



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR

**“Identificación de proteínas membranales sobre expresadas
en el ameloblastoma**

T E S I S

Que presenta

C.D. MARIANA RODRIGUEZ VAZQUEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Director de la Tesis:

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

México D.F.

JULIO 2015

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la dirección del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y con el apoyo financiero CONACyT con el número de registro 557456

DEDICATORIAS

A mis padres y hermano.

Carmen, Sergio, Yeyo.

Con mucho amor a mi papá, mamá, Yeyo, por estar conmigo en todo momento, por darme una carrera para mi futuro y enseñarme los frutos de la perseverancia y el trabajo.

A mis familiares.

Lidia, Juan, Juanito, Luisa, Ian, Ana, Chucho, Dany, Erika, Rosa, Roberto, Beto, Nacho, Mary, Luis, Marina, Victor, Claudia, Dary, Gloria...

Gracias por las risas, el ánimo y la comida. Por siempre creer en mí, por ser la familia que somos, por ser padres y hermanos para mí.

A Ricardo.

*Por siempre creer en mí y tu apoyo siempre incondicional.
Gracias.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Por abrir un nuevo espacio para la investigación en odontología, por creer en esto y aceptarme en su grupo de trabajo. Siempre ser una guía paciente en este nuevo mundo para mí y sus comentarios siempre de apoyo y acertados.

A mis asesores

Dra. Patricia Talamás Rohana.

Dra. Abigail Betanzos Fernández

Por sus comentarios y sugerencias siempre acertados, por todo su apoyo y ayuda brindados en el desarrollo de éste trabajo.

C. Carlos Vázquez Calzada

C. Mario Rodríguez Nieves

Gracias por la asesoría y soporte Técnico.

A mis compañeros de laboratorio.

Martha, Tania, Elena, Ana, Marcos, Chris, Aaron, Javier. Por ayudarme en mis dudas y hacer los días en el laboratorio más divertidos.

Al Hospital Juárez de México, en especial a los C.M.F.

Carlos Juan Liceaga Escalera

Juan José Trujillo Fandiño

Luis Alberto Montoya Pérez

Madeleine Edith Velez Cruz

Por creer en éste proyecto y todas las facilidades brindadas para el desarrollo del mismo.

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de los tumores odontogénicos.

Tabla 2 Proteínas de membrana encontradas en extractos totales de quiste dentígero, ameloblastoma unicístico ameloblastoma sólido y carcinoma ameloblástico

Tabla 3. Muestras de ameloblastomas y quistes dentígeros usados en este estudio

Tabla 4. Proteínas identificadas por espectrometría de masas.

Índice de Figuras

Figura 1. Etapas morfológicas en la formación de los órganos dentarios.

Figura 2. Imágenes clínicas, radiográficas e histológicas de los principales TO's.

Figura 3. Hemimandibulectomías como tratamiento de los tumores odontogénicos.

Figura 4. Tipos de ameloblastoma.

Figura 5. Quiste dentífero.

Figura 6. Ameloblastomas provenientes de quistes dentíferos.

Figura 7. Vía de señalización SHH.

Figura 8. Expresión membranal y citoplasmática de PTCH en el ameloblastoma.

Figura 9. Efecto del anticuerpo neutralizante y la ciclopamina en la proliferación en las células AM-1.

Figura 10. Análisis por inmunohistoquímica de las proteínas membranales en cortes de ameloblastoma.

Figura 11. Análisis del fraccionamiento membranal y citoplásmico en muestras de ameloblastoma y quiste dentífero.

Figura 12. Western blot contra E-cadherina.

Figura 13. Western blot contra ODAM.

Figura 14. Proteínas membranales de todas las muestras analizadas.

Abreviaturas

TO	Tumor odontogénico
OMS	Organización Mundial de la Salud
pI	Punto isoelectrico
SDS- PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SHH	Sonic Hedgehog
TCA	Ácido Tricloro Acético
DTT	Ditiotreitol
AU	Ameloblastoma Uniquístico
AMS	Ameloblastoma Sólido
AMELO	Ameloblastoma no especificado
QD	Quiste dentígero
PM	Proteínas Membranales
SN1	Sobrenadante 1 (Proteínas hidrosolubles)
ET	Extracto Total
ODAM	Proteína odontogénica asociada a ameloblastos (Odontogenic Ameloblast Associated Protein)

Resumen

Los tumores odontogénicos (TO's) son lesiones que derivan de los tejidos productores de dientes o de sus remanentes, los cuales quedan dentro de los tejidos mandibulares o dentro de los tejidos blandos. Estas neoplasias pueden ser benignas o malignas con variación en su agresividad y su potencial para desarrollar metástasis. Son poco frecuentes, pero pueden plantear un reto diagnóstico y terapéutico significativo. Debido a la falta de marcadores específicos para este tipo de lesiones, el diagnóstico se basa en consideraciones histológicas y anatómicas, su tratamiento es quirúrgico, con un alto impacto físico y mental para el paciente.

Dentro de los TO's se encuentra el ameloblastoma, el cual es una neoplasia benigna, intraósea, polimórfica, localmente invasiva derivada de epitelio odontogénico y que exhibe un comportamiento clínico agresivo con alta tendencia a ser recurrente. Interesantemente, se ha sugerido que el ameloblastoma puede originarse de las paredes de un quiste dentígero.

Por su parte, las proteínas de membrana se han relacionado con la transformación tumoral en cierto tipo de cánceres, por lo que actualmente 2/3 de las drogas están dirigidas a estos blancos terapéuticos.

Por tal motivo, en éste trabajo se realizó una comparación entre las proteínas membranales del ameloblastoma con respecto a las del quiste dentígero. Con este propósito se analizaron 10 muestras provenientes de pacientes del Hospital Juárez de México. Estas incluyeron dos quistes dentígeros y ocho ameloblastomas. La purificación de proteínas membranales se realizó mediante su separación con Triton X-114 y cambios de temperatura. Con el fin de confirmar la correcta purificación de las proteínas de interés estas se sometieron a ensayos de Western blot utilizando anticuerpos contra proteínas de membrana y citoplásmicas. Los resultados mostraron que solo los extractos totales y las proteínas de membrana fueron reconocidas por un anticuerpo contra la proteína membranal E-cadherina, mientras que un anticuerpo

contra la proteína odontogénica asociada a ameloblastos (ODAM, *Odontogenic Ameloblast Associated Protein*) solo mostró reacción en los extractos totales y las proteínas citoplásmicas, indicando la eficiencia de método. Al comparar el patrón electroforético de las proteínas membranales se encontraron tres bandas que se encuentran en todos los tipos de ameloblastoma y no así en los de quiste dentígero. Tras su identificación mediante espectrometría de masas de esas bandas diferenciales se encontraron proteínas de membrana que tienen gran impacto en el comportamiento biológico de otros tipos de tumores, estas fueron HSP60, vinculina, plectina y la integrina $\alpha 6$.

Abstract

Odontogenic tumors (OT's) are lesions arising from teeth producing tissues or their remnants, which are within the mandibular tissue or into the soft tissues. These tumors can be benign or malignant with variation in their aggressiveness and their potential to develop metastases. They are rare, but may represent a diagnostic and therapeutic challenge. Due to the lack of specific markers for this type of tumors, the diagnosis is based on histological and anatomical considerations, the treatment is surgical, with a high physical and mental impact on the patient.

Ameloblastoma is a benign OT, it is intraosseous, polymorphic, locally invasive odontogenic epithelium-derived and exhibiting an aggressive clinical behavior with high tendency to recur. Interestingly, it has been suggested that ameloblastoma may originate from the walls of a dentigerous cyst.

On the other hand, membrane proteins have been linked to tumor transformation in certain kind of cancers, thus 2/3 of drugs currently used are directed to these therapeutic targets

For this reason, in this study we compared the electrophoretic profile of membrane proteins ameloblastoma with those of dentigerous. We analyzed 10 samples obtained from the Hospital Juárez de México. These samples included two dentigerous cysts and eight ameloblastomas. Purification of membrane proteins was done by their separation with Triton X-114 and temperature changes. To confirm the purification of the membrane proteins, they were submitted to Western blot assays using antibodies against membrane and cytoplasmic proteins. Results showed that only total extracts and membrane proteins were recognized by an antibody against the membrane protein E-cadherin, whereas an antibody against the cytoplasmic protein ODAM only reacted with total extracts and cytoplasmic proteins, indicating the efficiency of the method.. When we compared the electrophoretic pattern of the

membrane proteins, we detected three bands that were seen in all ameloblastomas, but absent in the dentigerous cyst samples. After their analyses by mass spectrometry we identified membrane proteins that have been shown a great impact in the biological behavior on other type of tumors, such as HSP60, vinculin, plectin and integrin $\alpha 6$.

Introducción

Odontogénesis

El inicio del desarrollo dental comienza al final de la quinta semana de gestación embrionaria, en donde se encuentran en contacto tejido epitelial y tejido del ectomesénquima. Entonces, la lámina dental comienza a proliferar de manera intensa y localizada dentro del ectomesénquima. A esta fase se le conoce como “etapa de iniciación” (Koussoulakou DS, *et. al.* 2009), en la cual los procesos moleculares y celulares que se llevan a cabo determinan el tipo y la posición exacta de cada diente en la mandíbula y maxila en desarrollo (Koussoulakou DS, *et. al.* 2009). Desde este punto, el desarrollo dental se realiza en tres etapas siguientes llamadas brote o yema, casquete y campana (Fig. 1) (Tucker A, Sharpe P., 2004).

La etapa de brote es un estado proliferativo de las células epiteliales orales inducido por el tejido mesenquimatoso, dando origen a la lámina dental, cuyas células proliferan dentro del ectomesénquima de los maxilares y adquiere una forma redondeada (Fig. 1) (Koussoulakou DS, *et. al.* 2009). Gracias a esta formación cóncava dentro del ectomesénquima, la densidad celular aumenta, así como la concentración de varios factores de crecimiento (Koussoulakou DS, *et. al.* 2009), lo que lleva a la formación de tejido epitelial que semeja un casquete sobre una esfera de ectomesénquima condensado (Fig. 1), lo cual es denominado papila dental. El ectomesénquima que limita la papila dental y que encapsula el órgano dentario es llamado folículo o saco dental, siendo ésta la estructura que da origen a los cementoblastos, osteoblastos y fibroblastos (Slavkin HC, 1974). Aquí ocurre la transformación de la forma semiesférica del casquete a una estructura semi-piramidal que se continúa con la lámina dental en la punta del cono (Fig. 1). Este evento inicia la morfogénesis dental, donde la base del cono será en el futuro la corona del diente. El epitelio dentro del casquete se caracteriza como el epitelio del esmalte interno,

mientras que la parte exterior de la tapa está cubierta por el epitelio del esmalte externo (Koussoulakou DS, *et. al.* 2009).

La formación del primer nudo marca el inicio de la fase de campana del desarrollo dentario, ya que se desplaza el retículo estrellado y adquiere la forma de una campana (Fig. 1). Los nudos, se colocan en las puntas de las invaginaciones epiteliales para coordinar la formación y determinar la posición y la altura de las cúspides correspondientes a la corona (Coin R. *et. al.* 1999), y el órgano del esmalte está claramente separado de la papila dental (Koussoulakou DS, *et. al.* 2009). Durante esta etapa, las células se diferencian *in situ*, y la corona toma su forma final. Las células mesenquimales en la frontera de la pulpa dental se unen a la membrana basal del epitelio interno del esmalte, adoptan una forma cilíndrica y se transforman en odontoblastos que producen y secretan colágena tipo I, la cual es el mayor componente de la predentina, que a su vez es calcificada por la hidroxiapatita para formar la dentina, esto en presencia de altas concentraciones de tenascina y fosfatasa alcalina (Koussoulakou DS, *et. al.* 2009). Inmediatamente después de la deposición predentina, las células del epitelio interno del esmalte toman una forma columnar y se diferencian en ameloblastos que comienzan a sintetizar y depositar prismas de pre-esmalte (Hirota M. *et. al.* 2005). Las células de la capa intermedia ayudan considerablemente al proceso de formación del esmalte y, después de la erupción dentaria, se transforman en la capa basal del epitelio de unión. En esta etapa, se desintegra la lámina dental, dejando el diente "libre" de epitelio (Fig. 1) (Tucker A, Sharpe P., 2004).

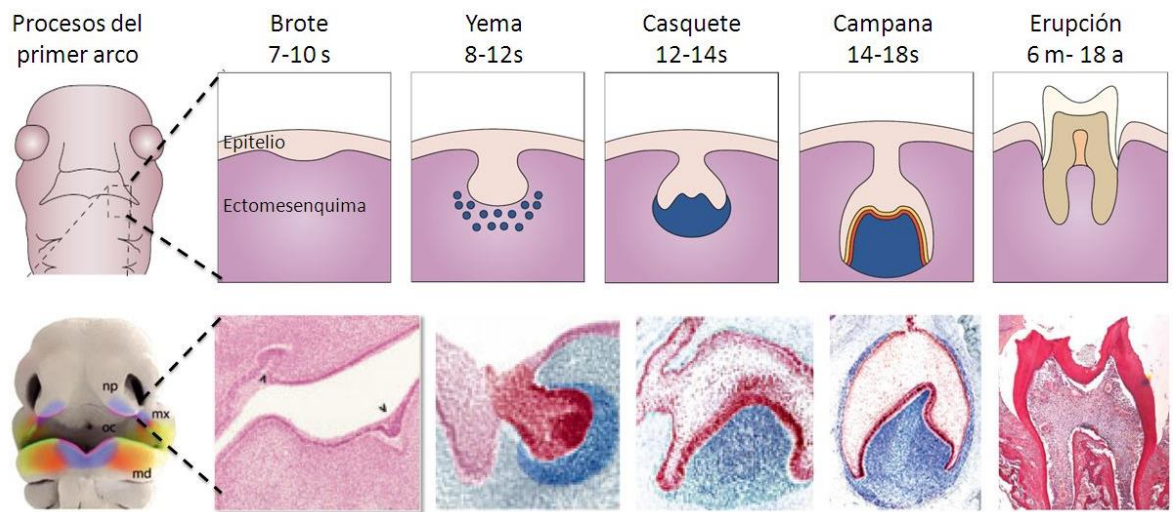


Figura 1. Etapas morfológicas en la formación de los órganos dentarios Abigail Tucker. Nature Reviews Genetics 5; 499, 2004.

Tumores odontogénicos

Los tumores odontogénicos (TO's) son lesiones que derivan de los tejidos productores de dientes o de sus remanentes que quedan dentro de los tejidos mandibulares o dentro de los tejidos blandos. Estas neoplasias pueden ser benignas o malignas con variación en su agresividad y su potencial para desarrollar metástasis (Mosqueda-Taylor A. 2008). Los TO's son poco frecuentes, pero pueden plantear un reto diagnóstico y terapéutico significativo (WHO, 2005).

Estos tumores habitualmente son asintomáticos, pero pueden expandir la mandíbula y causar movilidad de los dientes, además de pérdida de hueso, mientras que en el examen microscópico, los TO's tienden a mostrar rasgos similares a los de las células o tejidos de origen y pueden ser de tejido epitelial, mesenquimal o ambos (Regezi Joseph A, Scuibba James J, 2000).

La falta de marcadores específicos para confirmar el origen de todas las lesiones odontogénicas, hace que el diagnóstico se base principalmente en consideraciones anatómicas, su relación con órganos dentarios o en las similitudes histológicas entre algunos tumores odontogénicos con estructuras dentales, como el ligamento periodontal, la pulpa, la papila o el folículo dental (Mosqueda-Taylor A. 2008).

Clasificación de tumores odontogénicos

La clasificación de los tumores odontogénicos presentada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2005 está basada primero en el comportamiento clínico de las lesiones, ya sea benigna o maligna (Tabla 1).

Las subclasificaciones de las lesiones benignas están basadas en los tipos de tejido odontogénico que están involucrados: epitelio odontogénico con estroma fibroso maduro sin ectomesénquima odontogénico; epitelio odontogénico con ectomesénquima odontogénico, con o sin formación de tejido duro; mesénquima y/o ectomesénquima odontogénico con o sin la presencia de epitelio odontogénico (Tabla 1) (WHO, 2005)

Entre los tumores odontogénicos benignos se encuentran el ameloblastoma, el tumor odontogénico quístico queratinizante y el mixoma odontogénico (Tabla 1), entre otros. Estos, a diferencia de los tumores odontogénicos malignos, no presentan atipia celular (Fig. 2), metástasis ni invasión local. Entre los tumores odontogénicos malignos se encuentran el ameloblastoma metastatizante maligno, el carcinoma escamocelular intraóseo primario, el carcinoma odontogénico de células claras y el carcinoma odontogénico de células fantasma (Tabla 1), por mencionar algunos (WHO, 2005).

Hasta hace unos años, el más común de los TO's benignos era el odontoma, seguido del ameloblastoma sólido/multiquístico y el mixoma odontogénico Daley TD *et. al.* 1994, Mosqueda-Taylor A. *et. al.* 1997, Buchner A. *et. al.* 2006, Guerrisi M. *et. al.* 2007). Sin embargo, en la última edición sobre la clasificación de los tumores odontogénicos, que toma en cuenta el diagnóstico por inmunohistoquímica, biología molecular y estudios genéticos (WHO, 2005), el tumor odontogénico quístico queratinizante (TOQQ) fue incluido en los TO's, siendo ahora éste el tumor

odontogénico más frecuente, desplazando al odontoma al segundo lugar (Gaitán-Cepeda LA *et. al.* 2010).

Tabla 2 Clasificación de los tumores odontogénicos.

Benigno	Epitelio odontogénico sin ectomesénquima odontogénico	Ameloblastoma Tumor odontogénico escamoso Tumor odontogénico epitelial calcificante Tumor odontogénico adenomatoide Tumor odontogénico queratoquístico
	Epitelio odontogénico con ectomesénquima odontogénico (con o sin formación de tejidos duros dentales)	Fibroma ameloblástico Fibrodentinoma ameloblástico Fibro odontoma ameloblástico Odontoma Odontoameloblastoma Tumor odontogénico quístico calcificante Tumor dentinogénico de células fantasmas
	Ectomesénquima odontogénico con o sin inclusión de epitelio odontogénico	Fibroma odontogénico Mixoma Cementoblastoma benigno
Maligno	Carcinomas odontogénicos	Ameloblastoma maligno Carcinoma espinocelular intraóseo primario- tiposólido Variantes malignas de tumores odontogénicos Cambios malignos en quistes odontogénicos
	Sarcomas odontogénicos	Fibrosarcoma ameloblástico Fibrodentinosarcoma ameloblástico Fibroodontosarcoma ameloblástico
	Carcinosarcomas odontogénicos	

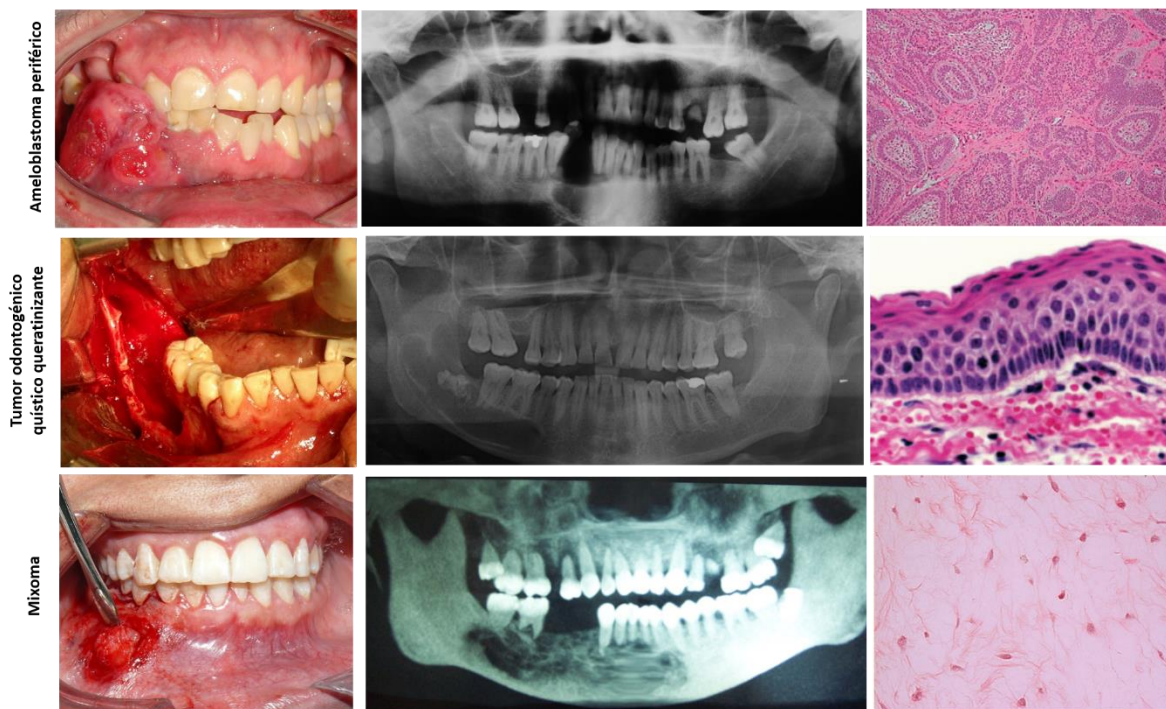


Figura 2 Imágenes clínicas, radiográficas e histológicas de los principales TO's. Imágenes facilitadas por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

Etiología de los tumores odontogénicos

La etiología de los tumores odontogénicos benignos y malignos no se conoce. La mayoría de los TO's parecen surgir *de novo*, sin un factor causal aparente (Mosqueda-Taylor A. 2008). Hasta el momento se ha incrementado la evidencia que muestra que los residuos del epitelio odontogénico juegan un papel en la histogénesis de los tumores odontogénicos y quistes (Mosqueda-Taylor A. 2008, Lucas RB 1983).

En la actualidad se sabe que las fuentes potenciales para el desarrollo de un tumor odontogénico son varias, donde se incluyen las siguientes (Mosqueda-Taylor A. 2008):

- a) La lámina dental pre-funcional (epitelio odontogénico con capacidad para producir un diente), que es más abundante en los terceros molares inferiores.
- b) La lámina dental post-funcional, un concepto que cubre los restos epiteliales como los de Serre, ubicados dentro del tejido gingival fibroso, las células epiteliales de Malassez, que descansan en el ligamento periodontal, y el epitelio reducido del órgano del esmalte, que cubre la superficie del esmalte hasta la erupción del diente.
- c) La capa de células basales del epitelio gingival, que originalmente dan lugar a la lámina dental.
- d) La papila dental, el origen de la pulpa dental, que tienen el potencial de ser inducidas a producir odontoblastos y sintetizar la dentina y/o material dentinoide
- e) El folículo dental.
- f) El ligamento periodontal, el cual tiene el potencial de inducir la producción de fibras y material mineralizado.

Tratamiento

Debido al pequeño número de casos publicados de TO's, en la actualidad no se encuentran disponibles protocolos o pautas de tratamiento específicos. La resección quirúrgica con márgenes de seguridad (0.5 mm) es el tratamiento de elección (Fig. 3) (WHO, 2005). Las lesiones pequeñas pueden ser resueltas con enucleación y curetaje y son también citadas la aplicación de sustancias criogénicas con el objetivo de anular el posible compromiso del margen de la lesión, donde el nitrógeno líquido es el más utilizado para cirugía criogénica en hueso, después de la resección de la lesión (Pogrel MA, 1995).

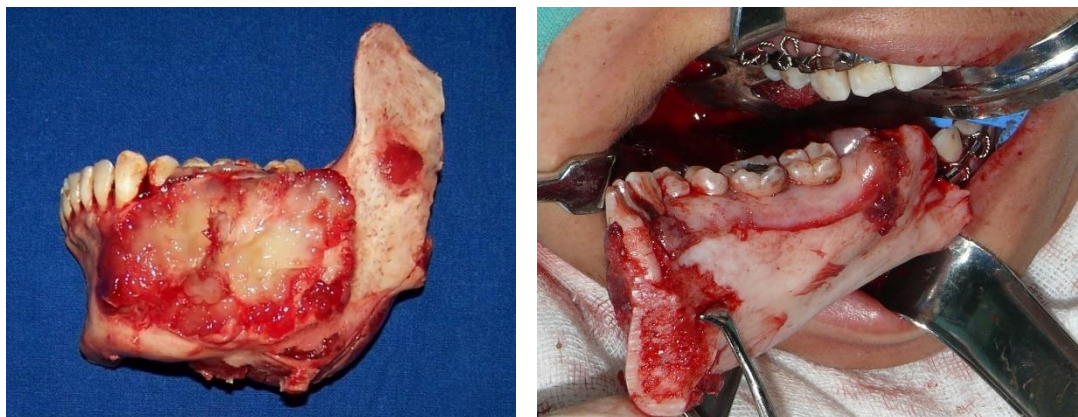


Figura3. Hemimandibulectomías como tratamiento de los tumores odontogénicos. Imágenes facilitadas por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

Ameloblastoma

El ameloblastoma es una neoplasia benigna, intraósea, polimórfica, localmente invasiva, que presenta un patrón microscópico de tipo folicular o plexiforme que pueden llegar a unirse en forma secundaria con el epitelio bucal (Kramer IRH *et. al.* 1992). Representa el 1% de todas las lesiones quísticas y tumorales de los maxilares, siendo un tumor benigno derivado de epitelio odontogénico que exhibe un comportamiento clínico agresivo con alta tendencia a ser recurrente (Punnya AV, Rekha K. 2008). Esta lesión puede surgir en un gran rango de edad (10-92 años), siendo los 33 años la edad más común, sin tener predilección por alguno de los sexos (Punnya AV, Rekha K. 2008). El 85% de los casos ocurren en la mandíbula con predilección en las áreas molar y de rama mandibular (Punnya AV, Rekha K. 2008).

Clínicamente, la zona afectada puede parecer normal o presentar una tumoración con desplazamiento dental y/o mala oclusión, la mucosa que lo recubre es normal, siendo neoplasias generalmente asintomáticas (Shafer WG *et. al.* 1986). Fundamentalmente son lesiones centrales, pero se han registrado casos de este tumor en tejidos blandos gingivales en aproximadamente del 2 al 10% de los casos (Yamamoto T. *et. al.* 1990).

Radiográficamente pueden aparecer como zonas radiolúcidas uniloculares o multiloculares con bordes festoneados (Fig. 2). Frecuentemente se asocia a órganos dentarios no erupcionados o retenidos y en los dientes adyacentes a la lesión, la reabsorción radicular es común (Regezi JA, Scuibba JJ. 1989).

El ameloblastoma puede originarse a partir de la lámina dentaria o sus derivados: órgano del esmalte, restos epiteliales de Malassez, restos de Serres, Gobernáculo o bien de quistes foliculares (Lucas RB. 1983). Si bien su causa sigue siendo desconocida, la desregulación de algunos genes en la odontogénesis puede jugar un papel importante en su histogénesis (WHO, 2005).

De acuerdo a Vickers y Gorlin (Vickers RA, Gorlin RJ. 1970) se reconocen cuatro

características para identificar histológicamente a los ameloblastomas:

- 1) Hiperchromatismo nuclear de las células basales.
- 2) Células basales en empalizada.
- 3) Polarización nuclear hacia el otro lado de la membrana basal y
- 4) Vacuolización citoplasmática de las células basales.

Clasificación clínica de los ameloblastomas

Según la clasificación de la OMS en el 2005, el ameloblastoma se puede dividir en:

a) Ameloblastoma desmoplástico

Este tipo de ameloblastoma histopatológicamente presenta islotes de epitelio irregulares con bordes puntiagudos, células periféricas cuboidales con núcleos hipercromáticos, apariencia columnar menos frecuente que en las otras variantes, microquistes en el espesor de los islotes y estroma fibroso con severa desmoplasia (Hirota M. *et. al.* 2005). Representa aproximadamente del 4 al 13% del total de ameloblastomas (Philipsen HP. *et. al.* 2001). Esta variedad generalmente se desarrolla en la zona anterior o premolar del maxilar y en la mandíbula, sin preferencia por uno en concreto. Esta variante tiene peor pronóstico, ya que presenta un mayor índice de recidivas posquirúrgicas y un mayor porcentaje de malignización (Hirota M. *et. al.* 2005, Philipsen HP. *et. al.* 2001). Se presenta fundamentalmente en la cuarta y quinta década de vida, sin predilección por género (Hirota M. *et. al.* 2005). Además, exhibe características radiológicas atípicas y variadas, como lesiones localizadas, radiolúcidas, multiloculares, irregulares con bordes indistintos, o un aspecto mixto radioopaco/radiolúcido con márgenes mal definidos similares a una lesión fibroósea, o una lesión osteolítica expansiva parecida a un panal de abeja, con aspecto moteado o multilocular (Laxmana AR *et. al.* 2010).

b). Ameloblastoma uniuístico

Esta variante de ameloblastoma fue descrito por primera vez por Robinson y Martínez en 1977 (Konouchi H *et. al.* 2006), y en ese entonces esta lesión fue separada como una entidad distinta por ofrecer cuadros histogenéticos particulares. Algunos autores opinan que se desarrolla a partir de los quistes odontogénicos preexistentes, mientras que otros sostienen que estos ameloblastomas emergen *de novo* (Konouchi H *et. al.* 2006). Robinson y Martínez

plantean que el ameloblastoma y los quistes odontogénicos tienen un ancestro común (Konouchi H *et. al.* 2006). Así, la transición desde un quiste no neoplásico a uno neoplásico podría ser una posibilidad (Robison L *et. al.* 1977).

Este tipo de ameloblastoma está relacionado en el 50 a 80 % de los casos, y en ocasiones hasta el 99 %, con un diente incluido, mientras el porcentaje restante puede simular un quiste radicular o un quiste residual (Robison L *et. al.* 1977). La edad media de surgimiento no está bien establecido, ya que algunos autores mencionan que es de 18.7 años (Konouchi H *et. al.* 2006), mientras que otros mencionan que es de 26.9 años (Yavagal C *et. al.* 2009). De cualquier modo, este dato lo diferencia de los otros tipos de ameloblastoma, en donde la edad media es de 32.7 años, en rangos que abarcan desde la segunda a la quinta décadas de la vida (Konouchi H *et. al.* 2006; Yavagal C *et. al.* 2009).

El término ameloblastoma uniuquístico puede ser atribuido a todas aquellas lesiones quísticas que presenten alguno de los siguientes requisitos en el contexto de su pared (Cunha EM *et. al.* 2005):

- Ameloblastoma uniuquístico simple: El epitelio del quiste es homogéneamente ameloblastomatoso.

- Ameloblastoma uniuquístico intraluminal: Un nódulo ameloblastomatoso o más se proyectan en el lumen quístico (aspecto descrito como luminal o intraluminal), sin evidencia de infiltración de la pared fibrosa del quiste por epitelio odontogénico.

- Ameloblastoma uniuquístico intramural:

Uno o más proyecciones epiteliales ameloblásticas proliferan en el espesor de la pared conectiva, ya sea del tipo folicular o plexiforme el cual puede estar o no conectado a la cubierta epitelial del quiste; o bien, islas de tejido ameloblástico que están presentes en el interior de la pared conectiva en contacto directo con el epitelio

de un quiste aparentemente no neoplásico.

c) Ameloblastoma sólido o multiquístico

Es el segundo tumor odontogénico más frecuente. Se origina centralmente, pero suele crecer en todas las direcciones invadiendo el tejido local y destruyendo el hueso, ya que se esparce lentamente por infiltración (WHO, 2005). Las lesiones son no encapsuladas y presentan un porcentaje de recidiva de hasta un 90 % si son tratados solo con curetaje (Kehinde E et. al. 2006).

Existen dos patrones histológicos, el folicular y el plexiforme, sin que esto presente una relevancia clínica. El tipo folicular consiste en islas de epitelio odontogénico dentro de un estroma fibroso, sus células basales son columnares, hipercromáticas y en forma de empalizada. Las células centrales pueden estar libremente arregladas, parecidas al retículo estrellado, éstas comúnmente se vuelven quísticas y en algunas ocasiones confluentes (WHO, 2005). Por su parte, el patrón plexiforme presenta células basales acomodadas en fibras anastomosadas con un retículo estrellado escaso. El estroma usualmente presenta un tipo de degeneración quística (WHO, 2005).

d) Extraóseo o periférico

Este tipo de ameloblastoma se observa como un aumento de volumen localizado de la encía. Es la menos frecuente de las formas clínicas del ameloblastoma, representando del 1 al 10% de estas lesiones (WHO, 2005). Raramente afecta el hueso adyacente y presenta muy buena evolución posterior al tratamiento quirúrgico (Steven E et. al. 2008).

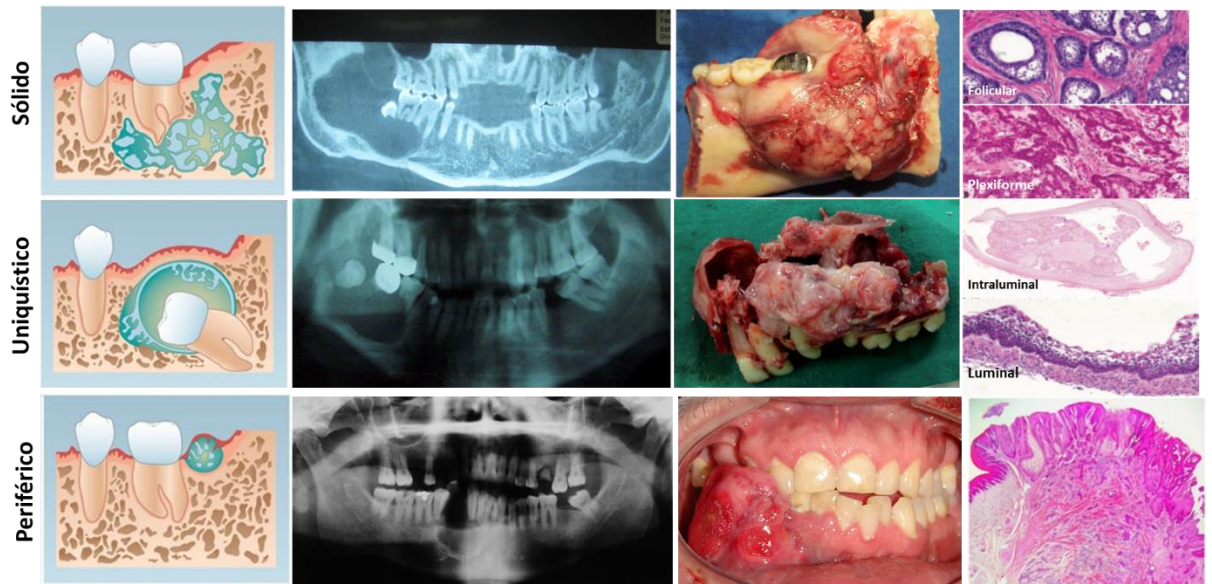


Figura 4. Tipos de ameloblastoma. Se muestra un esquema e imágenes radiográficas, clínicas e histológicas de los ameloblastomas más comunes. Imágenes proporcionadas por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

Quiste dentígero

El quiste dentígero es el tipo más común de quistes odontogénicos no inflamatorios, el segundo en frecuencia de todos los quistes odontogénicos (Mourshed F. 1964; Alfred L. Weber *et. al.* 2003; Scholl RJ *et. al.* 1999; Narang RS *et. al.* 2012) y es la causa más frecuente de radio opacidad presente alrededor de un diente no erupcionado (Scholl RJ *et. al.* 1999). Un quiste dentígero rodea la corona de un diente no erupcionado por la expansión de su folículo dental y está unido al límite amelodentinario (Scholl RJ *et. al.* 1999). Histopatológicamente, está conformado como una cavidad tapizada de epitelio escamoso hiperplásico no queratinizado hacia el lumen. Una cápsula de tejido conectivo con presencia de infiltrado inflamatorio da soporte al epitelio. Las células epiteliales que recubren esta lesión pueden aparecer de forma aplanada o cuboidal y suelen presentarse de 2 a 6 capas (Parvathi Devi *et. al.* 2010).

El quiste dentígero se forma dentro del revestimiento del folículo dental cuando se acumula líquido entre el epitelio folicular y la corona del diente en desarrollo no erupcionado (Alfred L. Weber *et. al.* 2003).

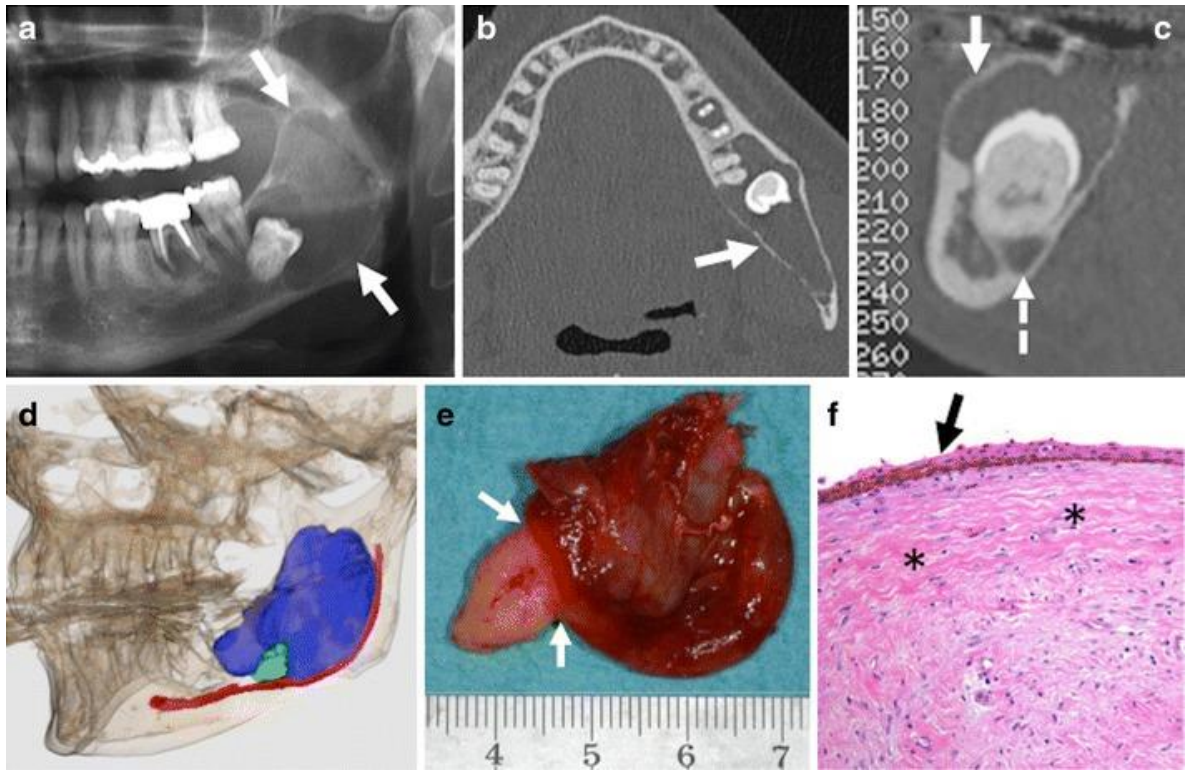


Figura 5. Quiste dentígero. Tomado de *Insights Imaging* 2014 Feb;5(1):85-101.

Relación entre el quiste dentígero y el ameloblastoma

En la pared de un quiste dentígero pueden desarrollarse tumores odontogénicos benignos como ameloblastomas, tumores adenomatoides y tumores mucoepidermoides, así como tumores malignos como carcinomas (Alfred L. Weber et.al. 2003). Clínica y radiográficamente el ameloblastoma uniuquístico y el quiste dentígero son idénticos (K.M.K Mashtan, S. Rajkumari 2011) de hecho, algunos tipos de ameloblastoma uniuquístico que histológicamente presentan pequeñas islas de epitelio ameloblástico pueden ser erróneamente diagnosticados como quistes dentígeros, estos suelen tratarse como un quiste dentígero, llevando a cabo una enucleación simple, lo cual predispone a la reaparición del ameloblastoma (Dunshe A. et. al. 2003).

Scholl y colaboradores afirman que aproximadamente 50% de los ameloblastomas se originan de las paredes de un quiste dentígero (Figura 6), constituyendo una entidad bien definida llamada ameloblastoma mural (Scholl RJ et. al. 1999), mientras que Shteyer y colaboradores argumentan un 85% de los casos y una edad promedio de 21.8 años al momento de su diagnóstico (Shteyer A et. al. 1978).

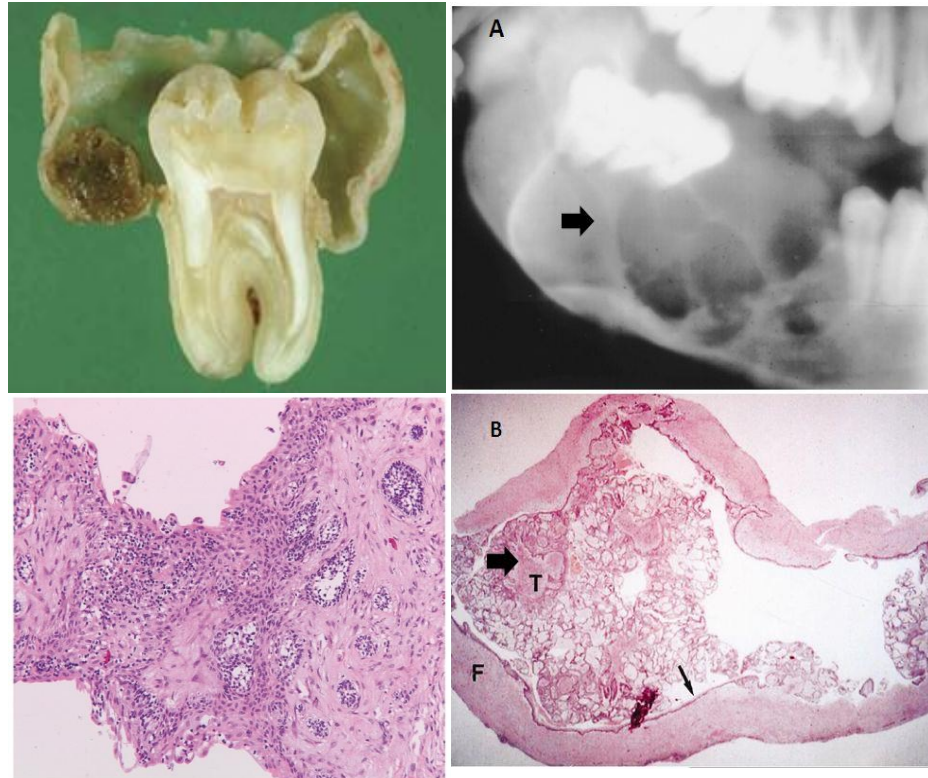


Figura 6. Ameloblastomas provenientes de quistes dentígeros. Entre el 50% y el 85% de los ameloblastomas murales se originan en la pared de un quiste dentígero.⁵⁴ Radiográfica y clínicamente son parecidos a los ameloblastomas comunes o a grandes quistes dentígeros (A). Histológicamente se observa la cavidad conformada por el quiste, con crecimiento de una masa tumoral hacia el interior y que deriva del epitelio, mientras una capa de tejido fibroso (F) recubre la lesión por la superficie externa (B). Tomada y modificada de Scholl JR. *RadioGraphics* 19: 1107-1124, 1999

Estudio de moléculas como biomarcadores

El desarrollo del cáncer es impulsado por la acumulación de cambios en el DNA en algunos de los aproximadamente 40 000 genes cromosómicos. En los tumores sólidos (90% de todos los tumores malignos humanos), son comunes las aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales (Rowley JD.2001; Jallepalli PV et. al. 2001). Los defectos en la reparación del DNA pueden conducir a la inestabilidad genética de todo el genoma, lo que puede impulsar aún más la progresión del cáncer (J.P.A Baak, et. al. 2003). Durante la última década, nuestro conocimiento del genoma humano en lesiones pre-malignas se ha incrementado enormemente. La genómica (el estudio del genoma humano) y la proteómica (el análisis de las proteínas presentes en un tipo de células o en una condición determinada) juegan un papel importante en la comprensión, el diagnóstico, el pronóstico y posiblemente también el tratamiento del cáncer y de los tumores sólidos benignos (J.P.A Baak, et. al. 2003).

Proteómica

Menos del 2% de las enfermedades son monogénicas (causadas por la mutación de un solo gen), mientras que el 98% restante son poligénicas, ya que involucran múltiples genes (Wilkins, M. R., J. C. *et. al.* 1995). El conocimiento de las vías que va a seguir una enfermedad depende enormemente de un análisis proteómico de las proteínas involucradas (J.P.A Baak, *et. al.* 2003).

El término "proteómica" fue acuñado por primera vez en 1995 y se definió como la caracterización a gran escala de todo el componente proteico de una línea celular, tejido, u organismo en una condición determinada (Wilkins, M. R., J. C. *et. al.* 1995; Anderson *et. al.* 1996; Wasinger *et. al.* 1995). Actualmente se pueden encontrar dos definiciones de proteómica. La primera es la definición más clásica, la cual restringe el análisis a gran escala de los productos génicos, estudios que implican sólo las proteínas (Graves PR, 2002). La segunda definición combina los estudios de proteínas con análisis que tienen implicaciones genéticas, como el análisis de mRNA, la genómica, y el análisis de doble híbrido en levadura (Pandey A *et. al.* 2000). Sin embargo, el objetivo de la proteómica es el mismo, obtener una visión más global e integrada de la biología, mediante el estudio de todas las proteínas de una célula en lugar de cada una en particular (Graves PR, 2002).

La manera más fácil de hacer un estudio proteómico es comparar los proteomas de dos condiciones y observar sus diferencias. La detección y cuantificación de proteínas diferenciales de células o tejidos nos permite tratar de resolver preguntas como: ¿Qué función tienen las proteínas?, ¿Qué tipo de modificaciones postransduccionales sufren las proteínas y cuál es su función?, ¿Cómo varían las proteínas de una célula o tejido enfrentados a sus similares, pero en distintas condiciones ambientales? (Görg A *et. al.* 2005).

En la actualidad el análisis proteómico permite el estudio de las proteínas en tiempo y espacio, ya que se ha desarrollado a un grado de poder analizar redes moleculares,

y por lo tanto, se pueden explicar fenómenos muy complejos como el cáncer (Gauss C *et. al.* 1999).

Este tipo de análisis permite conocer cuando las proteínas cambian su patrón de expresión dependiendo de las circunstancias del medio ambiente y, por lo tanto, del estado fisiológico en que se encuentre el organismo, esta información está siendo aplicada a varios campos de la biología y la medicina (Wilson AM *et. al.* 2007). De esta forma, dos o más condiciones diferentes de una célula, tejido u organismo (por ejemplo, un tejido sano y otro enfermo) pueden ser comparadas y así, identificar cambios en el patrón de expresión proteico, cambios que pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos.

El análisis de los proteomas, permite la identificación de las funciones de las proteínas involucradas en la patogénesis o en el envejecimiento celular, entre otros procesos (Cázares-Raga FE 2007). Este tipo de análisis sirve también para proponer modelos de interacción molecular que expliquen la biogénesis de padecimientos así como para la identificación de marcadores para el diagnóstico y predicción de enfermedades (Wilson AM *et. al.* 2007; Svetlov SI *et. al.* 2006), blancos para drogas o blancos terapéuticos (Romeo MJ *et. al.* 2005).

Las aplicaciones de la proteómica en el cáncer son muy diversas, esta herramienta ha abierto el campo para hacer detecciones tempranas del cáncer, para conocer el estatus de cualquier célula o tejido en un proceso de enfermedad, para observar mutaciones de un gen, alteraciones en la transcripción y traducción de un gen y la alteración de los productos proteicos de un gen, y todos estos usos pueden servir como biomarcadores de enfermedad (Wulfschlegel JD *et. al.* 2003). Un ejemplo, entre muchos, de que este tipo de estudios han servido para encontrar biomarcadores es el estudio del carcinoma de células escamosas de glándulas salivales, ya que al comparar la saliva de pacientes sanos con pacientes con ese tipo de tumor, se identificaron algunos biomarcadores de este tipo de cáncer (Wang ZH *et. al.* 2010). Esta estrategia también se ha empleado para descifrar las moléculas que se expresan en la progresión

del epitelio benigno al epitelio metastásico en el cáncer de mama (Rennstam K *et. al.* 2006).

La tecnología más frecuentemente utilizada para monitorear los cambios en la expresión de complejos proteicos es la electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) (Huber LA *et. al.* 2003), la cual es una técnica poderosa para la separación proteica, primero por su punto isoeléctrico (pI) y luego dependiendo su peso molecular. La digestión de las proteínas separadas por esta técnica hace posible un mayor análisis mediante espectrometría de masas (MS), ya que los péptidos obtenidos pueden ser utilizados para buscar la secuencia de la proteína en una base de datos (NCBI, SWISSPRTO, HGMP, entre otras) para su identificación (J.P. A. Baak *et. al.* 2003).

Proteómica de membranas plasmáticas

La membrana plasmática mantiene las barreras esenciales entre el citoplasma y el medio extracelular, contiene proteínas que median algunas de las funciones celulares, actuando como sensores de las señales extracelulares, transportadores de moléculas específicas y como el punto de unión de la membrana con el citoesqueleto, la matriz extracelular y las células adyacentes (Lund R *et. al.* 2009).

Las proteínas de membrana representan un tercio de las proteínas codificadas por el genoma (Josic R *et. al.* 2009), y aproximadamente el 50% de la masa de la membrana celular (Huber LA *et. al.* 2003). También, más de dos tercios de las drogas existentes y futuras tienen como blanco proteínas de membrana (Hopkins AL *et. al.* 2003; Hopkins AL *et. al.* 2002; Rabilloud T 2003). Las membranas celulares son hidrofóbicas y por lo tanto solo son solubles en soluciones que contienen detergentes. La mayoría de ellas tienen numerosas modificaciones postraduccionales, como glicosilación, fosforilación y sulfatación, esto es la razón de su heterogeneidad extremadamente alta (Josic R *et. al.* 2009).

Los receptores membranales son proteínas transmembranales que se unen a moléculas de señalización hidrofílicas que no pueden cruzar la bicapa lipídica y que actúan como transductores de señales para regular procesos celulares, por lo que esos receptores son moléculas clave para la sobrevivencia celular, y por lo tanto son considerados como blancos terapéuticos (Leth-Larsen R *et. al.* 2010). Las interacciones entre proteínas y receptores son independientes de la síntesis proteica, por lo que la proteómica se ha convertido en la principal forma de abordar la señalización y regulación de los receptores membranales (Leth-Larsen R *et. al.* 2010).

Los cambios fenotípicos asociados a la transformación maligna que incluyen la proliferación celular, adhesión y migración continuamente son mediados o iniciados por proteínas asociadas a la membrana plasmática, como los receptores membranales (Leth-Larsen R *et. al.* 2010).

El caracterizar marcadores de la superficie celular en tipos específicos celulares a distintos niveles de diferenciación, o diferentes estadios de la enfermedad, puede ser una forma de identificar marcadores moleculares potenciales para su subsecuente uso como blancos terapéuticos, que pueden ser reconocidos ya sea por anticuerpos monoclonales o bien por moléculas biológicas pequeñas (Josic R *et. al.* 2009). Un ejemplo de esto es la disminución en la expresión de HLA clase I en algunos tumores en comparación con células normales (Leth-Larsen R *et. al.* 2010).

En diferentes tipos de cáncer se han encontrado proteínas específicas de tumor utilizando diferentes técnicas, entre las que se encuentran la detección diferencial de cDNA's y la purificación de las proteínas de la superficie reconocidos por algunos tipos de anticuerpos tumorales (Adam PJ *et. al.* 2003). Las células cancerosas mutadas presentan alteraciones en los niveles de expresión de proteínas de membrana particulares. Estas alteraciones pueden ser una sobre expresión de algún tipo de receptor, como lo que se encontró con HER-2, el cual puede contribuir al crecimiento celular tumoral activado por ligandos circulantes o producidos, o bien pueden ser una falta o disminución en la expresión de algunas moléculas de adhesión que permiten a las células tumorales separarse del tumor primario y esparcirse (Leth-Larsen R *et. al.* 2010).

Identificación de proteínas membranales

Las proteínas de membrana son poco abundantes a comparación de las demás proteínas solubles que se obtienen en el lisado, ya sea de cultivo celular o de tejido, lo que las hace complicadas de estudiar aún con los recientes avances en las tecnologías proteómicas (Leth-Larsen R *et. al.* 2010). Grandes cantidades de algunas proteínas pueden dificultar la detección de otras menos frecuentes, como lo son las proteínas de membrana, por lo que el fraccionamiento de los extractos totales aumenta la probabilidad de la detección de éste tipo de proteínas (Huber LA *et. al.* 2003). El fraccionamiento subcelular permite la separación de organelos basándose en sus propiedades físicas y consiste en dos pasos principales: la homogeneización, que se basa en la ruptura de la organización celular, y el fraccionamiento del homogenado para separar los diferentes organelos celulares.

Los cultivos celulares actualmente son más utilizados para el fraccionamiento celular, debido a que las células pueden ser manipuladas de maneras imposibles de lograr en las células derivadas de tejidos. Sin embargo, tras la homogeneización los cultivos celulares son más difíciles de fraccionar que la mayoría de los tejidos, posiblemente por diferencias en la organización de su citoesqueleto (Huber LA *et. al.* 2003).

Por otra parte, el fraccionamiento celular se puede lograr mediante centrifugaciones diferenciales, debido a que cada organelo tiene tamaño, densidad, carga y otras propiedades características de las cuales depende la separación (Huber LA *et. al.* 2003). En general, casi todos los procedimientos de preparaciones membranales se inician con una incubación en soluciones hipotónicas del tejido o las células a usar, seguido de una homogeneización y remoción del núcleo y detritus celulares mediante la centrifugación a bajas velocidades (Huber LA *et. al.* 2003). Así, después de la primera centrifugación, se obtiene el sobrenadante post nuclear para posteriormente realizarle un protocolo de fraccionamiento celular que consiste en una sedimentación

por centrifugación que separa la fracción total de membranas de todas las proteínas solubles (Huber LA *et. al.* 2003).

Además el subfraccionamiento de las membranas plasmáticas se ha realizado mediante el uso de gradientes de sacarosa para la posterior identificación de proteínas específicas de organelos mediante 2-DE, sin embargo mediante este método la membrana plasmática co-purifica con Golgi y endosomas tempranos (Josic D *et. al.* 2007), por lo que es recomendable evaluar la integridad funcional y mecánica de los organelos, esto se puede realizar mediante diversos métodos. El inmunomarcaje para seguir la distribución de marcadores específicos de organelos puede ser usado, así como un análisis morfológico de todas las fracciones mediante microscopía electrónica (Huber LA *et. al.* 2003).

Otras técnicas recomiendan digerir las proteínas, previo a la separación de los péptidos y colocar éstos directamente en el espectrómetro de masas eliminando así el problema de mantener a las proteínas hidrofóbicas solubles (Huber LA *et. al.* 2003), pero la baja abundancia e hidrofobicidad de las proteínas de la membrana plasmática complica su purificación e identificación mediante espectrometría de masas (Josic D *et. al.* 2007).

Moléculas estudiadas en el Ameloblastoma

Hasta el momento, el diagnóstico de los tumores odontogénicos está basado en los hallazgos histológicos, sin embargo en ocasiones la resolución de un diagnóstico diferencial, sobre todo en biopsias pequeñas, es complicada, por lo que marcadores específicos serían de gran utilidad (Cairns L *et. al.* 2010).

Como se mencionó anteriormente, la etiología del ameloblastoma aún no ha sido establecida, pero un paso importante para determinar la patogénesis tumoral es su patrón clonal, ya que el ameloblastoma ha demostrado ser monoclonal (Gomes CC *et. al.* 2009, Gomes CC *et. al.* 2010), esto es, una mutación o alteración molecular inicial es el primer evento en el desarrollo tumoral. Sin embargo, a pesar de que se conocen diversas alteraciones moleculares en el ameloblastoma, la secuencia de éstos eventos sigue sin conocerse (Gomes CC *et. al.* 2009).

Desde 1995 se ha estudiado la proliferación celular en los ameloblastomas con Ki67, el núcleo inmunorreactivo a esta molécula se ha encontrado mayoritariamente en las células periféricas tipo ameloblastos en las áreas folicular y plexiforme de los ameloblastomas sólidos, así como en las células basales de los ameloblastomas uniuquísticos (Bologna-Molina R *et. al.* 2008). Por esto se ha sugerido que la proliferación celular, y por lo tanto el crecimiento del ameloblastoma, está centrado en las zonas periféricas de la lesión compuestas de células tipo ameloblastos (Ja"á" skela" inen K *et. al.* 2002; Bologna-Molina R *et. al.* 2008).

Con respecto a la apoptosis, se ha encontrado que el ameloblastoma expresa dos tipos de patrones celulares: el área anti-apoptótica proliferativa, correspondiente a su capa periférica basal, y el área pro-apoptótica correspondiente a las capas centrales de las islas tumorales (Sandra F *et. al.* 2001).

La ameloblastina es la proteína más importante involucrada en la citodiferenciación dental y es altamente expresada durante la diferenciación del epitelio interno (Gomes CC *et. al.* 2010). Se expresa en ameloblastos diferenciados, pero también se ha

identificado en las células epiteliales del ameloblastoma, sólo que en estas lesiones, el gen presentó mutaciones somáticas que no se presentaron en la mucosa oral normal (Saku T *et. al.* 1992; Takata T 2000; Snead ML 1992; Tsujigiwa H *et. al.* 2005).

Con respecto a las proteinasas de matriz, se ha reportado que la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) puede suprimir el comportamiento invasivo local de los ameloblastomas tanto *in vitro* como *in vivo* (Gomes CC *et. al.* 2010).

Publicaciones recientes han propuesto diferentes moléculas para diferenciar varias lesiones odontogénicas (Cairns L *et. al.* 2010). Por ejemplo, calretinina se expresa específicamente en las áreas del ameloblastoma donde se localizan células parecidas al retículo estrellado, por lo que se le ha considerado como un posible marcador clínico de epitelio ameloblástico neoplásico (Altini M *et. al.* 2000; DeVilliers P *et. al.* 2008, 57).

La vía de señalización Sonic hedgehog (SHH) (Fig. 7) es importante para la organogénesis, regula la proliferación y diferenciación de los ameloblastos y se ha visto que está involucrada con la proliferación del ameloblastoma (Kanda S *et. al.* 2013). SHH es una proteína secretada que activa a un complejo receptor de membrana formado por patched (PTCH) y smoothened (SMO), ambos con siete pases transmembranales (Ingham PW *et. al.* 2001; Echerlard Y *et. al.* 1993), en ausencia de SHH, PTCH inhibe a SMO, pero si SHH se une a PTCH se activan las proteínas GLI (Ingham PW *et. al.* 2001), los cuales funcionan como factores de transcripción que activan a otros genes blanco que van a resultar en la proliferación y diferenciación celular (Ren C *et. al.* 2012). Por lo que la activación aberrante de la vía de señalización SHH puede resultar en la formación tumoral (Hanh H *et. al.* 1999; Altaba AR 2002).

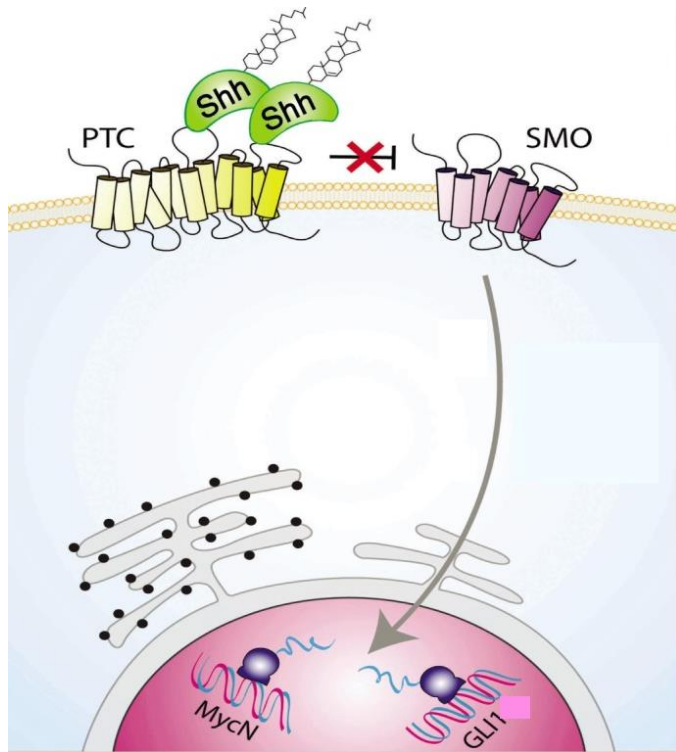


Figura 7 Vía de señalización SHH. Tomada y editada de Chin J Cancer. Jul 2011; 30(7): 442–449.

En un estudio inmunohistoquímico realizado en 29 ameloblastomas (17 foliculares y 12 plexiformes) se analizó la expresión de las moléculas SHH y PTCH involucradas la vía de señalización. En encía normal, como en células de ameloblastoma, SHH y PTCH se expresaron, sólo que ésta expresión fue más marcada en el citoplasma de las células de encía que en el ameloblastoma, a pesar de que ameloblastoma también mostró inmunoexpresión en la membrana celular (Fig. 8) (Kanda S *et. al.* 2013).

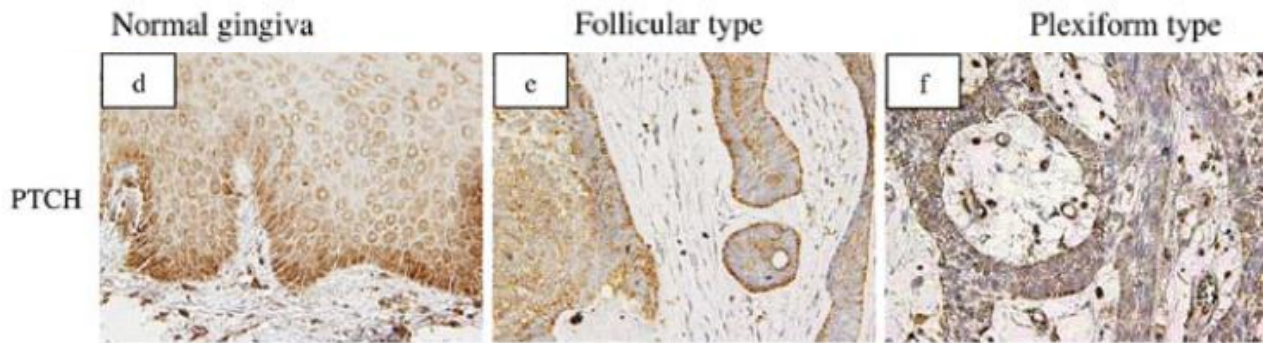


Figura 8. Expresión membranar y citoplasmática de PTCH en el ameloblastoma (Kanda S et. al. 2013).

En un cultivo celular de ameloblastoma (AM-1) que expresaba PTCH se le adicionó un anticuerpo neutralizante para Shh, el cual suprimió la proliferación de éstas células (Fig. 9) y también la traslocación al núcleo de GLI1 y GLI2, pero no de GLI3 (Kanda S *et. al.* 2013). También en la presencia del anticuerpo neutralizante, la expresión de BCL2 (proteína anti-apoptótica) disminuyó, mientras que BAX (proteína pro-apoptótica) aumentó (Kanda S *et. al.* 2013). La misma supresión de la proliferación ocurrió al adicionarle el fármaco ciclopamina, el cual inhibe las respuestas de los invertebrados a la vía de la familia Hedgehog y también tiene efectos teratogénicos (Cooper *et. al.* 1998) (Fig. 9). Estos resultados sugieren que ésta vía de señalización está constitutivamente activa en el ameloblastoma (Kanda S *et. al.* 2013), lo cual también se ha encontrado en varios tipos de cáncer como los de pulmón, esófago, páncreas y estómago (Watkins DN *et. al.* 2003; Thayer SP *et. al.* 2003; Berman DM *et. al.* 200381).

Actualmente existen diferentes estudios inmunohistoquímicos que muestran la presencia diferencial de moléculas en las células del ameloblastoma, pero poco son los datos de proteínas membranales que se encuentran en este tipo de lesiones (Figura 10).

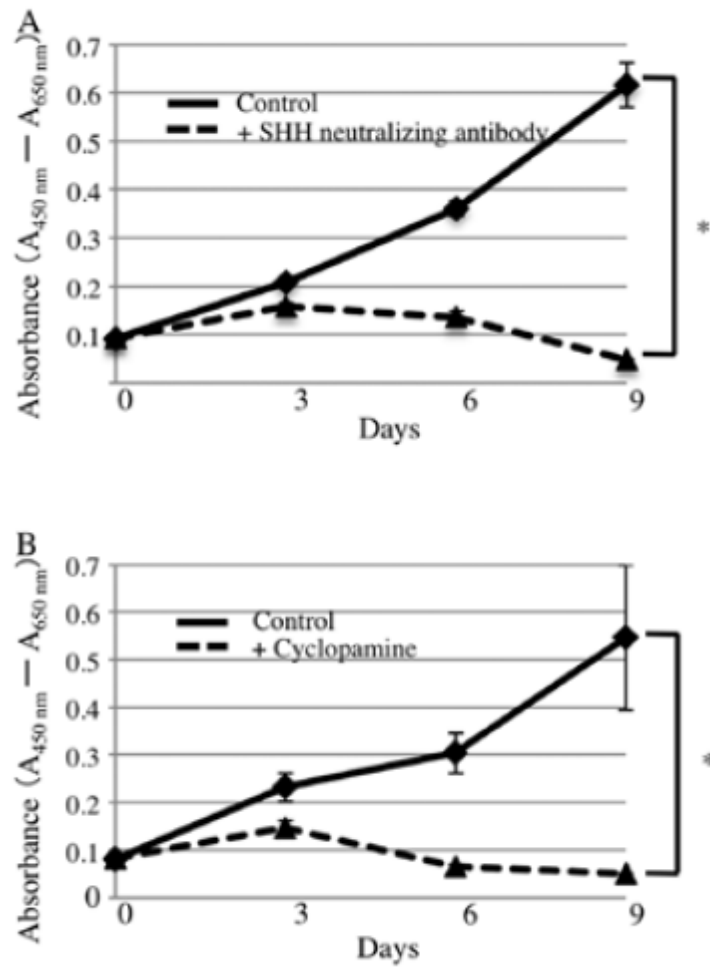
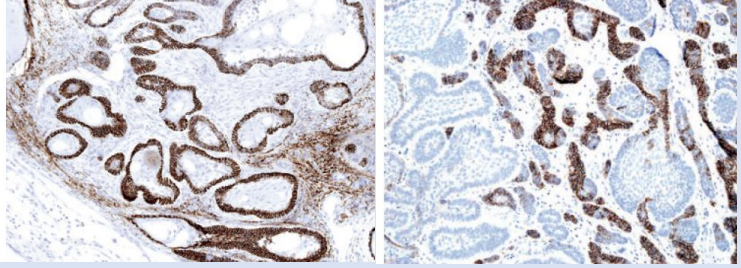
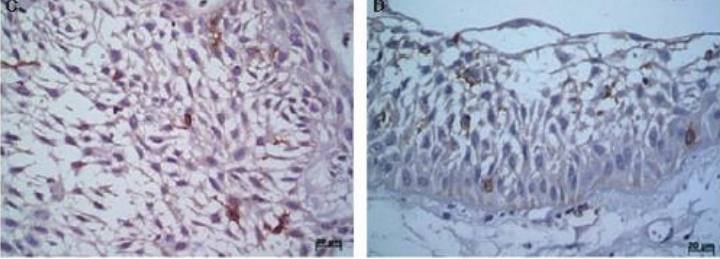
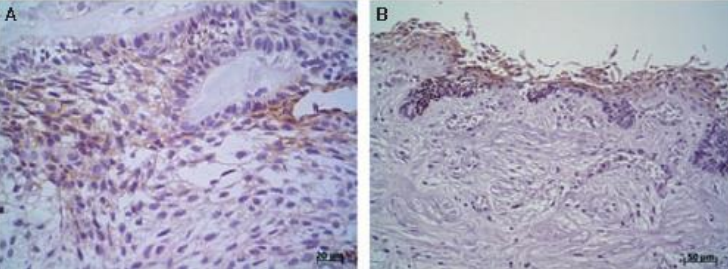
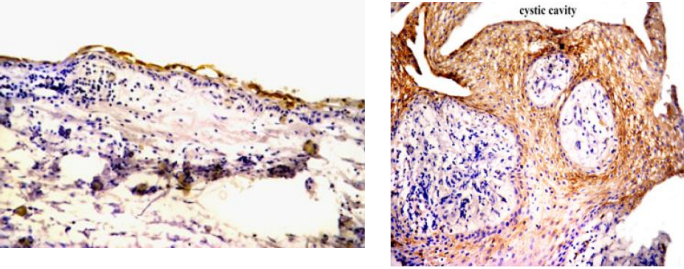


Figura 9. Efecto del anticuerpo neutralizante y la ciclopamina en la proliferación en las células AM-1. La porliferación celular se inhibe significativamente en la presencia de 1ng/ml del anticuerpo neutralizante de SHH y 1mM de ciclopamina comparado con su ausencia (Kanda S 2013).

Molécula			Referencia
CD56	 <p style="text-align: center;">Folicular Plexiforme</p>		Cairns L et. al. 2010
CD1a	 <p style="text-align: center;">Sólido Uniquístico</p>		Ranson et. al. 2002
E-cadherina	 <p style="text-align: center;">Folicular Uniquístico</p>		Ranson et. al. 2002
CD10	 <p style="text-align: center;">Quiste dentígero Uniquístico</p>		Mello LA et. al. 2013

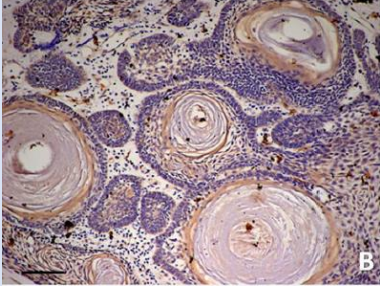
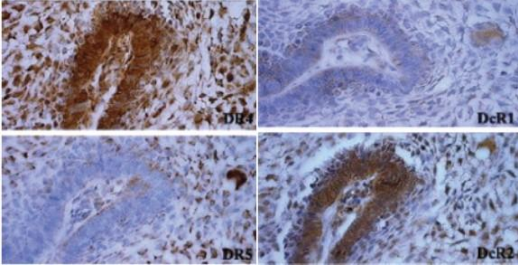
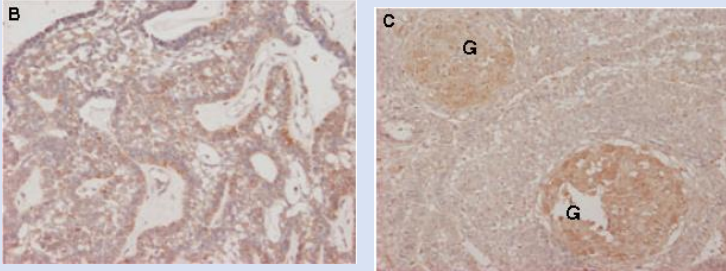
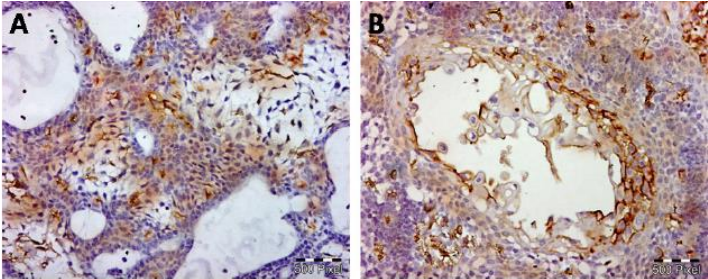
c-met		Masloub SM et. al. 2011
TRAIL-R		Poomsawat S et. al. 2012
ABCG2	<p style="text-align: center;">Plexiforme Granular</p> 	Kumamoto H et. al. 2012
EGFR		Abdel-Aziz A et. al. 2012

Figura 10 Proteínas membranales analizadas inmunohistoquímicamente en ameloblastoma.

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se realizó un estudio comparativo de los perfiles de proteínas expresadas en diferentes lesiones odontogénicas, entre las que se encuentran el quiste dentígero, el ameloblastoma uniuquístico, el ameloblastoma sólido/multiquístico y el carcinoma ameloblástico (García-Muñoz A *et. al.* 2014). En ese estudio se encontró un gran número de proteínas con expresión diferencial entre las diversas lesiones estudiadas (García-Muñoz A *et. al.* 2014). En este estudio lo que se pudo observar fue que aunque todos los perfiles comparten varias proteínas, los perfiles del carcinoma ameloblástico y el ameloblastoma sólido son más parecidos entre sí y presentan mayores diferencias con los perfiles de las otras lesiones odontogénicas epiteliales. De manera similar, los perfiles del ameloblastoma uniuquístico y del quiste dentígero son más parecidos entre sí (García-Muñoz A *et. al.* 2014). En ambos casos, aunque los perfiles mostraron gran parecido, también se observaron manchas con expresión diferencial entre esas lesiones.

Al comparar los perfiles de proteínas del ameloblastoma uniuquístico y el quiste dentígero se encontraron 10 proteínas sobre expresadas en el tejido tumoral, entre las cuales solo tres son membranales (alfa enolasa 1, proteína de unión a la hormona tiroidea y la Cadena C Ig gamma) (Tabla 3). Por su parte el carcinoma ameloblástico expresó 7 proteínas las cuales parecen no expresarse en el ameloblastoma sólido, entre las cuales se encuentran las citoqueratinas 17 y 8, VCP/p97, GRP78, ubiquinol citocromo reductasa, rcTPI1 y la peroxiredoxina 1 (García-Muñoz A *et. al.* 2014).

Tabla 2 Proteínas de membrana encontradas en extractos totales de quiste dentífero, ameloblastoma uniuíquístico. ameloblastoma sólido y carcinoma ameloblástico.

Lesión	Proteínas membranales con sobre expresión
Quiste dentífero	Alfa enolasa 1
Ameloblastoma uniuíquístico	Proteína de unión a la hormona tiroidea Cadena C Ig gamma
Ameloblastoma sólido	Cadena B e hemoglobina Fibrinógeno gamma

Justificación

Actualmente el diagnóstico de los tumores odontogénicos se realiza histológicamente, lo que limita mucho el tratamiento y da como resultado un impacto físico y mental desfavorable para el paciente.

Debido a que este tipo de lesiones no se consideran tan comunes, no se cuenta con información suficiente o representativa sobre la eficacia de fármacos en su tratamiento. Es por eso que la información sobre proteínas de membrana que se expresan diferencialmente en el ameloblastoma sería de gran utilidad, ya que una gran cantidad de los fármacos utilizados actualmente están diseñados para blancos terapéuticos localizados en la membrana plasmática de células tumorales.

Hipótesis

La identificación de proteínas de membrana expresadas diferencialmente por el ameloblastoma brindará información clave sobre funciones de las células tumorales, así como de posibles blancos terapéuticos

Objetivo general

Identificar proteínas de membrana plasmática que se sobre expresen en el ameloblastoma.

Objetivos particulares

1. Enriquecer proteínas de membrana de muestras de quiste dentígero y ameloblastoma.
2. Identificar proteínas membranales que se sobre expresen en el ameloblastoma con respecto al quiste dentígero.

Materiales y Métodos

Obtención de las muestras

Las muestras fueron proporcionadas por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

Las muestras se tomaron inmediatamente después de que el tumor se extirpó; posteriormente estas muestras se lavaron con solución fisiológica con el fin de eliminar sangre y residuos contaminantes. Luego, las muestras se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Cabe mencionar que estas muestras se diagnosticaron previamente mediante biopsia por un especialista en diagnóstico histopatológico del Hospital Juárez de México.

Extracción de proteínas totales

La preparación de las muestras se basó en la extracción selectiva de proteína (Abdel-Aziz A et. al. 2012). Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron mecánicamente. Después, los tejidos se homogeneizaron en amortiguador de muestra para isoelectroenfoque (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, amortiguador IPG 2%, DTT 40 mM y agua MQ) en presencia de inhibidores de proteasas (Complete™ Roche Germany). Posteriormente, las muestras se homogeneizaron utilizando un sonicador dando 4 pulsos de 30 segundos cada uno a una amplitud de 80%, todo esto en hielo para evitar el calentamiento de las muestras. El material insoluble fue removido mediante centrifugación (20,000 xg por 5 min a 4 °C), en donde el sobrenadante se conservó.

Precipitación de proteínas con TCA acetona

Por otra parte, las proteínas se precipitaron con acetona-ácido tricloroacético (TCA). A un volumen de muestra se le agregaron 8 volúmenes de acetona a -20°C y un volumen de TCA al 100%, esto se mezcló por inmersión 5 veces y se dejó precipitar a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C, se eliminó el

sobrenadante y se realizó un lavado con 1 ml de acetona a -20°C utilizando el vórtex. Una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones fue dada para posteriormente eliminar todo el sobrenadante con la ayuda de puntas estériles. Posteriormente, se eliminó los restos de acetona dejando secar la pastilla. Finalmente, el botón perfectamente seco se resuspendió en 300 ml de PBS estéril.

Extracción de proteínas membranales

La purificación de las proteínas membranales se llevó a cabo mediante el kit “ReadyPrep proteín extraction (membrane I)” (BioRad) el cual ofrece un método para la preparación de fracciones celulares altamente enriquecidas en membrana y proteínas hidrofóbicas y se basa en la separación de proteínas de membrana mediante la separación de fases dependiente de temperaturas utilizando el detergente Tritón X-114, el cual tiene un bajo punto de enturbamiento.

La extracción se realizó de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante. Por cada 50 mg de tejido se agregaron 0.5 ml del amortiguador M1 (amortiguador de lisis) frío, en presencia de inhibidores de proteasas (Complete™ Roche Germany). La suspensión se sometió a sonicación en hielo de 3 a 4 pulsaciones de 40 segundos cada una, esto con el fin de romper las células y fragmentar el DNA genómico. Posteriormente, se agregó la misma cantidad de la solución M2 (Tritón X-114) frío, se agitó con vórtex por 60 segundos de cuatro a cinco veces y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se incubó a 37 °C durante 30 minutos, para después mezclar la suspensión de 3 a 4 veces durante 30 segundos. Entonces, se centrifugó a la máxima velocidad de la microcentrífuga (~16 000 xg) por 5 minutos a temperatura ambiente. Al término de la centrifugación se observaron dos fases, la fase superior, que contiene las proteínas hidrofílicas, se transfirió a un tubo limpio. Al tubo con la fase inferior, que contiene a las proteínas hidrofóbicas, se le agregaron nuevamente 0.5 ml de la solución M2 fría y se mezcló con vórtex, para incubar en hielo por 10 minutos y a 37°C durante 30 minutos, para volver a centrifugar, todo esto como se describió previamente, sólo que esta vez se obtuvo el botón de la centrifugación, el

cual contiene las proteínas hidrofóbicas membranales. Adicionalmente, las proteínas se precipitaron con acetona- TCA. Finalmente, la pastilla se resuspendió en PBS y se almacenó a -70°C , hasta su uso.

Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de las proteínas, tanto totales como membranales, se realizó mediante la utilización del kit DC Protein Assay (BIO RAD). Para ello, se preparó una curva estándar con proteína BSA (Bovine Serum Albumin) con rango de 0 a $5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, colocando cantidades de 0, 0.5, 1, 3 y $5\ \mu\text{l}$ de BSA a concentración de $1\ \text{mg}/\text{ml}$, así como la cantidad suficiente de agua para alcanzar un volumen total de $5\ \mu\text{l}$. De la muestra de proteínas totales problema se colocó $1\ \mu\text{l}$. Entonces, se adicionaron $25\ \mu\text{l}$ de la solución A' (solución alcalina de tartrato de cobre más reactivo S), $200\ \mu\text{l}$ del reactivo B (reactivo de Folin) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia de los estándares y de la muestra de extractos se midió en un espectrofotómetro (Beckman) a $750\ \text{nm}$. El estándar número 1 ($0.0\ \mu\text{g}$ de proteína) se utilizó como blanco de las lecturas. Después de cuantificar los extractos, su integridad se analizó en geles SDS-PAGE al 10%.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A $40\ \mu\text{g}$ de proteínas totales o membranales obtenidas de las muestras se les agregó amortiguador de muestra (Tris-HCl pH 6.8 $62.5\ \text{mM}$, glicerol 25%, SDS 2%, azul bromofenol 0.01%), se incubaron a 90°C durante 5 min y se cargaron con micropuntas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS). Para ello, el gel separador se preparó con los siguientes reactivos: acrilamida 10%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, SDS al 0.1%, persulfato de amonio (PSA) 0.1%

y 0.15% de TEMED; mientras que el gel concentrador se preparó con acrilamida 6%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS al 0.1%, PSA 0.1% y 0.15% de TEMED; como amortiguador de corrida se utilizó una solución Tris 0.25 M, Glicina 1.9 M y 0.1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 110 V (25 miliamperios) por 140 min.

Después de la separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida, éstos se tiñeron durante 1 h con azul de Coomassie G-250 0.25% a temperatura ambiente y en agitación. Para desteñir los geles, éstos se incubaron en agitación en una solución de etanol al 5% y ácido acético al 7% hasta que las bandas de las proteínas aparecieron azules sobre el fondo transparente. En ese momento, los geles se transfirieron a un recipiente que contenía agua destilada y se realizó un registro fotográfico de la imagen.

Ensayos de Western blot

Para el ensayo de Western blot, las proteínas se separaron mediante PAGE-SDS (10%) como se mencionó anteriormente. Después, el gel se equilibró con el amortiguador de transferencia (Tris 0.25M, Glicina 1.9M y 20% de metanol) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se formó un emparedado sujeto por un folder de plástico con la parte oscura hacia abajo, con los siguientes elementos: una fibra Scotch, luego un papel filtro previamente equilibrado en el amortiguador de transferencia sobre el cual se colocó el gel y luego una membrana de nitrocelulosa. A continuación se agregaron dos papeles filtro, otra fibra Scotch y el folder se cerró, y éste se colocó en la cámara de electroforesis, orientando la parte oscura del folder hacia el polo negativo y el papel de nitrocelulosa hacia el polo positivo. Las proteínas del gel se transfirieron al papel de nitrocelulosa 350 mA durante 90 min (o bien toda la noche a 30 mA) utilizando un baño de hielo. Posteriormente, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau por dos minutos para visualizar la correcta transferencia de las proteínas, después se destiñó y se bloqueó con PBS-Tween 0.05% y leche descremada

al 5% durante 1 h a 37 °C. Enseguida, se incubó con el anticuerpo primario contra las proteínas E-cadherina (IgG de rata) (dilución 1:5000) (Abcam, UK) y ODAM (IgG de conejo) (dilución 1:3000) (Abcam) en PBS-Tween al 0.05% con 5% de leche durante toda la noche a 4 ° C en movimiento. Entonces, la membrana se lavó tres veces durante 10 min con PBS-Tween 0.1% y dos veces de 10 minutos con PBS y se incubó durante 90 min a 37 °C en movimiento con un segundo anticuerpo anti IgG de rata o de conejo (dilución 1:20,000), según correspondiera, acoplado a peroxidasa (Invitrogen). . La membrana de nitrocelulosa se lavó cuatro veces durante 10 min con PBS-Tween al 0.1% y una vez de 10 minutos con PBS y la unión antígeno-anticuerpo se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL plus (Amersham), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Análisis por espectrometría de masas

Una vez que se verificó la correcta obtención de proteínas membranales, se procedió a comparar el patrón electroforético de las proteínas membranales de las muestras analizadas. Se localizaron 3 bandas las cuales estaban sobre expresadas en el ameloblastoma con respecto al quiste dentígero, fueron escindidas manualmente, colocados en 30 µl de agua ultrapura y referidos para su identificación por espectrometría de masas a CINVESTAV Irapuato. El tipo de identificación utilizado fue el MSMS ion search y la basa de datos utilizada para la búsqueda fue IPI_human V3.87 la cual contiene 91467 secuencias.

Resultados

Muestras utilizadas en la obtención de las proteínas totales y membranales.

En el presente estudio se utilizaron biopsias de ameloblastomas y de quistes dentígeros que fueron obtenidas del Hospital Juárez de México. Todos los tejidos fueron previamente diagnosticados histológicamente por un experto del mismo Hospital. Para este trabajo se obtuvieron un total de 10 biopsias de pacientes, las cuales incluyeron dos quistes dentígeros y ocho ameloblastomas (Tabla 4).

Tabla 3. Muestras de ameloblastomas y quistes dentígeros usados en este estudio

Ameloblastoma uniuquístico (AU)	3
Ameloblastoma Sólido (AMS)	1
Ameloblastoma (no especificado) AMELO	4
Quiste dentígero (QD)	2
TOTAL	10

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en una dimensión

Con el fin de poder observar diferencias entre los diferentes ameloblastomas y el quiste dentígero, se analizaron sus perfiles proteicos. Inicialmente, se analizó la integridad de las proteínas totales extraídas de cada tejido mediante el corrimiento electroforético en geles unidimensionales en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS). Cabe mencionar que estos ensayos se hicieron por triplicado de cada una de las lesiones y en todas las réplicas de cada lesión se observó el mismo patrón de bandas proteicas sin degradación aparente (datos no mostrados). Todas las lesiones mostraron bandas desde menos de 14 kDa hasta mayores de 230 kDa (Fig. 11). Una vez que se determinó la integridad de las proteínas totales, se procedió a extraer las proteínas de membrana como se describió en Materiales y Métodos. Posteriormente, las proteínas totales, las proteínas citoplásmicas y las proteínas membranales se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% teñidos con azul de Coomassie. En la figura 11 se pueden apreciar los patrones proteicos de las tres fracciones de un ameloblastoma no especificado (panel A), un ameloblastoma unicístico (panel B), un quiste dentígero (panel C) y un ameloblastoma sólido (panel D). En todos los geles se puede observar una buena integridad, sin degradación aparente, tanto de los extractos totales (carril 1), como de las proteínas membranales (carril 2) y del citoplasma (carril 3). En cada una de las muestras se observó la presencia de bandas con un rango de <30 a >245 kDa (Fig. 11). Además, se puede observar un patrón totalmente distinto para las diferentes fracciones (Fig. 11), sugiriendo un fraccionamiento eficiente.

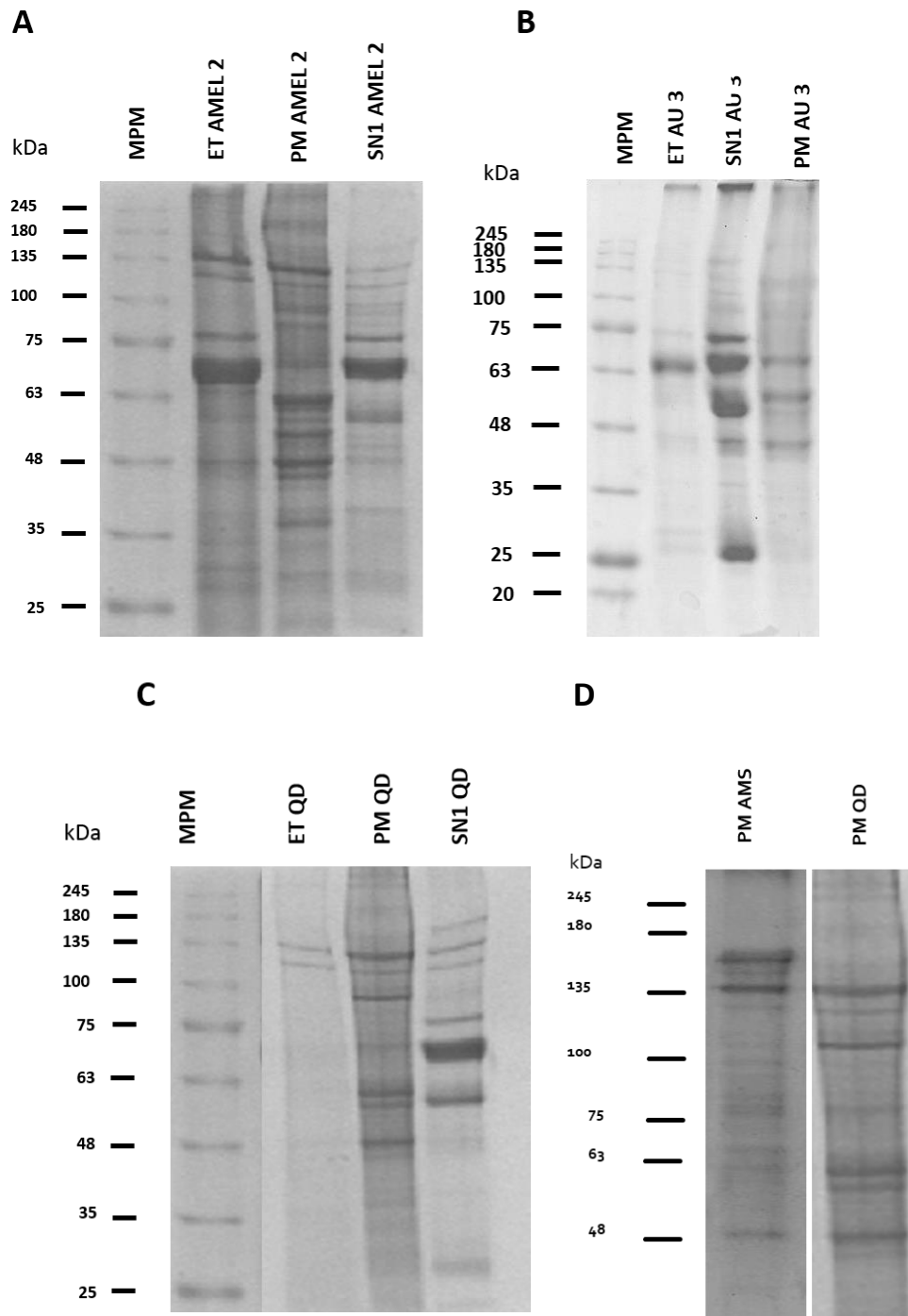


Figura 11. Análisis del fraccionamiento membranar y citoplásmico en muestras de ameloblastoma y quiste dentígero. Biopsias de: (A) ameloblastoma no especificado (AMEL), (B) ameloblastoma uniuquistico (AU), quiste dentígero (C) y ameloblastoma sólido (D) se utilizaron para obtener las proteínas membranarales como se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente, los extractos totales (ET) y las fracciones membranarales (PM) y citoplásmicas (SN1) de cada tejido se analizaron por SDS-PAGE al 10%. MPM: marcadores de peso molecular.

Validación de la correcta obtención de las fracciones membranales mediante Western blot

Para comprobar la correcta separación de las fracciones en las lesiones analizadas se realizaron ensayos de Western blot utilizando dos anticuerpos: uno contra E-cadherina, la cual es una proteína membranal de células epiteliales (Kelly KA et. al. 2008) y otro contra ODAM, que es una proteína citoplásmica presente en células epiteliales de tejidos odontogénicos (Moffatt P et. al. 2008).

En el ensayo de western blot contra E-cadherina realizado en extractos totales (ET), fracciones membranales (PM) y fracciones citoplásmicas (SN1) de un ameloblastoma no especificado (AMEL), un ameloblastoma uniuquístico (AU) y un quiste dentígero (QD) pudimos observar que el anticuerpo reconoció en los extractos totales y en la fracciones membranales de todas las muestras una banda de 120 kDa. Adicionalmente en todas las fracciones membranales y en los extractos totales de AMEL se observó el reconocimiento de una banda de ≈ 80 kDa. La banda de mayor peso molecular corresponde a la forma madura de la proteína, mientras que la banda de menor tamaño puede corresponder al fragmento llamado ectodominio (ver Discusión) (Fig. 12). Ninguna de estas bandas se observó en las fracciones citoplásmicas (Fig. 12). Por otra parte, el ensayo de Western blot para detectar a la proteína ODAM en las diferentes fracciones de una muestra de AMEL y de un QD, mostró el reconocimiento de dos bandas de 72 y 37 kDa en los extractos totales de las muestras analizadas y en la fracción citoplásmica de QD, mientras que en la fracción citoplásmica de AMEL solo se detectó la banda de 72 kDa (Fig. 13). De cualquier manera, no hubo reconocimiento de ninguna banda en los extractos membranales de las dos muestras (Fig. 13). Así, los dos ensayos de Western blot anteriores muestran una correcta separación de las fracciones membranales de las muestras analizadas.

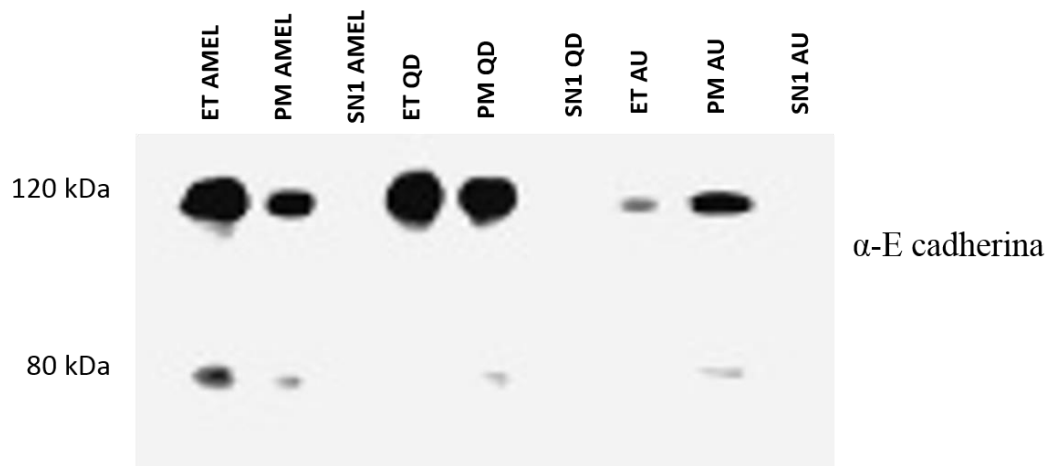


Fig. 12 Western blot contra E- cadherina. Los extractos totales (ET) y las fracciones membranales (PM) y citoplásmicas (SN1) de muestras de ameloblastoma no especificado (AMEL), de quiste dentífero (QD) y de ameloblastoma uniuqístico (AU) se sometieron a ensayos de western blot utilizando un anticuerpo contra la proteína membranal E-cadherina

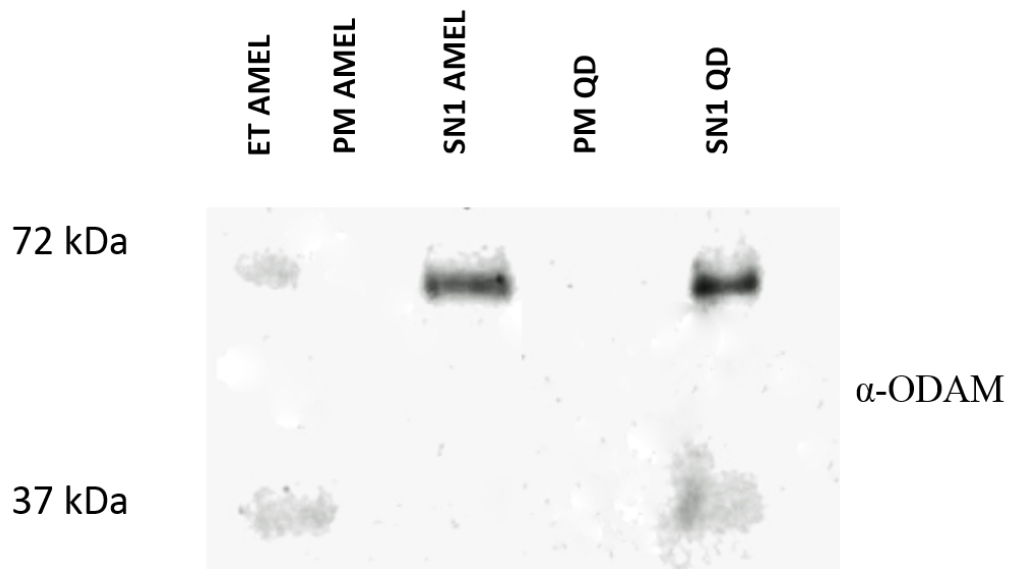


Fig. 13 Western blot contra ODAM. Los extractos totales (ET) y las fracciones membranales (PM) y citoplásmicas (SN1) de muestras de ameloblastoma no especificado (AMEL) y de quiste dentígero (QD) se sometieron a ensayos de western blot utilizando un anticuerpo contra la proteína citoplásmica ODAM

Identificación de proteínas con expresión diferencial entre ameloblastoma y quiste dentígero

Una vez que se verificó la correcta obtención de proteínas membranales, se procedió a comparar el patrón electroforético de las proteínas membranales de las muestras analizadas. Importantemente, se obtuvo un patrón prácticamente idéntico entre las diferentes muestras de QD, así como un patrón muy similar entre las diferentes muestras de AU (Fig. 14). Por otra parte, el patrón de los ameloblastomas no especificados (AMEL1, AMEL2, AMEL3 y AMEL4) son casi idénticos al del ameloblastoma sólido (ASM) (Fig. 14), sugiriendo que posiblemente AMEL1,2,3 y 4 sean del tipo AMS. De cualquier manera, es interesante observar un patrón similar, con pocas diferencias, entre todos los ameloblastomas, no importando su tipo histológico (Fig.14). Por otra parte, desde estos ensayos podemos observar algunas proteínas que están siendo expresadas de manera diferencial entre QD y ameloblastomas (Fig.14).

Con el propósito de observar mejor las diferencias entre los diferentes patrones membranales, éstos se analizaron por separado, es decir se comparó QD con AU y QD con AMEL (Fig. 15). En la comparación de AU y QD se observaron cinco bandas en QD que no se detectaron en AU (Fig. 15B, flechas verdes). Además, en éstas comparaciones se pueden apreciar algunas bandas que se encuentran expresadas en ambas lesiones pero que tienen una mayor intensidad en el ameloblastoma, ya sea no especificado o uniuístico con relación al quiste dentígero (Fig. 15, flechas amarillas). También hay tres bandas con pesos moleculares aproximados de 93, 55 y 32 kDa que se encuentran expresadas en AMEL, pero que no se observan en QD (Fig. 15A, flechas rojas). Interesantemente, al hacer la comparación entre AU y QD bandas con el mismo peso molecular también se encuentran en AU pero no en QD (Fig. 15B, flechas rojas). Debido a la presencia de estas bandas exclusivamente en los ameloblastomas, éstas fueron seleccionadas para realizar su identificación mediante espectrometría de masas.

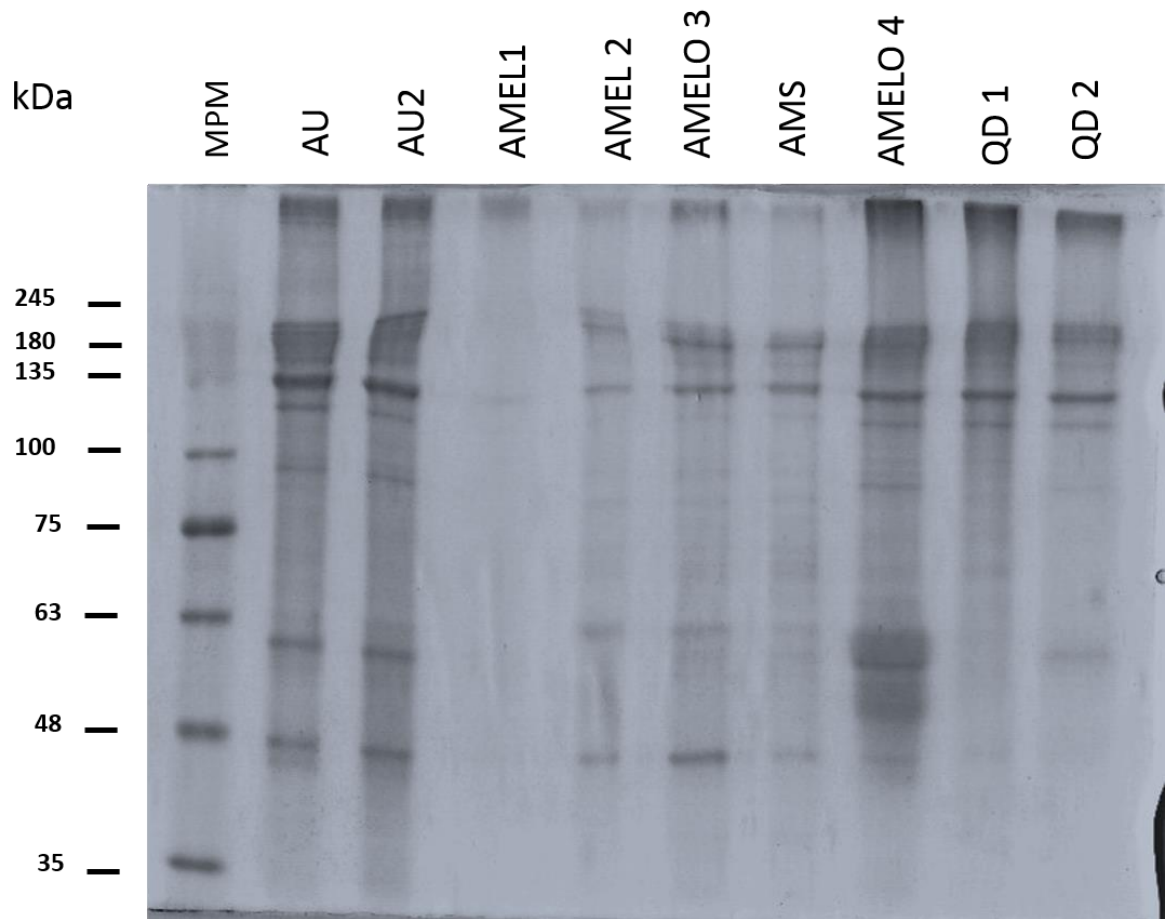


Figura 14 Proteínas membranales de todas las muestras analizadas. Los patrones de proteínas membranales de las diferentes lesiones se analizaron mediante SDS_PAGE al 10% teñidos con azul de Coomassie. Ameloblastomas no especificados (AMEL) ameloblastomas uniuquísticos (AU), Ameloblastomas sólidos (AMS) y quistes dentígeros (QD)

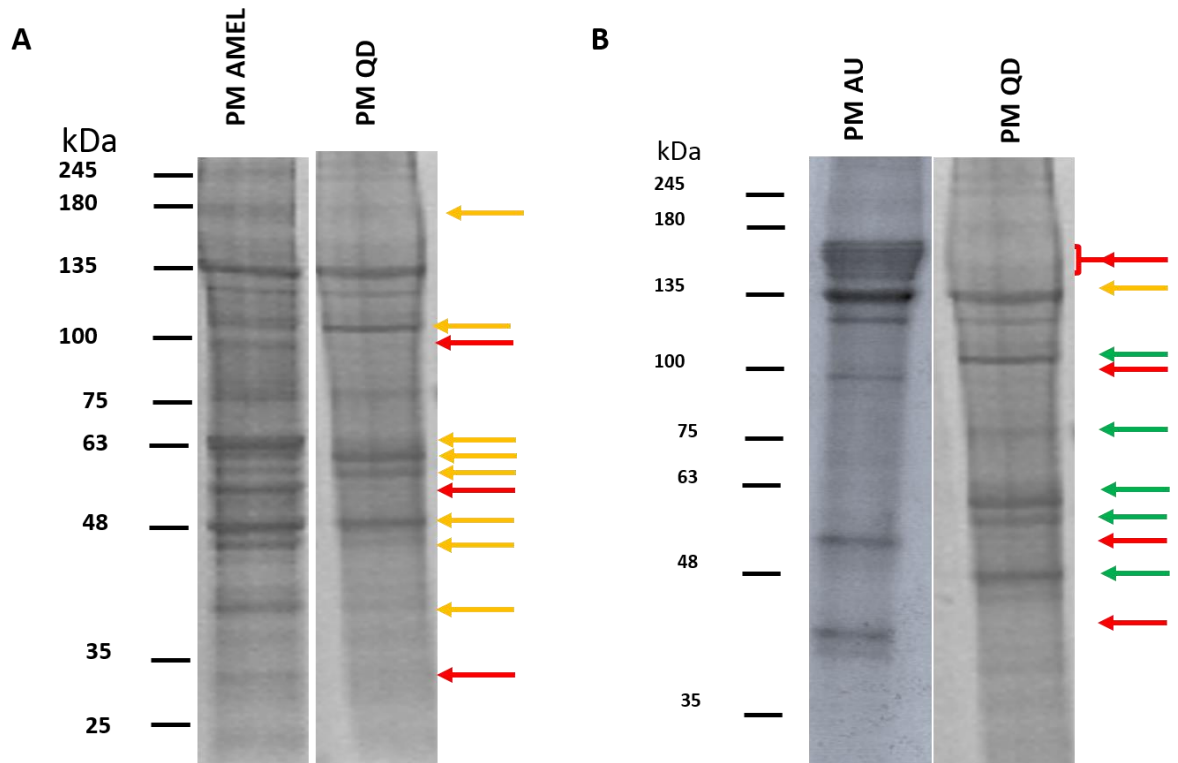


Figura 15. Comparación de los extractos membranales de ameloblastoma y quiste dentífero. Los patrones de proteínas membranales (PM) de ameloblastomas y de quiste dentífero se compararon mediante SDS_PAGE al 10% teñidos con azul de Coomassie. (A) Comparación de ameloblastoma no especificado (AMEL) y quiste dentífero (QD) (B). Comparación de ameloblastoma uniuquístico (AU) y quiste dentífero (QD). En Flechas amarillas se muestran las bandas que tienen mayor expresión en los ameloblastmas con relación al quiste dentífero, las flechas rojas muestran las proteínas que se observan en ameloblastomas y no así en el QD y las flechas verdes indican las bandas que se ven en QD pero no en los ameloblastomas.

Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

Como se mencionó anteriormente, en los geles de SDS- PAGE se pueden observar tres bandas que se ven expresadas tanto en el ameloblastoma no especificado como en el ameloblastoma uniuístico, pero no así en el quiste dentígero (Fig. 15), por lo que éstas fueron seleccionadas y escindidas manualmente y colocadas en 50 µl de agua Mili Q y referidos para su identificación por espectrometría de masas.

De acuerdo a los resultados de espectrometría de masas, se logró la identificación de las proteínas HSP60, vinculina, plectina y la integrina $\alpha 6$ (Tabla 5).

Tabla 4. Proteínas identificadas por espectrometría de masas.

PROTEÍNA	ID PROTEÍNA	SCORE/COBERTURA/		PÉPTIDOS	MEMBRAN A	FUNCIÓN
		PESO MOLECULAR/PI				
HSP60	IPI00784154.1	19.90/9.95/61/5.87		GVMLAVDAVIAELKK	Golgi	Plegamiento de proteínas
Plectina	IPI00398776.3	32.93/2.28/512/5.77				
Vinculina isoforma 1	IPI00291175.7	64.68/14.92/116.6/6.09		AIPDLTAPVAAVQAAVSNLVR	Plasmática	Adhesión célula-célula y célula MEC (regula expresión de E-cadherina)
Integrina α 6 isoforma 7	IPI00921080.1	21.10/6.81/106.5 /7.66		NSYPDVAVGSLSDSVTIFR	Plasmática	Estructura de hemidesmosomas y amelogenesis

Discusión

Los tumores odontogénicos (TO's) son lesiones que derivan de los tejidos productores de dientes o de sus remanentes, los cuales quedan dentro de los tejidos mandibulares o dentro de los tejidos blandos (Mosqueda-Taylor 1994). Estas neoplasias pueden ser benignas o malignas con variación en su agresividad y su potencial para desarrollar metástasis (Mosqueda-Taylor 1994). Son poco frecuentes, pero pueden plantear un reto diagnóstico y terapéutico significativo (WHO, 2005). Debido a la falta de marcadores específicos para este tipo de lesiones el diagnóstico se basa en consideraciones histológicas y anatómicas, su tratamiento es quirúrgico, con un alto impacto físico y mental para el paciente (WHO 2005).

Dentro de los TO's se encuentra el ameloblastoma, el cual es una neoplasia benigna, intraósea, polimórfica, localmente invasiva derivada de epitelio odontogénico y que exhibe un comportamiento clínico agresivo con alta tendencia a ser recurrente (Kramer IRH *et. al.* 1992). Interesantemente, se ha sugerido que el ameloblastoma puede originarse de las paredes de un quiste dentígero. Por esta razón, en el presente trabajo se realizó una comparación entre las proteínas membranales del ameloblastoma con respecto a las del quiste dentígero. Es importante señalar que lo ideal sería comparar los patrones proteicos del ameloblastoma con los de un tejido normal. Sin embargo, debido a que el ameloblastoma se origina de los remanentes del tejido embrionario que da lugar a la formación de los órganos dentarios, es prácticamente imposible, principalmente por cuestiones éticas, contar con el tejido embrionario normal. Es por esa razón que en este trabajo se decidió comparar dos lesiones con comportamiento diferente en cuanto a su agresividad, tomando al quiste dentígero, una lesión no tumoral, como "control" del ameloblastoma (tejido tumoral).

Por otra parte, las proteínas de membrana se han relacionado con la transformación tumoral en cierto tipo de cánceres (Leth-Larsen R *et. al.* 2010), por lo que actualmente

2/3 de las drogas están dirigidas a estos blancos terapéuticos (Hopkins AL et. al. 2002; Hopkins AL et. al. 2003; Rabilloud T 2003).

Por ejemplo, en cáncer de mama, la sobre expresión del receptor HER-2, puede contribuir al crecimiento celular tumoral activado por ligandos circulantes o producidos por las mismas células, o bien pueden ser una falta o disminución en la expresión de algunas moléculas de adhesión que permiten a las células tumorales separarse del tumor primario y esparcirse (Leth-Larsen R et. al. 2010). Otros ejemplos de proteínas asociadas a membrana que forman la base de un número de nuevas terapias contra el cáncer son Gleevec Gleevec (abl quinasa) (FDA 2001), Herceptina (Her2neu) (Hatakeyama S et. Al. 2011), Panorex (Ep-CAM) (Brenner, 1999), e IRESSA (receptor de EGF1) (Abicht, A., and Lochmuller, H. 2000). También se ha encontrado que proteínas de membrana como pequeñas GTPasas, cinasas y cateninas están implicadas en la carcinogénesis (Adam PJ et. al. 2003). Por esa razón, en este trabajos se decidió comparar solamente las proteínas membranales de ameloblastoma y quiste dentigero, con el fin de poder identificar algún blanco potencial para el tratamiento de la lesión tumoral.

En la identificación de proteínas que se expresan diferencialmente en tejidos, es de gran importancia el material de estudio disponible y el número de réplicas utilizadas para definir un proteoma. En este estudio logramos analizar 10 lesiones diferentes, dos de ellas eran quistes dentígeros y 8 eran ameloblastomas de al menos dos diferentes tipos (AMS y AU) además de contar con muestras de ameloblastomas no especificados, de los cuales obtuvimos tanto sus extractos protéicos totales, como sus fracciones solubles (citoplasmicas) e insolubles (membranales). Debido a lo mencionado previamente, las proteínas de membrana fueron las de más importancia para nosotros, por lo que éste estudio se centró en ellas.

Debido a que se obtuvo poca cantidad de las proteínas membranales (información no mostrada), sólo fue posible determinar el patrón de proteínas por SDS-PAGE y no por electroforesis bidimensional como se había planteado originalmente. Es importante

aclarar que la extracción de proteínas se realizó en tres ocasiones independientes y que se obtuvieron patrones de bandas prácticamente idénticos en los triplicados, lo que descartó que las diferencias encontradas puedan deberse a variaciones en la extracción de proteínas. Además, de manera interesante los patrones de lesiones del mismo tipo, provenientes de diferentes pacientes, también presentaron patrones muy similares, lo que nos puede indicar la reproducibilidad de los procedimientos experimentales implementados. Debido al patrón altamente similar entre los ameloblastomas no especificados y el ameloblastoma sólido podemos deducir que éstos con los que no se contaba un diagnóstico histológico certero previo son del tipo sólido. Sin embargo, cabe mencionar que en la literatura no hay registro del patrón proteico de proteínas membranales de tumores odontogénicos. Interesantemente, los perfiles proteicos de todos los ameloblastomas también mostraron ser similares, independientemente del tipo clínico de ameloblastoma, sugiriendo que el desarrollo de este tipo de tumores tiene un mecanismo común que nos puede facilitar la identificación de posibles blancos terapéuticos. Además, el no encontrar demasiadas diferencias entre los patrones proteicos de quiste dentígero y de ameloblastoma, soporta la hipótesis de que el quiste dentígero puede ser origen del ameloblastoma, y que por lo tanto nuestra premisa de comparar estas dos lesiones puede ser eficiente para detectar proteínas involucradas en el desarrollo de la lesión tumoral. .

El método elegido para la obtención y purificación de proteínas membranales fue el kit “ReadyPrep proteín extraction (membrane I)” (BioRad) el cual ofrece una preparación de fracciones celulares altamente enriquecidas en membrana y proteínas hidrofóbicas y se basa en la separación de proteínas de membrana mediante la separación de fases dependiente de temperaturas utilizando el detergente Tritón X-114, el cual tiene un bajo punto de enturbamiento. Por lo que obtuvimos dos fracciones, la soluble en medio hidrofílico, llamada en este trabajo SN1, y que contenía a la fracción citoplásmica, y la fracción soluble en detergente, que contenía a las proteínas transmembranales.

Para corroborar la correcta separación de las fracciones celulares se realizaron ensayos de Western blot contra una proteína específica para membrana de células epiteliales (E-cadherina) y para una proteína citoplásmica de epitelio dental (ODAM). E-cadherina sólo se expresó en los extractos totales y membranales de todas las muestras analizadas, pero en ninguno de sus fracciones citoplásmicas. Las cadherinas son una familia de glicoproteínas transmembranales o membranales que median la adhesión celular dependiente de calcio (García-Muñoz *et. al.* 2012; Gumbiner BM 2005; Halbleib JM, Nelson WJ 2006). Consisten en al menos cinco súper familias, dentro de las tipo 1 o clásicas se incluye a E-cadherina (Lien W *et. al.* 2006), la cual se encuentra en tejidos epiteliales y ha sido identificada tanto en tejido normal como en condiciones patológicas. En 1980 Francois Jacob describió una glicoproteína de 84 kDa a la que llamó gp84 en la membrana de células embrionarias de carcinoma de ratón, la cual es considerada como el ectodominio de E-cadherina (Hulpiau P, van Roy F 2009), posteriormente concluyeron que gp84 es sintetizada como varios precursores de vida corta que son procesados a una forma estable de 120 kDa, la cual puede ser llamada ovomorulina (Hyafil F *et. al.* 1980). Por lo anterior en membranas celulares epiteliales, se puede encontrar a E-cadherina en sus pesos de 120 y 80 kDa, como fue el caso en algunas de las lesiones analizadas en este trabajo.

Por su parte, ODAM es una proteína que proviene de un gen implicado en la formación de dientes y hueso, así como en la mineralización (Kawasaki K *et. al.* 2003). Esta proteína es altamente expresada en ameloblastos maduros (Park JC *et. al.* 2007) y presente en el esmalte de los órganos dentales y en las células epiteliales (Moffatt P *et. al.* 2008). Se ha demostrado su sobre expresión en cánceres epiteliales como el cervical (Rosty C *et. al.* 2005), gástrico (Aung PP *et. al.* 2006) y de mama, donde se ha postulado como un biomarcador favorable para su pronóstico (Kestler DP *et. al.* 2011), ya que se ha demostrado una correlación entre su expresión nuclear y un mejoramiento de 5 años en la sobrevivencia del paciente (Siddiqui *et. al.* 2009). En nuestro estudio ODAM se vio expresada solamente en los extractos totales y citoplásmicos. Este resultado, junto con la detección de E-cadherina solamente en

extractos totales y en las fracciones membranales nos puede indicar un correcto fraccionamiento celular con el método elegido..

Al hacer una comparación entre las bandas obtenidas en los extractos membranales de los ameloblastomas con el quiste dentígero se encontraron tres bandas de expresión diferencial, donde se expresaron en todos los tipos de ameloblastomas, pero no en el quiste, por lo que estas bandas fueron las seleccionadas para ser analizadas por espectrometría de masas.

En la banda de un peso aproximado de 100 kDa a HSP60, proteína mitocondrial que en algunos tumores se transloca a citoplasma, membrana plasmática e incluso es secretada (Hynes RO 2002). En la banda de aproximadamente 55 kDa se encontró vinculina, plectina y la integrina $\alpha 6$.

El microambiente tumoral es muy importante para la progresión del cáncer, el cual está constituido por células epiteliales y estromales. El fenotipo tumoral está determinado por las interacciones entre las células cancerosas y éste microambiente (Ishiba T et. al. 2014). En los últimos años se ha demostrado que las chaperonas pueden ser factores patogénicos en condiciones a las que se les ha nombrado chaperonopatías (Katada K 2012), entre estas patologías se encuentran varios tipos de cáncer donde las chaperonas actúan en favor de las células tumorales mejorando su sobrevivencia y crecimiento mediante mecanismos como pueden ser la inhibición de la apoptosis y la respuesta antitumoral o promoviendo la angiogénesis (Danen EH et. al. 1993; Walsh N et. al. 2009). HSP60 fue encontrada en la banda 1, de aproximadamente 100 kDa; recordemos que el método de extracción de proteínas utilizado en éste trabajo obtiene y concentra proteínas totales, esto es, proteínas insolubles que se encuentren en cualquier tipo de membrana de la célula.

En eucariontes, la proteína HSP60 es considerada típicamente como una chaperona mitocondrial, pero en últimas fechas se ha encontrado en el citoplasma, la superficie celular, en el espacio extracelular y en la sangre periférica donde tiene funciones nuevas las cuales se han relacionado con la carcinogénesis, específicamente en la

sobrevivencia y proliferación de células tumorales (Ishiba T et. al. 2014). Aunque también se puede encontrar expresada en células normales (Soltys BJ et. al. 1997), la sobre expresión de HSP60 en la superficie de células tumorales (Pisselli P et. al. 2000; Feng H et. al. 2002; Shin BK 2003) ha sido considerado como una señal de alerta para el sistema inmune, lo que lleva a la activación y maduración de células dendríticas y la generación de la respuesta antitumoral de células T (Feng H et. al. 2002; Shin BK 2003; Osterloh A et. al. 2004). Interesantemente, la HSP60 se ha encontrado asociada a la integrina α -3 β -1, la cual está implicada en la adhesión de células metastásicas de cáncer de mama a nódulos linfáticos y osteoblastos, cuya asociación fue inhibida mediante una droga que se une a HSP60, la mizoribina (Barazi HO et. al. 2002). HSP60 también está involucrada en la metástasis del carcinoma pancreático (S. Hehlhans et. al. 2007) y la presencia en la superficie celular de células de tumores orales determina la lisis celular por linfocitos T gamma delta (Laad AD et. al. 1999).

Las células tumorales pueden secretar HSP60 vía exosomas, ésta chaperona se encuentra en la membrana de los exosomas, lo que puede estar indicando que HSP60 funciona como un ligando para receptores de superficie de células que sean blanco para éste tipo de exosomas, por ejemplo las células del sistema inmune (Campanella C et. al. 2012). Los niveles elevados de ésta proteína en células tumorales se ha relacionado a: (I) la habilidad de sobrevivir a estímulos apoptóticos; (II) pérdida de senescencia replicativa; (III) proliferación fuera de control; y (IV) transformación neoplásica (Capello F, Zummo G 2005; Capello F, Zummo G 2006; Di Felice V et. al. 2005). Por lo anterior, las HSP membranales han sido consideradas como blancos para anticuerpos específicos para la terapia de inmunidad antitumoral (Capello F, Zummo G 2005). Por lo tanto, de confirmarse la sobre expresión de HSP60 en el ameloblastoma, esta proteína podría ser considerado como un biomarcador y/o como un posible blanco terapéutico de esta lesión.

Las integrinas son heterodímeros transmembranales de tipo I compuestas de dos subunidades, la α y la β . El heterodímero confiere un ligando específico para un sustrato específico de la matriz extracelular (van der Flier A, Sonnenberg A 2001).

Actualmente se conocen 18 subunidades α y 8 β lo que da origen a 24 receptores diferentes con especificidad distinta para proteínas extracelulares (R.O. Hynes 2002; K.R. Legat, R Fassler 2009). La función de las integrinas en parte es dictada por cambios en la conformación del receptor que resulta en la alteración de la afinidad al ligando y la señalización (Ginsberg MH 2005; Hynes RO 2002). Se sabe que reclutando moléculas de señalización y adaptadoras a las colas citoplásmicas de las subunidades β , las integrinas contribuyen a la regulación de la supervivencia, proliferación, adhesión y motilidad celular, así como su resistencia a terapias anti cáncer (Ginsberg MH 2005; Hynes RO 2002; F.G. Giancotti 1999; A. Vehlow, N. Cordes 2013; Y. Onodera et. al. 2013; N. Kannan et. al. 2014). En cambio, poco se conoce de las subunidades α en estos procesos, aunque se ha visto que la inhibición de la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con la fibronectina con un anticuerpo específico para la $\alpha 5$ otorgó radiosensibilidad a las células de cáncer de mama (J.M. Nam et. al. 2010).

La integrina $\alpha 6$ es el receptor para laminina, se sobre expresa en la superficie de células tumorales y está relacionada con mal pronóstico, disminución en la supervivencia y metástasis (Hangan D et. al. 1997; Friedrichs K et. al. 1995; Tagliabue E et. al. 1998). Existen hipótesis que sugieren que ésta integrina juega un papel importante en el fenotipo agresivo e invasivo del cáncer de páncreas (Walsh N et. al. 2009). En el cáncer de próstata se ha demostrado la persistente expresión de las integrinas $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$. Así mismo, se ha reportado la expresión de la integrina $\alpha 6\beta$, la cual se une a la urocinasa (uPA) (Ports MO et. al. 2009), un factor pro-metastásico. La unión de uPA a la integrina $\alpha 6$ aumenta la migración celular *in vitro* y ha sido propuesto como mecanismo de la liberación de células tumorales de la adhesión a laminina (Ports MO et. al. 2009). En el mismo estudio vieron que la inhibición de la función de la integrina $\alpha 6$ en células tumorales, ya sea mediante el uso de un anticuerpo o bien por la mutación en ésta integrina, retarda la aparición de metástasis a hueso, ya que la integrina $\alpha 6$ es utilizada por las células troncales hematopoyéticas para llegar al hueso (Ports MO et. al. 2009), lo que soporta la hipótesis que la escisión de la integrina $\alpha 6$ permite la extravasación de las células tumorales de la circulación

(Ports MO *et. al.* 2009). En otro estudio sobre cáncer de próstata, al inhibir a la integrina $\alpha 6$ con un miRNA se logró reducir la invasión celular al bloquear la extravasación de células troncales de cáncer de próstata (Zoni E *et. al.* 2015).

Por otra parte, las integrinas $\alpha 2$, 3, 5 y 6 se encuentran sobre expresadas en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Steglich A *et. al.* 2015). Esos estudios acerca de la participación de la integrina $\alpha 6$ en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer parecen apoyar la idea de que la probable expresión diferencial de esta integrina en ameloblastoma pudiera tener un papel funcional en el desarrollo de esta neoplasia, aunque se requiere de un análisis de la expresión de esta integrina en un mayor número de ameloblastomas para comprobar esta hipótesis. Además, si se comprobará la sobre expresión de esta proteína en estas lesiones, se requerirán otros estudios, incluyendo la inhibición de su expresión, para poder determinar el papel donde participa esta proteína en el desarrollo del ameloblastoma.

Por otra parte, la vinculina es una proteína de unión a actina que se localiza en la parte citoplásmica de las uniones de la integrina a la matriz extracelular (adhesiones focales) y las adhesiones celulares mediadas por caherina (Ziegler WH *et. al.* 2006). Es parte de la formación de la adhesión (Humphries JD *et. al.* 2007), proliferación celular (Subauste MC *et. al.* 2004), y la regulación del citoesqueleto de actina (Wen KK *et. al.* 2009; Carisey A *et. al.* 2013). La pérdida de su expresión se ha relacionado con el desarrollo de diversos tipos de cánceres (Li T *et. al.* 2014), como lo son el carcinoma escamoso (Kawahara E *et. al.* 1999) y el cáncer de mama (Lifschitz-Mercer B *et. al.* 1997); también sus bajos niveles pueden predecir mal pronóstico de sobrevivencia en cáncer de células escamosas (Kawahara E *et. al.* 1999). Concordantemente, la sobreexpresión de vinculina produce disminución de la migración celular (Coll JL *et. al.* 1995). En nuestro caso se detectó una posible sobre expresión de vinculina en el ameloblastoma, por lo que su papel en el desarrollo de esta neoplasia debe corroborarse y en su caso estudiar su papel.

Por último, plectina es miembro de la familia de las plaquinas, las cuales están involucradas en la organización del citoesqueleto conectando a los filamentos intermedios con otras proteínas del citoesqueleto y anclándolas a la membrana plasmática (Jefferson JJ et. al. 2004; Sonnenberg A, Liem RK 2007). Plectina es una proteína dimérica que sirve de unión del citoesqueleto a la membrana plasmática para sus tres mayores componentes: los microfilamentos de actina, los microtubulos y los filamentos intermedios (Jefferson JJ et. al. 2004; Okumura M 1999). También juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad tisular (Fuchs P et. al. 1999). Además puede mediar la conexión de los microfilamentos de actina con los hemidesmosomas por sus diversos sitios de unión (Sonnenberg A, Liem RK 2007). En el carcinoma escamoso de cabeza y cuello se ha visto que el rango de sobre vivencia de los pacientes que tienen altos niveles de plectina era significativamente menor comparada con los pacientes que tenían bajos niveles de E-cadherina (Katada K et. al. 2012). En éste estudio se sugiere que, plectina promueve la migración e invasión de las células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello mediante la activación de la cinasa Erk $\frac{1}{2}$, por lo que plectina puede tener potencial para ser usado como biomarcador de pronóstico (Katada K et. al. 2012). En el adenocarcinoma ductal pancreático, plectina también ha sido sugerido como biomarcador (Kelly KA et. al. 2008). Por lo tanto, la sobre expresión de plectina en el ameloblastoma también pudiera participar en su comportamiento biológico.

Conclusiones

En este estudio se logró obtener proteínas de membrana de ameloblastoma y de quiste dentígero y se encontró la sobre expresión de las proteínas HSP60, vinvulina, plectina e integrina $\alpha 6$ en el ameloblastoma. Estas proteínas pudieran tener un papel importante en el desarrollo de una lesión no tumoral a la lesión tumoral y por lo tanto, podrían ser consideradas como biomarcadores y/o blancos terapéuticos.

Perspectivas

- Comprobar que las proteínas identificadas se encuentren sobre expresadas en los ameloblastomas analizados con relación al quiste dentígero.
- Comprobar que las proteínas identificadas se encuentren en membrana de ameloblastomas.
- Analizar un mayor número de muestras

Referencias

A. Vehlow, N. Cordes, Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme, *Biochim. Biophys. Acta – Rev, Cancer* 2013 (1836) 236–244.

Abdel-Aziz A, Amin MM. EGFR, CD10 and proliferation marker Ki67 expression in ameloblastoma: possible role in local recurrence. *Diagn Pathol.* 2012 Feb 2;7:14.

Abicht, A., and Lochmuller, H. (2000) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2, 539–600.

Adam PJ, Boyd R, Tyson KL, Fletcher GC, Stamps A, Hudson L, Poyser HR, Redpath N, Griffiths M, Steers G, Harris AL, Patel S, Berry J, Loader JA, Townsend RR, Daviet L, Legrain P, Parekh R, Terrett JA. Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer. *J Biol Chem.* 2003 Feb 21;278 (8):6482-9. Epub 2002 Dec 10.

Alfred L. Weber, Takashi Kaneda, Steven J. Scrivani, and Shahid Aziz. *Jaw: Cysts, Tumors, and Nontumorous Lesions. Head and Neck Imaging, Mosby* 930-994, 2003.

Altaba AR, Sánchez P and Dahmane N: Gli and Hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2: 361-372, 2002.

Altini M, Coleman H, Doglioni C, Favia G, Maiorano E. Calretinin expression in ameloblastomas. *Histopathology* 2000; 37; 27–32.

Anderson, N. G., and N. L. Anderson. 1996. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 17:443–453.

Aung PP, et al. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metallo-proteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene.* 2006;25:2546–57.

Avril L, Lombardi T, Ailianou A, Burkhardt K, Varoquaux A, Scolozzi P, Becker M. Radiolucent lesions of the mandible: a pattern-based approach to diagnosis. *Insights Imaging*. 2014 Feb;5(1):85-101.

Barazi HO, Zhou L, Templeton NS, Krutzsch HC, Roberts DD. Identification of heat shock protein 60 as a molecular mediator of alpha-3-beta-1 integrin activation. *Cancer Res* 2002; 62:1541-8.

Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, *et al*: Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 425: 846-851, 2003.

Bitgood MJ and McMahon AP: Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 172: 126-138, 1995.

Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, *et al*. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol* 2008; 44: 805–11.

Brenner, T. L., and Adams, V. R. (1999) *J. Am. Pharm. Assoc.* 39, 236–238.

Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM (2006). Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. *J Oral Maxillofac Surg* 64: 1343–1352.

Cairns L, Naidu A, Robinson CM, Sloan P, Wright JM, Hunter KD. CD56 (NCAM) expression in ameloblastomas and other odontogenic lesions. *Histopathology*. 2010 Oct; 57(4):544-8.

Campanella C, Bucchieri F, Merendino AM, Fucarino A, Burgio G, Corona DF, Barbieri G, David S, Farina F, Zummo G, de Macario EC, Macario AJ, Cappello F. The odyssey of Hsp60 from tumor cells to other destinations includes plasma membrane-associated stages and Golgi and exosomal protein-trafficking modalities. *PLoS One*. 2012;7(7)

Cappello F, Zummo G. HSP60 expression during carcinogenesis: a molecular “Proteus” of carcinogenesis? *Cell Stress Chap* 2005; 10:263-4.

Cappello F, Zummo G. HSP60 expression during carcinogenesis: where is the pilot? *Pathol Res Pract* 2006; 202:401-2.

Carisey A, Tsang R, Greiner AM, Nijenhuis N, Heath N, Nazgiewicz A, Kemkemer R, Derby B, Spatz J, Ballestrem C: Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Curr Biol* 2013, 23:271–281.

Cázares-Raga FE, González-Lázaro M, Montero-Solís C, González-Cerón L, Zamudio F, Martínez-Barnette J, Torres-Monzón JA, Ovilla-Muñoz M, Aguilar-Fuentes J, Rodríguez MH, de la Cruz Hernández-Hernández F. GP35 ANOAL, an abundant acidic glycoprotein of female *Anopheles albimanus* saliva. *Insect Mol Biol.* 2007 Apr;16(2):187-98. Epub 2007 Feb 6.

Chandra D, Choy G, Tang DG (2007) Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its proapoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase- 3. *J Biol Chem* 282: 31289–31301.

Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV. Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol.* 1999 May;43(3):261-7

Coll JL, Ben-Ze'Ev A, Ezzell RM, Rodriguez FJ, Baribault H, Oshima RG, Adamson ED: Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:9161–9165.

Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A. 1998. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* **280**: 1603–1607.

Cunha EM, Fernandes AV, Versiani MA, Loyola AM. Unicystic ameloblastoma: a possible pitfall in periapical diagnosis. *International Endodontic Journal.* 2005;38:334-40.

Daley TD, Wysocki GP, Pringle GA (1994). Relative incidence of odontogenic tumors and oral and jaw cysts in a Canadian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 77: 276–280.

Danen EH, van Muijen GN, van de Wiel-van Kemenade E, Jansen KF, Ruiter DJ, Figdor CG. Regulation of integrin-mediated adhesion to laminin and collagen in human melanocytes and in nonmetastatic and highly metastatic human melanoma cells. *Int J Cancer* 1993;54:315–321. [PubMed: 8387465]

Dassule HR and McMahon AP: Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol* 202: 215-227, 1998.

DeVilliers P, Liu H, Suggs C et al. Calretinin expression in the differential diagnosis of human ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Am. J. Surg. Pathol.* 2008; 32; 256–260.

Di Felice V, Ardizzone N, Marcianò N, Bartolotta T, et al. Senescence-associated Hsp60 expression in normal human skin fibroblasts. *Anat Rec* 2005; 284:446-53.

Dong D, Stapleton C, Luo B, Xiong S, Ye W, et al. (2011) A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 71: 2848–2857.

Dunsche A, Babendererde O, Lüttges J, Springer IN. Dentigerous cyst versus unicystic ameloblastoma--differential diagnosis in routine histology. *J Oral Pathol Med* 32:8; 486-491, 2003.

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, *et al*: Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75: 1417-1430, 1993.

F.G. Giancotti, Integrin signaling, *Science* 285 (1999) 1028–1032, doi:10.1126/science.285.5430.1028.

FDA approves Novartis' Gleevec. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2001 Jun;1(1):3.

Feng H, Zeng Y, Graner MW, Katsanis E. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood* 2002; 100:4108-15.

Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA. High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res* 1995;55:901–906.[PubMed: 7850807]

Frixen U. H., Behrens J., Sachs M., Eberle G., Voss B., Warda A., Luchner D. and Birchmeier W. (1991) E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 113, 173–185.

Fuchs P, Zorer M, Rezniczek GA, Spazierer D, Oehler S, Castanon MJ, et al. Unusual 50 transcript complexity of plectin isoforms: novel tissue-specific exons modulate actin binding activity. *Hum Mol Genet* 1999;8:2461–72.

Gaitán-Cepeda LA, Quezada-Rivera D, Tenorio-Rocha F, Leyva-Huerta ER. Reclassification of odontogenic keratocyst as tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. *Oral Dis.* 2010 Mar;16(2):185-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01625.x. Epub 2009 Sep 11.

García-Muñoz A, Bologna-Molina R, Aldape-Barrios B, Licéaga-Escalera C, Montoya-Pérez LA, Rodríguez MA. Identification of proteins with increased levels in ameloblastic carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Jun;72(6):1183-96.

García-Muñoz A, Rodríguez MA, Bologna-Molina R et al. The orosomucoid 1 protein (alpha1 acid glycoprotein) is overexpressed in odontogenic myxoma. *Proteome Sci* 2012;10:49

Gauss C, Kalkum M, Löwe M, Lehrach H, Klose J. Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis.* 1999 Mar;20(3):575-600.

Gey, G. O., Coffman, W. D, Kubicek, M.T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12; 364–365, 1952.

Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:509–516.

Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2010 Sep;39(8):585-91. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00908.x. Epub 2010 Jul 2. Review.

Gomes CC, Oliveira CS, Castro WH, Lacerda JC, Gomez RS. Clonal nature of odontogenic tumours. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 397–400.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004 Dec;4(12):3665-85. Review. Erratum in: *Proteomics*. 2005 Feb;5(3):826-7.

Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Mar;66(1):39-63; table of contents. Review.

Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Mar;66(1):39-63; table of contents. Review.

Guerrisi M, Piloni MJ, Keszler A (2007). Odontogenic tumors in children and adolescents. A 15-year retrospective study in Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12: E180–E185.

Gumbiner B. M. (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 622 – 634

Hahn H, Wojnowski L, Miller G and Zimmer A: The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. *J Mol Med* 77: 459-468, 1999.

Halbleib J. M. and Nelson W. J. (2006) Cadherins in development: Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20, 3199 – 3214.

Hangan D, Morris VL, Boeters L, von Ballestrem C, Uniyal S, Chan BM. An epitope on VLA-6 (alpha6beta1) integrin involved in migration but not adhesion is required for extravasation of murine melanoma B16F1 cells in liver. *Cancer Res* 1997;57:3812–3817. [PubMed: 9288792]

Harada H, Mitsuyasu T, Nakamura N, Higuchi Y, Toyoshima K, Taniguchi A, Yasumoto S. Establishment of ameloblastoma cell line, AM-1. *J Oral Pathol Med*. 1998 May;27(5):207-12.

Hardcastle Z, Mo R, Hui C and Sharpe PT: The Shh signaling pathway in tooth development. defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 125: 2803-2811, 1998.

Hatakeyama S, Mizusawa N, Tsutsumi R, Yoshimoto K, Mizuki H, Yasumoto S, Sato S, Takeda Y. Establishment of human dental epithelial cell lines expressing ameloblastin and enamelins by transfection of hTERT and cdk4 cDNAs. *J Oral Pathol Med* 40:3; 227-234, 2011.

Hatakeyama S, Mizusawa N, Tsutsumi R, Yoshimoto K, Mizuki H, Yasumoto S, Sato S, Takeda Y. Establishment of human dental epithelial cell lines expressing ameloblastin and enamelins by transfection of hTERT and cdk4 cDNAs. *J Oral Pathol Med* 40:3; 227-234, 2011.

Hirota M, Aoki S, Kawabe R, Fujita K. Desmoplastic ameloblastoma featuring basal cell ameloblastoma: A case report. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2005;99(2):160-4.

Hopkins AL, Groom CR. Target analysis: a priori assessment of druggability. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2003;(42):11-7.

Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Sep;1(9):727-30.

Huber LA, Pfaller K, Vietor I. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res*. 2003 May 16;92(9):962-8. Review.

Hulpiau P, van Roy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Feb;41(2):349-69.

Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C: Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 2007, 179:1043–1057.

Hyafil F., Babinet C. and Jacob F. (1981) Cell-cell interactions in early embryogenesis: A molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26, 447–454.

Hyafil F., Morello D., Babinet C. and Jacob F. (1980) A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 21, 927–934.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673–687.

Ingham PW and McMahon AP: Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principals. *Genes Dev* 15: 3059-3087, 2001.

Ishiba T, Nagahara M, Nakagawa T, Sato T, Ishikawa T, Uetake H, Sugihara K, Miki Y, Nakanishi A. Periostin suppression induces decorin secretion leading to reduced breast cancer cell motility and invasion. *Sci Rep.* 2014 Nov 17;4:7069.

J.-M. Nam, Y. Onodera, M.J. Bissell, C.C. Park, Breast cancer cells in threedimensional culture display an enhanced radio response after coordinate targeting of integrin alpha5beta1 and fibronectin, *Cancer Res.* 70 (2010) 5238–5248, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2319.

J.P.A Baak, F.R.C Path, M.A.J.A Hermsen, G Meijer, J Schmidt, E.A.M Janssen, Genomics and proteomics in cancer, *European Journal of Cancer*, Volume 39, Issue 9, June 2003, Pages 1199-1215

Ja"ä" skela" inen K, Jee KJ, Leivo I, Saloniemi I, Knuutila S, Heikinheimo K. Cell proliferation and chromosomal changes in human ameloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 136: 31–7.

Jaeger M, Santos J, Domingues M, Ruano R, Araújo N, Caroli A, Jaeger R. A novel cell line that retains the morphological characteristics of the cells and matrix of odontogenic myxoma. *J Oral Pathol Med.* 29: 3; 129-38, 2000.

Jallepalli PV, Lengauer C. Chromosome segregation and cancer, cutting through the mystery. *Nature Rev Cancer* 2001, 1, 109–117.

Jefferson JJ, Leung CL, Liem RK. Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:542–53.

Josic D, Clifton JG. Mammalian plasma membrane proteomics. *Proteomics*. 2007 Aug;7(16):3010-29. Review.

K. M. K. Masthan, S. Rajkumari, M. Deepasree, N. Aravindha Babu, S. Leena Sankari. Neoplasms associated with odontogenic cysts. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene* 3:10; 123-130, 2011.

K.R. Legate, R. Fassler, Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 187–198, doi:10.1242/jcs.041624.

Kanda S, Mitsuyasu T, Nakao Y, Kawano S, Goto Y, Matsubara R, Nakamura S. Anti-apoptotic role of the sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma. *Int J Oncol.* 2013 Sep;43(3):695-702.

Kanda S, Mitsuyasu T, Nakao Y, Kawano S, Goto Y, Matsubara R, Nakamura S. Anti-apoptotic role of the sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma. *Int J Oncol.* 2013 Sep;43(3):695-702.

Katada K, Tomonaga T, Satoh M, Matsushita K, Tonoike Y, Kodera Y, Hanazawa T, Nomura F, Okamoto Y. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. *J Proteomics.* 2012 Mar 16;75(6):1803-15. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.018. Epub 2011 Dec 30. P

Kawahara E, Tokuda R, Nakanishi I: Migratory phenotypes of HSC-3 squamous carcinoma cell line induced by EGF and PMA: relevance to migration of loosening of adhesion and vinculin-associated focal contacts with prominent filopodia. *Cell Biol Int* 1999, 23:163–174. 12.

Kawasaki K, Weiss KM. Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:4060–5.

Kehinde E, Vincent I. Clinicopathological analysis of histological variants of ameloblastoma in a suburban Nigerian population. *Head Face Med.* 2006;2:42.

Kelly KA, Bardeesy N, Anbazhagan R, Gurumurthy S, Berger J, Alencar H, et al. Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS Med* 2008;5:e85.

Kestler DP, Foster JS, Bruker CT, Prenshaw JW, Kennel SJ, Wall JS, Weiss DT, Solomon A. ODAM Expression Inhibits Human Breast Cancer Tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)*. 2011;5:73-85. doi: 10.4137/BCBCR.S6859. Epub 2011 Apr 28.

Konouchi H, Asami J, Yanagi Y, Hisatomi M. Usefulness of contrast enhanced-MRI in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. *Oral Oncology*. 2006;42(5):481-6.

Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci*. 2009;5(3):226-43. Epub 2009 Feb 24. Review

Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. *Histological Typing of Odontogenic Tumours*. 2th ed. Berlin: Springer-Verlag; 1992.

Kumamoto H, Ohki K. Detection of CD133, Bmi-1, and ABCG2 in ameloblastic tumors. *J Oral Pathol Med*. 2010 Jan;39(1):87-93.

Laad AD, Thomas ML, Fakhri AR, Chiplunkar SV. Human gamma-delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells. *Int J Cancer* 1999; 80:709-14.

Laxmana AR, Gogineni SB, Thomas PS, Shetty SR. Desmoplastic ameloblastoma-a report of two clinical cases. *Braz J Oral Sci*. 2010;9:137-41.

Leth-Larsen R, Lund RR, Ditzel HJ. Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2010 Jul; 9(7):1369-82. doi: 10.1074/mcp.R900006-MCP200. Epub 2010 Apr 8. Review.

Li T, Guo H, Song Y, Zhao X, Shi Y, Lu Y, Hu S, Nie Y, Fan D, Wu K. Loss of vinculin and membrane-bound β -catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2014 Dec 11;13:263.

Lien W. H., Klezovitch O. and Vasioukhin V. (2006) Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Curr. Opin. Cell Biol*. 18, 499 – 506.

Lifschitz-Mercer B, Czernobilsky B, Feldberg E, Geiger B: Expression of the adherens junction protein vinculin in human basal and squamous cell tumors: relationship to invasiveness and metastatic potential. *Hum Pathol.* 1997 Nov;28(11):1230-6.

Lucas RB. *Pathology of Tumours of the Oral Tissues.* 4th ed. Churchill-Livingstone. Edinburgo 1983

Lund R, Leth-Larsen R, Jensen ON, Ditzel HJ. Efficient isolation and quantitative proteomic analysis of cancer cell plasma membrane proteins for identification of metastasis-associated cell surface markers. *J Proteome Res.* 2009 Jun;8(6):3078-90.

Macario AJL, Conway de Macario E (2005) Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med* 353: 1489–1501

Masloub SM, Abdel-Azim AM, Elhamid ES. CD10 and osteopontin expression in dentigerous cyst and ameloblastoma. *Diagn Pathol.* 2011 May 24;6:44.

Mello LA, Figueiredo AL, Ramos EA, Gurgel CA, Martins MD, de Figueiredo CR, Cury PR, de Albuquerque Júnior RL, Ramalho LM, Santos JN. CD1a-positive Langerhans cells and their relationship with E-cadherin in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2013 Jul;42(6).

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;103:941–60.

Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruíz-Godoy Rivera LM, Meneses-García A. Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997 Dec;84(6):672-5.

Mosqueda-Taylor A. New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Sep 1;13(9):E555-8.

Mourshed f. A roentgenographic study of dentigerous cysts. li. Role of roentgenograms in detecting dentigerous cyst in the early stages. Oral surg oral med oral pathol. 1964 jul;18:54-61.

N. Kannan, L.V. Nguyen, C.J. Eaves, Integrin β 3 links therapy resistance and cancer stem cell properties, Nat. Cell Biol. 16 (2014) 397–399.

Narang RS, Manchanda AS, Arora P, Randhawa K. Dentigerous cyst of inflammatory origin-a diagnostic dilemma. Ann Diagn Pathol. 2012;16:119–23.

Okumura M, Uematsu J, Hirako Y, Nishizawa Y, Shimizu H, Kido N, et al. Identification of the hemidesmosomal 500 kDa protein (HD1) as plectin. J Biochem 1999;126:1144–50.

Osterloh A, Meier Stiegen F, Veit A, Fleischer B, von Bonin A, Breloer M. Lipopolysaccharidefree heat shock protein 60 activates T cells. J Biol Chem 2004; 279:47906-11.

Pandey, A., and M. Mann. 2000. Proteomics to study genes and genomes. Nature 405:837–846.

Park JC, et al. The amyloid protein APin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. Eur J Oral Sci. 2007;115:153–60.

Parvathi Devi, Thimmarasa V. Bhovi, Vishal Mehrotra, Mayuri Agarwal. Multiple Dentigerous Cysts. J. Maxillofac. Oral Surg. s12663-010-0090-z. 2010.

Pathology and genetics, World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours, Leon Barnes, John W. Eveson, Peter Reichart, David Sidransky, IARC Press Lyon, 2005, 285, 286, 316, 317.

Perl A. K., Wilgenbus P., Dahl U., Semb H. and Christofori G. (1998) A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. Nature 392, 190–193.

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;37:455–60.

Piselli P, Vendetti S, Vismara D, Cicconi R, Poccia F, et al. Different expression of CD44, ICAM-1 and HSP60 on primary tumor and metastases of a human pancreatic carcinoma growing in scid mice. *Anticancer Res* 2000; 20:825-31.

Pogrel MA. The management of lesions of the jaws with liquid nitrogen cryotherapy. *J Calif Dent Assoc.* 1995 Dec;23(12):54-7.

Poomsawat S, Punyasingh J, Vejchapipat P, Larbcharoensub N. Co-expression of hepatocyte growth factor and c-met in epithelial odontogenic tumors. *Acta Histochem.* 2012 Jul;114(4):400-5.

Ports MO, Nagle RB, Pond GD, Cress AE. Extracellular engagement of alpha6 integrin inhibited urokinase-type plasminogen activator-mediated cleavage and delayed human prostate bone metastasis. *Cancer Res.* 2009 Jun 15;69(12):5007-14.

Premalatha BR, Patil S, Rao RS, Reddy NP, Indu M. Odontogenic tumor markers - an overview. *J Int Oral Health.* 2013 Apr;5(2):59-69. Review.

Punnya AV, Rekha K. "Ameloblastoma with mucous cells": review of literature and presentation of 2 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Dec;106(6):e20-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.08.014. Review.

Qian-Lin Z, Ting-Feng W, Qi-Feng C, Min-Hua Z, Ai-Guo L (2010) Inhibition of cytosolic chaperonin CCTf-1 expression depletes proliferation of colorectal carcinoma in vitro. *J Surg Oncol* 102: 419–423.

R.O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines in their roles as major adhesion receptors, *Integrins* 110 (2002) 673–687.

Rabilloud T. Membrane proteins ride shotgun. *Nat Biotechnol.* 2003 May;21(5):508-10.

Ranson, M., Mansoor, W., and Jayson, G. (2002) *Expert Rev. Anticancer Ther.*2, 161–168

Regezi JA, Scuibba JJ. *Oral Pathology.Clinical-Pathologic Correlations.* WB Saunders. Philadelphia. 1989.

Regezi Joseph A, Scuibba James J: *Patología Bucal.* McGraw Hill Interamericana. 2000.

Reichart PA, Philipsen HP (2004). *Odontogenic Tumours and Allied Lesions.* Quintessence Publishing: London.

Ren C, Amm HM, DeVilliers P, Wu Y, Deatherage JR, Liu Z, MacDougall M. Targeting the sonic hedgehog pathway in keratocystic odontogenic tumor. *J Biol Chem.* 2012 Aug 3;287(32):27117-25.

Rennstam K, Hedenfalk I. High-throughput genomic technology in research and clinical management of breast cancer. Molecular signatures of progression from benign epithelium to metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2006;8(4):213. Review.

Robinson L, Martinez MG. Unicystic ameloblastoma: a prognostically distinct entity. *Cancer.* 1977 Nov;40(5):2278-85.

Romeo MJ, Espina V, Lowenthal M, Espina BH, Petricoin EF 3rd, Liotta LA. CSF proteome: a protein repository for potential biomarker identification. *Expert Rev Proteomics.* 2005 Jan;2(1):57-70. Review.

Rosty C, et al. Clinical and biological characteristics of cervical neoplasias with FGFR3 mutation. *Mol Cancer.* 2005;4:15.

Rowley JD. Chromosome translocations, dangerous liaisons revisited. *Nature Rev Cancer* 2001, 1, 245–250.

S. Hehlhans, M. Haase, N. Cordes, Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies, *Biochim. Biophys. Acta* 1775 (2007) 163 doi:10.1016/j.bbcan.2006.09.001.

Saku T, Okabe H, Shimokawa H. Immunohistochemical demonstration of enamel proteins in odontogenic tumours. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 113–9.

Sandra F, Nakamura N, Mitsuyasu T, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Two relatively distinct patterns of ameloblastoma: an anti-apoptotic proliferating site in the outer layer (periphery) and a pro-apoptotic differentiating site in the inner layer (centre). *Histopathology* 2001; 39: 93–8.

Scholl RJ, Kellett HM, Neumann DP, Lurie AG. Cysts and cystic lesions of the mandible: clinical and radiologic-histopathologic review. *Radiographics*. 1999 Sep-Oct;19(5):1107-24.

Schrohl AS, Anderson MH, Sweep F, Schmitt M, Harbeck N, Foekens J. Tumor markers: From laboratory to clinical utility. *Mol Cell Proteomics* 2003 Jun; 2(6): 378-87. Epub 2003 Jun 17.

Shafer WG, Hine MK, Levy BM. A textbook of Oral Pathology. 4th ed. Philadelphia WS Saunders. 1986

Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem* 2003; 278:7607-16.

Shteyer A, Lustmann J, Lewin-Epstein J. The mural ameloblastoma: a review of the literature. *J Oral Surg.* 36:11; 866-872, 1978.

Siddiqui S, Bruker CT, Kestler D, et al. Odontogenic ameloblast associated protein as a novel biomarker for human breast cancer. *Am Surg.* 2009;75:769–75.

Simon P. Langdon. Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. *Human Press Inc.*, Totowa, NJ. 88: 3-39.

Slavkin HC. Embryonic tooth formation. A tool for developmental biology. *Oral Sci Rev.* 1974;4(0):7-136

Snead ML, Luo W, Hsu DD, Melrose RJ, Lau EC, Stenman G. Human ameloblastoma tumours express the amelogenin gene. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74: 64–72.

Soltys BJ, Gupta RS. Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. *Cell Biol Int* 1997; 21:315-20.

Sonnenberg A, Liem RK. Plakins in development and disease. *Exp Cell Res* 2007;313:2189–203

Steglich A, Vehlow A, Eke I, Cordes N. α integrin targeting for radiosensitization of three-dimensionally grown human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2015 Feb 28;357(2):542-8.

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.

Stone DM, Hynes M, Armanini M, *et al*: The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384: 129-134, 1996.

Strumane K., Berx G. and van Roy F. (2004) Cadherins in cancer. In: *Cell Adhesion*, vol. 165, pp. 69–103, Behrens J. and Nelson J. (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg.

Subauste MC, Pertz O, Adamson ED, Turner CE, Junger S, Hahn KM: Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J Cell Biol* 2004, 165:371–381.

Svetlov SI, Xiang Y, Oli MW, Foley DP, Huang G, Hayes RL, Ottens AK, Wang KK. Identification and preliminary validation of novel biomarkers of acute hepatic

ischaemia/reperfusion injury using dual-platform proteomic/degradomic approaches. *Biomarkers*. 2006 Jul-Aug;11(4):355-69.

Tagliabue E, Ghirelli C, Squicciarini P, Aiello P, Colnaghi MI, Menard S. Prognostic value of alpha 6 beta 4 integrin expression in breast carcinomas is affected by laminin production from tumor cells. *Clin Cancer Res* 1998;4:407–410.

Takata T, Miyauchi M, Ogawa I, et al. Immunoexpression of transforming growth factor beta in desmoplastic ameloblastoma. *Virchows Arch* 2000; 436: 319–23.

Tao Q, Lv B, Qiao B, Zheng CQ, Chen ZF.
Immortalization of ameloblastoma cells via reactivation of telomerase function: Phenotypic and molecular characteristics. *Oral Oncol* 45:12; 239-44, 2009.

Tao Q, Lv B, Qiao B, Zheng CQ, Chen ZF.
Immortalization of ameloblastoma cells via reactivation of telomerase function: Phenotypic and molecular characteristics. *Oral Oncol* 45:12; 239-44, 2009.

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al: Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425: 851-856, 2003.

Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Han PP, et al. Analysis of amelogenin gene (AMGX, AMGY) expression in ameloblastoma. *Oral Oncol* 2005; 41: 843–50.

Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):499-508. Review.

van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001;305:285– 298.

van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Nov;65(23):3756-88. doi: 10.1007/s00018-008-8281-1. Review.

Vickers RA, Gorlin RJ. Ameloblastoma: Delineation of early histopathologic features of neoplasia. *Cancer*. 1970 Sep;26(3):699-710.

Vleminckx K., Vakaet Jr L., Mareel M., Fiers W. and Van Roy F. (1991) Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107–119.

Walsh N, Clynes M, Crown J, O'Donovan N. Alterations in integrin expression modulates invasion of pancreatic cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009 Oct 13;28:140.

Wang ZH, Yan C, Zhang ZY, Zhang CP, Hu HS, Tu WY, Kirwan J, Mendenhall WM. Impact of salivary gland dosimetry on post-IMRT recovery of saliva output and xerostomia grade for head-and-neck cancer patients treated with or without contralateral submandibular gland sparing: a longitudinal study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011 Dec 1;81(5):1479-87. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.07.1990. Epub 2010 Oct 8.

Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams, and I. Humphery-Smith. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16:1090–1094.

Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA and Baylin SB: Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422: 313-317, 2003.

Wen KK, Rubenstein PA, DeMali KA: Vinculin nucleates actin polymerization and modifies actin filament structure. *J Biol Chem* 2009, 284:30463–30473.

Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser, and K. L. Williams. 1995. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13:19–50.

Wilson AM, Kimura E, Harada RK, Nair N, Narasimhan B, Meng XY, Zhang F, Beck KR, Olin JW, Fung ET, Cooke JP. Beta2-microglobulin as a biomarker in peripheral arterial disease: proteomic profiling and clinical studies. *Circulation*. 2007 Sep 18;116(12):1396-403.

Wulfschlegel JD, Paweletz CP, Steeg PS, Petricoin EF 3rd, Liotta L. Proteomic approaches to the diagnosis, treatment, and monitoring of cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2003;532:59-68. Review.

Y. Onodera, J.-M. Nam, H. Sabe, Intracellular trafficking of integrins in cancer cells, *Pharmacol. Ther.* 140 (2013) doi:10.1016/j.pharmthera.2013.05.007.

Yamamoto T, Ueta E, Yoneda K, Osaki T. Peripheral ameloblastoma: case report with immunohistochemical investigation. *J Oral Maxillofac Surg*. 1990 Feb;48(2):197-200.

Yavagal C, Anegundi R, Shetty S. Unicystic plexiform ameloblastoma: An insight for pediatric dentists. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2009;27:70-4.

Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR: The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* 2006, 16:453–460.

Zoni E, van der Horst G, van de Merbel AF, Chen L, Rane JK, Pelger RC, Collins AT, Visakorpi T, Snaar-Jagalska BE, Maitland NJ, van der Pluijm G. miR-25 Modulates Invasiveness and Dissemination of Human Prostate Cancer Cells via Regulation of α v- and α 6-Integrin Expression. *Cancer Res*. 2015 Jun 1;75(11):2326-36.