) la variedad acantomatosa, que presenta formación de queratina en los islotes epiteliales; iii) la de células granulosas, con islotes conteniendo células de citoplasma con gránulos eosinófilos que corresponden a lisosomas; y iv) la de células basales, con un patrón similar al del carcinoma cutáneo de células basales (6, 15, 20).

### 3.1.3 Clasificación clínica

Según la clasificación clínica de los tumores odontogénicos de la OMS 2005 (6), el ameloblastoma se puede clasificar en:

1. Desmoplásico
2. Uniquístico
3. Sólido o multiquístico
4. Extraóseo o periférico

*1. Ameloblastoma desmoplásico* Este tipo de ameloblastoma histopatológicamente presenta islotes de epitelio irregulares con bordes puntiagudos, células periféricas cuboidales con núcleos hipercromáticos, apariencia columnar menos frecuente que las otras variantes, microquistes en el espesor de los islotes y estroma fibroso con desmoplasia grave (6,21). Representa aproximadamente un 3-14 % del total de ameloblastomas (21). Esta variedad generalmente se desarrolla en la zona anterior o premolar del maxilar y la mandíbula, presentándose predominantemente en la región mandibular anterior (6). Sin embargo, algunos autores destacan su

predilección por el maxilar comparado con los otros ameloblastomas (21). Estos ameloblastomas tienen peor pronóstico, ya que presentan un mayor índice de recidivas posquirúrgicas y un mayor porcentaje de malignización (21, 22). Se presenta fundamentalmente en la cuarta y quinta década de vida generalmente sin predilección por género (6).

2. *Ameloblastoma uniuquístico* Esta variante de ameloblastoma fue descrita por primera vez por Robinson y Martínez en 1977. Aproximadamente el 80 % de los ameloblastomas uniuquísticos, están asociados a un tercer molar mandibular retenido (23). Los casos asociados a un diente no erupcionado muestran una edad media de 16 años, en contraposición a 35 años en ausencia de un diente no erupcionado (24). De 5 a 15 % de todos los ameloblastomas son de tipo uniuquístico (25). El diagnóstico presuntivo clínico radiográfico, es frecuentemente un quiste dentífero (6). Robinson y Martínez (26) plantean que el ameloblastoma y los quistes odontogénicos tienen un ancestro común por lo que la transición desde un quiste no neoplásico a uno neoplásico podría ser una posibilidad. Existen dos variantes histopatológicas: i) La variante luminal es una lesión quística revestida por epitelio ameloblastomatoso y ii) la variante mural donde la pared del quiste es infiltrada por epitelio ameloblastomatoso que exhibe un patrón ya sea folicular o plexiforme. A veces, ambas variantes pueden ocurrir en la misma lesión (25, 27).

3. *Ameloblastoma sólido o multiquístico*. Este tipo de ameloblastoma es uno de los tumores odontogénicos con mayor significancia clínica, requiriendo en numerosas ocasiones un tratamiento invasivo, como lo es la resección parcial (28). Presenta crecimiento lento, es localmente invasivo, tiene una alta tasa de recurrencia si no es eliminado adecuadamente, pero la metástasis es prácticamente es infrecuente (6). La mayoría de los casos son diagnosticados entre los 30 y 60 años, siendo poco frecuente su presencia en personas de menos de 20 años (16). Las lesiones son no encapsuladas y presentan un porcentaje de recidiva de hasta en un 90 % si son tratados solamente con curetaje (15).

4. *Extraóseo o periférico*. Estos tumores se observan como un aumento de volumen localizado en la encía o en la mucosa alveolar en áreas edéntulas (6). Es la menos frecuente de las formas clínicas, comprendiendo 1.3 a 10 % de todos los ameloblastomas (29); raramente afecta el hueso adyacente y presenta muy buena evolución posterior al tratamiento quirúrgico (6, 30).

### **3.1.4 Consideraciones terapéuticas**

La actitud terapéutica ante este tipo de neoplasia es compleja por su propensión característica a la recidiva, que surge de la posibilidad de dejar lesiones microscópicas. La elección de un tratamiento está condicionada a una serie de características según la presentación clinicopatológica del ameloblastoma, particularidades macroscópicas y microscópicas de la lesión, localización, tamaño, edad del paciente y la posibilidad de un seguimiento periódico a largo plazo.

El tratamiento de elección para el ameloblastoma unicístico depende de la tipificación histológica (15). La enucleación es el tratamiento que se reserva para los casos de ameloblastomas unicísticos en que la proliferación ameloblástica está limitada al epitelio quístico o que dicho crecimiento protruye a la luz quística sin invasión de la pared, ya que en estos casos el tejido o pared conjuntiva periférica que lo circunda actúa como una barrera adecuada de tejido íntegro (26,27). En los casos en que el componente celular neoplásico infiltre la cápsula o pared conectiva sin que exista una delimitante precisa entre la lesión y el hueso adyacente, la conducta terapéutica será distinta, dependiendo de la localización y la extensión del mismo; pudiendo llegar hasta la realización de una resección (31).

Al elegir la conducta terapéutica ante ameloblastomas sólidos/multiquísticos, se debe tomar en cuenta que en estas entidades la infiltración del tejido esponjoso es frecuente (6, 15); además, existe una pequeña tendencia a la infiltración del hueso cortical; el periostio generalmente forma una barrera contra el crecimiento tumoral y que no es posible localizar una cápsula definida cuando el tumor está en contacto con la mucosa bucal (26, 31) En caso de recidiva, con erosión de las corticales, se indica un tratamiento más agresivo que consiste en la resección



amplia con márgenes de seguridad amplios (al menos 1 centímetro más allá de los límites radiológicos (Fig. 2) (32). También se ha sugerido el tratamiento de los ameloblastomas sólidos/multiquísticos de la mandíbula con curetaje seguido por criocirugía con spray de nitrógeno líquido, lo que puede reducir el porcentaje de recidiva local y disminuir la indicación a la resección radical (32, 33).

El ameloblastoma periférico, debido a su comportamiento no agresivo y a la no afectación del hueso subyacente, requiere una exéresis con mínimo margen, ya que raramente recurren (33).

En el caso del ameloblastomas tipo desmoplástico, el tratamiento de elección es la resección quirúrgica (21, 22), aunque no existe un tratamiento estándar. Se recomienda una escisión en bloque con márgenes de seguridad, por su elevada tendencia a invadir estructuras vecinas y por la relación entre el número de recidivas y el riesgo de malignización (30).

Así, los tratamientos quirúrgicos para el ameloblastoma se resumen en:

1. Curetaje: Raspado quirúrgico de las paredes delimitantes de la lesión.
2. Enucleación: Remoción de la lesión íntegra.
3. Resección en Bloque: Remoción quirúrgica de la lesión intacta con una cuota de hueso periférico íntegro (1-1.5 cm). Mantiene la continuidad del margen mandibular posterior e inferior.
4. Resección segmental: Remoción quirúrgica de un segmento de mandíbula o maxilar superior sin preservar la continuidad del margen.
5. Hemirresección: Hemimandibulectomía o hemimaxilarectomía.

El alcance de la intervención no consiste solamente en la eliminación completa de la lesión, sino que también en la optimización funcional. Por lo tanto, como parte

del plan de tratamiento, se debe llevar a cabo la rehabilitación protésica y funcional de pacientes que han recibido cirugías donde se debió resear (Fig. 2).

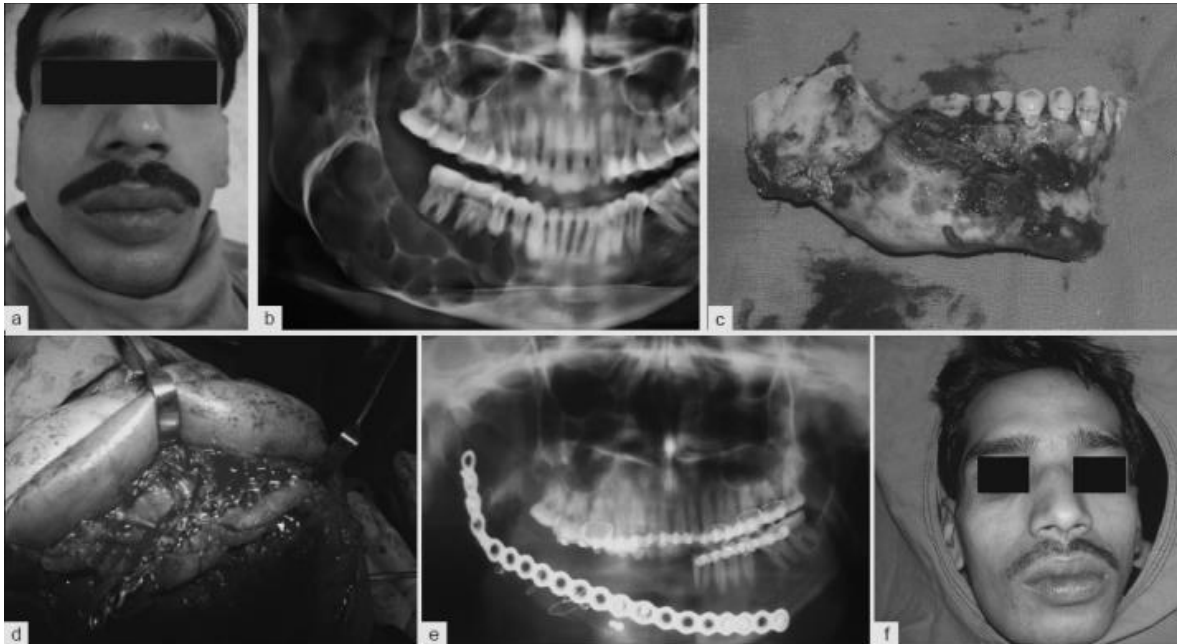


Figura 2. Plan de tratamiento de ameloblastoma. a) Vista frontal preoperatoria, (b) Imagen radiolúcida multilocular que involucra cuerpo derecho y el ángulo de la mandíbula, (c) Resección de una parte de la mandíbula que involucra 2 cm de hueso normal, (d) Reconstrucción de la mandíbula con injerto de cresta ilíaca, (e) Imagen radiográfica postoperatoria, (f) Vista frontal postoperatoria. Tomado de Dandriyal, 2011 (33).

### 3.2 TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO (TOQ)

El tumor odontogénico queratoquístico (TOQ) es un tumor benigno intraóseo uni o multiquístico caracterizado por una proliferación de epitelio odontogénico y por la formación de estructuras quísticas revestidas de epitelio escamoso estratificado con una capa de paraqueratina corrugada típica y en empalizada de las células basales (6). Se describen dos variantes de este tumor en función de su asociación con otras manifestaciones sistémicas; presentándose así la variante esporádica y la que se asocia con el síndrome de carcinoma nevoide de células basales

(llamado también de Gorlin) (34). Este tumor anteriormente se conocía como queratoquiste odontogénico, pero fue renombrado por la OMS en 2005 dentro de la clasificación de tumores odontogénicos (Cuadro 1) (6) para reflejar su naturaleza neoplásica caracterizada por un patrón infiltrativo, mostrando agresividad local, y una alta tasa de recurrencia, además de la presencia de figuras mitóticas en la capa suprabasal y la asociación con la mutación del gen supresor de tumor homólogo I de Patched (PTCH-1) (6, 35).

### **3.2.1 Etiología y Epidemiología**

Se cree que el TOQ puede surgir a partir de la lámina dental o de sus remanentes y se puede encontrar asociado con dientes impactados (36). Los TOQ's son una de las anomalías más consistentes del síndrome de Gorlin, ya que ocurren en 65 a 75% de los casos (37). Estudios recientes han demostrado que las formas esporádicas (no sindrómicas) y sindrómicas de dicho tumor se asocian con mutaciones en el gen PTCH-1 (38, 39); dicho gen codifica para una proteína transmembranal que se une a Sonic Hedghog (SHH), uno de los tres ligandos de la vía de señalización Hedghog (HH) (Fig. 3). La vía SHH ha mostrado un mecanismo crucial en la proliferación y diferenciación celular en varios tejidos, incluyendo los dientes (41). Cuando existe ausencia del ligando, el receptor PTCH-1 y el receptor Smoothened (SMO) forman un complejo membranal que tiene un efecto supresor sobre la transducción de señales de proliferación celular (40) (Fig. 3). Cuando se lleva a cabo la unión de SSH a PTCH1 se pierde el efecto inhibidor sobre SMO y se lleva a cabo la activación de factores de transcripción que resultan en la proliferación celular (Fig. 3). Por lo tanto, en los casos en los que PTCH-1 es mutado se promueve el desarrollo de tumores (Fig. 3) (40,42).

En un estudio hecho por Gaitán y colaboradores en 2010 (43), se demostró que con la reclasificación hecha por la OMS en 2005, el TOQ se convirtió en el tumor odontogénico más frecuente dentro de una muestra de la población mexicana. La presencia del TOQ puede observarse en un rango de edad variado, existiendo entre los 10 y los 40 años, presentándose mayoritariamente en la edad adulta

(44). La edad promedio reportada por varios autores varía de 38 años a 40 años (45, 46). El TOQ sindrómico ocurre a una edad más temprana que las variantes esporádicas (37). La razón de género reportada es de 1.6:1 hombre: mujer, por lo que sigue siendo una patología con una definida predilección masculina (47). Puede ocurrir tanto en la mandíbula como en el maxilar, teniendo una frecuencia con una proporción 2:1 con predisposición por presentarse en la mandíbula, específicamente por la región posterior (6).

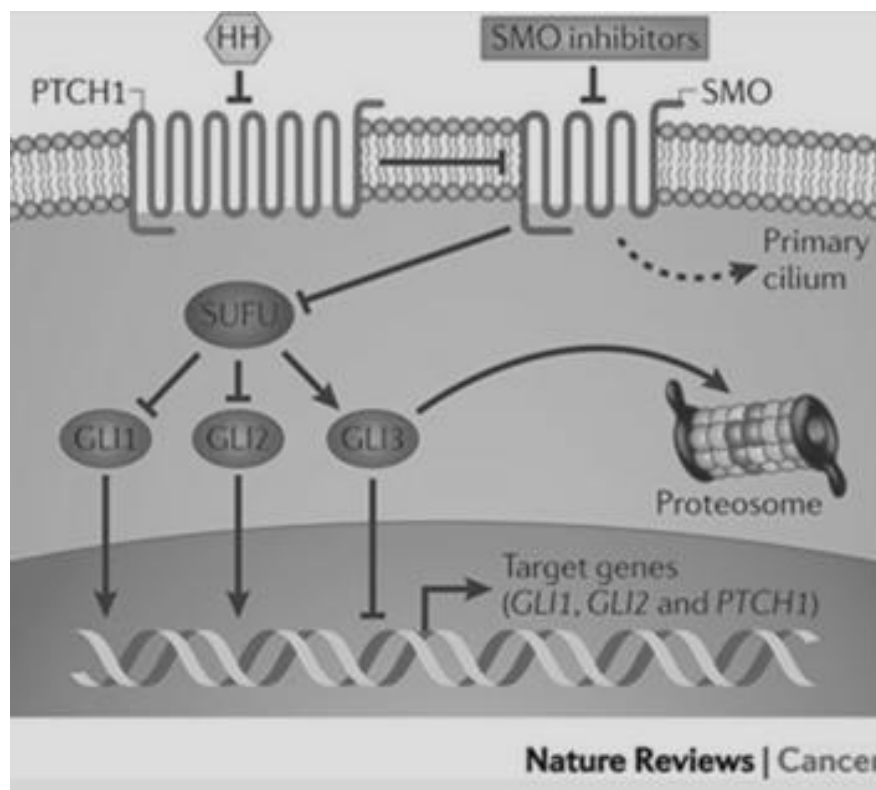


Figura 3. Vía de señalización de Hedghog. Cuando el ligando Hedghog (HH) se une a Patched (PTCH-1), causa su internalización y degradación, con la posterior liberación de la supresión de Smoothened (SMO). Entonces, SMO entra en los cilios primarios, donde se activa (flecha discontinua). SMO entonces interacciona con el supresor de fusión (SuFu) que a su vez, promueve la activación y translocación nuclear de los oncogenes homólogos 1 y 2 asociado al glioma (GLI1 y GLI2) y la degradación de GLI3 permitiendo la expresión de genes que promueven la proliferación celular. Tomado de Curran y col., 2011.

### 3.2.2 Histología

El revestimiento del TOQ es epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado u ortoparaqueratinizado; tal epitelio consiste en cinco a ocho capas de células de espesor con ausencia de crestas interpapilares (Fig. 4) (6). La capa basal se presenta en empalizada con células cilíndricas o cúbicas y los núcleos hiper cromáticos se orientan lejos de la membrana basal. Las figuras mitóticas son vistas en la capa suprabasal (Fig. 4). La capa de queratina se ve como una superficie ondulada o corrugada (Fig. 4). Por lo general, el tejido conectivo está desprovisto de un componente inflamatorio (6).

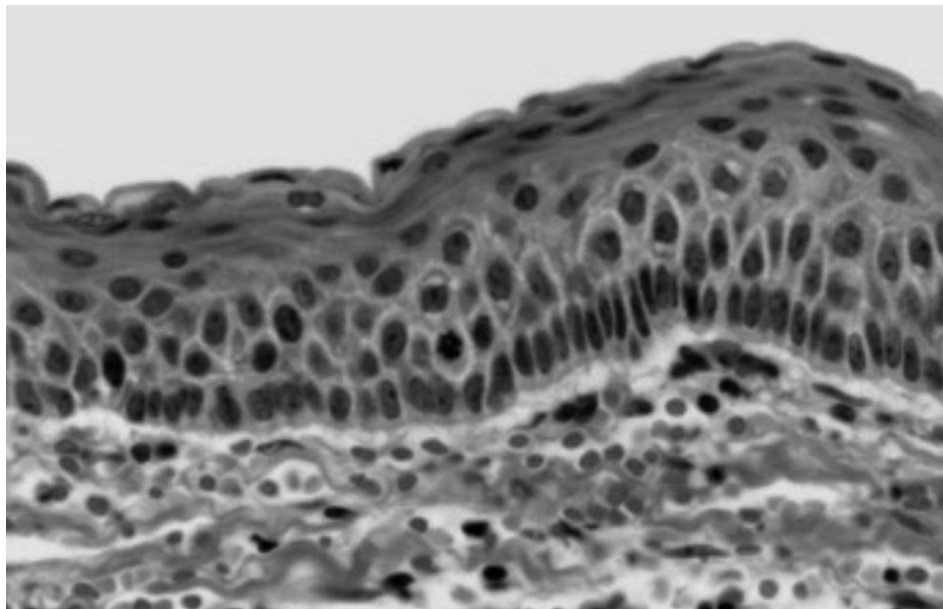


Figura 4. Aspecto histopatológico de TOQ. Sección de TOQ que presenta de 5 a 8 capas de células; las células basales en empalizada son prominentes con núcleos hiper cromáticos y existe presencia de una superficie típica de aspecto corrugado paraqueratinizado. Se muestra mitosis en la capa suprabasal. Tomado de Barnes y col., OMS 2005.

### 3.3 QUISTE DENTÍGERO (QD)

El quiste dentígero (QD), o también llamado quiste folicular, aparece como una lesión unilocular, radiolúcida, bien definida y asintomática (excepto cuando

alcanza un tamaño considerable) (9). Se asocia a la corona de dientes no erupcionados y clínicamente puede expandir el hueso cortical hasta tal punto que provoca el desplazamiento de los gérmenes dentarios y la reabsorción radicular de los dientes adyacentes (9,48,49).

### **3.3.1 Etiología y Epidemiología**

El QD se forma a partir del epitelio reducido del esmalte, y su contenido es líquido (50). La incidencia relativa del QD en amplias series de casos oscila entre el 18 y el 33%, siendo el quiste odontogénico de desarrollo más frecuente y el segundo después del quiste radicular de todos los quistes presentes en mandíbula y maxilar (4, 51). Suele aparecer en la segunda y tercera década de vida (4,52). Afecta más a hombres y aparece con más frecuencia asociado a los terceros molares inferiores, seguido por los caninos superiores y los terceros molares superiores (4, 49,51).

### **3.3.2 Histología**

Por lo general, el QD está constituido por una pared de tejido conectivo con una capa delgada de epitelio escamoso estratificado que tapiza la luz del quiste (Fig. 5). La formación de brotes epiteliales suele faltar, salvo que exista infección secundaria (11). La pared de tejido conectivo a menudo es bastante gruesa y se compone de mucho tejido conectivo fibroso. Además la superficie del epitelio suele estar cubierta de una delgada capa "acanalada" de paraqueratina y ortoqueratina similar a la observada en el quiste primordial y los otros quistes odontogénicos (10) (Fig. 5).

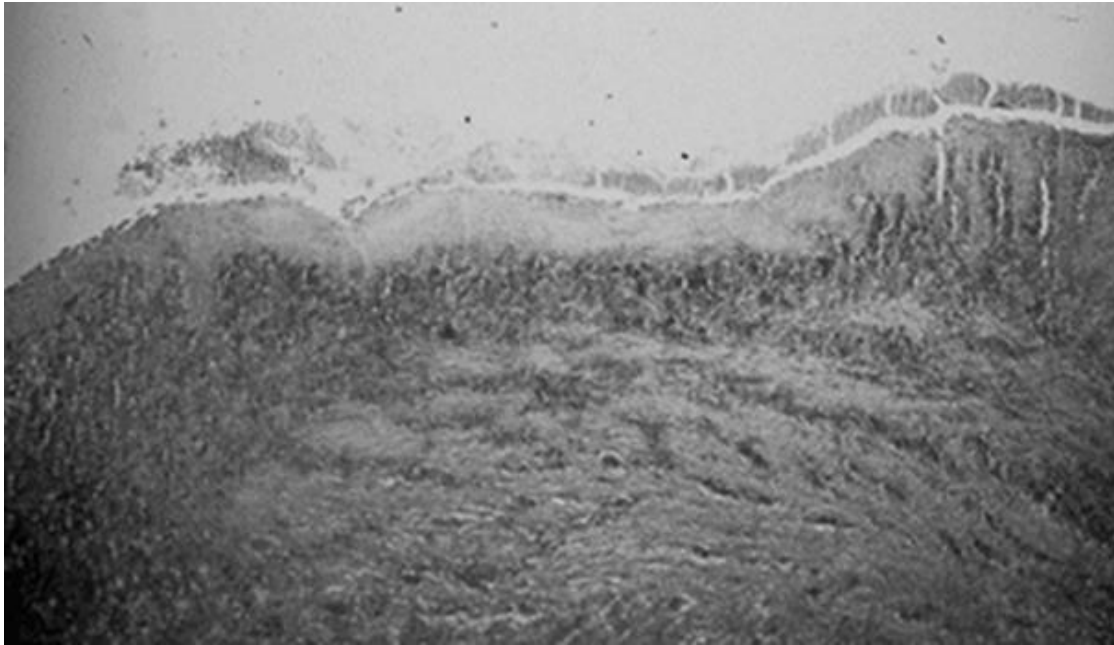


Figura 5. Aspecto histopatológico de biopsia escisional de quiste dentífero. El estudio histopatológico muestra epitelio de pocas células de espesor y en su mayor parte no queratinizado. La pared quística está compuesta por tejido conjuntivo fibroso con fibras colágenas entremezcladas por fibroblastos, dentro de la misma se evidencia pequeños nidos de epitelio odontogénico. Tomado Tami y col. 2000.

### **3.3.3 Complicaciones**

El QD es potencialmente capaz de convertirse en una lesión agresiva, produciendo expansión ósea, asimetría facial, desplazamiento dental, resorción radicular de los dientes adyacentes y dolor (53).

En el maxilar inferior, a consecuencia de un QD de la zona molar puede llegar a producirse una resorción casi total de la rama ascendente, con el desplazamiento del molar (50,53). Un QD en un canino superior produce expansión de la porción anterior del maxilar superior y puede semejarse a una celulitis o a una sinusitis (50, 51,53). En el maxilar superior puede invadir el seno maxilar y producir una sinusitis, también puede progresar hacia las fosas nasales y la fosa pterigomaxilar produciendo dolor e infección, en ocasiones produciendo supuración y fístulas al

exterior (53). Las complicaciones más serias serían la formación de un ameloblastoma, el desarrollo de un carcinoma epidermoide o la formación de un carcinoma mucoepidermoide (54).

### **3.3.4 Consideraciones Terapéuticas**

Las opciones terapéuticas del QD son la descompresión, marsupialización o la enucleación según las características de la lesión; los criterios que dictarán la modalidad de tratamiento son el tamaño y la localización de la lesión, la edad del paciente, la dentición que presenta y la posible afectación de estructuras anatómicas importantes (55). La exéresis simple está indicada cuando no hay riesgo de lesionar estructuras anatómicas, tales como, ápices de dientes vitales vecinos, seno maxilar o el nervio dentario inferior (50,55). En cambio, la marsupialización está indicada cuando el quiste haya desplazado dientes, o si se quiere que erupcione el diente impactado asociado al quiste (51,55,56).

## **3.4 PROTEÍNA ODONTOGÉNICA ASOCIADA A AMELOBLASTOS (ODAM)**

La proteína odontogénica asociada a ameloblastos (ODAM, por sus siglas en inglés *odontogenic ameloblast-associated protein*), anteriormente designada con el nombre de Apin, fue originalmente clonada de la línea celular humana KATO III (57) y detectada por primera vez como proteína única del depósito amiloide del tumor odontogénico epitelial calcificante (CEOT) (58).

En mamíferos, ODAM consta de 273 a 281 aminoácidos dependiendo la especie, conteniendo en humanos 279 residuos (59). ODAM contiene una secuencia de péptido señal conservada con sitio de corte en el aminoácido Serina 15 y una secuencia rica en residuos de glutamina y prolina (59, 60).

El gen ODAM se localiza en el locus 4q13 formando parte del grupo de genes de SCPP's (fosfoproteínas secretoras de unión a calcio); los cuales han sido implicados en el desarrollo y mineralización de huesos y dientes (60, 61, 62).



ODAM ha sido implicado en diversos procesos, como la diferenciación de ameloblastos, la maduración y mineralización del esmalte, la formación y regeneración del epitelio de unión, el crecimiento tumoral y la metástasis (60, 63, 64). Además, ODAM se expresa en diversos tipos de neoplasias tales como cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama y en tejidos sanos como glándulas salivales, glándulas nasales y tráquea (60,65).

A pesar de los diferentes procesos en los que se ha implicado la expresión de ODAM, su función precisa permanece ampliamente desconocida.

#### **3.4.1 ODAM en la mineralización del esmalte**

La formación del esmalte dental se divide en tres estadios: i) secretor; ii) de transición; y iii) de maduración (66). Durante el estadio secretor, los ameloblastos columnares secretan proteínas especializadas conocidas como proteínas de matriz extracelular, incluyendo amelogenina, ameloblastina, enamelin, enamelinina (67) y la más recientemente encontrada, ODAM (68).

En un estudio hecho por Lee y col. en 2010 (63), se determinó que la localización subcelular de ODAM varía de manera etapa-específica durante la diferenciación de ameloblastos (Fig. 6). Durante la etapa secretora de la amelogénesis, ODAM se localizó en el núcleo y el citoplasma de los ameloblastos; sin embargo, durante la etapa de maduración de la amelogénesis, ODAM se observó en el citoplasma y en la interfaz entre los ameloblastos y la capa de esmalte, pero no en el núcleo (Figura 6).

Además, ODAM se detectó en el medio condicionado de la línea celular de linaje de ameloblastos (ALC) entre los días 14 a 21, que coincidió con la etapa de maduración de la amelogénesis (63).

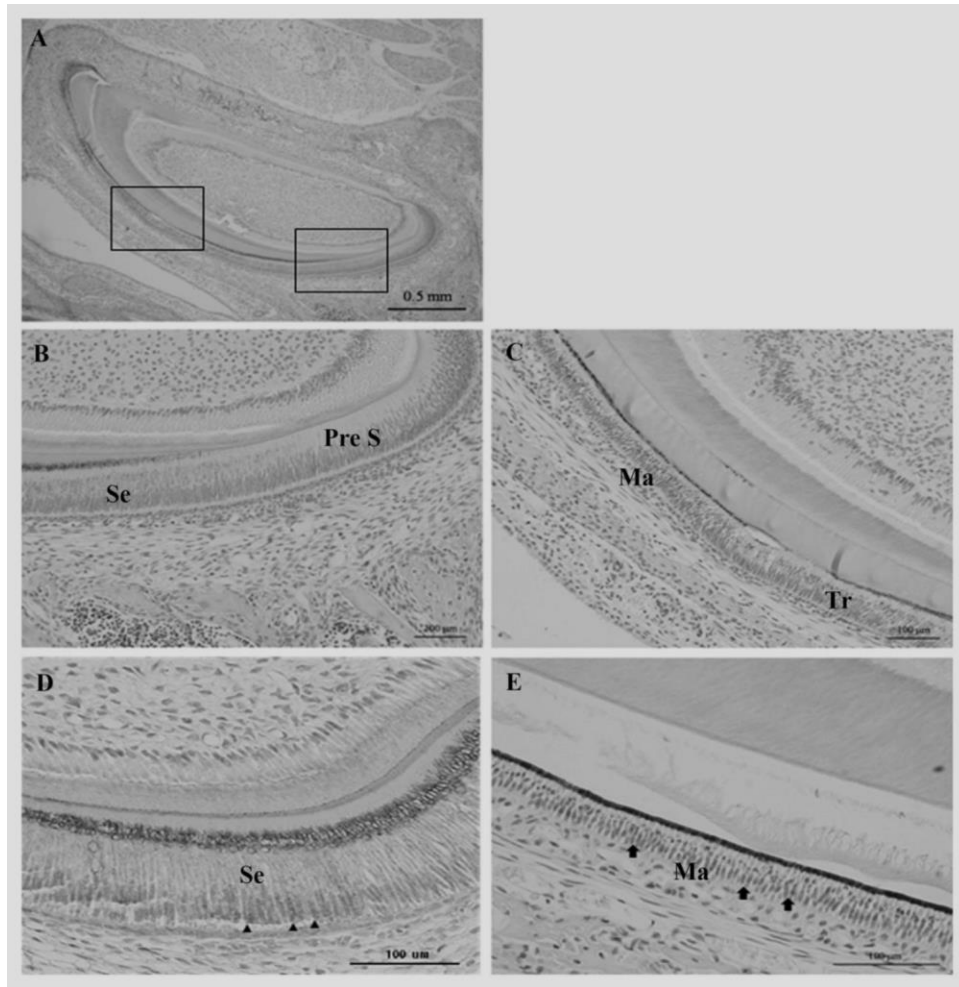


Figura 6. Análisis inmunohistoquímico de la expresión ODAM durante la diferenciación de ameloblastos en el incisivo inferior de un ratón de 16 días de edad. (A y B) Ameloblastos presecretorios, los cuales carecen de expresión de ODAM. (C) Ameloblastos en etapa de transición que expresan ODAM en la región supranuclear del citoplasma. (D) Ameloblastos secretorios que expresan ODAM en su núcleo (puntas de flecha) y el citoplasma. (E) Ameloblastos en la etapa de maduración que no expresan la proteína ODAM en su núcleo (flechas). Pres, pre-secretora; Se, secretora; Tr, de transición; Ma, de maduración. Tomado de Lee y col., 2010.

La proteína Runx2, también denominada CBFA1, es un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos (69). Está presente en el estadio secretor tardío y de maduración de los ameloblastos (70) y también se expresa durante el desarrollo glandular mamario, así como en cáncer de mama, donde se asocia con metástasis (71). Runx2, el cual es estimulado por BMP-2 (proteína morfogenética ósea 2) o TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante

beta), controla factores que actúan en el desarrollo del epitelio del órgano del esmalte (72). Se ha demostrado que el promotor del gen de ODAM contiene sitios de unión a Runx2 (73), lo cual sugiere que Runx2 puede estar envuelto en estadios de la formación del órgano del esmalte y puede también tener una implicación directa en la formación del esmalte dental. Por otra parte, la metaloproteínasa de matriz 20 (MMP-20, también conocida como enamelinasa) ha mostrado tener una función en la formación del esmalte. La MMP-20 juega un rol importante en la degradación de amelogenina, la cual es esencial para el crecimiento axial de los cristales del esmalte (67, 68, 74). La expresión de MMP-20 también se ha detectado en tejidos patológicos como en los tumores odontogénicos (75) y carcinomas de mama, entre otros (76). Se ha determinado que la expresión nuclear de Runx2 y ODAM correlaciona con la expresión de MMP-20 en ALC (63). El aumento de expresión de ODAM y Runx2, aumenta la expresión de MMP-20, y la expresión de Runx2 aumenta la expresión de ODAM, no siendo así de manera contraria (63). La pérdida de Runx2 en ALC disminuye la expresión de ODAM, resultando en baja regulación de la expresión de MMP-20 (63). Cuando aumenta la expresión de MMP-20, se acelera el procesamiento de amelogenina durante la mineralización del esmalte (63), por lo que se sugiere que Runx2 regula la expresión de ODAM a nivel proteínico y que ODAM con localización nuclear tiene una función reguladora importante en la mineralización del esmalte a través de la regulación de la expresión de MMP-20 (Fig. 7).

A pesar que se especula que el papel de ODAM extranuclear puede implicar la adhesión y la unión celular (Fig. 7), la función de ODAM citoplasmática o secretada en ameloblastos en etapa de maduración, aún se encuentra indeterminada.

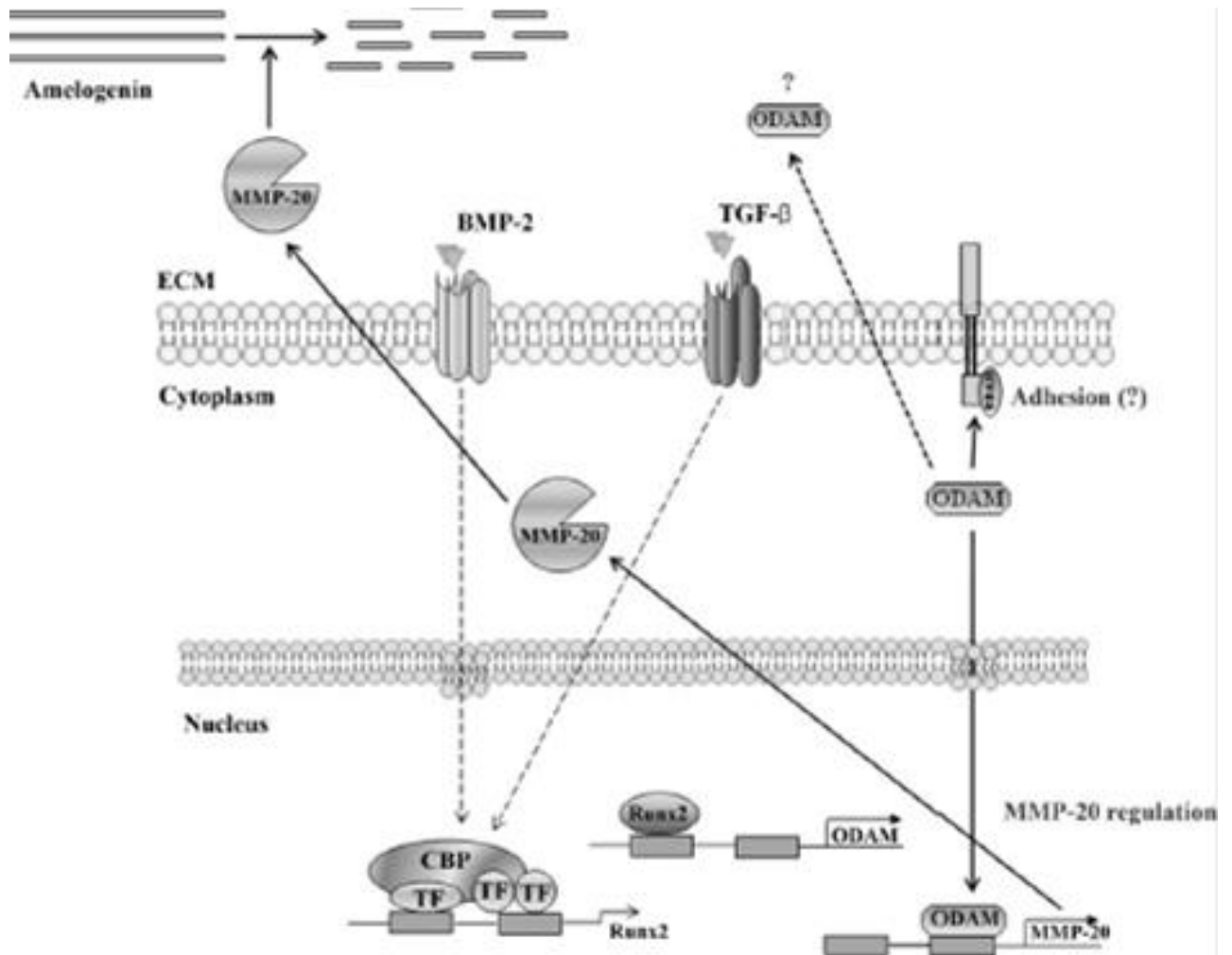


Figura 7. Modelo propuesto para la activación transcripcional de MMP-20 a través de la cooperación de Runx2 y ODAM nuclear. Runx2 se asocia con el promotor de ODAM y ODAM se recluta en el promotor de MMP-20. Así, Runx2 regula la expresión de ODAM y ODAM tiene un efecto en la activación de MMP-20. Tomado de Lee y col., 2010.

### 3.4.2 ODAM en el desarrollo de tumores

La expresión de ODAM ha sido demostrada en diversos tipos de tumores, tanto benignos como malignos, incluyendo tumores odontogénicos, así como diversos

tipos de cáncer, dentro de los que se encuentran el de pulmón, el gástrico y el de mama. (58, 63, 77) (Fig.8).

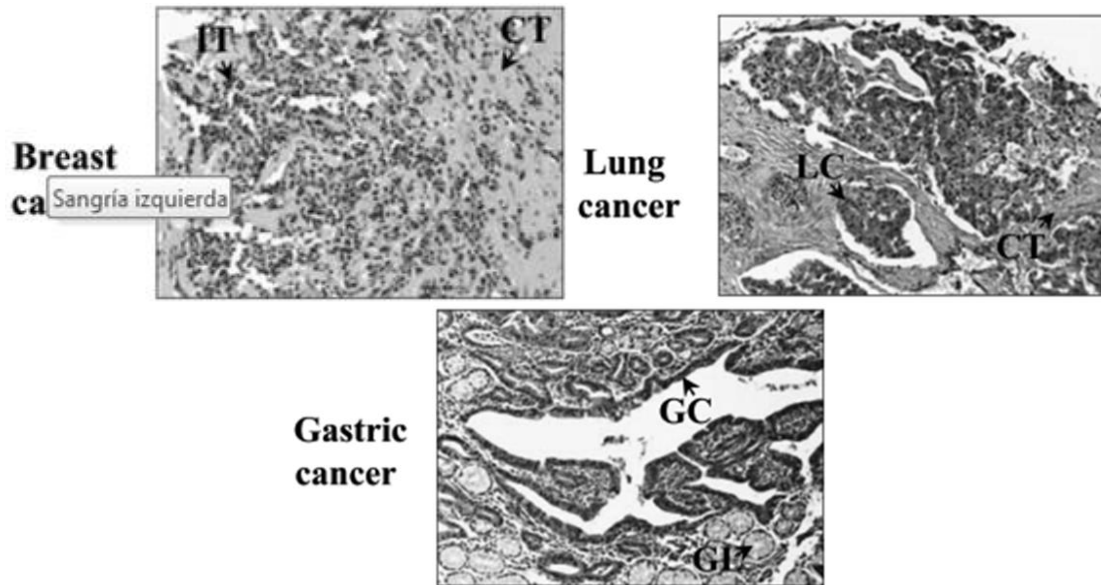


Figura 8. Inmunolocalización de ODAM en distintos tipos de cánceres de estirpe epitelial. Inmunodetección de ODAM en secciones de cáncer de mama, de pulmón y gástrico con anticuerpo anti-ODAM acoplado a peroxidasa. CT, tejido conectivo; IT, infiltración de células tumorales; LC, células de carcinoma de pulmón; GC, células de carcinoma gástrico; GL, glándula gástrica. Tomado de Kestler y col., 2008.

Se han realizado diversas investigaciones para lograr una mayor comprensión de la posible función de ODAM en el proceso de carcinogénesis de diferentes tumores y tratar de identificar procesos que muestren que ODAM podría servir como un biomarcador de la enfermedad.

Un estudio hecho por Siddiqui y col. 2009 (78) mostró que ODAM parece servir como un marcador de pronóstico favorable en cáncer de mama; mostrando que existe una correlación estadísticamente significativa entre la presencia nuclear de ODAM y una mayor supervivencia a los 5 años en los pacientes que presentaban

dicha enfermedad, independientemente de la etapa de en la que se encontraban (78) (Tabla 2).

Stage	Stain	5 Year Survival	n (%)	% Difference w/in Stage
0	Positive	Deceased	0 (0%)	$\Delta$ in survival = 2%
		Alive	2 (100%)	
	Negative	Deceased	1 (2%)	$\Delta$ in survival = 5.7%
		Alive	50 (98%)	
I	Positive	Deceased	2 (15.4%)	$\Delta$ in survival = 8.3%
		Alive	11 (84.6%)	
	Negative	Deceased	8 (21.1%)	$\Delta$ in survival = 12%
		Alive	30 (78.9%)	
II	Positive	Deceased	1 (7.1%)	$\Delta$ in survival = 13.9%
		Alive	13 (92.9%)	
	Negative	Deceased	6 (15.4%)	Chi square = 33.274, $P < 0.001$
		Alive	33 (84.6%)	
III	Positive	Deceased	5 (25.0%)	$\Delta$ in survival = 13.9%
		Alive	15 (75.0%)	
	Negative	Deceased	10 (37.0%)	
		Alive	17 (63.0%)	
IV	Positive	Deceased	21 (77.8%)	
		Alive	6 (22.2%)	
	Negative	Deceased	11 (91.7%)	
		Alive	1 (8.3%)	

Tabla 2. Expresión nuclear de ODAM y sobrevivencia de 5 años en diferentes estadios de cáncer de mama. Tomado de Siddiqui y col. 2009.

Con el objetivo de investigar la función de ODAM en la regulación del crecimiento tumoral y de la metástasis, Kestler y col. 2011 (64) realizaron un estudio en donde llevaron a cabo la transfección de ODAM a la línea celular MDA-MB-231 que corresponde a células de cáncer de mamá altamente invasivas, las cuales son normalmente negativas para la expresión de esta proteína. La sobre expresión de ODAM en células de cáncer de mama humano, mostró una marcada inhibición de sus propiedades neoplásicas; aumentando la actividad apoptótica (Fig. 9), disminuyendo la tasa de crecimiento tumoral (Fig. 10), y suprimiendo el desarrollo de metástasis (Fig. 11) (64).

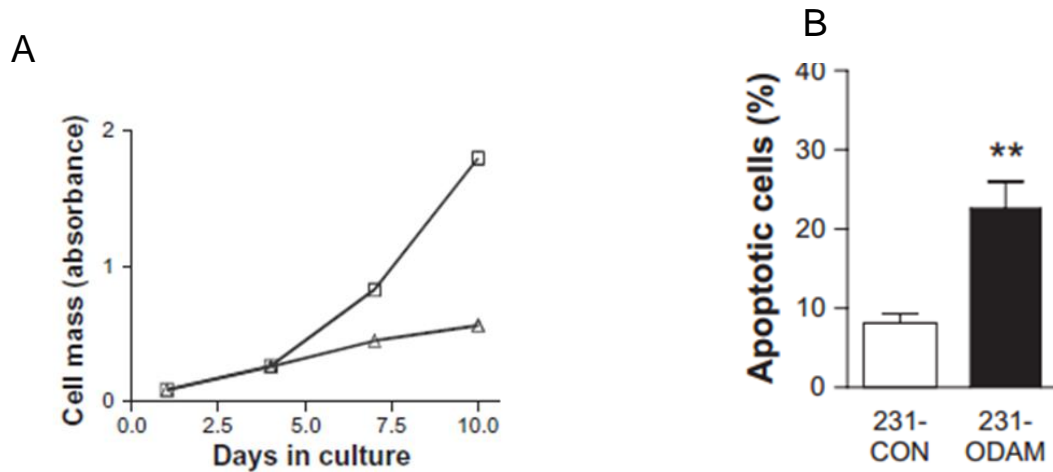


Figura 9. La expresión de ODAM inhibe el crecimiento y provoca apoptosis de células MDA-MB-231. (A) Tasa de crecimiento de células MDA-MB-231 transfectadas con ODAM ( $\Delta$ ) y células control sin la transfección ( $\square$ ). (B) Actividad apoptótica de células transfectadas con ODAM (231-ODAM) y células control (231-CON) basándose en la tinción con Anexina V. Tomado de Kestler y col., 2011.

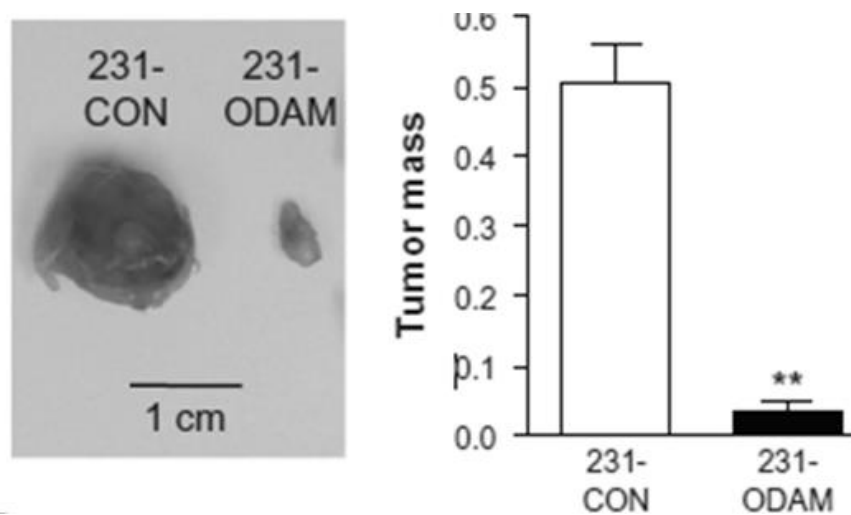


Figura 10. La expresión de ODAM suprime el desarrollo de la masa tumoral de células MDA-MB-231 en ratones. Tumores obtenidos seis semanas después de la implantación de  $3 \times 10^6$  células MDA-MB-231 transfectadas con ODAM (231-ODAM) y células control sin la transfección (231-CON). Tomado de Kestler y col., 2011.

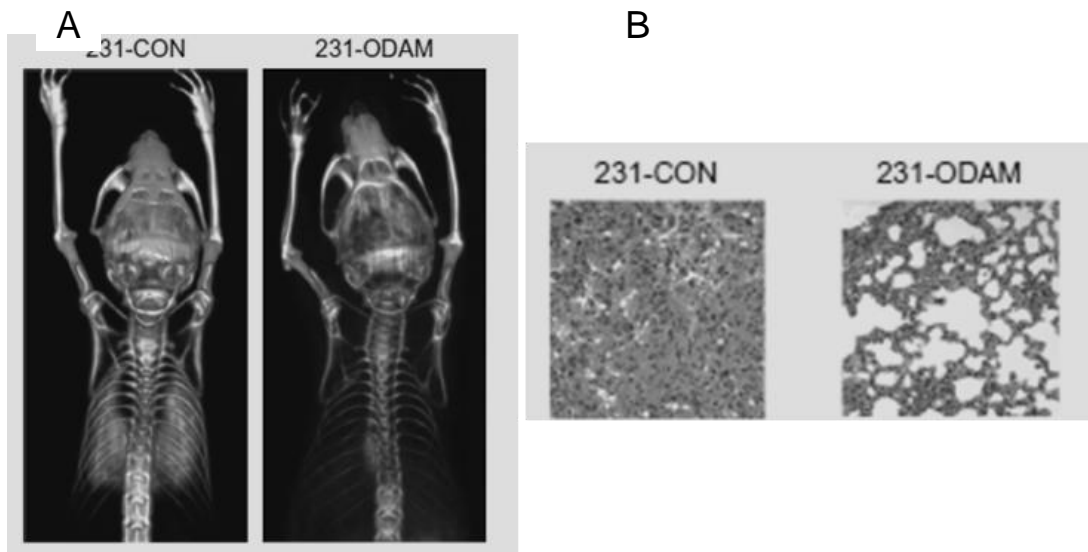


Figura 11. La expresión de ODAM suprime el desarrollo de metástasis de pulmón en ratones. (A) Imagen dorsal generada mediante PET (tomografía por emisión de positrones) de la acumulación de  $^{18}\text{F}$ FLT (fluorotimidina F 18) en pulmones de ratones después de 31 días de la inoculación intravenosa de  $8 \times 10^5$  células de MDA-MB-231 tranfectadas con ODAM (231-ODAM) y con  $8 \times 10^5$  células control (231-CON). (B) Tinción con hematoxilina y eosina representativa del tejido de pulmón de los ratones tranfectados con ODAM (231-ODAM) y de los ratones control sin la transfección (231-CON). Tomado de Kestler y col., 2011.

### 3.4.3 Expresión de ODAM en el ameloblastoma

Como se mencionó anteriormente, la expresión de ODAM se ha demostrado en diferentes tumores odontogénicos como lo es el CEOT, donde fue descrita por primera vez (58). En cuanto a la expresión de ODAM en las lesiones de nuestro interés ya descritas, sólo existen reportes de ensayos de inmunohistoquímica en ameloblastoma (77, 79); y referente al TOQ, existe un reporte de expresión de proteínas de matriz del esmalte, dentro de las que se encuentra ODAM, determinado por ensayo de qRT-PCR (80).

Existe controversia en las investigaciones realizadas acerca de la expresión de ODAM en ameloblastoma. En 2008 Kestler y col. (77), realizaron un estudio para poder ofrecer evidencia de la expresión de ODAM en diferentes tipos de tejidos, tantos dentales como los que no lo son, como glándula salival y tráquea; también



realizó el análisis en tejidos tumorales dentro de los que se encontró ameloblastoma, donde se detectó la presencia de ODAM (Fig. 12).

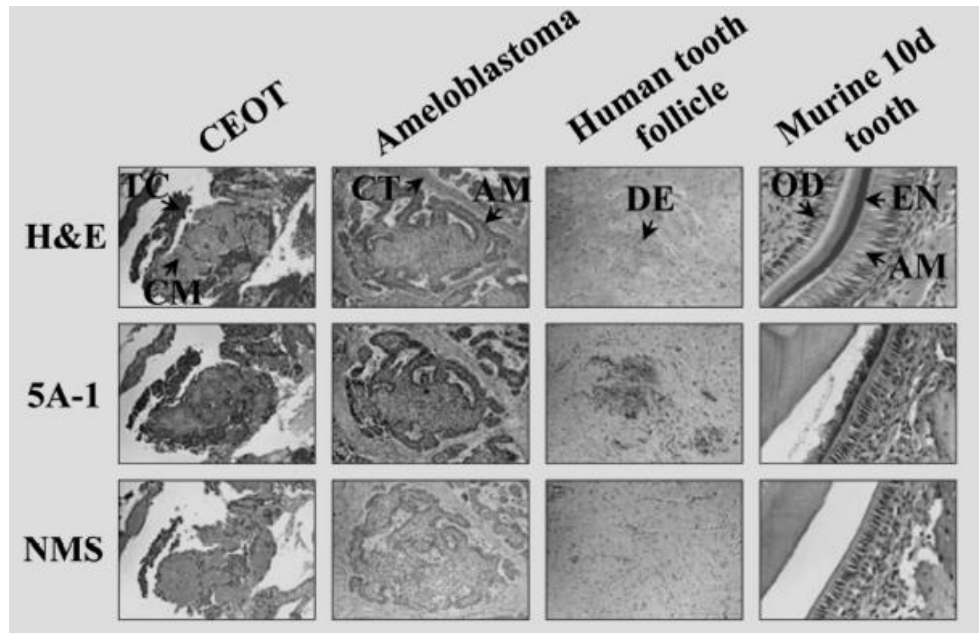


Figura 12. Detección inmunohistoquímica de ODAM en el tejido dental normal y patológico. Se muestra la expresión de ODAM en CEOT, ameloblastoma, un diente supernumerario extraído y un diente en desarrollo de un ratón de 10 días de edad. Los paneles superiores describen las secciones teñidas con hematoxilina-eosina (H&E); los paneles medio e inferior muestran tinción de células incubadas con anticuerpo monoclonal anti-ODAM (5A-1) o con suero normal de ratón (NMS). TC, células tumorales calcificantes epiteliales; CM, material calcificado que contiene amiloide; AM, ameloblastos; CT, tejido conectivo; DE, epitelio dental; OD, odontoblastos; EN, esmalte. Tomado de Kestler y col. 2008.

Por el contrario, en el estudio hecho por Macedo y col. en 2011 (79), donde se evaluó la expresión en diferentes tumores odontogénicos de diferentes proteínas de la matriz que se expresan durante la formación del esmalte (amelogenina, amelotina, ameloblastina y ODAM), no se detectó la presencia de ODAM en ninguno de los cuatro especímenes de ameloblastoma analizados (Tabla 3) (79).

		<i>Antibody</i>			
		<i>AMB</i>	<i>AMTN</i>	<i>ODAM</i>	<i>AMEL</i>
Odontoma (n = 1)	Enamel matrix	-	+	-	+
	Forming enamel surface	+	+	+	+
	Secretory ameloblasts	+ <sup>b,d</sup>	+ <sup>b</sup>	+ <sup>d</sup>	+
	Ghost cells and related calcifications	-	+	-	+
	Ectomesenchymal tissue with myxoid (loose) appearance (similar to dental papillae)	-	+	-	+ <sup>c</sup>
	Ectomesenchymal tissue with dense cellularity	-	-	-	-
Ameloblastoma (n = 4)	Other structures	-	-	-	-
CCOT (n = 2)	Ghost cells	+ <sup>a,c</sup>	+ <sup>a,c</sup>	-	-
	Transitory cells toward ghost cells	+	+ <sup>c</sup>	+ <sup>a,c</sup>	-
	Unspecific groups of epithelial cells	-	-	+ <sup>a,c</sup>	-
	Inflammation area	-	+	-	-
AF (n = 1)		-	-	-	+ <sup>c</sup>
OF (n = 1)		-	-	-	-
REE (n = 7)	Cylindrical upper cells	+ <sup>c,e</sup>	+ <sup>c,e</sup>	+ <sup>c,e</sup>	-
Dental lamina (n = 4)	Basal cells (cubic)	-	-	-	N/A <sup>f</sup>

Tabla 3. Detección inmunohistoquímica de proteínas de matriz del esmalte en tumores odontogénicos. CEOT, tumor odontogénico epitelial calcificante, AF, fibroma ameloblástico; OF, fibroma odontogénico y REE, órgano reducido del esmalte; + positivo, +/- débil positivo, - negativo. Tomado de Macedo y col. 2011

Como se ha explicado en el presente escrito, la expresión de ODAM se ha visto implicada en diferentes condiciones, tanto fisiológicas como patológicas; mostrando así la importancia de su estudio.

Gran parte de las investigaciones realizadas sobre dicha proteína, han tenido como objetivo la búsqueda de la función que tiene en el proceso (desarrollo o inhibición) de la tumorigénesis.

Así, a pesar de la importancia de ODAM en el proceso odontogénico y en el control de diversos tumores de estirpe epitelial, hasta el momento no existe un reporte donde se realice el análisis de la expresión de ODAM en TOQ y QD; además de existir discrepancia en su expresión en el ameloblastoma. Además, ODAM representa una proteína de nuevo estudio por lo que la proteína no ha sido cristalizada para poder tener una idea relevante de estructura-función de ésta.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Las lesiones de la cavidad oral, en diversas ocasiones, requieren de un tratamiento agresivo e invasivo; por lo cual es importante proveer bases para un mejor entendimiento del comportamiento biológico de estas lesiones que sirva como guía para un adecuado tratamiento y evitar posteriores recurrencias.

La proteína ODAM ha sido implicada en diversas actividades como la diferenciación de los ameloblastos, la formación y regeneración del epitelio de unión y en el crecimiento tumoral y la metástasis, sugiriendo un amplio papel fisiológico; sin embargo, la función precisa de ODAM permanece en gran medida desconocida.

En la actualidad no existen reportes en la literatura sobre los niveles de expresión ni se ha realizado la caracterización estructural de ODAM en TOQ y QD. Además en el caso particular del ameloblastoma, existen controversias acerca de su expresión. Por lo tanto, sería importante analizar la expresión de ODAM en estas lesiones odontogénicas para iniciar el estudio de esta proteína en la biología de las mismas.

## **V. HIPÓTESIS**

Las lesiones odontogénicas presentan diferencia en los niveles de expresión y en la localización subcelular de ODAM.

## **VI. OBJETIVOS**

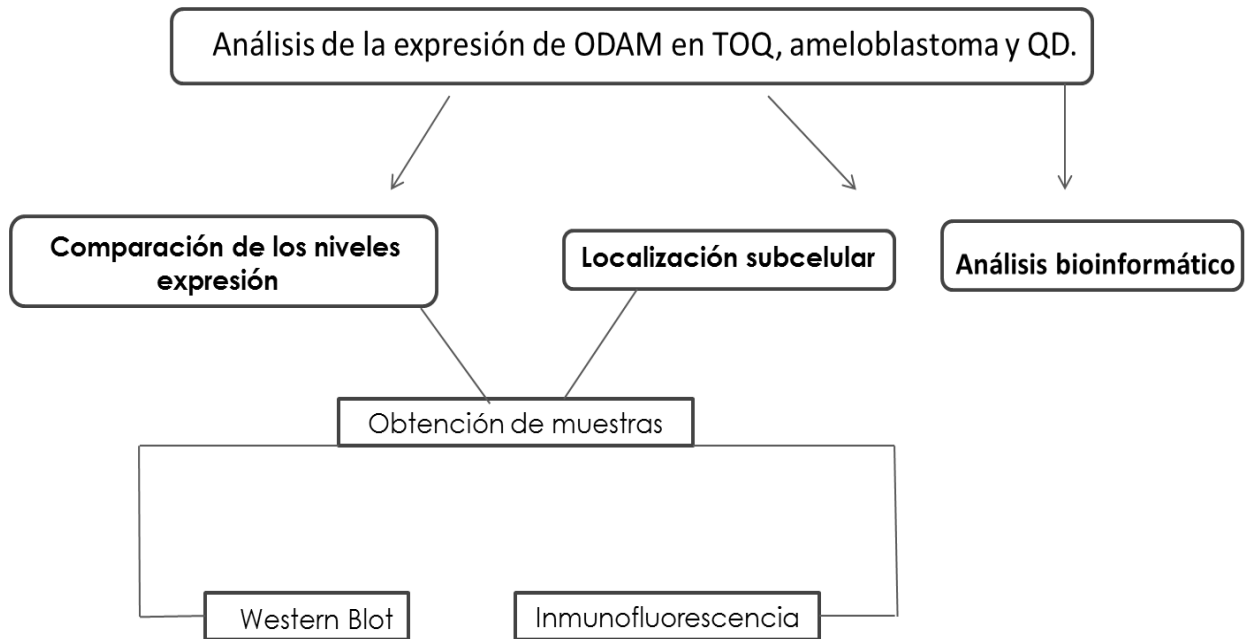
### **Objetivo General**

Analizar la expresión de ODAM en ameloblastoma, TOQ y QD.

### **Objetivos particulares**

- 1.- Realizar el análisis bioinformático de ODAM.
- 2.- Comparar los niveles de expresión de ODAM entre ameloblastoma, TOQ y QD.
- 3.-Localizar a la proteína ODAM en las diferentes lesiones odontogénicas.

## VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

### **Análisis *in silico***

Se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas para poder realizar un análisis *in silico* de la secuencia de la proteína ODAM, que proporcionó datos que ayudan a lograr una mejor comprensión de las funciones de ésta. Para estudiar su homología con otras proteínas se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los dominios de la proteína se analizaron con diferentes bases de datos como son: CDD (Conserved Domain Database) encontrado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/StGructure/cdd/cdd.shtml>, Pfam en <http://pfam.xfam.org/> y SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) en [30](http://smart.emblc-</a></p></div><div data-bbox=)

heidelberg.de/. Posteriormente se llevó a cabo la predicción de su estructura 3D aún desconocida, basándose en los resultados proporcionados por el servidor I-Tasser en <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>.

### **Obtención de muestras**

Las muestras de QD, ameloblastoma y de TOQ se obtuvieron del departamento de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México. Dichas muestras fueron tomadas inmediatamente después de la realización de su extirpación y fueron lavadas con solución fisiológica con el fin de eliminar sangre y residuos contaminantes. Las muestras de tejido fueron depositadas en criotubos, se colocaron en nitrógeno líquido y se conservaron almacenándolas a  $-80^{\circ}$  hasta su uso.

### **Extracción de proteínas de tejido tumoral y cultivo celular.**

La lesión odontogénica almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido, se disgregó con ayuda de un mortero para posteriormente agregar 300  $\mu\text{l}$  de amortiguador RIPA (Tris, NaCl, NP-40 1%, Desoxycolato de Sodio 1%, Dodecilsulfato Sódico [SDS] 0.1%) y 8  $\mu\text{l}$  de inhibidor de proteasas (COMPLETE ROCHE) 40x. Dichas muestras se sometieron a sonicación con pulsos al 80% en 2 lapsos de 10 segundos (Sonics Vibra-Cell VCX130 / CV18); finalmente el extracto se centrifugó a 20817  $\times g$  10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se removió el sobrenadante para su uso posterior; las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En caso de cultivo, cuando se obtuvo un 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa con amortiguador fosfato salino (PBS) y se agregó el amortiguador de lisis RIPA para continuar con los pasos ya mencionados. La cuantificación de las proteínas obtenidas se realizó con el kit DC-Protein Assay (Bio-Rad).

### **Ensayos de Western blot**

Se utilizaron 40  $\mu\text{g}$  de proteínas obtenidas de tejido o de cultivo celular, las cuales se mezclaron con el amortiguador de carga (Tris-HCl 0.5M, glicerol 10%, SDS 5%), se les agregó 1  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol y 1  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol y fueron

calentadas 5 min a 90°C para después cargarlas con micropuntas en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y se separaron por electroforesis vertical. El gel obtenido se equilibró en 20 ml de amortiguador de transferencia (10% tris, 10% glicina, 20% metanol) durante 10 min. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda a 4°C a 350 mA durante 1 h. Para verificar la transferencia de proteínas, las membranas se tiñeron con solución de rojo de Ponceu (2 g de Ponceau S, 30 g ácido tricloroacético y agua cbp 100 ml) durante 5 min a temperatura ambiente; después se lavaron hasta que desapareciera la tinción de las bandas proteicas. Entonces, las membranas fueron bloqueadas con 25 ml de PBS-leche al 5 % durante 1 h. Después se incubaron con el anticuerpo primario anti-ODAM (Abnova) a una dilución de 1: 2500 en PBS-leche 2% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó el anticuerpo primario 8 veces/5 min con PBS-Tween 0.05%. Las membranas se incubaron durante 1 h con anticuerpo secundario (Gene Tex) anti-ratón conjugado a hrp (horse-radish peroxidase) en dilución 1:20 000 en PBS-leche 2% y se lavaron 8 veces/5 min con PBS-Tween 0.05%. La unión del anticuerpo primario con las proteínas de interés fue evidenciada mediante quimioluminiscencia usando el kit ECL (Amersham, GE), utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante.

Para analizar los niveles de expresión relativa para la proteína de interés (ODAM), las mismas membranas se incubaron con un anticuerpo dirigido contra la proteína actina, la cual fue utilizada como control de carga. Posteriormente, la intensidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos fue analizada mediante densitometría, donde se empleó el software Image J 1.44 (National Institutes of Health, USA). Posteriormente se determinó para cada muestra la relación densitométrica de la banda reconocida por el anticuerpo anti-ODAM con respecto a la de la banda reconocida por el anticuerpo anti-actina y al valor obtenido para la muestra de QD se eligió arbitrariamente como el 100% de expresión relativa. Finalmente, se utilizó la prueba estadística *t* de Student para el análisis de los resultados.

### **Ensayo con la lectina *Sambucus Nigra* (SNA)**

Después de la transferencia del gel, la membrana fue bloqueada con albúmina sérica bovina (ASB) al 5% (SIGMA), TBS pH 7.4/Tween 20 (2%) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Después de bloquear la membrana, se realizaron tres lavados rápidos con Tris fosfato salino (TBS) pH 7.4/Tween 20 (2%) y se incubó con SNA en dilución 1:25 000 en agitación constante durante 3 h a TA y 9 h a 4°C. Se realizaron 5 lavados con TBS-Tween 20 al 2% en agitación ligera durante 10 min cada uno a TA. Posteriormente la membrana fue incubada con estreptovidina conjugada a peroxidasa (Pierce) a una dilución 1:10 000 durante 2 h a TA. Se realizaron 5 lavados con TBS-Tween 20 al 2% en agitación ligera durante 10 min cada uno. La membrana fue revelada con la solución de detección (ECL Western blotting detection reagents; Amersham,GE).

### **Inmunofluorescencia**

Los tejidos se fijaron en etanol absoluto durante 48 h, se incubaron en xilol (tres cambios durante 1 h cada uno) y finalmente se incluyeron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5 µm utilizando un micrótopo RM2145 (Leica Microsystems AG). Las secciones de tejido se desparafinaron utilizando una incubadora a 60°C toda la noche. Los cortes histológicos se colocaron en xilol 10 minutos, lo cual se repitió tres veces (3x10 min). Posteriormente, las laminillas se hidrataron en soluciones descendientes de etanol (absoluto, 95%, 90%, 80%, 70%).

Ya que el reconocimiento de algunos anticuerpos pueden ser afectado por los métodos de fijación y por la inclusión de del tejido en parafina, se realizó la activación de sitios antigénicos por medio de la colocación de las laminillas en amortiguador de citratos 10 mM pH6, durante 10 min. a 95°C. Posterior a este tiempo, el tejido se dejó enfriar dentro del mismo amortiguador aproximadamente 20 min y se lavó 5 veces con agua desionizada. Los tejidos se permeabilizaron por 15 min a TA con 0.2% de Tritón X-100, se retiró el Tritón y se lavó 2 veces con PBS filtrado. Para eliminar la autofluorescencia de los cortes histológicos, se colocó una solución del colorante Sudán Negro B al 0.1% en etanol al 70%



durante 25 min.; posteriormente, se lavaron los tejidos con agua destilada por 10 min. Las muestras se incubaron con suero de bovino adulto al 10% durante 1 h a TA y posteriormente fueron incubadas con anticuerpo primario anti-ODAM con dilución 1:50 toda la noche a 4 °C. El anticuerpo primario fue lavado 4 veces con PBS para después colocar el anticuerpo secundario anti-ratón en dilución 1:150 (Alexa Flúor 488, Invitrogen) durante 1 h en cámara húmeda. Se realizaron 2 lavados y los núcleos se tiñeron con DAPI (4',6-Diamidino-fenilindol diclorhidrato, Invitogen) durante 10 min y fueron lavadas 2 veces. Finalmente, las muestras se montaron con 15 µl de Vectashield (Vector Labs) en un portaobjetos sellándolo con esmalte de uñas. La adquisición de imágenes se realizó utilizando el microscopio confocal de la marca LSM700, Carl Zeiss, Alemania; las muestras se analizaron con el software ZEN. Los controles fueron tratados bajo las mismas condiciones pero sin llevar a cabo la incubación con el anticuerpo primario.

### **Cuantificación de la inmunofluorescencia**

Con el uso de ImageJ (v1.49, NIH), se realizó la cuantificación de la inmunofluorescencia de los tejidos calculando el total de la fluorescencia celular corregida (TFCC o TCCF, del inglés Total Corrected Cell Fluorescence). Diferentes secciones de cada corte de tejido fueron seleccionadas y de cada una obtuvimos los siguientes datos: área seleccionada, densidad integrada y media de fluorescencia. Para realizar el cálculo del TFCC se utilizó la siguiente fórmula: La media de la intensidad integrada de la sección problema – (la media del área de la sección problema x la media de fluorescencia del control negativo). Posteriormente los resultados se graficaron utilizando la prueba estadística t de Student en el programa GraphPad Prism 5.

## IX. RESULTADOS

El estudio se realizó con muestras de pacientes proporcionadas por el Hospital Juárez de México admitidas mediante un diagnóstico histopatológico previo. En total se procesaron un total de 13 especímenes que fueron distribuidas de la siguiente manera:

Western Blot	Inmunofluorescencia
<ul style="list-style-type: none"><li>• 1 QD</li><li>• 3 Amelos</li><li>• 3 TOQ's</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 2 QD</li><li>• 2 Amelos</li><li>• 2 TOQ's</li></ul>

### 9.1 ANÁLISIS IN SILICO

#### 9.1.1 Predicción *in silico* de proteínas homólogas y dominios conservados.

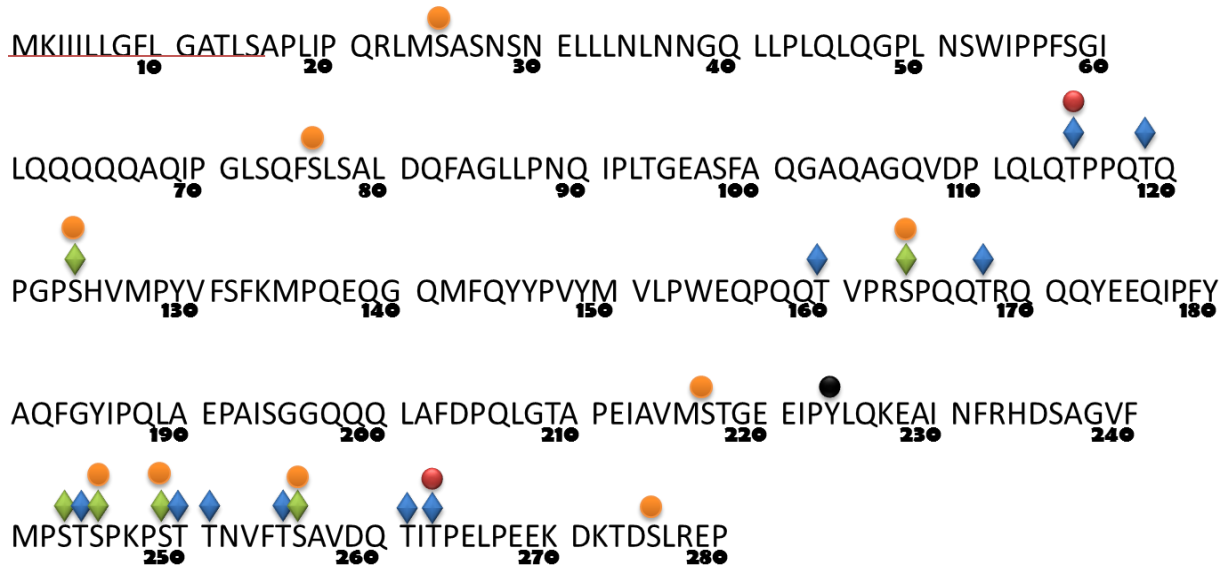
Se realizó una búsqueda de secuencias proteicas homólogas por medio de un alineamiento de tipo local hecho en el programa BLAST (81). No se obtuvieron datos relevantes en cuanto a otras proteínas que tuvieran un grado considerable de identidad con ODAM.

También se llevó a cabo un análisis de posibles dominios conservados con los servidores CDD, Pfam y SMART, encontrando que ODAM pertenecía a la superfamilia y contenía el dominio llamado ODAM, sin que estas bases de datos nos proporcionaran otros dominios funcionales encontrados en otras proteínas.

### 9.1.2 Predicción *in silico* de modificaciones postraduccionales y secuencia péptido señal

Se realizó la predicción de posibles modificaciones postraduccionales que presenta la proteína ODAM, utilizando la secuencia con número de acceso NP\_060325.3.

La presencia de potenciales sitios de glicosilación se realizó con NetOGlyc 4.0. Este es un servidor que emplea redes neuronales para la predicción de sitios de O-glicosilación tipo GalNAc en mamíferos (82). Los sitios de fosforilación se predijeron con NetPhos 2.0, que es un servidor que emplea redes neuronales para la predicción de sitios de fosforilación en serina, treonina y tirosina (83). La predicción de secuencia péptido señal se realizó con SignalP 4.1, un servidor que predice la presencia y ubicación del péptido señal y su sitio de corte en las secuencias de aminoácidos de diferentes organismos; el método utiliza una combinación de varias redes neuronales artificiales (84). El resultado de estos análisis mostró que la proteína ODAM presenta 16 sitios potenciales de O-glicosilación, 10 en residuos de serina y 6 en residuos de treonina (Fig. 13). También se identificaron 13 sitios posibles de fosforilación, 10 en serina, 2 en treonina y 1 en tirosina (Fig. 13). Además se corroboró la presencia de un péptido señal que corresponde a los primeros 15 aminoácidos (Fig. 13).



**Figura 13. Predicción de modificaciones postraduccionales en ODAM.** La figura muestra 16 posibles sitios de O-glicosilación, 10 en el residuo treonina (♦) y 6 en serina (◇). Se observa que ODAM cuenta con 13 posibles sitios de fosforilación, encontrándose 10 en el residuo serina (●), 2 en treonina (●). ODAM también presenta un péptido señal en los primeros 15 aminoácidos de su secuencia (línea color roja), teniendo un sitio de corte en el residuo 15 que corresponde a serina.

### 9.1.3 Predicción *in silico* de la estructura secundaria

La predicción de la estructura secundaria se realizó con el servidor PSIPRED v3. (85), el cual toma en cuenta el grado de conservación de proteínas homólogas encontradas por el programa psi-Blast en una base de datos no redundante (85). Los resultados mostraron que la proteína ODAM presenta 5 posibles estructuras de  $\alpha$ -hélice distribuidas tanto en la parte C-terminal como en la parte N-terminal; las  $\alpha$ -hélices predichas, se observan constituidas por un pequeño número de aminoácidos (Fig. 14). También se muestra que ODAM posee una estructura rica en estructuras conocidas como “loop” o también llamadas bucles y por el contrario, se predijo una nula existencia de estructuras en lámina- $\beta$  (Fig. 14).



α-hélice      lámina-β      — "loop"      Conf: Confianza de la predicción

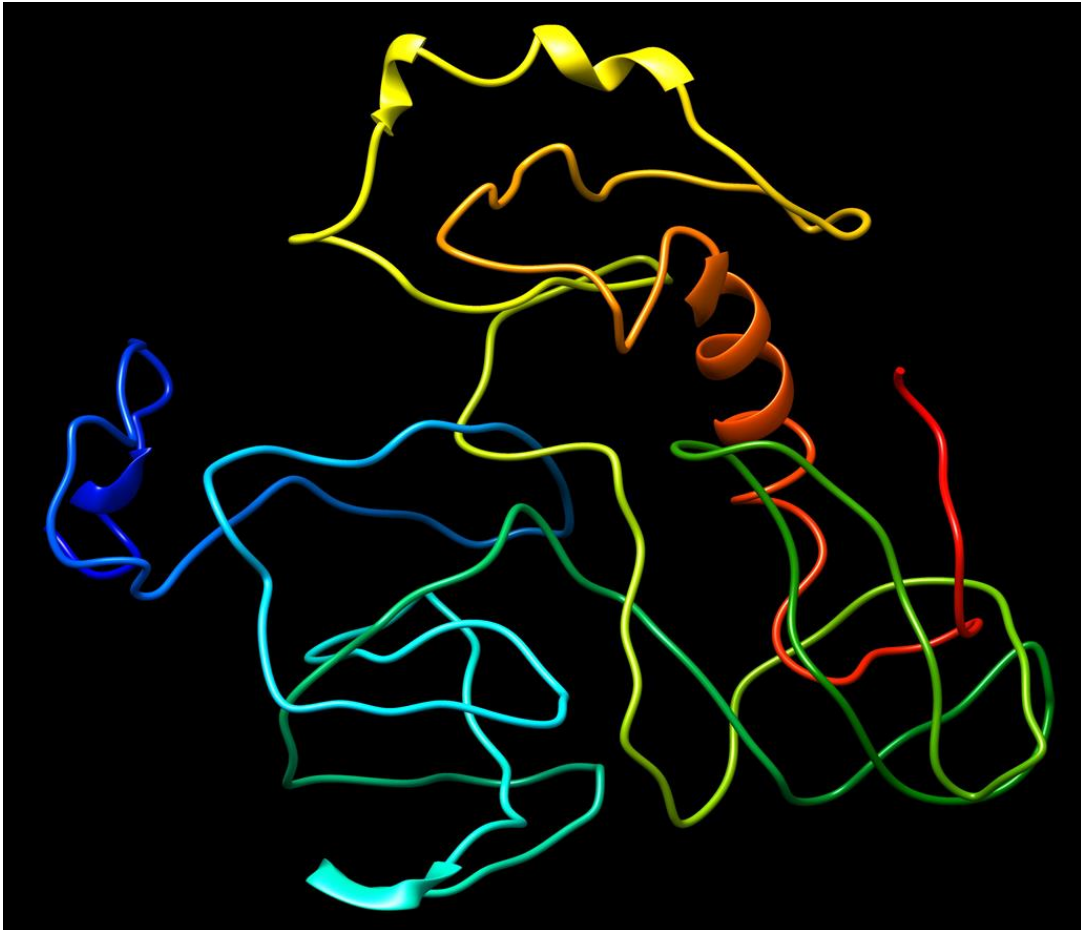
Pred: estructura secundaria predicha      AA: secuencia blanco

**Figura 14. Estructura secundaria de la proteína ODAM.** En la figura se muestra que la proteína parece carecer de estructuras en lámina β y solo presentar 5 posibles α-hélices pequeñas; la secuencia restante presenta una estructura no definida en forma de "loop".

#### **9.1.4 Predicción *in silico* de la estructura terciaria**

Para llevar a cabo el modelamiento, se eliminaron los primeros 15 aminoácidos de la secuencia proteica de ODAM porque que éstos corresponden a un péptido señal, que será escindido durante su procesamiento. Para la predicción teórica de la estructura terciaria de la proteína ODAM, se utilizó el servidor I-Tasser, un servidor que realiza un modelamiento híbrido combinando las técnicas de threading y ab-initio; se considera uno de los servidores más eficientes, siendo el número 1 en el ranking de la Evaluación Crítica de Técnicas para la Predicción de la Estructura de las Proteínas (CASP) (87). El servidor generó 5 modelos y cada uno estaba acompañando por un C-score que es el valor de confianza de la predicción de la estructura tridimensional. El C-score es un estimado de la calidad de los modelos predichos y es calculado basándose en la significancia (Z-score) de los alineamientos hechos automáticamente en el programa LOMETS, y la convergencia (densidad de “clusters”) de las simulaciones de I-TASSER (86). Los puntajes del C-score se encuentran típicamente entre -5 y 2, en donde un puntaje más alto refleja un modelo de mejor calidad. Para este resultado se eligió el modelo que el servidor predijo más estable, además de ser el modelo que concordaba con estructuras predichas modeladas por otros servidores.

La estructura predicha nos mostró resultados concordantes con la estructura secundaria anteriormente descrita, mostrando únicamente pequeñas estructuras de  $\alpha$ -hélice y observándose la mayoría de la proteína de una manera casi lineal, con gran cantidad de formas en espiral que le dan un aspecto de desorden a la estructura (Fig. 15).



**Figura 15. Predicción de la estructura tridimensional de ODAM.** En la figura se muestra una estructura con poco plegamiento y presentando únicamente pequeñas estructuras de  $\alpha$ -hélice. El modelo generado obtuvo un C-score de -3.54. El extremo N-terminal está representado de color azul marino y extremo C-terminal con color rojo.

### **9.1.5 Predicción *in silico* de ODAM como proteína intrínsecamente desordenada**

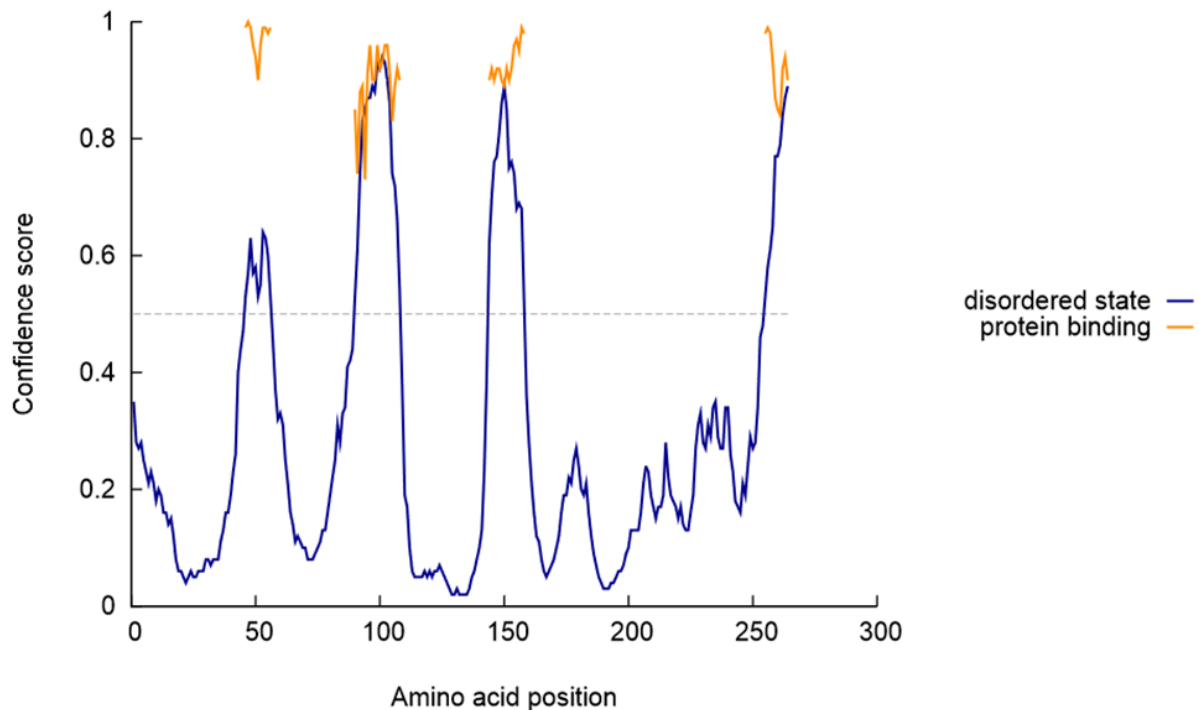
Las características conformacionales del modelamiento de ODAM, mostraron que ésta proteína carece de un plegamiento definido, manifestando en cierto grado un desorden estructural; por lo cual fue posible considerar que ODAM pudiera ser parte del grupo de proteínas a las que se les ha denominado como “proteínas intrínsecamente desordenadas” (PIDs o IDPs, del inglés Intrinsically Disordered Proteins) o “proteínas no estructuradas” (PINEs o IUPs, del inglés Intrinsically Unstructured Proteins) (88).

Las PIDs son proteínas caracterizadas por la ausencia de una estructura secundaria y/o terciaria estable cuando la proteína se encuentra como una cadena peptídica aislada en condiciones fisiológicas; éstas, existen en un equilibrio dinámico de conformaciones, en oposición a lo observado en las proteínas globulares. Las PIDs a menudo son responsables de funciones importantes relacionadas con la señalización o regulación, adaptabilidad, ciclo celular, modificaciones post-traduccionales, interacción rápida con otros agentes, etc. (89,90)

Para evaluar el estado de desorden y plegamiento azaroso de ODAM, se utilizó el servidor predictor del desorden DISOPRED2, que calcula la probabilidad empírica de que cada aminoácido de la proteína esté desordenado, sin pertenecer a ninguna clase de estructura secundaria, en la forma biológicamente activa de una proteína. El servidor analiza el carácter "intrínsecamente desordenado" de las proteínas a través de algoritmos que evalúan la relación entre carga neta e hidrofobicidad neta de la secuencia (91). Como resultado del análisis, se encontró que efectivamente ODAM contiene cuatro segmentos de aminoácidos desordenados dando explicación a la forma poco plegada de los modelamientos *in silico* antes mencionados (Fig. 16).



### Intrinsic disorder profile



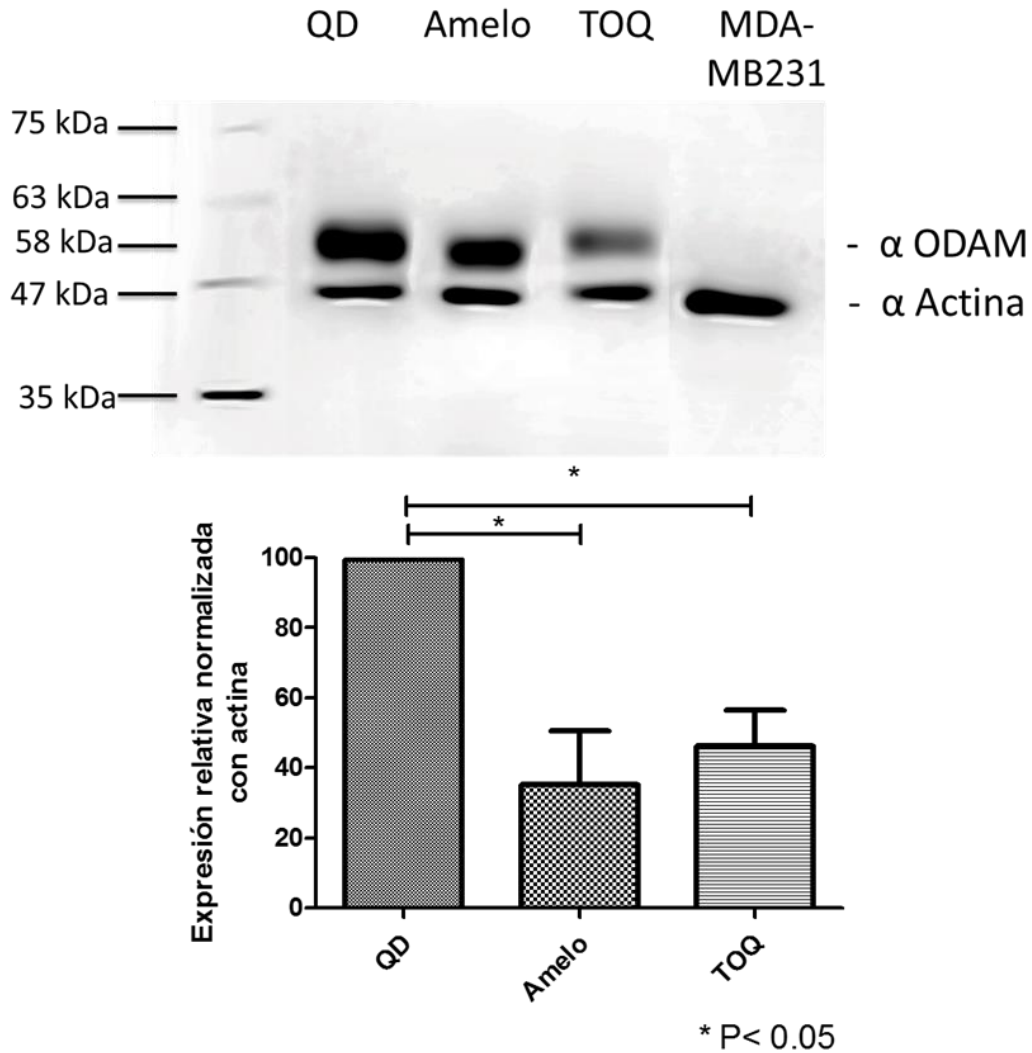
**Figura 16. Predicción de regiones desordenadas.** En la figura se muestra 4 regiones con segmentos de aminoácidos desordenados y 4 posibles sitios de unión a otras proteínas; estas regiones presentan una puntuación de confianza mayor a 0.5.

## 9.2 EXPRESIÓN DE ODAM EN BIOPSIAS DE TEJIDO DE QD, AMELOBLASTOMA (Amelo) Y TOQ

Para realizar el análisis de expresión de ODAM en las lesiones de nuestro interés, se llevaron a cabo ensayos de Western blot. En estos experimentos observamos que la expresión de ODAM era positiva para QD, Amelo y TOQ, pero no se detectó a la proteína en las muestras de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231 (Fig. 17), la cual se ha reportado que no expresa ODAM (64,65) y que por lo tanto, se utilizó como un control negativo. El anticuerpo anti-ODAM utilizado reconoció en las lesiones odontogénicas una banda con un peso molecular

aproximado de 58 kDa (Fig. 17). Cabe señalar que el peso molecular teórico de ODAM, de acuerdo al número de aminoácidos, es de aproximadamente 32 kDa, pero ya en reportes previos se ha encontrado a la proteína en diferentes pesos (58,65); esto puede deberse al alto número de posibles sitios tanto de glicosilación como de fosforilación que la proteína posee. Interesantemente, estos ensayos mostraron una aparente diferencia en la intensidad de la banda reconocida (Fig. 17) sugiriendo niveles de expresión diferente entre las lesiones analizadas.

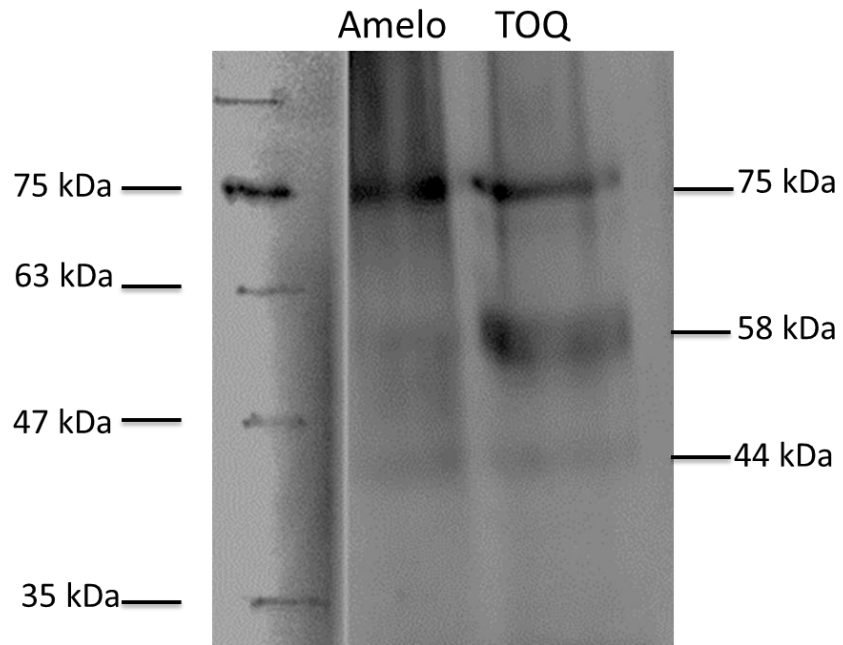
Para analizar los niveles de expresión de ODAM en las muestras estudiadas, se realizó la detección de actina en las mismas membranas, lo cual se utilizó como control de carga. En esos ensayos, el anticuerpo anti-actina detectó una banda de aproximadamente 47 kDa con aproximadamente la misma intensidad en todas las muestras (Fig. 17), indicando que en los diferentes carriles se cargó aproximadamente la misma cantidad de proteína, y por lo tanto, se sugiere que la intensidad de la proteína ODAM representa un diferente nivel de expresión de la proteína en las lesiones. Un análisis densitométrico de las bandas detectadas en los ensayos de Western blot y mediante una prueba t de Student, demostró que existen diferencias significativas en la expresión de ODAM. En estos ensayos la expresión en QD se le asignó un valor arbitrario de 100%. En comparación con QD, las muestras de Amelo y TOQ presentaron una expresión relativa de 35.32 y 46.3% respectivamente (Fig. 17). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en los niveles de expresión de ODAM entre QD y las lesiones tumorales ( $p < 0.05$ ), pero no se observaron diferencias significativas entre ambas lesiones tumorales.



**Figura 17. Expresión relativa de ODAM en QD, Amelo y TOQ.** (A) Extractos proteicos totales de QD, Amelo y TOQ, fueron analizados mediante ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra ODAM y como control de carga, se utilizó un anticuerpo dirigido contra actina. Como control negativo de la expresión de ODAM, se utilizó extractos totales de la línea celular de cáncer de mama metastásico MDA-MB231. Se muestra una imagen representativa de experimentos independientes. (B) Expresión relativa de ODAM. Análisis densitométrico de las bandas detectadas por Western Blot, donde los valores obtenidos para ODAM se normalizaron con mediciones correspondientes a las bandas de actina. El valor obtenido de la muestra de QD se tomó arbitrariamente como 100% de expresión relativa. \* denota valores con diferencias significativas entre QD y las muestras tumorales ( $P < 0.05$ ).

### 9.3 ENSAYO CON LECTINA *SAMBUCUS NIGRA* (SNA)

Como se observó en los ensayos de Western blot, la proteína ODAM fue identificada con un peso molecular de aproximadamente 58 kDa, el cual es diferente al peso predicho por composición de aminoácidos, que corresponde a aproximadamente 32 kDa. El peso de ODAM podría verse modificado por los múltiples sitios de posibles O-glicosilaciones que sugiere el análisis *in silico* realizado anteriormente. Para tatar de definir si la proteína ODAM está glicosilada, utilizamos la detección de glicoproteínas mediante el uso de una lectina, ya que el uso de estas moléculas que reconocen residuos de carbohidratos es útil para su identificación (92, 93). Así, se realizó un ensayo tipo Western blot sobre extractos totales de AMEL y TOQ utilizando la lectina SNA, que reconoce estructuras de N- y O-glicanos con ácido siálico terminal, además de reconocer a moléculas del tipo Sialil-Tn (Neu5Ac  $\alpha$ -2,6Gal/GalNac  $\alpha$ -Ser/Thr) (93). En el ensayo se observó el reconocimiento de tres bandas con pesos moleculares de 44, 58 y 75 kDa (Fig.18), siendo la de 58 kDa, la que coincide con la banda detectada en los experimentos de Western blot realizados anteriormente con el anticuerpo anti-ODAM (Fig.17). Estos resultados sugieren que la proteína ODAM pudiera estar glicosilada y que esta modificación pudiera ser responsable, al menos en parte, del mayor peso molecular encontrado para esta proteína en los ensayos de Western blot con respecto al peso molecular teórico.



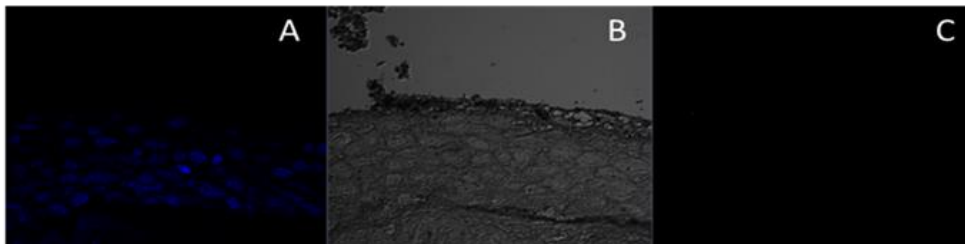
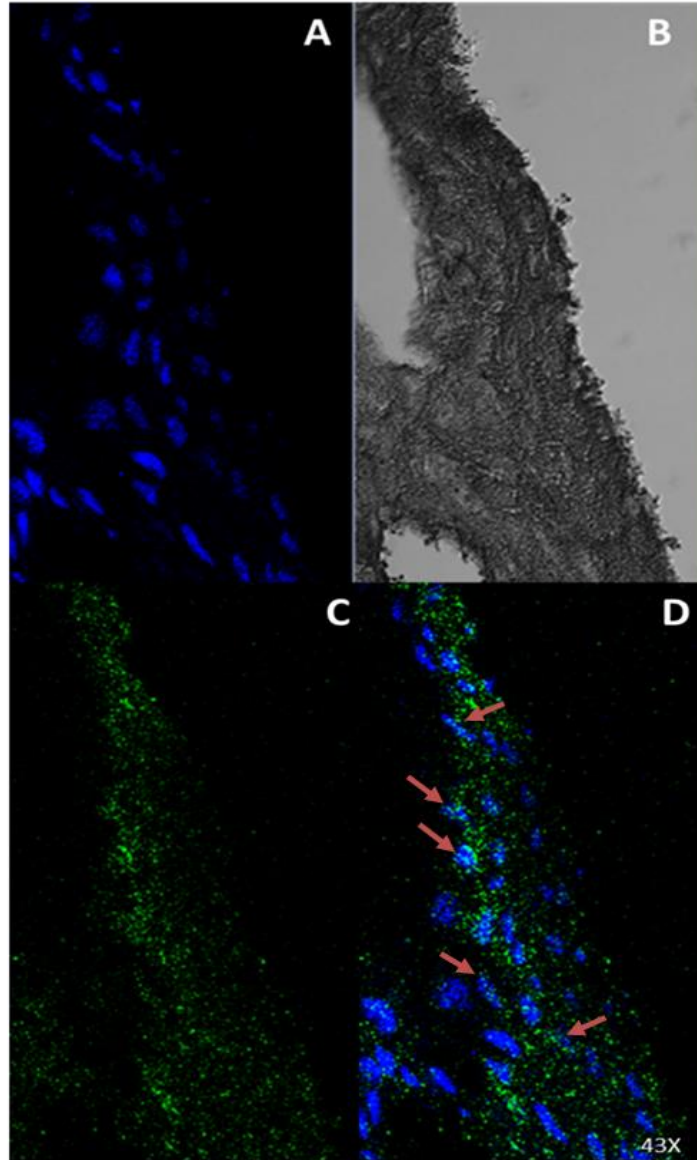
**Figura 18. Reconocimiento de glicoproteínas en Amelo y TOQ.** Extractos totales de Amelo y TOQ fueron incubados con lectina SNA, reconociendo a tres proteínas con residuos NeuAc; la banda de 58 kDa coincide con el peso molecular de la proteína reconocida por el anticuerpo anti-ODAM.

## **9.4 INMUNOHISTOFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS CON MICROSCOPIA CONFOCAL**

Para determinar la localización de ODAM en QD, Amelo y TOQ, se utilizaron cortes de tejido de éstas lesiones y se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en cada una de ellas. Se utilizó DAPI para el marcaje de núcleos y Alexa 488 como anticuerpo secundario para la visualización de la proteína; los controles negativos no fueron incubados con el anticuerpo primario. En todos los cortes histológicos se utilizó Negro de Sudán como medio para evitar la autofluorescencia presentada comunmente en cortes de tejido fijados.

### **9.4.1 Localización de ODAM en corte histológico de QD**

La marca de ODAM en QD se presentó positiva observándose en todo el epitelio de la lesión, teniendo localización tanto citoplasmática, perinuclear y con múltiples sitios de localización nuclear (Fig. 19).

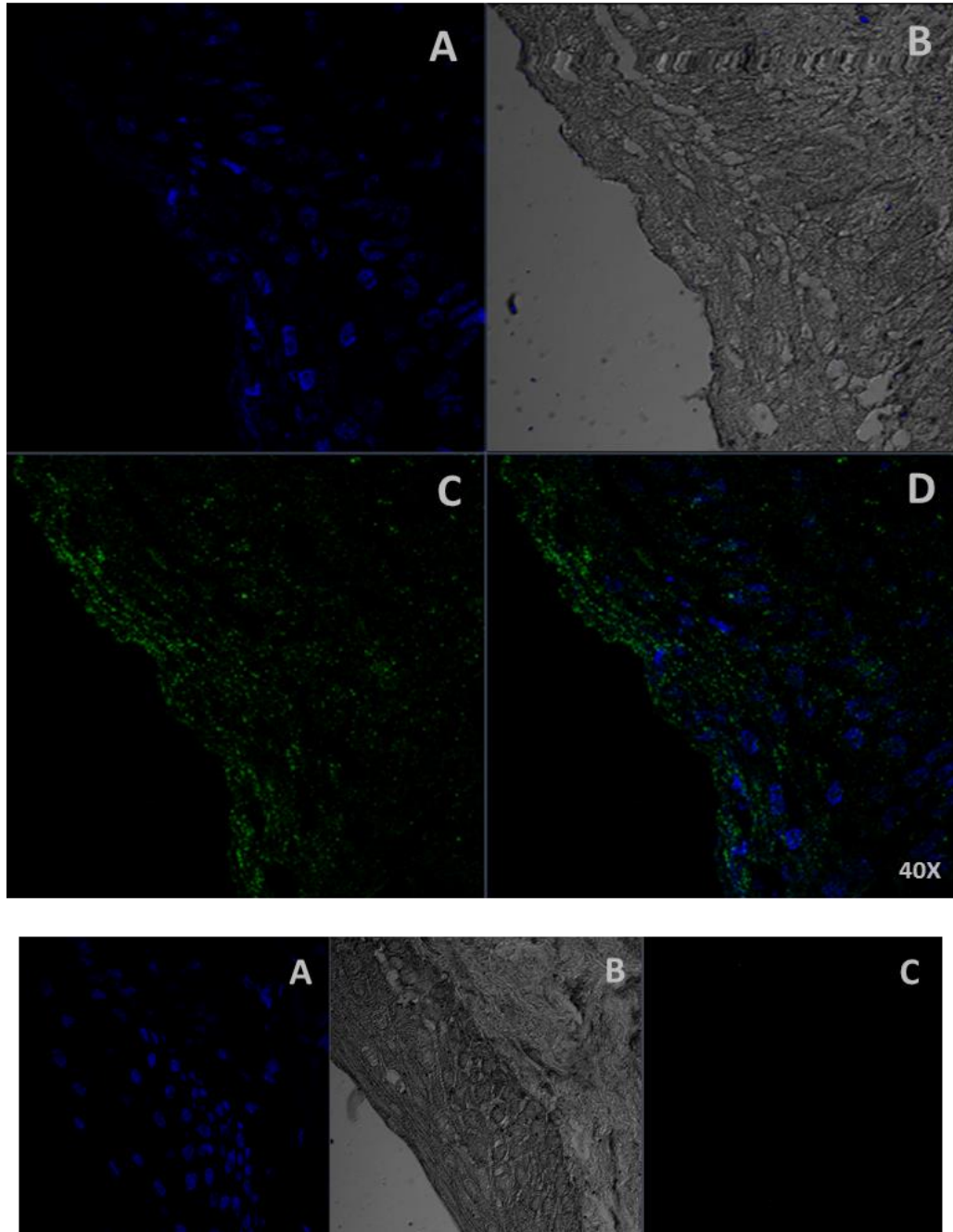


**Figura 19. Inmunolocalización de ODAM en QD.** Cortes de QD se analizaron mediante inmunohistofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-ODAM. (A) Núcleos teñidos con DAPI. (B) Campo claro (C) Tinción del anticuerpo ODAM. D) Integración del canal azul y verde. Las flechas indican algunos sitios de localización de ODAM en el núcleo. El panel inferior muestra el control negativo sin anticuerpo primario. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

#### **9.4.2 Localización de ODAM en corte histológico de TOQ**

En cuanto al marcaje obtenido en TOQ, se observó que ODAM presenta un patrón mayoritariamente citoplásmico, con menor cantidad de zonas nucleares comparado con QD; además se percibe una aparente menor cantidad de intensidad de fluorescencia con respecto al QD (Fig. 20). Interesantemente, se observó que gran parte de la marca se encuentra en la parte del paraqueratina de la lesión (Fig. 20), que como se mencionó anteriormente, es una parte patognomónica del TOQ.

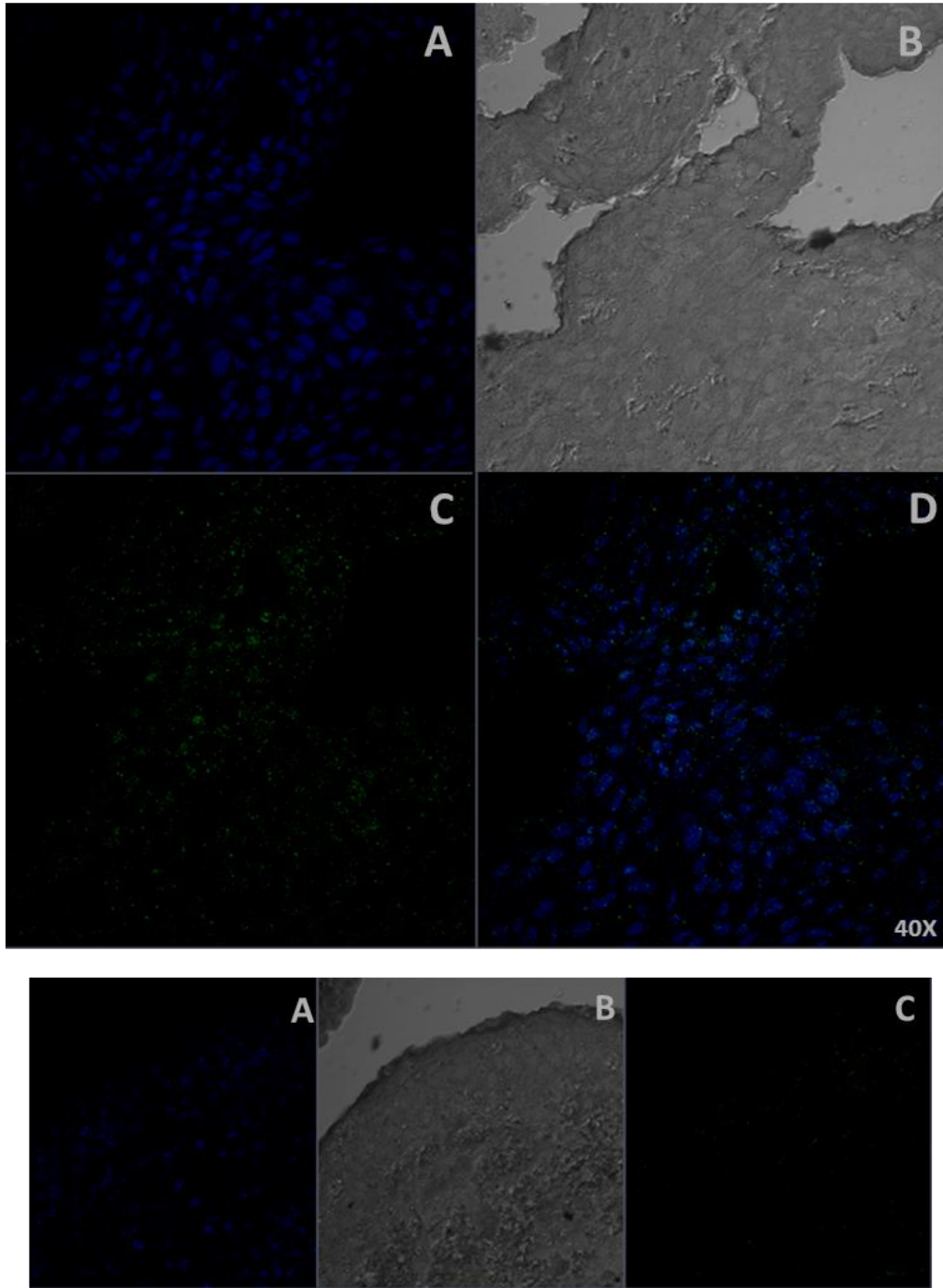




**Figura 20. Inmunolocalización de ODAM en TOQ.** Cortes de TOQ se analizaron mediante inmunohistofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-ODAM. (A) Núcleos teñidos con DAPI. (B) Campo claro. (C) Tinción del anticuerpo ODAM. (D) Integración del canal azul y verde. El panel inferior muestra el control negativo sin anticuerpo primario. Imagen representativa de 2 experimentos independientes.

### **9.4.3 Localización de ODAM en corte histológico de Ameloblastoma**

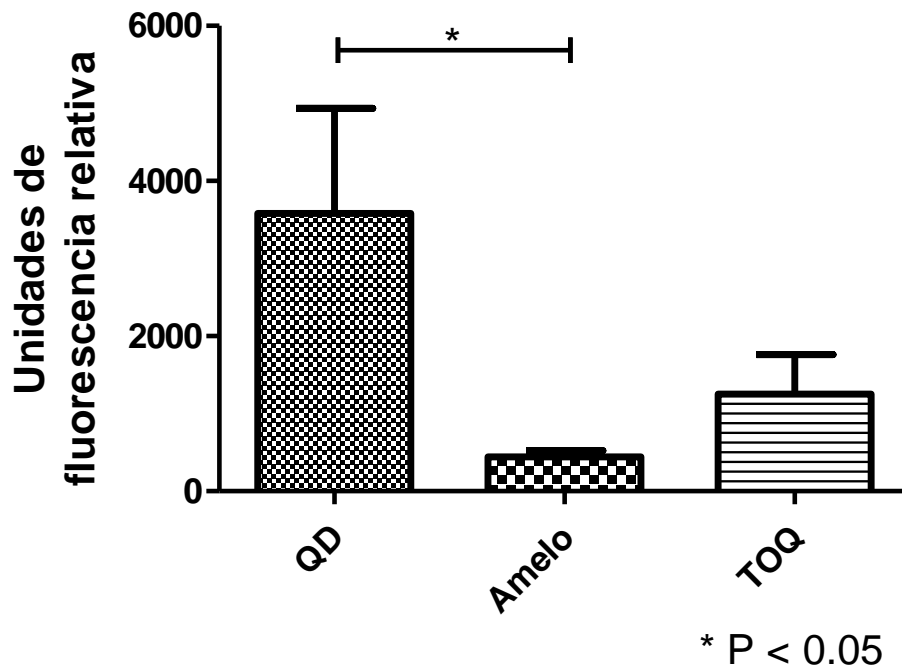
La intensidad de la señal de ODAM encontrada en ameloblastoma fue mucho menor que la observada tanto en QD como en TOQ (Fig. 21). Con respecto a su localización, en las 2 muestras que fueron procesadas se obtuvo una expresión básicamente citoplasmática; aunque se siguen presentando algunos núcleos con marcaje, existen en menor cantidad que incluso los observados en TOQ (Fig.21).



**Figura 21. Inmunolocalización de ODAM en Amelo.** Cortes de AMELO se analizaron mediante inmunohistofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-ODAM. (A) Núcleos teñidos con DAPI. (B) Campo claro. (C) Tinción del anticuerpo ODAM. (D) Integración del canal azul y verde. El panel inferior muestra el control negativo sin anticuerpo primario. Imagen representativa de 2 experimentos independientes.

#### **9.4.4 Cuantificación de la inmunofluorescencia**

Para llevar a cabo la cuantificación de la inmunofluorescencia de las muestras procesadas de QD, Amelo y TOQ se calculó el total de la fluorescencia celular corregida (TFCC) por medio del software Image J 1.49. Estos análisis revelaron que QD presentó valores mayores de fluorescencia relativa en comparación con Amelo y TOQ (Fig, 22). Al realizar el análisis estadístico, se observó una diferencia significativa comparando QD con Amelo ( $p < 0.05$ ). Estos resultados coinciden con lo encontrado en los ensayos de Western blot, soportando la hipótesis de una expresión diferencial de ODAM entre QD y Amelo. En cuanto a la comparación de QD con TOQ, aunque existe una menor fluorescencia en TOQ, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 22). Sin embargo, es necesario realizar estos ensayos en un mayor número de muestras para determinar si existe diferencias significativas entre QD y TOQ en la expresión de ODAM.



**Figura 22. Análisis de la fluorescencia de ODAM en QD, Amelo y TOQ.** La intensidad de fluorescencia en el reconocimiento de ODAM en las diferentes lesiones odontogénicas fue determinado mediante la medición de la fluorescencia celular corregida (TFCC) utilizando el software Image J 1.49 La figura muestra la media obtenida del TFCC de cada lesión. \* denota valores con diferencias significativas entre QD y Amelo ( $P < 0.05$ ).

## X. DISCUSIÓN

Los tumores odontogénicos son un grupo heterogéneo de lesiones que se originan a partir del tejido asociado al desarrollo del diente. El tejido anormal de cada uno de estos tumores puede correlacionarse a menudo con tejido similar al de la odontogénesis normal, desde el origen a la erupción del diente. Su atractivo e importancia radican en el hecho de ser una patología específica y única de los maxilares, así como en sus particulares características clínicas e histopatológicas que en ocasiones pueden generar amplias lesiones con diversos tratamientos agresivos, como lo es la resección quirúrgica amplia con márgenes adecuados, la cuál es el tratamiento de elección en la mayoría de este tipo de lesiones (3,6). El Amelo y el TOQ son las entidades con mayor incidencia dentro de la clasificación de tumores odontogénicos, presentando un comportamiento biológico localmente agresivo así como una alta tasa de recurrencia (11, 25,43). Por otro lado, los quistes odontogénicos son cavidades patológicas recubiertas por epitelio, originados a partir de componentes epiteliales del aparato odontogénico o de sus remanentes (51). El quiste dentígero es clasificado como un quiste del desarrollo odontogénico de los maxilares que rodea la corona de un diente no erupcionado, sin comprometer la superficie radicular de dicha estructura dentaria; es de crecimiento lento, no infiltrante que expande y desplaza estructuras, que requiere tratamientos quirúrgicos conservadores y que prácticamente no presenta recidivas (48,51). Sin embargo, se ha reportado que esta lesión puede dar origen al desarrollo de diferentes tumores odontogénicos (7,8, 54),

En la actualidad existe un gran desconocimiento de bases moleculares que ayuden al estudio de los tumores odontogénicos. Para una mayor comprensión del comportamiento clínico de estas lesiones es necesario entender los mecanismos biológicos y moleculares involucrados en el desarrollo de ellas, es por esto que el objetivo del presente estudio fue analizar y comparar la expresión de ODAM, una proteína que podría contribuir al entendimiento en los mecanismos del desarrollo y progresión de estas patologías.

La proteína ODAM fue identificada por primera vez en la porción amiloide asociada al tumor odontogénico epitelial calcificante también conocido como tumor de Pindborg (58) y se ha visto implicada en diferentes procesos como lo son la diferenciación de ameloblastos, mineralización del esmalte y formación y regeneración del epitelio de unión (60, 63, 68). Análisis adicionales han mostrado la expresión de ODAM en neoplasias epiteliales como cáncer gástrico, cáncer de pulmón y cáncer de mamá (77,94); en esta última patología, su expresión parece servir como un marcador favorable, mostrando una correlación estadísticamente significativa entre la presencia nuclear de ODAM y una mejor supervivencia a los 5 años de los pacientes, independientemente del estadio de la enfermedad (78).

Además, existen estudios que proporcionan evidencia de que la sobreexpresión de ODAM tiene un papel funcional en la supresión de la tasa de crecimiento, invasividad y el potencial metastásico de células cancerosas de mama altamente invasivas (64,94).

El estudio de ODAM en neoplasias ha sido un tanto delimitado a las lesiones cancerígenas, habiendo nulos estudios de la expresión de ésta en tumores odontogénicos de nuestro interés, lo cuál es muy importante por la relación encontrada de esta proteína en el desarrollo dentario, dándonos pauta a una posible desregulación de ODAM en algún punto de la odontogénesis.

En nuestro estudio se logró la detección y análisis de ODAM en las lesiones tumorales de Amelo y TOQ y en la lesión quística QD. Debido a que el correspondiente tejido sano de las lesiones odontogénicas son tejidos embionarios, los cuales son difíciles de obtener, en nuestro estudio se tomó al QD como la relación más cercana a esto, ya que es una lesión que puede expandir pero no infiltrar, raramente presenta recidiva y no es localmente agresiva.

En este trabajo se encontró que ODAM presentó mayor expresión en QD que en TOQ y Amelo, tanto en el análisis densitométrico de los ensayos de Western Blot como al cuantificar la inmunofluorescencia de dichas lesiones. Por lo tanto, los resultados concuerdan con el hecho observado en la literatura, donde la expresión

de ODAM es mayor en tejidos sanos que en los que presentan un patrón tumoral o metastásico (64,94).

ODAM se ha observado fuertemente expresada en el núcleo y citoplasma de estructuras benignas como vasos sanguíneos, glándulas salivales, tráquea e hiperplasia epitelial entre otros (64,77). En contraste, en la tinción en células malignas se encontró débilmente en citoplasma (64). ODAM también se ha localizado en núcleo, en citoplasma y de manera secretada en diferentes tumores de estirpe epitelial (65); además se ha visto implicada en importantes procesos de regulación (60,63).

En este estudio, en cuanto a su localización celular, se tuvo como resultado la señal de ODAM citoplasmática, perinuclear y nuclear de QD y TOQ, observándose una mayor localización nuclear en QD, aunque falta hacer un análisis cuantificable para poder aseverar lo antes escrito. En cuanto a Amelo, la entidad más agresiva de las tres patologías estudiadas, el marcaje se observó de menor intensidad (lo cuál fue verificado por el análisis de fluorescencia total) con una localización casi exclusiva en citoplasma, lo que correlaciona con el estudio de Kestler en 2011 (64), que detecta un mejor pronóstico en tumores de mama que presentan localización nuclear de ODAM.

Por otra parte, al realizar la posible estructura tridimensional de ODAM por medio de un ensayo bioinformático, se observó que esta proteína parece tener una conformación estructural casi por completo lineal, presentando variados sitios de desorden, lo que nos hace pensar que esta proteína forma parte del grupo de las llamadas proteínas intrínsecamente desordenadas (PIDs). En general, las PIDs son proteínas que presentan una composición de aminoácidos particular, son proteínas de baja complejidad que tienen una baja abundancia o carecen de aminoácidos hidrofóbicos y/o voluminosos (Val, Ile, Met Phe, Trp, Tyr), los cuales son la base de las proteínas globulares, pues promueven un plegamiento espontáneo y, por otro lado, poseen una alta proporción de aminoácidos cargados o polares (Gln, Ser, Pro, Glu, Lys, Arg) (95). Nuestro análisis de la estructura de



ODAM sugiere que ODAM tiene características propias de este tipo de proteínas, lo cual tiene una implicación importante, ya que este tipo de proteínas tienen un papel regulatorio, como por ejemplo, los factores de transcripción, en los cuales las regiones de desorden son la base para la interacción con los ácidos nucleicos y, por tanto, para su función como activadores o represores de la expresión genética (96). ODAM parece ser una proteína multifuncional, encontrándose en diferentes sitios de la célula y teniendo diferentes implicaciones en ella, todo esto pudiendo ser posible por la alta flexibilidad que demostró tener su estructura.

Hasta el momento, la función de ODAM en los tumores odontogénicos, así como en otras neoplasias, permanece en gran medida desconocida. En el estudio hecho por Lee en 2015 (94) se demostró que ODAM induce la actividad de la GTPasa RhoA y la expresión de factores río abajo, incluyendo la quinasa asociada a Rho (ROCK). La señalización de RhoA mediada por ODAM, da lugar a la reorganización del citoesqueleto de actina y a la promoción de la adhesión celular mediante la activación de PTEN y la inhibición de la fosforilación de AKT, en células de cáncer de mama no invasivas (94). Cuando ODAM se sobreexpresa en células de cáncer de mama y de cáncer gástrico, se activa RhoA en niveles elevados, lo que provoca que disminuya la motilidad, que aumente la adhesión y se inhiba la metástasis en dichas células (94).

Estos resultados sugieren que la expresión de ODAM mantiene la adhesión celular, lo que es importante para el análisis de nuestro estudio, ya que ese mismo mecanismo puede estar ocurriendo justo en las lesiones de nuestro interés, donde la menor expresión de ODAM puede estar provocando un fenotipo más infiltrante y agresivo, como en el caso de Amelo y TOQ, jugando un rol fundamental en la inhibición del crecimiento de lesiones quísticas como el QD; sin dejar de lado que la expresión positiva de ODAM también pudiera estar evitando que estos dos tumores no tuvieran un comportamiento metastásico.

Dado el pronóstico clínico favorable que muestra la sobreexpresión de ODAM, por lo menos en cáncer de mama (64), esta proteína puede ser de beneficio

terapéutico, y su estudio en los tumores odontogénicos es de suma importancia, ya que puede contribuir a comprender su comportamiento clínico y biológico y así, poder ser traducido en un futuro en tratamientos mejores más específicos y efectivos, lo que impactaría positivamente en la calidad de vida de los sujetos que los presentan.

Es importante mencionar que debido al tamaño reducido de las muestras analizadas, son necesarios estudios con mayor número de lesiones, para así mejorar el conocimiento sobre el papel de ODAM en el mecanismo patogénico de estas neoplasias y que los resultados sean más contundentes y representativos.

## **XI. CONCLUSIÓN**

En el presente trabajo se determinó la expresión positiva de ODAM en QD, Amelo y TOQ, patologías de la cavidad bucal con escaso conocimiento de bases moleculares. Además, se estudió una posible forma estructural de ODAM, que hasta el momento no se había tomado en cuenta para su análisis funcional. Los resultados reflejados en nuestro estudio, en conjunto con la bibliografía analizada, proveen evidencia de que ODAM, podría ser una molécula importante implicada en el comportamiento biológico de las lesiones odontogénicas . Sin embargo, se necesita realizar estudios más detallados para poder determinar una función precisa de esta proteína en las lesiones odontogénicas y establecer un posible rol terapéutico de esta proteína para estas lesiones, los cuales podrían retardar el desarrollo y/o las recurrencias tanto de Amelo como TOQ e inclusive para otras lesiones neoplásicas, tanto benignas como malignas.

## **XII. PERSPECTIVAS**

- Aumentar el número de muestras de estudio para que éste sea más representativo.
- Identificar experimentalmente sitios de fosforilación y glicosilación de la proteína.
- Trabajar con líneas celulares de ameloblastoma y quíste dentífero para poder realizar ensayos de silenciamiento y sobreexpresión.
- Realizar ensayos de inmunoprecipitación para conocer proteínas que estén interaccionando con ODAM y así, realizar el modelamiento estructural de éstas interacciones.

### **XIII. BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Philipsen HP, Reichart PA. Revision of the 1992-edition of the WHO histological typing of odontogenic tumours. A suggestion. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31:253-8.
- 2.- Mosqueda-Taylor A. New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13(9):555-558.
- 3.- Regezi JA, Kerr DA, Courtney RM. Odontogenic tumors: analysis of 706 cases. *J Oral Surg.* 1978; 36:771-778.
- 4.- Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Peñafiel C, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. *J Oral Pathol Med.*2002; 31:415-20
- 5.- Avelar RL, Antunes AA, Santos TS, Andrade ES, Dourado E. Odontogenic tumors: clinical and pathology study of 238 cases. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008; 74:668-73.
- 6.- Barnes L, Eveson J, Reichert P. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: World Health Organization Classification of Tumours Series, 2005.
- 7.- Holmlund HA, Anneroth G, Lundquist G, Nordenram A. Ameloblastoma originating from odontogenic cyst. *J Oral Pathol Med* 1991; 20:318-32.
- 8.- Yasuoka T, Yonemoto K, Kato Y, Tatematsu N. Squamous cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2000; 58(8):900-5.
- 9.- Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. The WHO Histological Typing of Odontogenic Tumours. Berlin, Springer, 1992.
- 10.- Shafer WB, Hine MK, Levy BM. A textbook of oral pathology. 3 ed. Philadelphia-London-Toronto: W.B. Saunders; 1982. Pp. 66-260.

- 11.- Regezi J, Sciubba J. Patología bucal. 2da. Edición. Mexico. Editorial Interamericana. McGraw-Hill; 1995.
- 12.- de Souza LB, Gordón-Núñez MA, Nonaka CF, de Medeiros MC, Torres TF, Emiliano GB. Odontogenic cysts: demographic profile in a Brazilian population over a 38-year period. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15(4):583-90.
- 13.- Eversole LR, Tomich CE, Cherrick HM. Histogenesis of odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1971; 2(4):569-81.
- 14.- Heikinheimo K, Jee KJ, Niini T, Aalto Y, Happonen RP, Leivo I, Knuutila S. Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. *J Dent Res.* 2002; 81: 525-530.
- 15.- Adebisi KE, Ugboko VI, Omoniyi-Esan GO, Ndukwe KC, Oginni FO. Clinicopathological analysis of histological variants of ameloblastoma in a suburban Nigerian population. *Head Face Med.* 2006; 2:42.
- 16.- Shear M, Singh S. Age-standardized incidence rates of ameloblastoma and dentigerous cyst on the Witwatersrand, South Africa. *Community Dent Oral Epidemiol* 1978; 6: 195-199.
- 17.- Small IA, Waldron CA. Ameloblastoma of the jaws. *Oral Surg.* 1955; 8:281-97.
- 18.- Paikkatt VJ. Unicystic ameloblastoma of the maxilla: A case report. *Journal of Indian society of pedodontics and preventive dentistry.* 2007; 25(2):106-10.
- 19.- Stanley HR, Diehl DL. Ameloblastoma potential of follicular cyst. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1965;20:260- 98.
- 20.- Gruica B, Stauffer E, Buser D, Bornstein M. Ameloblastoma of the follicular, plexiform, and acanthomatous type in the maxillary sinus: a case report. *Quintessence Int.* 2003; 34(4):311-4.

- 21.- Philipsen HP, Reichart PA, Takata T. Desmoplastic ameloblastoma (including “hybrid” lesion of ameloblastoma). Biological profile based on 100 cases from the literature and own files. *Oral Oncol* 2001; 37: 455-460.
- 22.- Kishino M, Murakami S, Fukuda Y, Ishida T. Pathology of the desmoplastic ameloblastoma. *J Oral Pathol Med* 2001 ;30(1):35-40.
- 23.- Eversole LR, Leider AS, Strub D. Radiographic characteristics of cystogenic ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 57: 572-577.
- 24.- Philipsen HP, Reichart PA (1998). Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. *Oral Oncol* 34: 317-325.
- 25.- Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B: 86-99.
- 26.- Robinson L, Martinez MG. Unicystic ameloblastoma: a prognostically distinct entity. *Cancer* 1997;40:2278–85.
- 27.- Ackermann GL, Altini M, Shear M. The unicystic ameloblastoma: a clinicopathological study of 57 cases. *J Oral Pathol* 1988; 17: 541-546.
- 28.- Bachmann A, Linfesty M. Ameloblastoma, Solid/Multicystic Type. *Head and Neck Pathol* 2009; 3:307–309.
- 29.- Philipsen HP, Reichart PA, Nikai H, Takata T, Kudo Y. Peripheral ameloblastoma: biological profile based on 160 cases from the literature. *Oral Oncol* 2001; 37:17-27.
- 30.- Steven E, Smullin W. Peripheral desmoplastic ameloblastoma: report of a case and literature review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 2008; 105(1):37-40.
- 31.- Arotiba GT, Arotiba JT, Taiwo AO. Biologic, anatomic and clinical considerations in the management of the classic intraosseous ameloblastoma of the jaws. *Nig Q J Hosp Med.* 2010; Apr-Jun;20(2):55-63.

- 32.- Infante P, Prats V, Gonzalez LM, Belmonte C, Martinez R, Eusebio Torres, Gacto P, Gomez T. Treatment of recurrent mandibular ameloblastoma. *Exp Ther Med* 2013; 6(2): 579–583.
- 33.- Dandriyal R, Gupta A, Pant S, Baweja H. Surgical management of ameloblastoma: Conservative or radical approach. *Natl J Maxillofac Surg.* 2011; 2(1): 22–27.
- 34.- Shear, M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. *Oral Oncol.* 2002; 38: 223-231.
- 35.- Madras J, Lapointe H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. *J Can Dent Assoc* 2008; 74(2):165–165
- 36.- Stoelinga, PJW. Etiology and pathogenesis of keratocysts. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am* 2003;15:317–324.
- 37.- Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 69(3):299–308.
- 38.- Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, De Marco L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2000; 79:1418–1422.
- 39.- Shuang Pan, Li-li Xu, Li-sha Sun, Tie-jun Li. Identification of known and novel PTCH mutations in both syndromic and non-syndromic keratocyst odontogenic tumor. *Int J of Oral Science* 2009; 1 (1): 34-38.
- 40.- Ng JM, Curran T. The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2011; 11(7), 493–501.
- 41.- Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Research* 2005; 15: 301–316.



- 42.- Cohen MM. Nevroid basal cell carcinoma syndrome: molecular biology and new hypotheses. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999; 28(3):216–223.
- 43.- Gaitán LA, Quezada D, Tenorio F, Leyva ER. Reclassification of odontogenic keratocyst as tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. *Oral Diseases* 2010; 16: 185-187.
- 44.- Meara JG, Li KK, Shah SS, Cunningham MJ. Odontogenic keratocysts in the pediatric population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122:725–728.
- 45.- Brannon RB. The odontogenic keratocyst: a clinicopathologic study of 312 cases. Part I: clinical features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42:54–72.
- 46.- Woolgar JA, Rippin JW, Browne RM. The odontogenic keratocyst and its occurrence in the nevroid basal cell carcinoma syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1987; 64:727–730.
- 47.- Chirapathomsakul D, Sastravaha P, Jansisyanont P. A review of odontogenic keratocysts and the behavior of recurrences. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(1):5– 9.
- 48.- Joseph A. Regezi, D.D.S., M.S. *Odontogenic Cysts, Odontogenic Tumors, Fibroosseous, and Giant Cell Lesions of the Jaws*. *Modern Pathology* 2002; 15:331-41.
- 49.- Sapp JPh, Eversole LR and Wysocki GP: *Cysts of the oral region*, in Sapp Eversole Wysocki: *Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology*, St. Louis, Mosby, 1997.
- 50.- Regezi JA. Cyst and cystlike lesions. In Regezi J A, Sciubba J, Pogrel M A. *Atlas of Oral and Maxillofacial Pahtology*. Philadelphia: WB Saunders, 2000.
- 51.- Mosqueda A, Irigoyen ME, Diaz MA, Torres MA. Odontogenic cysts. Analysis of 856 cases. *Med Oral* 2002; 7(2):89-96.

- 52.- Hu YH, Chang YL, Tsai A. Conservative treatment of dentigerous cyst associated with primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 112(6):5-7.
- 53.- Singh S, Singh M, Chhabra N, Nagar Y. Dentigerous cyst: a case report. *J Indian Soc Pedo Prev Dent* 2001; 19(3):123-126.
- 54.- Maximiw WG, Wood RE. Carcinoma arising in a dentigerous cyst: a case report and of the literature. *J. Oral Maxillofac Surg.* 1991; 49: 639-43.
- 55.- Motamedi MH, Talesh KT. Management of extensive dentigerous cysts. *British Dental Journal* 2005; 198(4):203-206.
- 56.- Núñez-Urrutia S, Figueiredo R, Gay-Escoda C. Retrospective clinicopathological study of 418 odontogenic cysts. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15(5):767-3.
- 57.- Sekiguchi M, Sakakibara K, Fujii G. Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jpn J Exp Med* 1978; 48:61-8.
- 58.- Solomon A, Murphy CL, Weaver K, Weiss DT, Hrcic R, Eulitz M, Donnell RL, Sletten K, Westermarck G, Westermarck P. Calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein. *J Lab Clin Med* 2003; 142:348–355.
- 59.- Jean-Yves Sire, Tiphaine Davit-Béal Sidney Delgado, Xun Gu. The origin and evolution of Enamel Mineralization Genes. *Cells Tissues Organs* 2007; 186: 25-48.
- 60.- Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, Nanci A. Characterization of Apin, a secreted protein highly expressed in tooth-associated epithelia. *J Cell Biochem* 2008; 103:941–956.
- 61.- Sire JY, Davit-Beal T, Delgado S, Gu X. The origin and evolution of enamel mineralization genes. *Cells Tissues Organs* 2007; 186:25–48.

- 62.- Kawasaki K, Weiss KM. Mineralized tissue and vertebrate evolution: The secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4060–4065.
- 63.- Lee HK, Lee DS, Ryoo HM, Park JT, Park SJ, Bae HS, Cho MI, Park JC. The odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) cooperates with RUNX2 and modulates enamel mineralization via regulation of MMP-20 *Journal of Cellular Biochemistry* 2010; 111: 755–767.
- 64.- Kestler DP, Foster JS, Bruker CT, Prenshaw JW, Kennel SJ, Wall JS, Weiss DT, Solomon A. ODA<sup>M</sup> Expression Inhibits Human Breast Cancer Tumorigenesis *Breast Cancer* 2011; 5:73–85.
- 65.- Lee HK, Park S, Oh HJ, Kim JW, Bae HS, Park CJ. Expression pattern, subcellular localization, and functional implications, of ODA<sup>M</sup> in ameloblast, odontoblasts, osteoblasts, and various cancer cells. *Gene Expression Patterns* 2012; 12:102-108.
- 66.- Reith EJ. The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *J Ultrastruct Res* 1970; 30:111–151.
- 67.- Hu JC, Sun X, Zhang C, Simmer JP. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci* 2001; 109:125–132.
- 68.- Park JC, Park JT, Son HH, Kim HJ, JeongMJ, Lee CS, Cho MI. The amyloid protein APin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur J Oral Sci* 2007; 115:153–160.
- 69.- Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci* 2008; 13: 898–903.
- 70.- D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I. Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 1999; 126: 2911–2920.

- 71.- Barnes GL, Hebert KE, Kamal M, Javed A, Einhorn TA, Lian JB, Stein GS, Gerstenfeld LC. Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Res* 2004; 64(13):4506-13.
- 72.- Golonzhka O, Metzger D, Bornert JM, Bay BK, Gross MK, Kioussi C, Leid M. Ctip2/Bcl11b controls ameloblasts formation during mammalian odontogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:4278–4283.
- 73.- Harbron L, Lalonde L, Athanassion M, Simmer JP, Papagerakis P. Runx2 expression and function in ameloblasts 2009, IADR Foster session #3093.
- 74.- Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem* 2008; 389:695–700.
- 75.- Takata T, Zhao M, Uchida T, Wang T, Aoki T, Bartlett JD, Nikai H. Immunohistochemical detection and distribution of enamelysin (MMP-20) in human odontogenic tumors. *The journal of biological chemistry* 2012; 287(32):27117–27125.
- 76.- Hegedus L, Cho H, Xie X, Eliceiri GL. Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *J Cell Physiol* 2008; 216:480–485.
- 77.- Kestler DP, Foster JS, Macy SD, Murphy CL, Weiss DT, Solomon A. Expression of odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) in dental and other epithelial neoplasms. *Mol Med* 2008; 14:318–326.
- 78.- Siddiqui S, Bruker CT, Kestler DP, Foster JS, Gray KD, Solomon A, Bell JL. Odontogenic ameloblast associated protein as a novel biomarker for human breast cancer. *Am Surg* 2009; 75:769–775.
- 79.- Macedo M, Callestini R, Issamu G, Cantanhede Orsini S. Expression of odontogenic ameloblast-associated protein, amelotin, ameloblastin, and

amelogenin in odontogenic tumors: immunohistochemical analysis and pathogenetic considerations. *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 272–280.

80.- Ren C, Amm HM, DeVilliers P, Wu Y, Deatherage JR, Liu Z, MacDougall M. Targeting the Sonic Hedgehog Pathway in Keratocystic Odontogenic Tumor. *The journal of biological chemistry* 2012; 287(32):27117–27125.

81.- Altschul, S. F., et. al.. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 1997; 25: 3389–3400.

82.- Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Lavery SB, Clausen H. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J* 2013; 32(10):1478-88.

83.- Blom, N, Gammeltoft, S, Brunak, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* 1999; 294(5): 1351-1362.

84.- Nielsen T, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 2011; 8:785-786.

85.- Bryson K, McGuffin LJ, Marsden RL, Ward JJ, Sodhi JS, Jones DT. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucl. Acids Res* 2005; 33 (Web Server Issue): W36-38.

86.- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 2010; 5:725-738

87.[http://www.predictioncenter.org/casp11/zscores\\_final.cgi?model\\_type=first&gr\\_type=server\\_only](http://www.predictioncenter.org/casp11/zscores_final.cgi?model_type=first&gr_type=server_only)

88.- Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* 2002; 27, 527-533.

- 89.- Dunker AK, Silman I, Uversky VN et al. Function and structure of inherently disordered proteins. *Current opinion in structural biology* 2008; 18 :756-764.
- 90.- Uversky VN Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 1090-1103.
- 91.- Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF and Jones DT. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life *Journal of Molecular Biology* 2004; 337, 635-645.
- 92.- Harvey D. J. Proteomic analysis of glycosylation: Structural determination of N- and O-linked glycans by mass spectrometry. *Expert Review of Proteomics*. 2005; 2:87–101.
- 93.- Nilson CL, editor. *Lectins analytical technologies*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 2007.
- 94.- Lee HK, Choung WH, Yang Y, Yoon HJ, Park IA, Park JC. ODAM inhibits Rho A-dependent invasion in breast cancer. *Cell Biochem Funct* 2015; 1-11.
- 95.- Dyson HJ, Wright, P.E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005 6:197-208.
- 96.- Mitchell PJ, Tijan R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 1989; 245: 371-378.