



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Establecimiento de líneas celulares de tumores
odontogénicos y de quiste dentífero como modelos de
estudio *in vitro*”**

T E S I S

Que presenta

MAESTRO EN CIENCIAS MARCOS AGUSTÍN MUÑIZ LINO

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

Director de la Tesis:

Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Profesor titular 3C

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV

ASESORES

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV

Dra. Febe Elena Cázares Raga

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

CINVESTAV

Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Departamento de Biología Celular

CINVESTAV

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Laboratorio de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado e Investigación

Facultad de Odontología

UNAM

AGRADECIMIENTOS

El proyecto de investigación descrito en esta tesis contó con el respaldo académico del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional – CINVESTAV-IPN, al cual agradezco profundamente.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACyT, la beca de estudios otorgada durante el periodo agosto de 2011 a julio de 2015.

La participación del Hospital Juárez de México y del Hospital Regional 1° de Octubre del ISSSTE, fue fundamental en la realización de este proyecto, les agradezco la donación de las biopsias utilizadas en el trabajo experimental.

Quiero agradecer particularmente, a la Dra. Maria Iliana Picco Díaz, al Dr. Carlos Juan Liceaga Escalera, al Dr. Luis Alberto Montoya Pérez y al Dr. Juan José Trujillo Fandiño.

Agradezco a la maestra Lucia Román Hinojosa del Centro Interdisciplinario de Ciencias de la Salud, Unidad Santo Tomás del Instituto Politécnico Nacional, por el absoluto apoyo brindado para la presentación de este trabajo en congresos nacionales e internacionales. Además, por ofrecerme las bases académicas que me permitieron competir en un ambiente profesional distinto del que me forme.

Al Dr. Mario Alberto Rodríguez agradezco infinitamente que me haya aceptado en su grupo de trabajo, por el apoyo y el tiempo que incondicionalmente me brindó; así como por la formación que me otorgó y que será parte importante de mi vida.

A los Dres. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, Fidel de la Cruz Hernández, Febe Cazares Raga, José Eduardo Pérez Salazar y Gloria Gutiérrez Venegas, por aceptar asesorarme; por su apoyo académico y en especie, por la franqueza en sus opiniones y por dedicarle tiempo imprevisto a la revisión de esta tesis.

A Carlos Calzada Vázquez, a Mario Rodríguez Nieves y a Guillermina García Rivera, por el apoyo académico y moral que me ofrecieron; por la amabilidad y entusiasmo mostrado hacia mí y hacia mi trabajo y por la amistad sincera que me ofrecieron.

A los profesores del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, por las observaciones, correcciones y opiniones vertidas sobre este trabajo.

A los compañeros de laboratorio que me hayan brindado su amistad y apoyo de forma sincera, leal y digna.

DEDICATORIAS

A mis padres Rosalina Lino y Marcos Muñiz

Por darme la vida, por su comprensión, cariño y apoyo. Y por todos los sacrificios.

A mis hermanos, Lina Ángela, Roberto y Eduardo

Por siempre estar presentes cuando los he necesitado. Por la felicidad que hemos y seguiremos compartiendo.

A Aarón Eduardo y Eyla Natalia

Por la alegría y la esperanza que me obsequian.

A mis amigos, Jessica, Maricela, Ana Laura, Martha, Saraí, Cecilia, Elena, Hugo, Job, Carlos Vázquez, Mario, Itzel, Olga y Alejandro, que con su apoyo, amistad, humildad, honestidad intelectual, integridad, etc., hicieron de este periodo de mi vida, una etapa exageradamente agradable.

A mi querido CINVESTAV, la institución más noble con la cual me he cruzado.

*“En la vida no hay nada que temer, solo hay cosas que comprender.
Ahora es el momento de entender más, para temer menos”*

Marie S. Curie

INDICE

Resumen	I
Abstract	II
1. INTRODUCCIÓN	
1. Antecedentes generales	1
1.1. La formación de los órganos dentarios	1
1.2. Generalidades de los tumores odontogénicos	5
1.3. Clasificación de los tumores odontogénicos	5
1.4. Estadísticas de frecuencia de los tumores odontogénicos a nivel mundial	10
1.5. Estadísticas de frecuencia de los tumores odontogénicos en México	12
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	
2.1. El tumor odontogénico ameloblastoma	15
2.2. El tumor odontogénico queratoquístico	16
2.3. Los quistes odontogénicos	20
2.3.1. Clasificación de los quistes odontogénicos	20
2.3.2. El quiste dentífero	22
3. ESTADO DEL ARTE	
3.1. Relación entre los tumores odontogénicos y los quistes odontogénicos	26
3.1.2. Relación entre el quiste dentífero y el ameloblastoma	26
3.1.3. Perfiles de expresión génica de ameloblastoma y quiste dentífero	29
3.2. Cultivos celulares como modelos de estudio	31
3.2.1 Líneas celulares de tumores odontogénicos	31
3.2.2. Línea celular de ameloblastoma AM-1	32

3.2.3. Línea celular de mixoma Mix 1	35
3.2.4. Línea celular de ameloblastoma AM	37
3.2.5. Líneas celulares de ameloblastoma HAM1, HAM2 y HAM3	39
3.2.6. Línea celular de odontoma mOd	42
3.2.7. Línea celular del Tumor Odontogénico Epitelial Calcificante CEOT	44
4. JUSTIFICACIÓN	46
5. HIPOTESIS	46
6. OBJETIVOS	46
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	47
8. METODOLOGÍA	48
8.1. Obtención y mantenimiento de los cultivos primarios de ameloblastoma, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentífero	48
8.1.2. Subcultivo de líneas celulares	48
8.1.3. Congelamiento de las líneas celulares	49
8.1.4. Descongelamiento de las líneas celulares	49
8.2. Extracción de proteínas de los cultivos celulares	49
8.3. Cuantificación de las proteínas purificadas	50
8.4. Ensayos de Western blot	50
8.5. Análisis de la expresión del RNAm de los blancos seleccionados	51
8.5.2. Aislamiento del RNA total	51
8.5.3. Síntesis del DNA complementario	51

8.5.4. Amplificación de los genes seleccionados mediante PCR	52
8.5.5. Análisis de los productos de PCR por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	52
8.6. Microscopía electrónica de transmisión	52
8.7. Zimografía en sustrato de gelatina	53
9. RESULTADOS	55
9.1. Muestras	55
9.2. Obtención de los cultivos primarios de tumores odontogénicos y quistes dentígeros	57
9.3. Obtención del cultivo primario de quiste dentígero (DeCy-1)	60
9.4. Morfología de las células DeCy-1 y tiempo de duplicación celular	60
9.5. El cultivo celular DeCy-1 expresa marcadores epiteliales, pero no expresa marcadores de fibroblastos	63
9.6. DeCy-1 expresa ODAM	69
9.7. Las células DeCy-1 expresan CD10 y osteopontina	69
9.8. DeCy-1 presenta estructuras semejantes a vesículas de secreción	72
9.9. DeCy-1 secreta MMP-2	72
10. DISCUSIÓN	78
11. CONCLUSIONES	82
12. PERSPECTIVAS	82
13. BIBLIOGRAFÍA	83

RESUMEN

Objetivos: El objetivo del trabajo vertido en esta tesis fue establecer y caracterizar cultivos celulares de tumores odontogénicos y de quiste dentígero, así como identificar posibles mecanismos de patogenicidad.

Materiales y Métodos: Las células epiteliales derivadas de quistes dentígeros, así como de tumores odontogénicos queratoquísticos y de ameloblastomas fueron cultivados en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino y las células fueron mantenidas en cultivo hasta la pérdida de viabilidad. La línea celular de quiste dentígero fue nombrada DeCy-1 y fue caracterizada a mayor profundidad. Se analizó la expresión de diversos marcadores por Western blot, y RT-PCR. Se utilizó microscopía electrónica de transmisión para examinar la ultraestructura de estas células. Ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida y zimogramas en geles de sustrato de gelatina fueron usados para analizar la presencia de proteínas y la actividad proteolítica respectivamente en el medio condicionado de las células DeCy-1.

Resultados: El cultivo celular de epitelio de quiste dentígero fue establecido. Esta línea celular (DeCy-1) expresa marcadores de epitelio como citoqueratinas, ODAM, MME y OPN. El análisis ultraestructural de las células DeCy-1 mostró alta actividad vesicular. El análisis por electroforesis mostró aproximadamente once bandas proteicas obtenidas del medio condicionado y los geles de zimograma mostraron actividad enzimática en el peso correspondiente a la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2).

Conclusiones: La línea celular DeCy-1 derivada de un quiste dentígero, puede ser usada como un modelo para profundizar el conocimiento de la naturaleza de esta lesión, así como de los tumores odontogénicos. Estas células secretan la metaloproteinasa de matriz 2, que posiblemente pudiera estar implicada en la patogénesis del quiste dentígero.

ABSTRACT

Objective: The aim of this work was to establish and characterize a cell culture from a dentigerous cyst and to identify possible factors involved in its pathogenesis.

Materials and Methods: Epithelial cells from a sample of dentigerous cyst were seeded and cultivated in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Expression of epithelial markers was analyzed by Western blot, immunofluorescence and RT-PCR assays. Transmission electron microscopy was used to examine the ultrastructure of the cells. SDS-PAGE and zymography on gelatin substrate of conditioned media were done to identify secreted proteins and protease activity, respectively.

Results: A cell culture derived from a dentigerous cyst was established. This cell line, named DeCy-1, expresses epithelial markers such as cytokeratins, ODAM, MME and osteopontin. The ultrastructural analysis showed that cells have a high vesicular activity and the analysis of the conditioned medium revealed the presence of about eleven secreted proteins, among them we found the matrix metalloproteinase 2.

Conclusions: DeCy-1 cell line, derived from a dentigerous cyst, may be used as an *in vitro* model to study the biology of this lesion. These cells secreted Matrix Metalloproteinase 2, an enzyme that may be involved in the pathogenesis of dentigerous cyst.

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. La formación de órganos dentarios.

Embriológicamente los órganos dentarios inician su formación de la séptima a octava semana de vida intrauterina, ¹ derivan del mesénquima de la cresta neural también llamada ectomesénquima, del epitelio del primer arco braquial y de una parte del epitelio del proceso frontonasal ²⁻⁴ (Figura 1). Independientemente de si la dentición sea temporal o permanente y del órgano que se trate (incisivo, canino, premolar y molar), la formación de los órganos dentarios inicia como placodas que representan un abultamiento epitelial en los sitios de los futuros arcos maxilares y mandibulares (Figura 2). Para después atravesar por diferentes etapas morfológicas bien definidas, caracterizadas por interacciones secuenciales y reciprocas del epitelio y el mesénquima. ⁴

Varias moléculas de señalización controlan las etapas de la formación de los órganos dentarios coordinando los procesos de proliferación celular, diferenciación, apoptosis, síntesis de matriz extracelular y aposición mineral ². Las principales moléculas involucradas en el desarrollo dental pertenecen a cinco vías de señalización: Notch, Proteína Morfogenética de Hueso (BMP), Factor de Crecimiento de los Fibroblastos (FGF), Sonic Hedgehog (shh) y Wingless/Integration 1 (Wnt). ² Importantemente, todas estas moléculas reguladoras son comunes a la odontogénesis y al desarrollo y progresión de los tumores odontogénicos (Figura 3). Así, la importancia de la odontogénesis en el estudio y entendimiento de los tumores odontogénicos radica en la inferencia de que estos tumores derivan de restos celulares del aparato que llevó a la formación de los órganos dentarios.

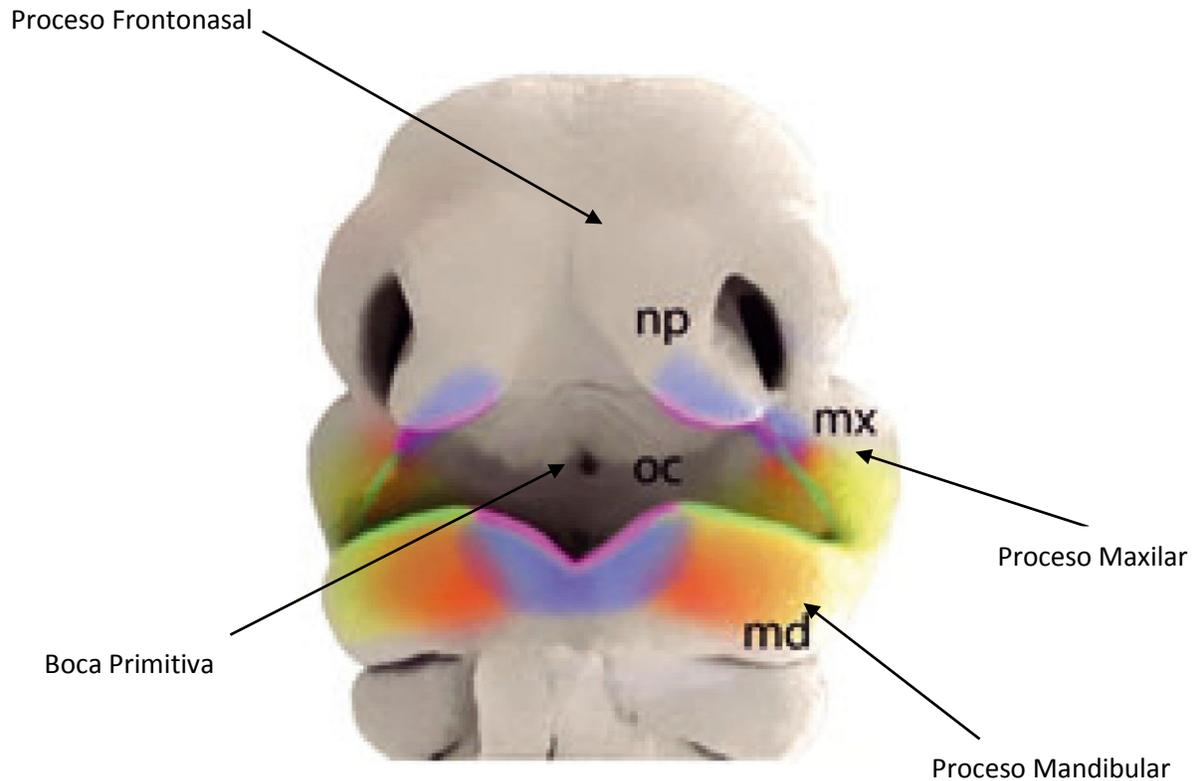


Figura 1. Los órganos dentarios se originan del epitelio del primer arco branquial.

Tras la formación del primer arco branquial, que dará origen a las estructuras del cráneo y la cara, se aprecian los llamados procesos. Un proceso frontonasal, que llevará a la formación del hueso frontal, las orbitas oculares y los huesos nasales, dos procesos maxilares que darán origen a los huesos maxilares y órganos dentarios superiores, dos procesos mandibulares que guiarán la formación de la mandíbula y órganos dentarios inferiores. El epitelio que recubre a los procesos maxilares y mandibulares finalmente llevará a la histomorfogénesis de los órganos dentarios. Tomada y modificada de Mitsiadis TA. *Genet* 80: 319-329, 2011.²

Etapas morfológicas en la formación de los órganos dentarios

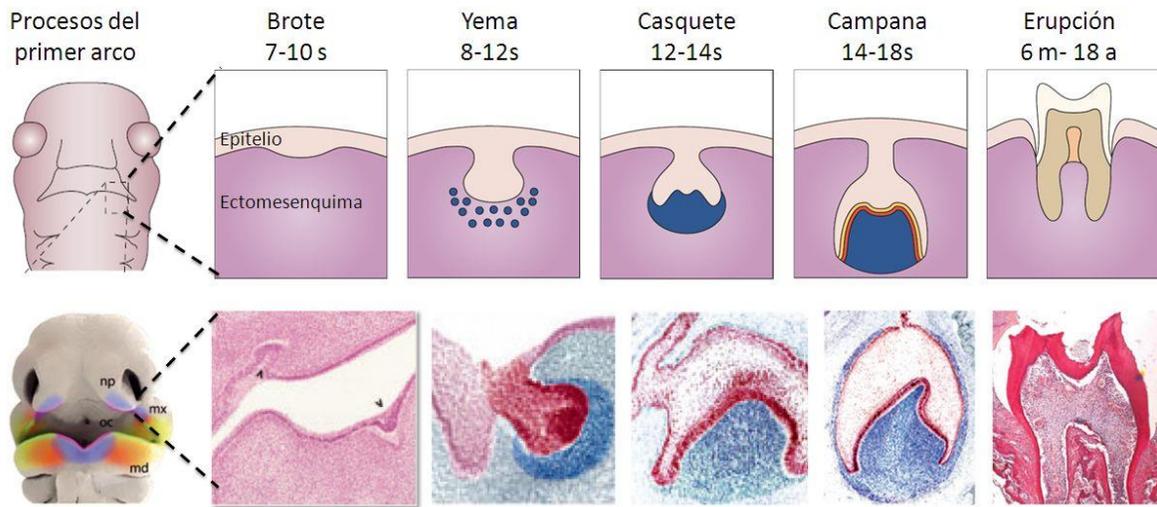


Figura 2. Diferentes etapas morfológicas en la formación de los órganos dentarios. Después de la invaginación del epitelio que recubre los procesos maxilares y mandibulares dentro del ectomesénquima, se forma un pequeño “brote”, primera etapa morfológica en la formación de los dientes. En una representación gráfica, así como en cortes histológicos, se observan las cuatro etapas morfológicas principales por las cuales transcurre la morfogénesis dentaria. Tomada, compuesta y modificada de Mitsiadis TA. *Clin Genet* 80: 319-329, 2011² y Tucker A. *Nature Reviews Genetics* 5; 499, 2004.²⁵

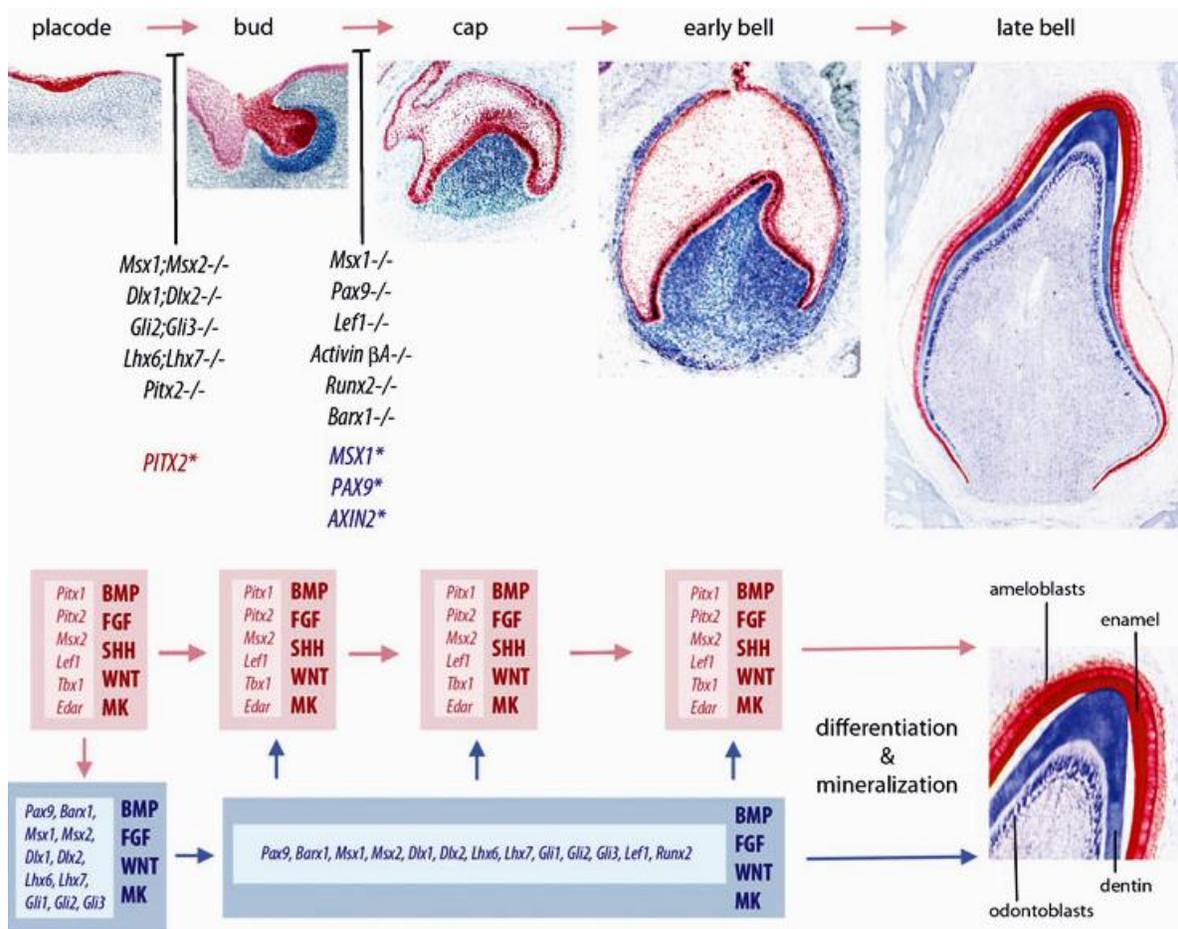


Figura 3. Moléculas involucradas tanto en la odontogénesis como en la progresión de los tumores odontogénicos. Cinco grupos de moléculas son reguladores comunes entre la odontogénesis y también han sido asociadas al desarrollo y progresión de los tumores odontogénicos.^{2, 26} Tomada y modificada de Mitsiadis TA. *Clin Genet* 80: 319-329, 2011²

1.2. Generalidades de los tumores odontogénicos.

Los tumores odontogénicos comprenden un amplio rango de desórdenes de crecimiento de los tejidos dentales, que van desde neoplasias benignas y malignas, hasta malformaciones crecimiento autolimitante⁵. Estos tipos de tumores pueden aparecer en cualquier etapa de la vida. Los tumores odontogénicos son lesiones que pueden derivar de tejidos mesénquimales, ectomesénquimales o de tejidos epiteliales que son o han sido parte del aparato que lleva a la formación de los órganos dentarios;⁶ por lo tanto, la localización de este tipo de tumores se presenta exclusivamente en el esqueleto maxilofacial, es decir, la mandíbula y el maxilar (Figura 4).

En dichos huesos de la cara, los tumores odontogénicos pueden localizarse de manera intraósea o también llamada central. Pueden localizarse de forma extraósea o llamada también periférica, en la cual, las lesiones se encuentran localizadas en los tejidos blandos adyacentes a los maxilares como lo son la encía y la mucosa alveolar.⁶

1.3. Clasificación de los tumores odontogénicos.

Los tumores odontogénicos fueron clasificados por primera vez en 1869 por el patólogo francés Pierre Paul Broca, usando el término “odontoma” para nombrar cualquier tumor localizado alrededor de los tejidos formadores de los órganos dentarios. Esta clasificación se basaba en la etapa de la formación de los órganos dentarios al momento en que aparecía el crecimiento tumoral.⁷

El termino odontoma permaneció en la nomenclatura de la clasificación de los tumores odontogénicos hasta 1958, cuando Pindborg y Clausen clasificaron a los tumores odontogénicos en epiteliales y mesodérmicos, según el origen celular del cual provinieran.⁸ En 1966 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un centro de colaboración para la clasificación histológica de los tumores odontogénicos. Finalmente, en 1971 la primera clasificación sistematizada fue publicada por la OMS^{7,9} y 21 años después en 1992 una segunda edición con sutiles correcciones.¹⁰

En el año 2000, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) inició la publicación de 10 libros, en los cuales esta vertida la nueva clasificación de los tumores humanos. En dicha clasificación se tomaron en cuenta criterios histopatológicos y criterios genéticos. En este contexto, para el año 2005, los tumores odontogénicos, fueron clasificados como parte de los tumores de cabeza y cuello en el noveno libro publicado por la IARC: "Tumores de Cabeza y Cuello, Patología y Genética".^{6, 7}

La clasificación de los tumores odontogénicos publicada por la IARC, a diferencia de la clasificación publicada para otros tumores, no contempla ningún criterio genético o molecular, sino que sólo está basada en la observación del aspecto histológico de estos tumores. Así, la actual clasificación de los tumores odontogénicos divide a los mismos en dos grandes grupos, dependiendo si el tumor en cuestión tenga la capacidad de producir metástasis a órganos distantes en el cuerpo (malignos), y un segundo grupo de tumores, que aunque puedan ser agresivos localmente (benignos), no producen metástasis a órganos distantes (Tabla I).^{6, 7}

Los tumores malignos son subclasificados según sea el origen celular del tumor en: i) carcinomas odontogénicos, cuando el origen es epitelial. Entre estos, se encuentran el ameloblastoma metastatizante, el carcinoma ameloblástico, el carcinoma escamoso primario intraóseo y los carcinomas odontogénicos de células claras y de células fantasma; y ii) sarcomas odontogénicos, cuando el tumor se deriva de células pertenecientes al tejido conectivo. En este grupo solo encontramos dos tumores, el fibrosarcoma ameloblástico y el fibrodentino/fibro-odontosarcoma ameloblástico.

De igual manera, los tumores benignos se clasifican dependiendo del origen celular que presenten, en: i) derivados de epitelio odontogénico, con estroma fibroso y sin ectomesénquima odontogénico. En este grupo de tumores se encuentran el ameloblastoma, el tumor odontogénico escamoso, el tumor odontogénico epitelial

calcificante, el tumor odontogénico adenomatoide y el tumor odontogénico queratoquístico; ii) derivados de epitelio odontogénico sin ectomesénquima. Este grupo de tumores puede o no formar tejido duro (hueso, dentina, esmalte), ejemplos de estos tumores son el fibroma ameloblástico, el fibrodentinoma ameloblástico, el odontoma, el odontoameloblastoma, el tumor quístico calcificante y el tumor dentinogénico de células fantasma; iii) derivados del mesénquima y/o ectomesénquima odontogénico. Este tipo tumoral puede o no contener células epiteliales y está representado por tres tumores: el fibroma odontogénico, mixoma odontogénico y el cementoblastoma.⁶

Por último, esta clasificación incluye a las: iv) lesiones relacionadas a huesos maxilofaciales, entre los cuales se encuentran el fibroma osificante, displasia fibrosa, displasia ósea, granuloma central de células gigantes, querubismo, quiste óseo aneurismático y quiste óseo simple.^{6, 11}

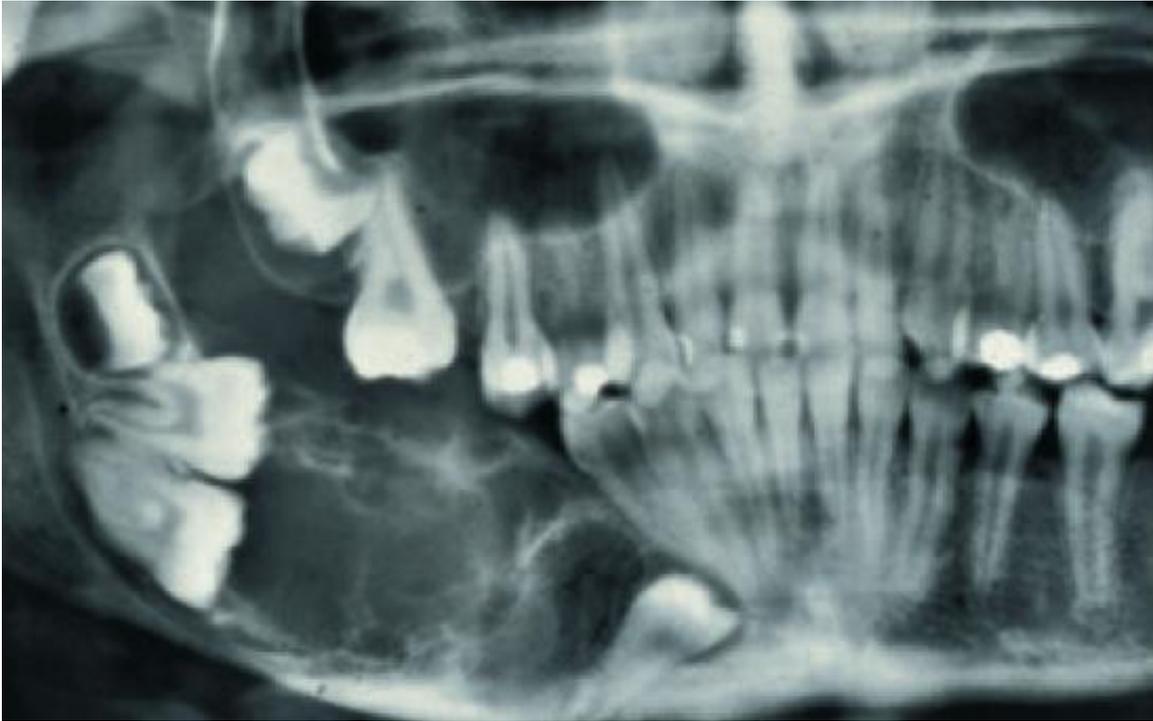


Figura 4. Localización de los tumores odontogénicos. La localización de este tipo de tumores es exclusiva de la zona maxilofacial, ya que estos derivan de células que forman parte del aparato formador de los órganos dentarios. En general, los tumores odontogénicos se hallan adyacentes a los dientes. La imagen muestra una radiografía con proyección ortopantomográfica en la que se observa un ameloblastoma sólido adyacente a tres órganos dentarios. Tomada de World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005.⁶

TUMORES MALIGNOS	TUMORES BENIGNOS
Carcinomas Odontogénicos	Derivados de epitelio odontogénico, con estroma fibroso y sin ectomesénquima
Ameloblastoma maligno o metastatizante	Ameloblastoma solido o multiquístico
Carcinoma ameloblástico – tipo primario	Ameloblastoma extraóseo
Carcinoma ameloblástico – tipo secundario indiferenciado, intraóseo	Ameloblastoma desmoplásico
Carcinoma ameloblástico – tipo secundario indiferenciado, periférico	Ameloblastoma uniuístico
Carcinoma escamoso intraóseo primario solido	Tumor odontogénico escamoso
	Tumor odontogénico epitelial calcificante
	Tumor odontogénico adenomatoide
	Tumor odontogénico queratoquístico
	Derivados de epitelio odontogénico sin ectomesénquima, con/sin formación de tejido duro
Carcinoma escamoso intraósea primario derivado del tumor odontogénico queratoquístico	
Carcinoma escamoso intraóseo primario derivado de quistes odontogénicos	Fibroma ameloblástico
Carcinoma odontogénico de células claras	Fibrodentinoma ameloblástico
	Fibroodontoma ameloblástico
	Odontoma complejo y compuesto
Carcinoma odontogénico de células fantasma	Odontoameloblastoma
Sarcomas Odontogénicos	Tumor odontogénico quístico calcificante
Fibrosarcoma ameloblástico	Tumor dentinogénico de células fantasma
Fibrodentino/fibro-odontosarcoma ameloblástico	Derivados del mesénquima y/o ectomesénquima odontogénico con/sin epitelio odontogénico
	Fibroma odontogénico
	Mixoma odontogénico
	Cementoblastoma
	Lesiones relacionadas a huesos maxilofaciales
	Fibroma osificante
	Displasia fibrosa
	Displasia ósea
	Granuloma central de células gigantes
	Querubismo
	Quiste óseo aneurismático
	Quiste óseo simple

Tabla I. Clasificación histopatológica de los tumores odontogénicos. Tomada y modificada de World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005.⁶

1.4. Estadísticas de frecuencia de los tumores odontogénicos a nivel mundial.

A diferencia de los estudios epidemiológicos de otros tipos de tumores, los reportes estadísticos mundiales de los tumores odontogénicos son pocos.¹²

Estudios mayoritariamente hechos en países asiáticos, africanos, así como en Brasil, muestran una mayor frecuencia del tumor odontogénico benigno ameloblastoma (Sri Lanka 69.8%,¹³ Nigeria 58.5%,¹⁴ China 40.3%,¹⁵ Tanzania 80.1%,¹⁶ Japón 58.6%,¹² Egipto 41.5%,¹⁷ India 61.5%²³ y Brasil 45.2%) (Figura 5). Las estadísticas en estos países también colocan a los odontomas en segundo sitio de frecuencia. En contraste, estudios hechos en otros países americanos y europeos mostraron una mayor frecuencia de odontomas (México 34.6%,¹⁸ Canadá 51.53%,¹⁹ Estados Unidos 75.9%,²⁰ Chile 44.7%²¹ y Estonia 34.3%)²² (Figura 5), mientras que la segunda lesión más frecuente es el ameloblastoma.

Una probable explicación de dicha diferencia en la proporción de ambos tumores, puede ser que en países como Estados Unidos, México y Canadá los tumores odontogénicos son diagnosticados y tratados en escuelas dentales, en donde la revisión radiográfica de rutina muestra lesiones asintomáticas (odontoma), mientras que en varios países Africanos, así como en Japón, el diagnóstico suele realizarse en unidades hospitalarias maxilofaciales, una vez que los pacientes ya presentan síntomas.^{6, 12}

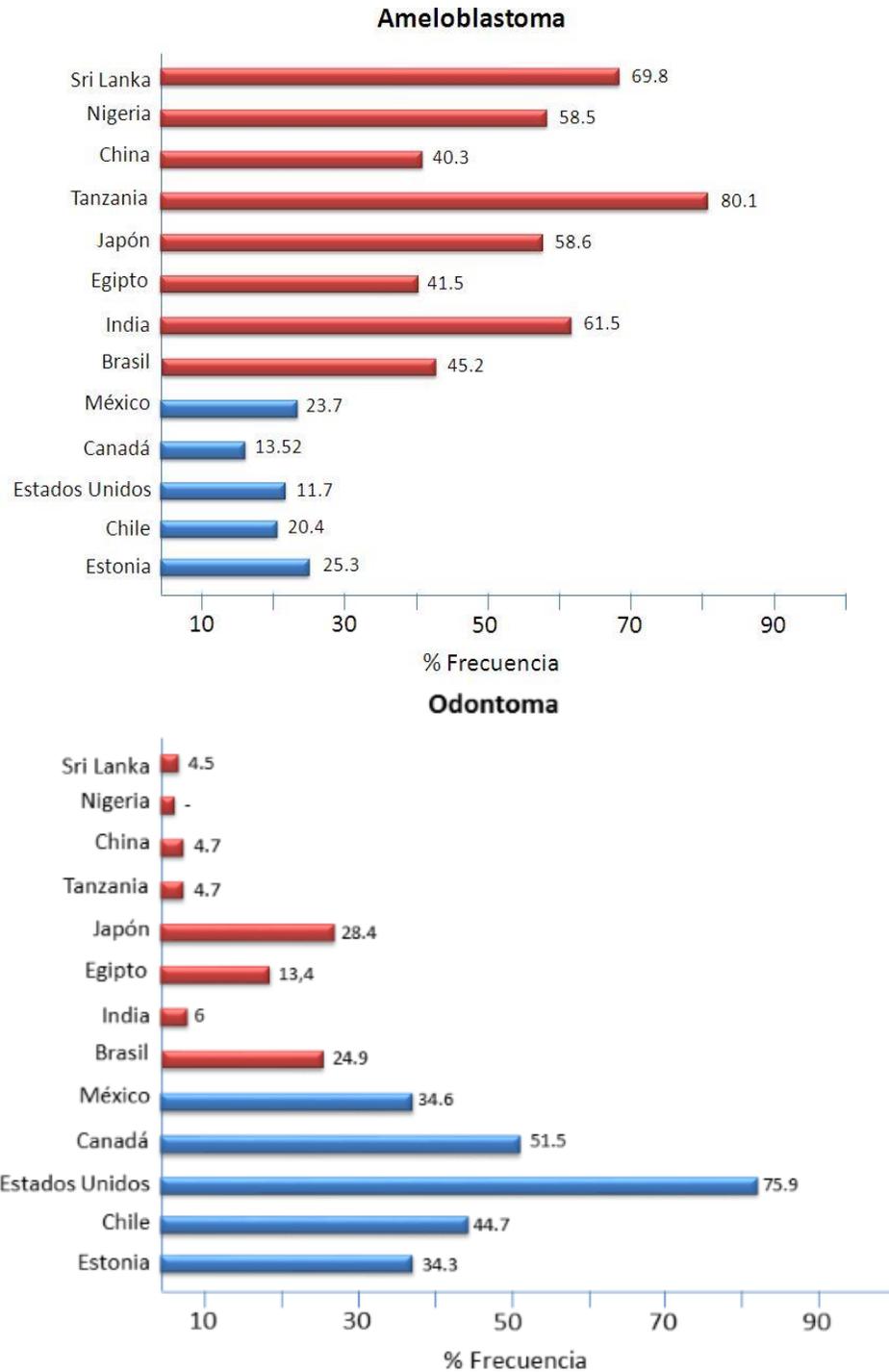


Figura 5. Frecuencia de los tumores odontogénicos a nivel mundial. Existe una diferencia en la proporción de dos tipos de tumores odontogénicos, mientras que el ameloblastoma es más frecuente en países asiáticos y africanos, el odontoma es más frecuente en países americanos y europeos, dicha diferencia podría estar explicada por el origen de las muestras en los diferentes estudios.^{6, 12-24}

1.5. Estadísticas de frecuencia de los tumores odontogénicos en México.

El primer estudio estadístico acerca de los tumores odontogénicos realizado en población mexicana se trató de un estudio retrospectivo de 349 casos obtenidos de cuatro diferentes servicios de histopatología en la ciudad de México, Mosqueda-Taylor y colaboradores¹⁸ realizaron este estudio basándose en los criterios histopatológicos de clasificación de la OMS de 1992. De los 349 casos analizados, 345 casos se trataron de tumores benignos (98.8%), mientras que 4 casos fueron malignos (1.1%).

El tumor de mayor frecuencia fue el odontoma (34.6%), seguido del ameloblastoma (23.7%), del mixoma (17.7%), del tumor odontogénico adenomatoide (7.1%) y del quiste odontogénico calcificante (6.8%)¹⁸. Los tumores odontogénicos representaron el 0.8% de las biopsias del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), el 2.5% de las biopsias de los servicios de patología bucal de la Universidad Autónoma de México (UNAM) y de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), así como el 3.7% de las biopsias recibidas en un servicio privado de patología bucal de la Ciudad de México (Figura 6).¹⁸

En la clasificación establecida en 2005 por la OMS, se redefinió al tumor odontogénico queratoquístico, que por su comportamiento y origen celular se le incluyó como un tumor odontogénico, ya que hasta dicha fecha esta lesión se consideraba un quiste del desarrollo y no una verdadera neoplasia.⁶ La redefinición del tumor odontogénico queratoquístico llevó a Gaitán-Cepeda y colaboradores²⁴ a reportar nuevos datos de frecuencia y prevalencia por año.

En este estudio publicado en 2010 fueron reclasificadas las biopsias de tumores odontogénicos recibidas en el periodo enero de 1981 hasta diciembre de 2008 del principal centro de diagnóstico histopatológico de tumores de cabeza y cuello de la Universidad Nacional Autónoma de México.²⁴

En dicho reporte fue analizada la prevalencia de tumores odontogénicos en dos periodos, de 1981 a 2004 y de 2005 a 2008 considerando las clasificación de 1992 y de 2005 respectivamente.²⁴

Para el periodo de 1981 a 2004 la prevalencia para los tumores odontogénicos fue de 2.6%, mientras que para el periodo 2005-2008 fue de 5%, esto representa un incremento en la prevalencia de los tumores odontogénicos del 92%. Respecto a la frecuencia de distribución, el odontoma fue el tumor más frecuente con 45.1% de los casos, seguido del ameloblastoma con 22.2%, mixoma 14.9%, tumor odontogénico adenomatoide 6.7%, fibroma odontogénico 5.8%, tumor odontogénico epitelial calcificante 0.8% y cementoblastoma 0.5%.²⁴ No obstante, la distribución cambio radicalmente a partir de los criterios de 2005. Una vez incluido el tumor odontogénico queratoquístico en la clasificación, éste desplazó al odontoma al segundo sitio como el tumor más frecuente (Figura 6).²⁴

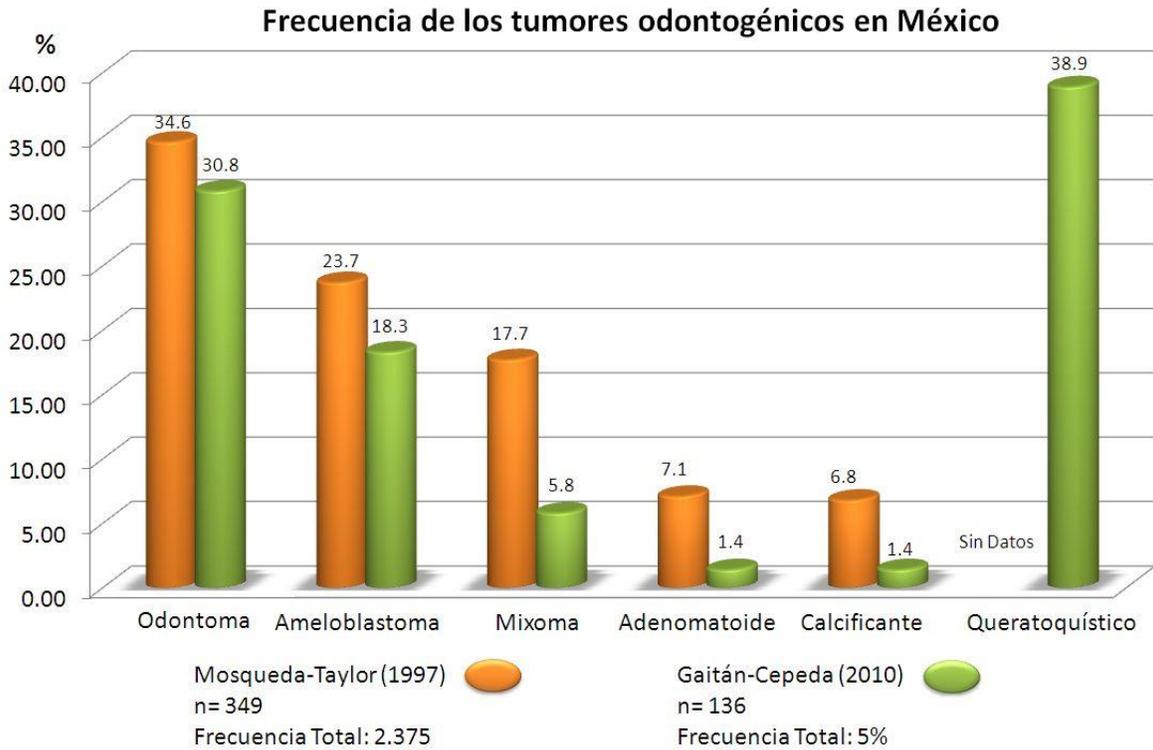


Figura 6. Frecuencia de los tumores odontogénicos en México. Con base en los únicos dos estudios hechos en población mexicana, se observa que debido a la reclasificación del queratoquiste a tumor odontogénico queratoquístico, este, ahora ocupa el primer lugar en frecuencia en la población. De dichos estudios también se desprende el hecho de que la frecuencia de los tumores odontogénicos ha incrementado en un 92%, ya que en el periodo comprendido entre 1981 a 2004 fue una prevalencia anual de 2.6%, mientras que para el periodo 2005 a 2008 fue de 5%. Este aumento en la prevalencia debe tomarse con precaución, dado que es consecuencia de la reclasificación del tumor odontogénico queratoquístico.^{6, 18, 24}

2. ANTECEDENTES PARTICULARES.

2.1. El tumor odontogénico ameloblastoma

El ameloblastoma (AM) es un tumor odontogénico, ubicado en la clasificación histopatológica de 2005 como un tumor benigno que deriva de tejido epitelial odontogénico y que a su vez contiene estroma fibroso y ausencia de ectomesénquima (Figura 7).⁶ Como ha sido mencionado anteriormente, el AM en países asiáticos y africanos ocupa el primer lugar en frecuencia, en tanto, en países americanos y europeos ocupa el segundo o tercer lugar en frecuencia. La mayoría de los casos de AM son diagnosticados entre los 30 a 60 años y en raras ocasiones antes de los 20 años de edad¹²⁻²⁴

Al ser un tumor odontogénico, el AM se presenta exclusivamente en los maxilares y raramente en cavidades sinusales. Aproximadamente el 80% de los casos ocurren en la mandíbula con una marcada predilección por la región posterior, excepto en individuos africanos, en los cuales el AM se presenta particularmente en una zona mandibular, la sínfisis. En el maxilar de igual forma, la predilección es por la zona posterior.⁶

Aunque AM es un tumor benigno y de lento crecimiento, es una neoplasia de comportamiento local agresivo, con un potencial muy pobre de metástasis.²⁷ Este es capaz de alcanzar gran tamaño y presenta destrucción y erosión ósea.²⁸ A su vez, presenta altas tasas de recurrencia a pesar de haber sido sometido a una remoción quirúrgica extensa (Figura 8).²⁹

Respecto a las características clínicas, los AM pequeños suelen ser asintomáticos, aunque presenten grados de inflamación variable. El dolor y la parestesia son raros. Radiográficamente pueden aparecer como zonas radiolúcidas uniloculares o multiloculares con bordes festoneados.⁶ AM, frecuentemente se asocia a órganos dentarios no erupcionados o retenidos. En los dientes adyacentes a la lesión, la reabsorción radicular es común²⁹ (Figura 8). El diagnóstico definitivo no está

basado en la observación radiográfica, ya que el tumor odontogénico queratoquístico y el mixoma suelen presentar características radiológicas semejantes.⁶ AM se propaga lentamente por infiltración a través de los espacios medulares de los maxilares para finalmente erosionar la cortical del hueso y extenderse a tejidos contiguos, como músculos y mucosa bucal.²⁹ Los AM presentes en los maxilares, al extenderse, eventualmente pueden obliterar los senos maxilares y subsecuentemente expandirse intracranealmente.^{6, 29}

2.2. El tumor odontogénico queratoquístico

El tumor odontogénico queratoquístico (TOQ) es una neoplasia que se encuentra clasificada como benigna y que presenta epitelio odontogénico con estroma fibroso y ausencia de ectomesenquima.⁶ El TOQ, se puede presentar en un extenso periodo de etapas de la vida, entre los diez y los noventa años, pero el pico de incidencia es entre la segunda y tercera décadas de la vida y tiene predisposición por el género masculino.¹⁰

Histológicamente, el TOQ está compuesto por células epiteliales hacia el lumen de la lesión. Este epitelio suele estar constituido de entre seis y ocho capas de células, sin embargo la característica principal de este epitelio es la paraqueratinización, es decir, la presencia de queratina en la capa cornea del epitelio, pero aún con presencia de núcleos celulares.³² Este epitelio está sostenido por un grueso tejido conectivo, frecuentemente infiltrado con células inflamatorias, sobre todo en tumores de gran tamaño.^{32, 33} Clínicamente, los TOQ de tamaño medio y chicos no son diagnosticados, ya que no presentan sintomatología, algunos pacientes han referido un sabor metálico.³³ Los TOQ de gran tamaño pueden expandir el hueso adyacente a la lesión, provocar dolor de leve a moderado y movilidad dental. Radiográficamente, el tumor se observa como una zona radiolúcida, con bordes óseos corticales bien definidos. Cuando la lesión se encuentra por debajo de los órganos dentarios, esta “festonea” las raíces de los dientes, ya que no suele destruir las raíces, pero si el hueso circundante. (Figura 9)^{32, 34, 35}

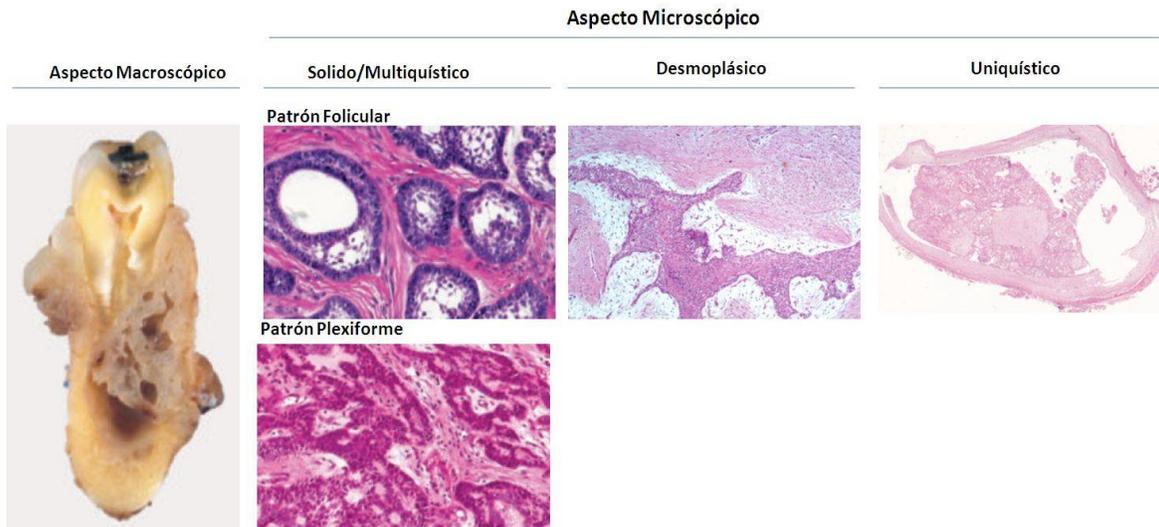


Figura 7. Clasificación histopatológica de los ameloblastomas. Los AM se clasifican como tumores benignos que derivan de tejido epitelial odontogénico y que a su vez contienen estroma fibroso y ausencia de ectomesénquima. La imagen muestra los diferentes tipos histológicos de ameloblastomas. Por un lado, se observan las características macroscópicas del AM, con un aspecto grisáceo a marrón y adyacente a un órgano dentario. Mientras que histológicamente se reconocen tres diferentes subtipos. El tipo sólido o también llamado multiquístico puede presentar dos diferentes patrones, el folicular que presenta regiones periféricas en palizada y degeneración quística central (folículos) y el plexiforme, en el cual es fácil distinguir cordones de células tumorales. El tipo desmoplásico se caracteriza por presentar islas de células epiteliales embebidas en tejido conectivo irregular. Finalmente, el tipo unicístico presenta una sola capa de tejido epitelial neoplásico formando una cavidad. Tomada y modificada de World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005.⁶

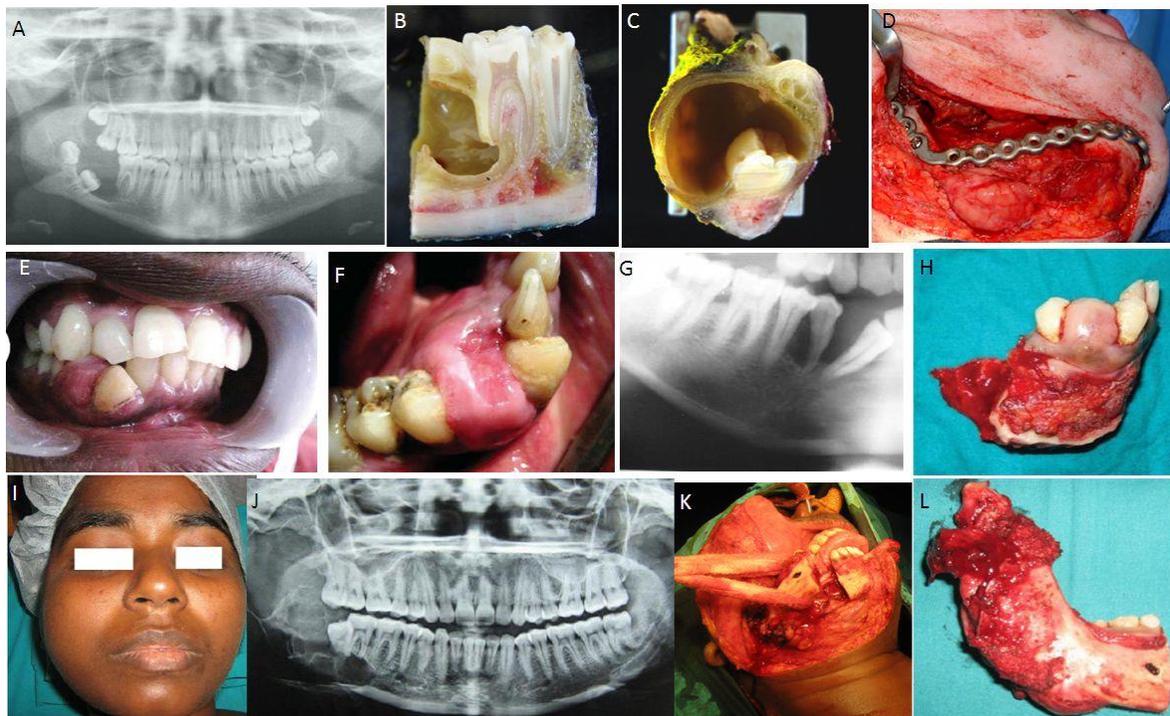


Figura 8. Características clínicas y radiográficas de los ameloblastomas. La imagen muestra una recopilación de algunas de las características clínicas y radiográficas de los AM. Cada fila horizontal muestra un caso. Los paneles A, G y J, muestran una radiografía con proyección ortopantomográfica en las que se observan patrones multiloculares (A y J) y patrón unilocular (G). Se observa, además, reabsorción radicular de dientes adyacentes (A, B, G y J). Clínicamente, AM suele presentarse con algún grado de inflamación en cara y mucosa bucal (E, F, I). El total de los casos diagnosticados como AM son tratados con cirugía extensa que puede involucrar la resección de la mitad de la mandíbula donde este hallada la neoplasia (D, H, K, L). Tomadas y modificadas de Candice C. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110; 585-592, 2010.²⁸ Sanjay CJ. *Imaging Science in Dentistry* 41; 89-93, 2011³⁰ y Rakesh S. *Head Neck Oncology* 2:1, 2010.³¹

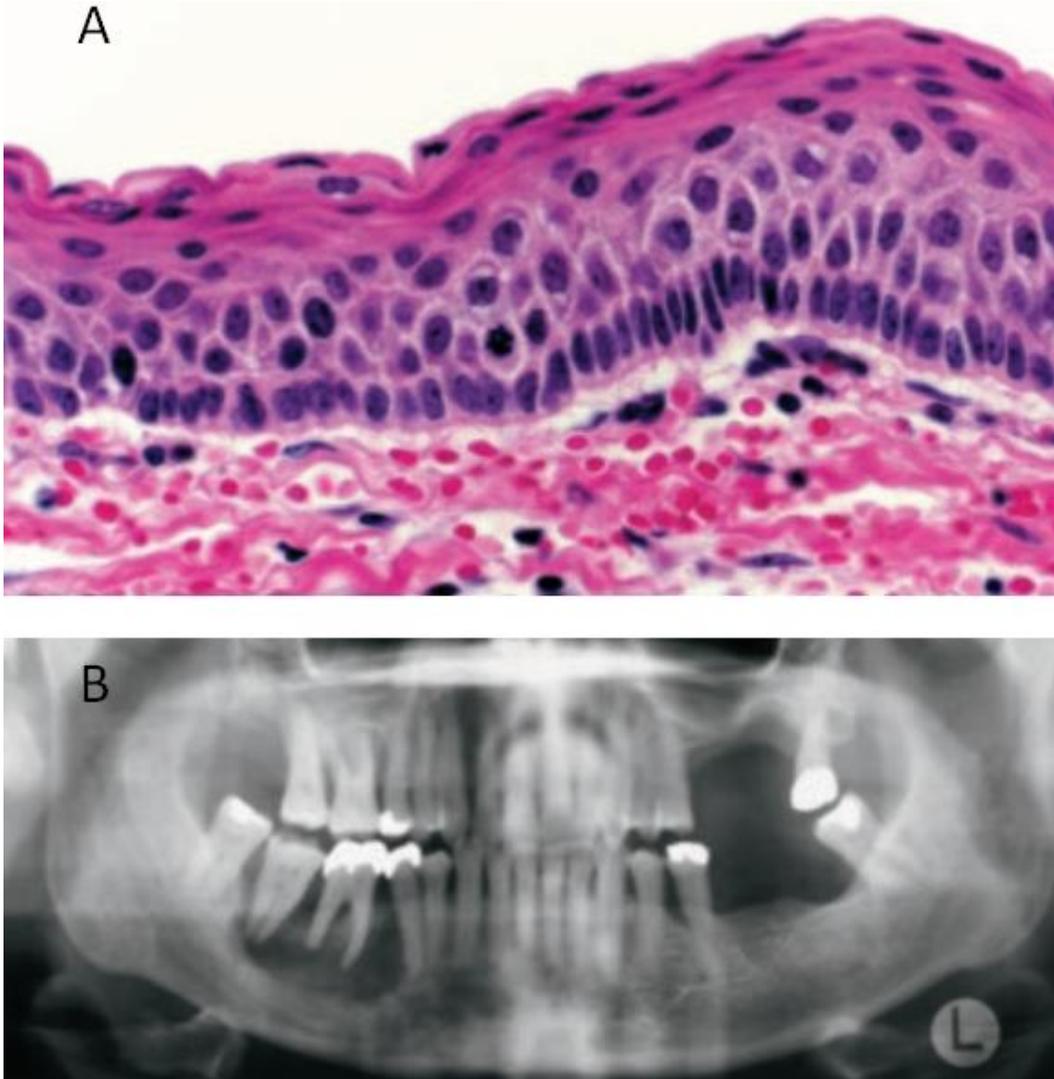


Figura 9. El tumor Odontogénico Queratoquístico. A) Micrografía 100X. El TOQ está conformado por epitelio paraqueratinizado, sostenido por tejido conectivo que frecuentemente está infiltrado por células inflamatorias. B) La imagen muestra una radiografía panorámica en la que se observa el patrón radiológico que muestra un TOQ. Este caso es una lesión unilocular, el tumor está bien definido por un perímetro óseo cortical. Tomada y modificada de World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005.⁶

2.3. Los quistes odontogénicos

Las lesiones que se desarrollan en los huesos maxilares pueden originarse de elementos dentales, óseos, nerviosos o de vasos sanguíneos.³² Como fue mencionado anteriormente, los tumores odontogénicos son neoplasias que derivan del aparato formador de los órganos dentarios.⁶ Sin embargo, existe otro tipo de lesiones que aunque se originan de células formadoras de los dientes, no son consideradas como neoplasias, sino como quistes odontogénicos.

Un quiste está caracterizado patológicamente como una cavidad revestida por epitelio y que a su vez puede estar ocupado por contenido líquido o semisólido.³³ En la mayoría de los casos, la examinación microscópica del epitelio que reviste el quiste, así como los hallazgos radiográficos y clínicos son necesarios para el diagnóstico confirmatorio. Los signos de la presencia de un quiste, frecuentemente emulan las características de los tumores odontogénicos. Los quistes, en la mayoría de los casos se presentan en la mandíbula y radiográficamente se observan como áreas uniloculares o multiloculares radiolúcidas que varían en tamaño y definición, estas lesiones pueden generar reabsorción ósea y reabsorción de las raíces dentales.³²

2.3.1. Clasificación de los quistes odontogénicos.

Los quistes clasificados como odontogénicos, suelen dividirse en dos grupos, i) inflamatorios; y ii) del desarrollo (Tabla 2). Los quistes inflamatorios, como el quiste periapical y el granuloma, son producto y derivan de un proceso inflamatorio de la pulpa dental.³² Los quistes del desarrollo no están asociados a inflamación y aunque se desconoce la causa y los mecanismos involucrados en su progresión, se sabe que histológicamente, al igual que los tumores odontogénicos, se producen de las células del aparato formador de los órganos dentarios.^{32, 34}

Quistes del desarrollo	Quistes inflamatorios
Quiste dentígero	Quiste radicular
Quiste de erupción	Quiste apical
Quiste lateral periodontal	Quiste lateral
Quiste gingival del infante	Quiste residual
Quiste gingival del adulto	

Tabla 2. Clasificación de los quistes odontogénicos. Los quistes odontogénicos, derivan de las células que forman o formaron parte de sistema embriológico que dio origen a los órganos dentarios, sin embargo, los quistes no son considerados como neoplasias, sino como cavidades revestidas de epitelio. Los quistes odontogénicos que se clasifican como inflamatorios son producto de una infección de origen dental, en este caso, el quiste tiene contenido purulento. Los quistes que se forman durante el estadio embrionario o durante la erupción dentaria, no presentan contenido purulento y son llamados quistes odontogénicos del desarrollo.³²

2.3.2. El quiste dentífero

El quiste dentífero (QD) es el quiste odontogénico del desarrollo más común y el segundo en frecuencia de todos los quistes odontogénicos, solo superado por el quiste inflamatorio periapical.³² Se origina del epitelio reducido del esmalte, una vez que la corona del órgano dentario se ha formado (Figura 10).^{32, 36}

Un QD se forma en el revestimiento del folículo dental, cuando un fluido se acumula entre el epitelio folicular y la corona de un diente en desarrollo o de un diente totalmente desarrollado sin erupcionar, dicho fluido puede acumularse entre las capas de epitelio o entre el epitelio y el esmalte de la corona dental.³² Esta lesión es más prevalente en adolescentes y adultos jóvenes, en donde la región de los molares es la más afectada. Usualmente, el QD se presenta como lesión solitaria que va de los 2 cm hasta una expansión masiva de la mandíbula; típicamente no produce dolor.³⁵

Radiográficamente el QD aparece como un área unilocular de osteólisis con bordes delgados y que está unida a la corona de un diente, que a la vez puede estar desplazado y observarse parcialmente reabsorbido, la superficie cortical del hueso afectado se aprecia expandida y adelgazada³² (Figura 10 y 11). La característica de mayor relevancia clínica, es su capacidad de reabsorción ósea y radicular, lo que le permite expandirse lentamente, capacidad que comparte con los tumores odontogénicos.^{6, 32, 35, 36}

Histológicamente, el QD está conformado como una cavidad tapizada de epitelio escamoso hiperplásico no queratinizado. Una capsula de tejido conectivo que puede contener infiltrado inflamatorio, da soporte al epitelio. Las células epiteliales de QD pueden aparecer de forma aplanada o cuboidal, con un grosor de 2 a 6 capas (Figura 12).³⁹

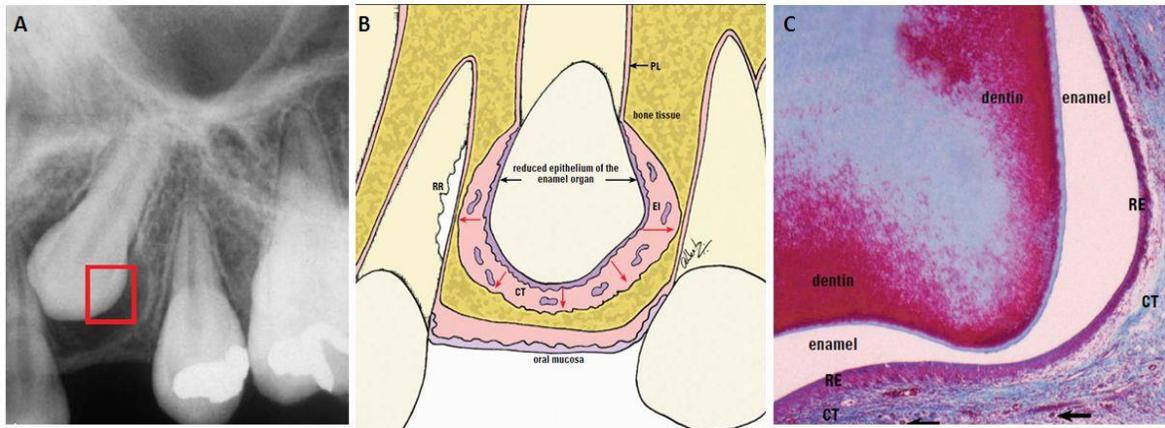


Figura 10. Origen del quiste dentígero. Un quiste dentígero se forma en el epitelio interno que reviste el folículo dental (epitelio reducido del esmalte), cuando un fluido se acumula entre este epitelio y la corona de un diente que aún no erupciona (A), dicho fluido puede acumularse entre las capas de epitelio o entre el epitelio y el esmalte de la corona dental (B y C). RE: Epitelio Reducido del Esmalte, CT: Tejido Conectivo. Tomada y modificada de: Alberto Consolaro. *Dental Press J Orthod* 15:4; 15-23, 2010.³⁷

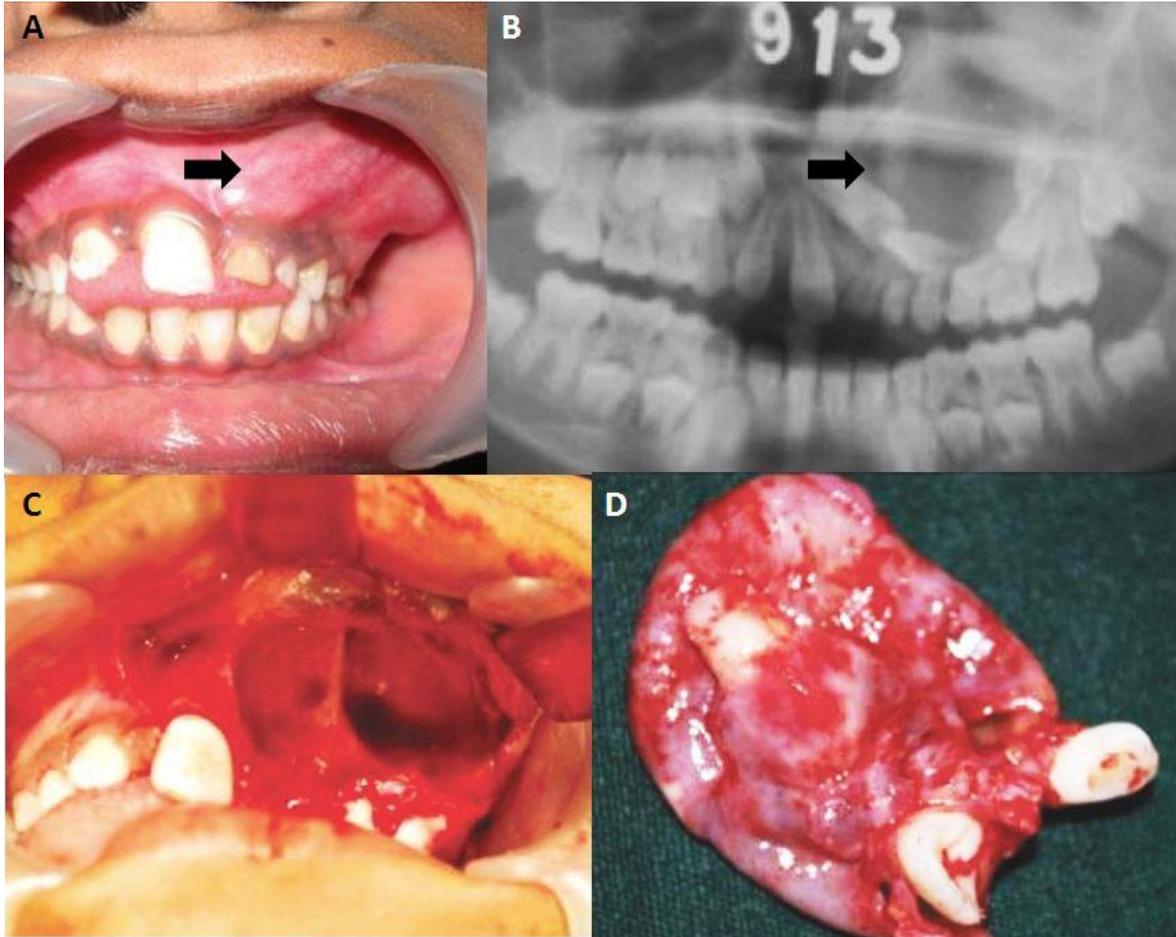


Figura 11. Quiste dentígero en un diente sin erupcionar. El quiste dentígero clínicamente puede observarse como un aumento de volumen en el área afectada cuando se trata de una lesión de gran tamaño (A), radiográficamente puede observarse una zona radiolúcida de bordes definidos y delgados adyacente a la corona de un órgano dentario que no ha erupcionado (B). El tratamiento es conservador a diferencia del tratamiento quirúrgico de los tumores odontogénicos ya que esta lesión está revestida por epitelio y por lo tanto encapsulada. La lesión frecuentemente es retirada en una sola pieza quirúrgica que incluye el diente del cual derivó (C y D). Tomada y modificada de KP Bharath. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 29: 99-103, 2011.³⁸

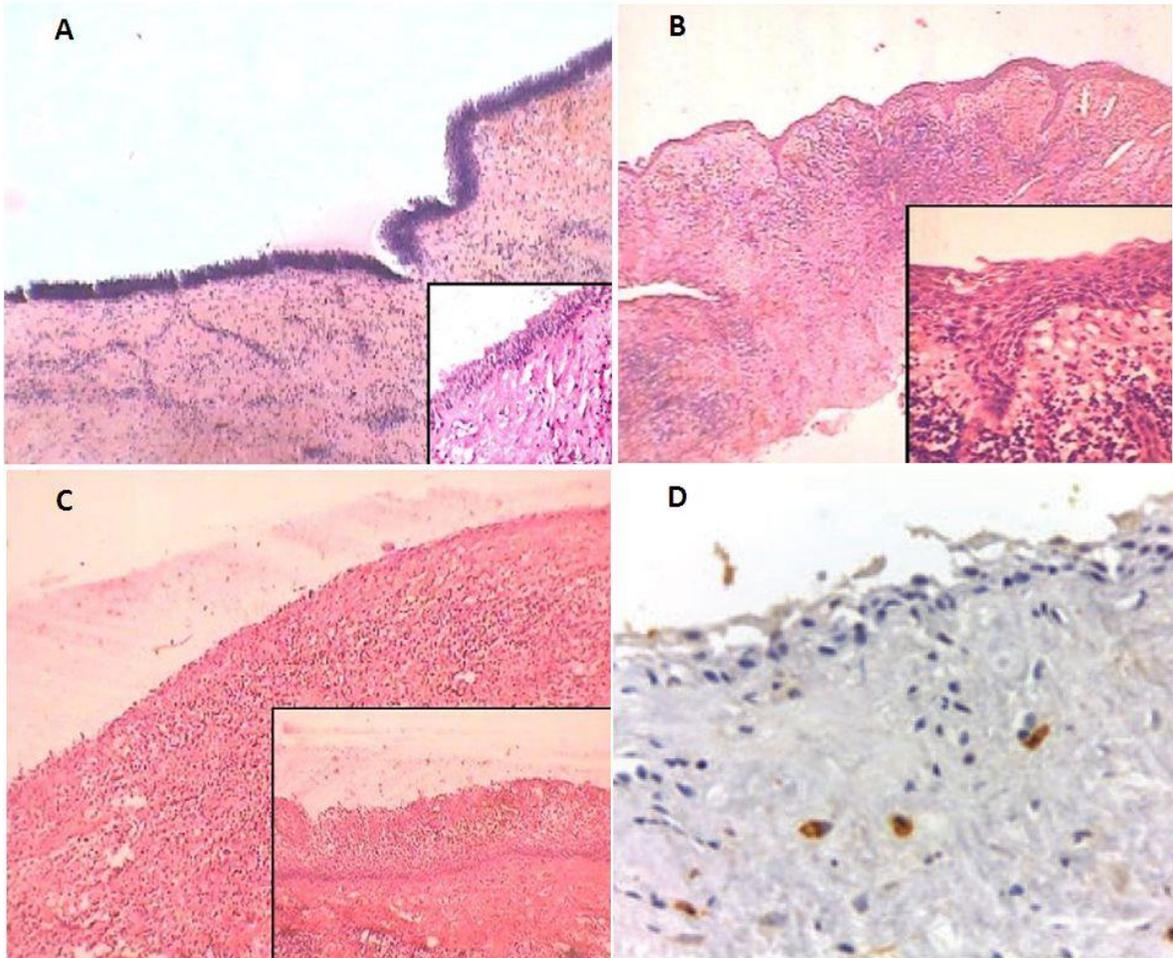


Figura 12. Histopatología del quiste dentígero. Histológicamente, esta lesión se compone de 2 a 6 capas de epitelio escamoso no queratinizado, sostenido por tejido conectivo fibroso. La morfología celular puede ser cuboidal o aplanada³⁹ (A, B y C) Tinción Hematoxilina y Eosina, magnificación original: 4x, recuadro: 10x. El tejido conectivo puede presentar infiltrado inflamatorio, en el panel D se observa inmunohistoquímica para visualización de mastocitos, anti-triptasa de mastocitos, magnificación 400x, contratinción Harris-Hematoxilina. Tomada y modificada de Ramandeep S. *Annals of Diagnostic Pathology* 2011.⁴⁰ y Noronha SN. *J Oral Pathol Med* 2012.⁴¹

3. ESTADO DEL ARTE.

3.1. Relación entre los tumores odontogénicos y los quistes odontogénicos

Cambios neoplásicos, si bien son raros, pueden darse a partir de los quistes dentígeros, convirtiéndose en un tumor odontogénico, ya sea benigno o maligno.^{6,}
⁴² Las neoplasias que pueden originarse a partir del revestimiento epitelial de los quistes odontogénicos incluyen al ameloblastoma, fibroma ameloblástico, tumor odontogénico epitelial calcificante, tumor odontogénico adenomatoide, odontoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma mucoepidermoide, esta transformación es más frecuente en el quiste dentígero.^{6, 32, 33, 35, 42-50}

En cuanto a los tumores malignos, la incidencia de los carcinomas que se originan de un quiste odontogénico es aproximadamente de 2 en 1000.⁵¹ Los criterios histopatológicos empleados para documentar la transformación maligna del epitelio de un quiste, es la identificación de una transición de epitelio normal a una displasia o un carcinoma.⁵² En un QD en el cual se ha desarrollado un tumor, histológicamente se observa tejido conectivo membranoso delineando al epitelio escamoso estratificado, este fenómeno es conocido como una neoplasia intraepitelial.⁴²

3.1.2. Relación entre el quiste dentígero y el ameloblastoma

En la pared de un QD pueden desarrollarse tumores odontogénicos benignos como ameloblastomas, tumores adenomatoides y tumores mucoepidermoides, así como tumores malignos como carcinomas.³² Clínica y radiográficamente el ameloblastoma uniuístico y el quiste dentígero son idénticos,⁴² de hecho, algunos tipos de ameloblastoma uniuístico que histológicamente presentan pequeñas islas de epitelio ameloblástico pueden ser erróneamente diagnosticados como QD, y suelen tratarse como un QD, llevando a cabo una enucleación simple, lo cual predispone a la reaparición del ameloblastoma.⁵³

Scholl y colaboradores³⁵ afirman que aproximadamente 50% de los ameloblastomas se originan de las paredes de un quiste dentífero (Figura 13), constituyendo una entidad bien definida llamada ameloblastoma mural, mientras que Shteyer y colaboradores argumentan que la transformación de un QD a un AM es un 85% de los casos y que la edad promedio de diagnóstico es a 21.8 años.⁵⁴

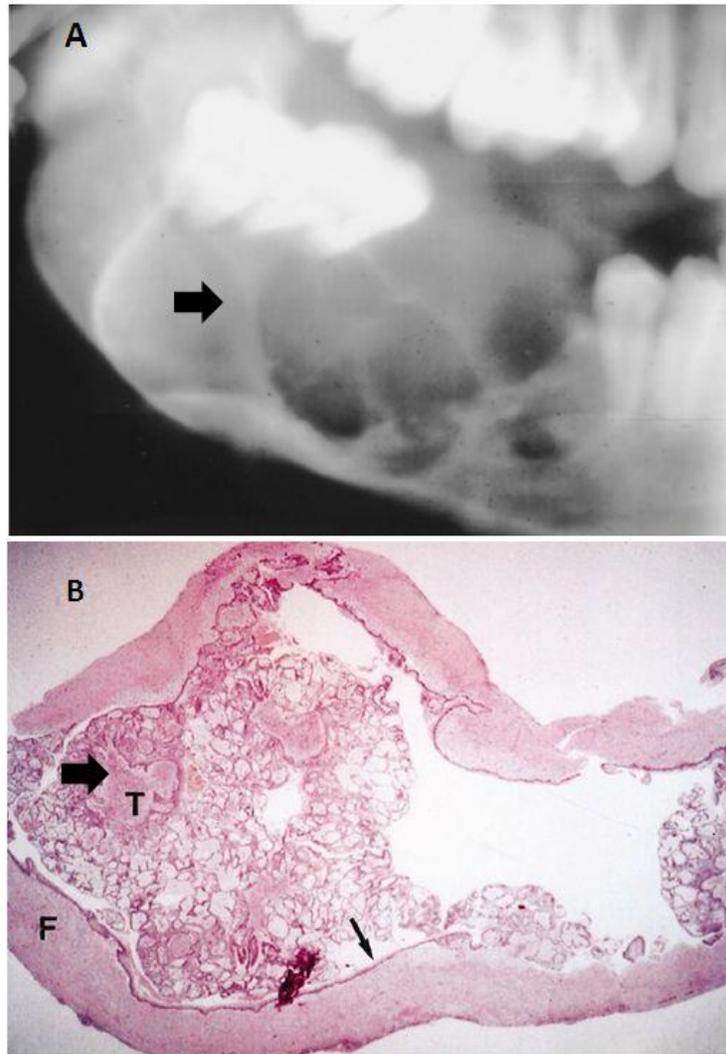


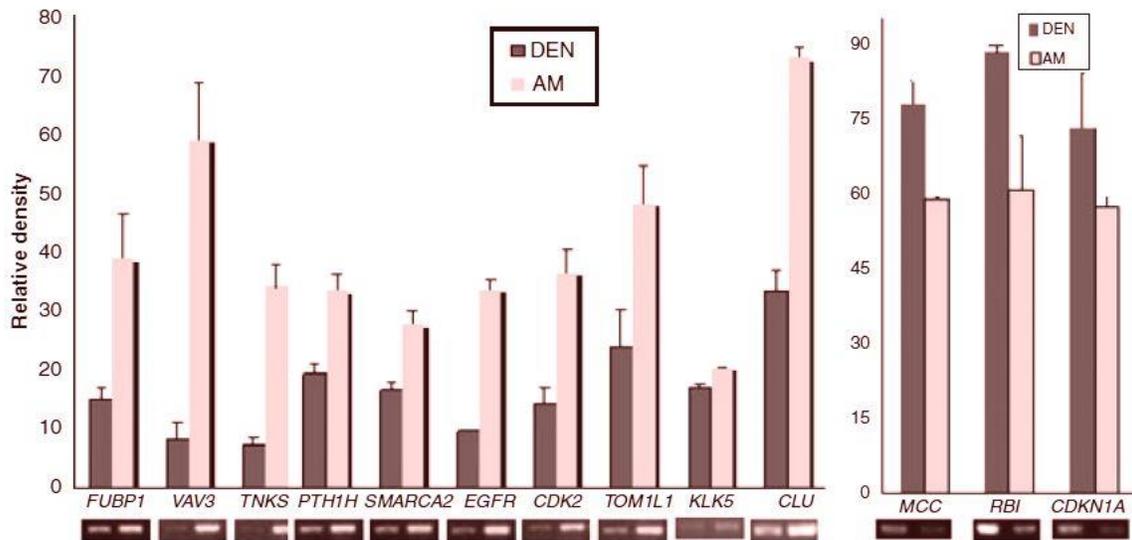
Figura 13. Ameloblastoma mural. Entre el 50% y el 85% de los ameloblastomas murales se originan en la pared de un quiste dentígero.⁵⁴ Radiográfica y clínicamente, el ameloblastoma mural es muy semejante a los ameloblastomas comunes y a los quistes dentígeros de gran tamaño (A). Histológicamente se observa la cavidad formada por el quiste, con crecimiento de una masa tumoral epitelial (M) hacia el interior. Una capa de tejido fibroso (F) rodea la lesión externamente (B). Tomada y modificada de Scholl JR. *RadioGraphics* 19: 1107-1124, 1999.³⁵

3.1.3. Perfiles de expresión génica de ameloblastoma y quiste dentígero.

Han sido analizados los perfiles de expresión del ameloblastoma. Estos estudios han comparado estos perfiles con los de gérmenes dentarios y con otros tumores odontogénicos.^{55, 56}

Sin embargo, bajo el hecho de que un QD puede tener una transformación neoplásica a AM, Jijun y colaboradores en 2006⁵⁷ compararon los perfiles de expresión génica de dos QD y dos AM. En dicho estudio, se hallaron en los AM 73 genes sobreexpresados y 49 genes con baja expresión en distintos procesos y funciones celulares. De estos, 10 genes sobreexpresados y 3 con baja expresión que pudieran ser considerados de importancia en la progresión a ameloblastoma fueron analizados por RT-PCR semicuantitativa (Figura 14, Tabla 3).⁵⁷

Muchos de los genes con baja expresión codifican citocinas o proteínas que están involucrados en la respuesta inmune e inflamación, así como genes codificantes de proteínas con la función de supresión de la tumorigénesis, como MCC (Mutado en Cancer Colorectal), RB1 (Retinoblastoma 1) y CDKN1A (Inhibidor de las Cinasas dependientes de Ciclinas 1A) ⁵⁷. La mayoría de los genes sobreexpresados codifican proteínas que están involucrados en el proceso de tumorigénesis, por ejemplo VAV3, que es un factor intercambiador de guanina y recientemente se ha demostrado sobrerregulado en la mitosis, TOMIL1 que es un sustrato de FYN miembro de la familia de las Cinasas Src y FUBP1 que es un factor de transcripción esencial para la expresión del protooncogen *c-myc*.⁵⁷



Genes sobreexpresados en ameloblastoma	Genes con baja expresión
FUBP1	MCC
VAV3	RB1
TNKS	CDKN1A
PTH1H	
SMARCA2	
EGFR	
CDK2	
TOMILI	
KLK5	
CLUSTERINA	

Figura 14 y tabla 3. Genes de importancia en la progresión de quiste dentígero a ameloblastoma. 13 de los 122 genes hallados desregulados mediante la comparativa de perfiles de expresión fueron considerados de importancia en la progresión de quiste dentígero a ameloblastoma. Estos fueron analizados por RT-PCR semicuantitativa. Tomada y modificada de Jijun Lim, *J Oral Pathol Med* 35: 278–285, 2006.⁵⁷

3.2. Cultivos celulares como modelos de estudio.

Los cultivos celulares son usados extensamente en investigación biomédica como modelos *in vitro*⁵⁹. Las técnicas requeridas para permitir que células crezcan y puedan mantenerse fuera del cuerpo fueron desarrolladas en el siglo XX.^{58, 59} Desde 1952 cuando apareció la primera publicación en donde se describía la línea celular HeLa,⁶⁰ miles de líneas celulares han sido establecidas representando un amplio espectro de tejidos normales y de enfermedades oncológicas humanas que han contribuido ampliamente en el entendimiento de la fisiología, bioquímica y biología molecular del humano. Se considera como cultivo primario al mantenimiento y crecimiento inmediato de células extraídas de un tejido en un medio de cultivo artificial y tras realizar el primer subcultivo con éxito es considerada ahora como una línea celular.⁵⁹

Los cultivos primarios de células normales tienen una vida proliferativa finita para después ingresar a un estado donde no existe división celular, estado conocido como senescencia, la cual es caracterizada por alteración en la expresión génica.⁶¹ La senescencia replicativa es dependiente del acumulativo de divisiones celulares y no del tiempo cronológico o metabólico celular, por lo tanto la proliferación está limitada por el número de mitosis.⁶² Ya que el ameloblastoma es un tumor benigno y el quiste dentígero es tejido “normal” es casi un hecho recurrir a la inmortalización de líneas celulares derivadas de ellas para tener un modelo de estudio, en donde la viabilidad de una caracterización detallada y de su uso por tiempos prolongados, no sea un impedimento.

3.2.1 Líneas celulares de tumores odontogénicos

Si bien los tumores odontogénicos son neoplasias, existen reportes de muerte por senescencia de cultivos primarios de ameloblastomas humanos.^{63, 65, 66} También existe un reporte de la inmortalización espontánea de una línea celular de mixoma odontogénico.⁶⁴ A continuación y en orden de fecha de publicación, son descritas

todas las líneas celulares de tumores odontogénicos humanos reportadas a la fecha.

3.2.2. Línea celular de ameloblastoma AM-1

Bajo las premisas de que ya habían sido reportados cultivos primarios de ameloblastomas humanos, de los cuales solo una mínima caracterización estructural había sido efectuada y que tras el fracaso en el establecimiento de líneas celulares de ameloblastoma en medio de cultivo libre de suero fetal bovino que finalmente desaparecían aproximadamente a los tres meses por senescencia, Harada y colaboradores en 1998⁶³ establecieron e inmortalizaron el primer cultivo de células epiteliales de un tumor odontogénico humano (AM-1) (Figura 15).

La transfección de células epiteliales de ameloblastoma mediante el uso del plásmido pMHPV16d (dímero cabeza-cola del genoma de HPV- 16) permitió inmortalizar el cultivo primario. (Figura 16). En este estudio se caracterizó el crecimiento de esta línea en matriz de colágeno, y se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico de diversos marcadores.⁶³

Esta línea celular es positiva a la expresión de citoqueratina (CK) 14, CK 18, CK19 y Bcl-2, pero negativa a la expresión de CK10 y amelogenina, además de la expresión de vimentina. AM-1 crece en superficies de colágeno provocando pérdida de su continuidad, penetrando hacia la matriz y formando estructuras semejantes a ductos⁶³ (Figura 16).

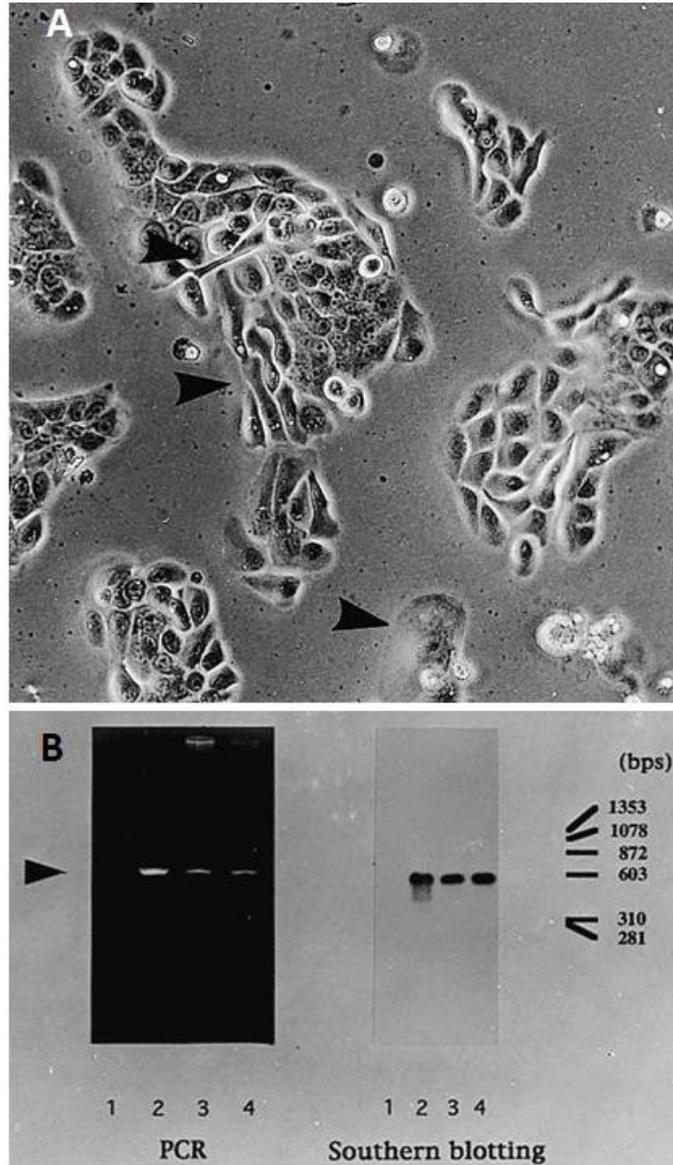


Figura 15. Línea celular AM-1. Las células de ameloblastoma AM-1 presentan una morfología poligonal (A). Mediante PCR y Southern blot fue analizada la presencia de RNA de HPV-16 (B), se observa la banda predicha en aproximadamente 603 pb. Carril 1, control negativo; carril 2, línea celular AM-1; carril 3, queratinocitos humanos transfectados con HPV-16; carril 4, línea celular de carcinoma cervico-uterino HPV-16+ (SiHa). Tomada y modificada de Harada H. *J Oral Pathol Med.* 5; 207-212, 1998.⁶³

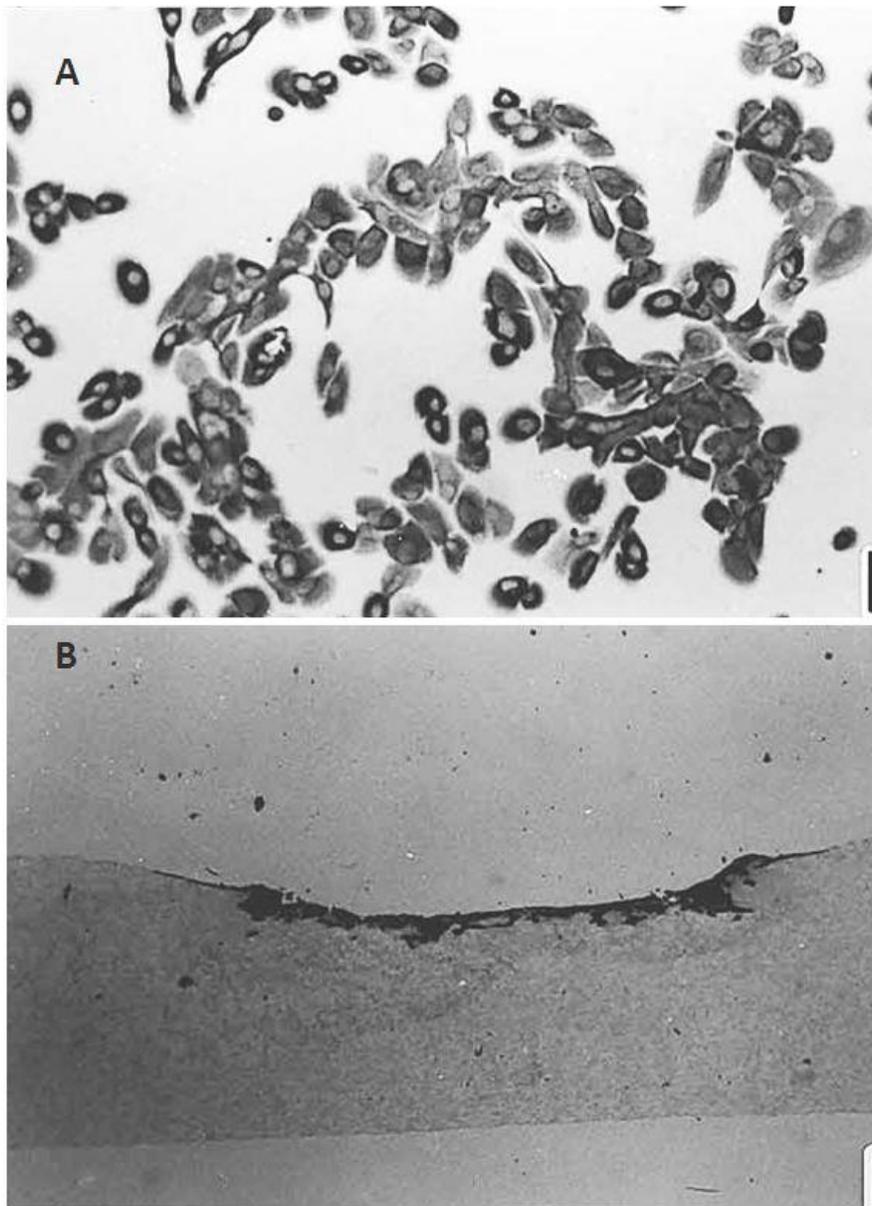


Figura 16. Caracterización de la línea celular AM-1. La caracterización de esta línea celular comprendió el análisis por inmunohistoquímica de las CK's 8, 14, 18 y 19 y el crecimiento en una matriz de colágeno. Se muestra una imagen representativa positiva para CK19 (A) y el patrón de socavado de crecimiento de las células en la matriz (B). Tomada y modificada de Harada H. *J Oral Pathol Med.* 5; 207-212, 1998.⁶³

3.2.3. Línea celular de mixoma Mix 1

La segunda línea celular reportada fue establecida para el tumor mixoma odontogénico en el año 2000 por Márcia Jaeger y colaboradores⁶⁴. De las líneas de tumores odontogénicos establecidas, la línea celular Mix 1 es la única en la que se reporta una inmortalización espontánea. A partir de un mixoma situado en el maxilar de una mujer de 19 años fue establecido este cultivo. Las células presentan una morfología alargada o estrellada y el tiempo de replicación fue de 2 días (Figura 17).⁶⁴

Tras el primer subcultivo, el cultivo primario de mixoma se transforma en línea celular, afirman los autores refiriendo a Freshney y cols.⁶⁷ Mix 1 fue caracterizada mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en las cuales se aprecia un patrón positivo para las proteínas vimentina, fibronectina, colágeno tipo I, tenascina y ácido hialurónico tal y como lo es inmunohistopatológicamente el mixoma. Mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión Mix 1 mostró células más grandes que las células del tumor de origen, con núcleo dentado, heterocromatina poco condensada y retículo endoplásmico dilatado, mientras que la matriz extracelular está caracterizada por arreglos filamentosos laxos e irregulares (Figura 17).⁶⁴

En 2008, Miyagi y colaboradores⁶⁸ realizaron el análisis de la expresión de las metaloproteinasas de matriz 2 y 9 (MMP2, 9) en el mixoma, argumentando el papel de estas metaloproteinasas en la invasividad y recurrencia de algunas neoplasias humanas, en dicho estudio se utilizó a Mix 1 como control, ya que retiene todas las características de los mixomas.⁶⁸

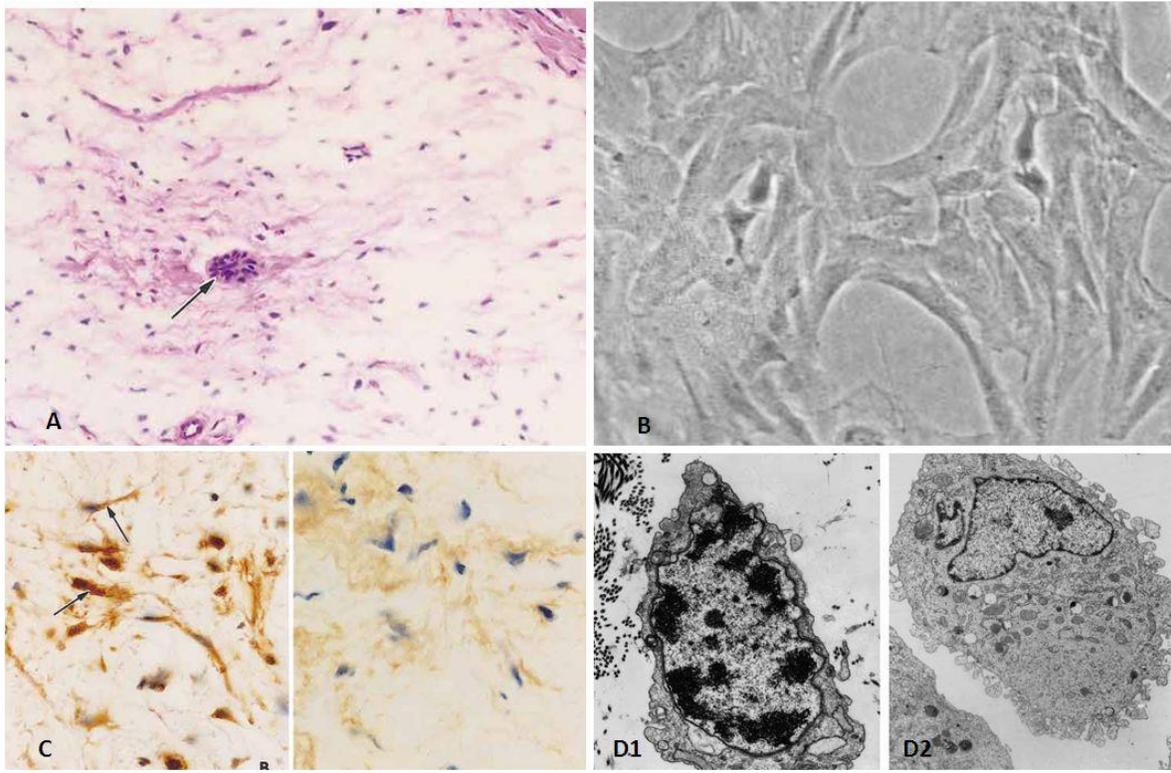


Figura 17. Línea celular Mix 1. Se muestra un corte histológico teñido con Hematoxilina y Eosina X400, del tumor original del que fue tomada la línea celular, en dicha imagen se muestran pequeñas islas de restos epiteliales odontogénicos (A). La morfología de Mix 1 es alargada o estrellada, se muestra una microfotografía en contraste de fases X400 en B. El panel C muestra dos tomas representativas de inmunohistoquímicas para vimentina y fibronectina correlacionando con la expresión de las mismas en cortes histológicos de mixoma. En el análisis ultraestructural se observa que las células de Mix 1 son de mayor tamaño que células del tumor original, además de heterocromatina poco condensada y retículo endoplásmico dilatado. Tomada y modificada de Jaeger M, Santos. *J Oral Pathol Med.* 29: 3; 129-38, 2000.⁶⁴

3.2.4. Línea celular de ameloblastoma AM

La segunda línea celular de ameloblastoma (AM) fue establecida por inmortalización a través de la reactivación de la función de la telomerasa reversa transcriptasa (hTERT)⁶⁵ luego de la observación de que las células derivadas de ameloblastoma tienen una vida muy corta asociada a senescencia celular. Esta línea fue originada de un tumor de un paciente masculino de 57 años de edad correspondiente a un ameloblastoma sólido de tipo plexiforme.⁶⁵

La inmortalización de la línea celular AM, como ya se había mencionado, fue reactivando la función de la hTERT mediante transfección con el vector retroviral pLXSN-hTERT y seleccionadas con G418 a 800mg/ml durante dos semanas. A partir del subcultivo número 6 esta línea fue analizada inmunohistoquímicamente para citoqueratinas y su crecimiento mediante ensayos de proliferación. AM muestra expresión fuerte de CK5, CK6 y CK8 y débil para vimentina,⁶⁵ lo cual demuestra el origen epitelial de AM. Además fue analizada la expresión de p53, p21, p16 y hTERT, teniendo como única diferencia a comparación de células no transfectadas, la pérdida de la expresión de p16 y la obvia ganancia de la expresión de hTERT.⁶⁵

En cuanto a la proliferación, AM hTERT+ muestra una rápida proliferación con un periodo de división de 23.5 horas; hasta el momento del reporte AM permaneció viable durante 100 subcultivos sin expresión de β -galactosidasa (no senescente), mientras que las células no transfectadas murieron en el subcultivo 6 por senescencia (Figura 18).⁶⁵

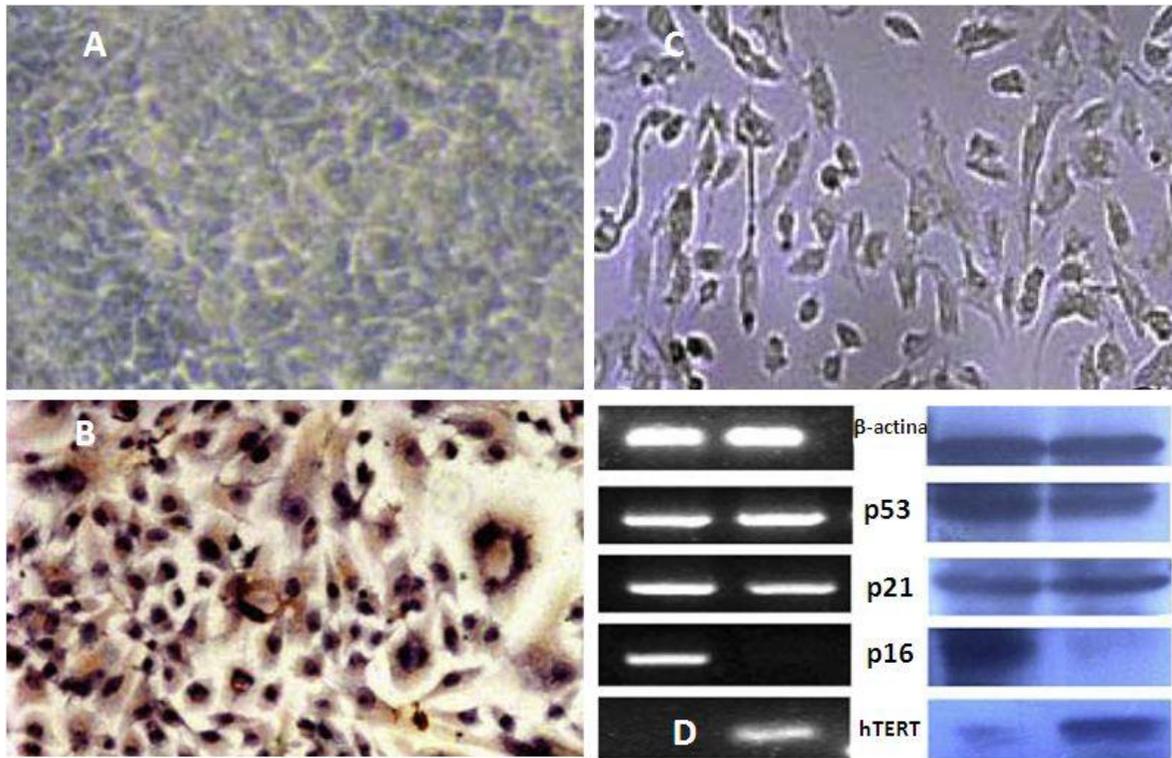


Figura 17. Línea celular AM. La línea celular AM se originó de un ameloblastoma solido plexiforme, su morfología celular es poligonal o estrellada (A), la expresión positiva a CK5, CK6 y CK8 asegura que la línea establecida es de origen epitelial tal y como lo es el ameloblastoma (B). A partir del sexto subcultivo, las células que no fueron transfectadas murieron por senescencia. Se observa la expresión de β -galactosidasa por inmunohistoquímica, enzima involucrada en el proceso de senescencia (C). El análisis de proteínas de importancia en el ciclo celular como p53, p16 y p21 fue analizada mediante RT-PCR y Western blot, solo la expresión de p16 sufrió una caída en células transfectadas con hTERT (D). Tomada y modificada de Tao Q. *Oral Oncology* 45:12; 239-44, 2009.⁶⁵

3.2.5. Líneas celulares de ameloblastoma HAM1, HAM2 y HAM3

Recientemente se ha publicado el establecimiento de tres líneas celulares (HAM1, HAM2 y HAM3) como modelos de estudio para la formación de esmalte, es decir tres líneas celulares derivadas de ameloblastos, interesantemente estas líneas celulares fueron originadas de epitelio dental derivado de un ameloblastoma.⁶⁶

El cultivo primario fue derivado de un ameloblastoma de un hombre de 26 años, la morfología celular, al igual que en las líneas AM-1 y AM, consistió de células poligonales. La inmortalización de las tres clonas derivadas de esta línea celular se llevó a cabo mediante la transfección con vector retroviral de la ciclina dependiente de cinasa 4 (Cdk4) pSR α MSU y para hTERT el vector retroviral pMXpuro-hTERT.⁶⁶

La caracterización de estas clonas consistió en el análisis de la expresión génica por RT-PCR de los marcadores CK14, CK18, Msx2, Jagged1, Notch, Sp3, Sp6 y ALP, estos marcadores son expresados en el epitelio del órgano del esmalte en las etapas embrionarias de la formación de los dientes.⁶⁵ Dichos marcadores fueron detectados en las tres clonas, al igual que ameloblastina y enamelina,⁶⁶ proteínas que regulan la adhesión, proliferación y diferenciación de los ameloblastos. Para el caso de amelogenina, proteína que secretan los ameloblastos en etapa madura o no embrionaria, no se encontró expresión del mRNA por RT-PCR ni de la proteína por inmunohistoquímica en ninguna de las clonas⁶⁶ (Figura 20).

Al momento del reporte, ninguna de las clonas de estas líneas celulares expresaron β -galactosidasa,⁶⁶ lo cual confirma la inmortalización mediada por hTERT. El tiempo de duplicación establecido fue de 28.8 horas para HAM1, 21.3 horas para HAM2 y 22.1 horas para HAM3, mientras que la observación por microscopía electrónica mostró un núcleo de gran tamaño y citoplasma con tonofibrillas y ausencia de desmosomas en los contactos célula-célula, datos que corresponden físicamente a la descripción de los ameloblastos (Figura 19).⁶⁶

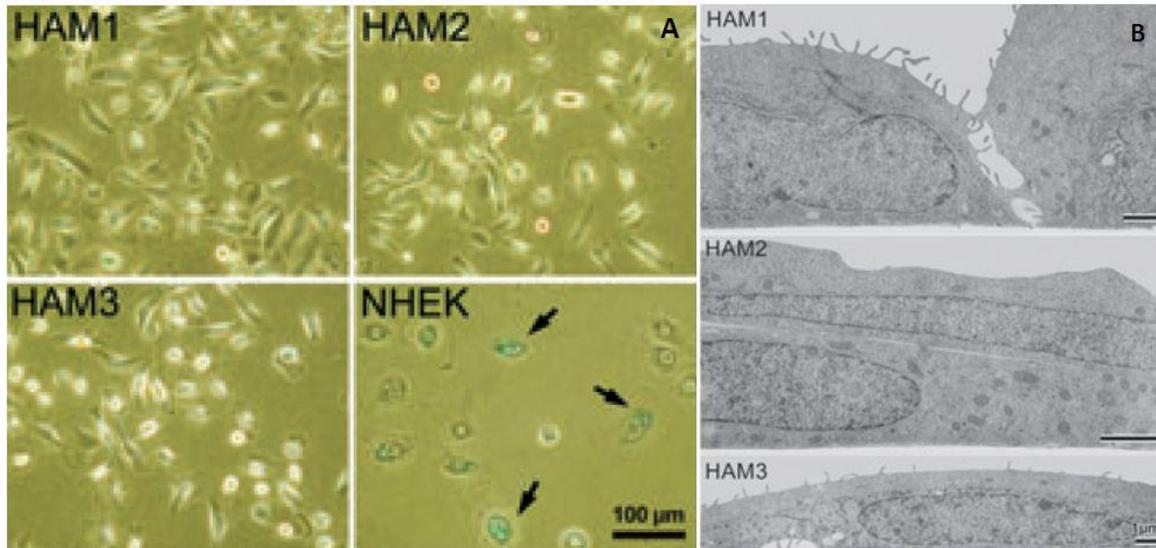


Figura 19. Líneas celulares de ameloblastoma HAM1, HAM2 y HAM3. La morfología de las clonas celulares HAM1, HAM2 y HAM3 es poligonal y alargada. La imagen muestra una inmunohistoquímica para la detección de β -galactosidasa en células transfectadas con cdk4 y hTERT y en células NHEK; tras 5 subcultivos las células NHEK muestran acumulación de β -galactosidasa provocando muerte por senescencia, mientras que para HAM1-3 no se observan depósitos (A). En B se muestra una micrografía electrónica demostrando núcleos relativamente alargados, tonofibrillas en el citoplasma y ausencia de desmosomas. Tomada y modificada de Hatakeyama S. *J Oral Pathol Med* 40:3; 227-234, 2011.⁶⁶

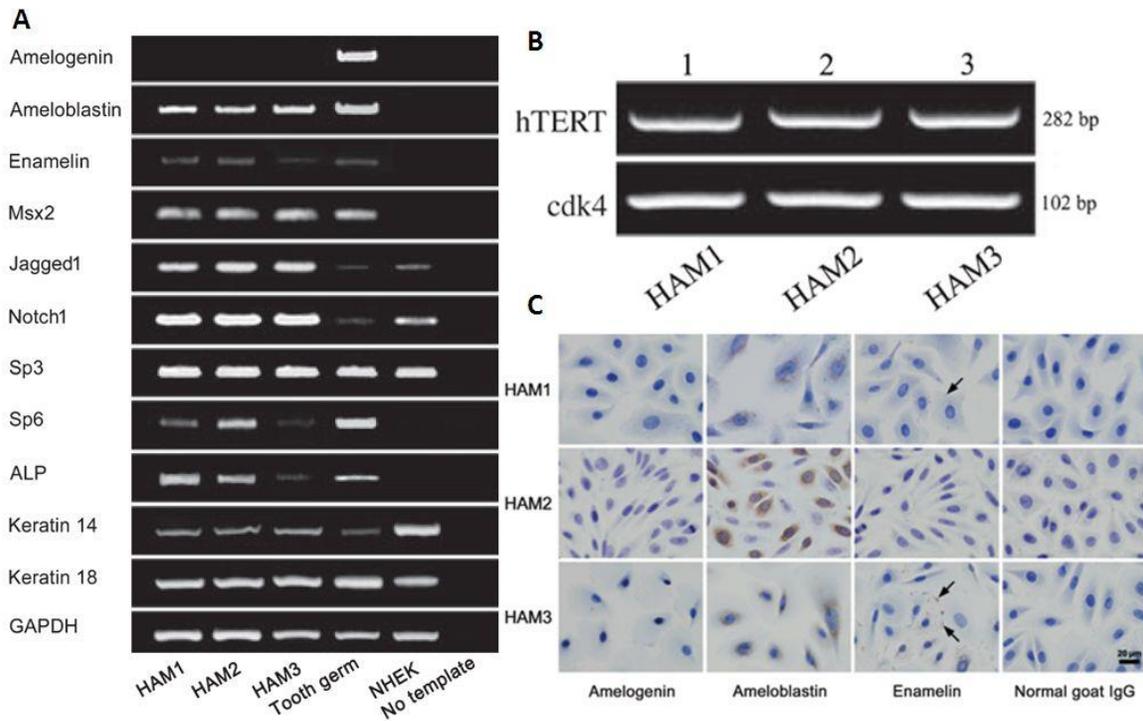


Figura 20. Caracterización HAM1, HAM2 y HAM3. El panel A muestra la expresión de mensajeros mediante RT-PCR de genes que son marcadores del epitelio dental del germen dentario en el proceso de embriogénesis dental. En B se muestra la expresión positiva para hTERT y cdk4 en las tres clonas transfectadas. Se analizó mediante inmunohistoquímica la presencia de proteínas de matriz del esmalte, se observó que la ameloblastina está presente claramente en el citoplasma de las tres líneas, mientras que la enamulina se localiza en la porción marginal de las clonas HAM1 y HAM3 (flechas), pero no en HAM2. En el caso de la amelogenina, esta no fue detectada para ninguna clona. Tomada y modificada de Hatakeyama S. *J Oral Pathol Med* 40:3; 227-234, 2011.⁶⁶

3.2.6. Línea celular de odontoma mOd.

El odontoma es un tumor odontogénico en el que prolifera tanto el epitelio odontogénico, como el mesénquima odontogénico.⁶ Hatano y colaboradores⁶⁹, han establecido e inmortalizado la primera línea celular de este tumor a partir de un fragmento de un odontoma quirúrgicamente removido de una paciente del sexo femenino. El cultivo celular obtenido constó de dos tipos celulares morfológicamente distintos, uno que era semejante a fibroblastos y otro en el que las células eran redondeadas, como típicamente se presentan los cultivos epiteliales.

Mediante la técnica de dilución clonal y separación selectiva de células epiteliales, mediante EDTA, los autores aislaron las células alargadas semejantes a fibroblastos, es decir, el mesénquima odontogénico. Esta línea celular fue nombrada mOd, (Figura 21).⁶⁹

Tras autenticar la línea celular mediante el perfil de STR's (del inglés Short Tandem Repeat), los autores analizaron marcadores de interés en ingeniería de tejidos para células mesénquimales. La línea celular mOd es positiva la expresión de fosfatasa alcalina (ALP).⁶⁹ Además, esta línea celular presentó expresión de sialoproteína de hueso (BSP), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN) y colágeno tipo I (COL1) X, todos ellos asociados a la formación de hueso. mOd también tiene capacidad de expresar marcadores que son considerados odontogénicos, tales como la proteína derivada de cemento (CP-23), sialofosfoproteína de dentina (DSPP), fosfoproteína de dentina (DSP), Distal-less homeobox 3 (DLX3) y las proteínas formadoras de hueso 2 y 6 (BMP2, BMP6) (Figura 21).⁶⁹

Interesantemente, la línea celular mOd presenta sobreexpresión de hTERT, a diferencia de células de la biopsia original,⁶⁹ así que esta línea es considerada inmortal. La importancia de esta línea celular discutida por los autores, radica en dos sentidos. Por un lado, es un modelo de estudio útil de la naturaleza de los odontomas y por otro lado provee de un modelo de estudio de la odontogénesis en sí, esto de la mano con su posible uso en ingeniería de tejidos, para generar estructuras reconstructivas de tejidos dentales.⁶⁹

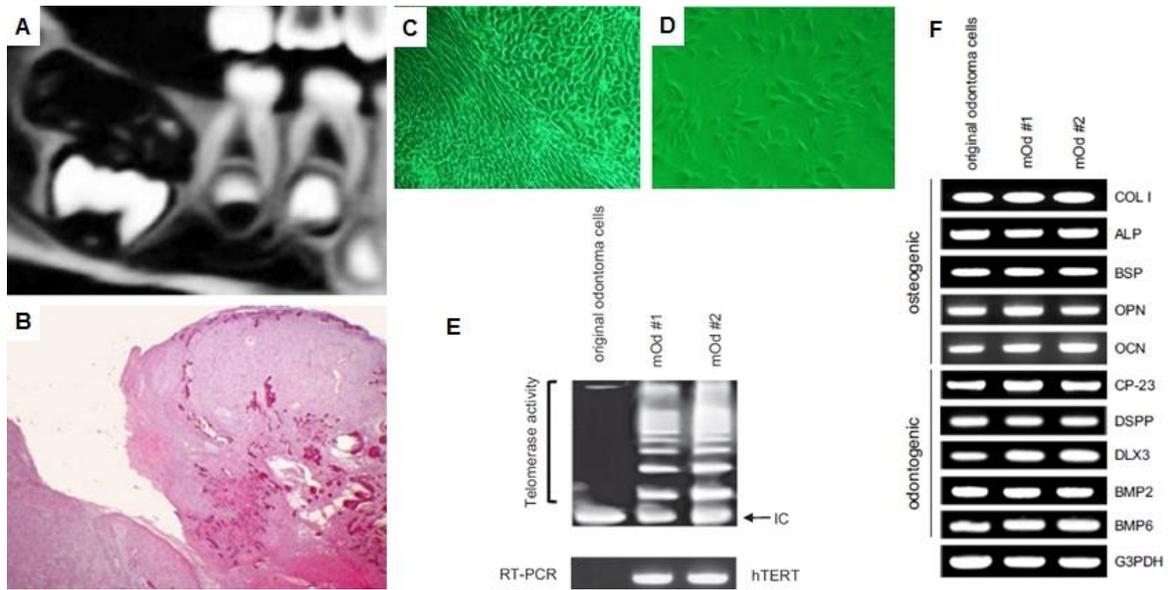


Figura 21. Línea celular de odontoma mOd. A partir de un odontoma mandibular de un paciente femenino fue establecida la línea celular mOd. El panel A muestra la tomografía de la tumoración adyacente a un tercer molar inferior retenido, en B se aprecia el análisis histopatológico, que consiste de material típico odontogénico, hueso, dentina cemento y esmalte. El cultivo presentó dos tipos celulares (C y D). Esta línea se considera como una inmortalización espontánea, ya que presenta sobreexpresión de la hTERT, en comparación con las células originales de la biopsia, el panel E, muestra un ensayo de actividad enzimática de la hTERT, en él se observa la ausencia de actividad en células de la biopsia original, mientras que en los subcultivos 100 y 200 de la línea mOd (mOd#1 y mOd#2) se observan los fragmentos de sintetizados por la enzima hTERT en forma de escalera. El panel F muestra los diferentes marcadores que expresa la línea celular y que se mantiene a diferentes tiempos de cultivo. Estos marcadores están asociados tanto a la formación de hueso, como a la de estructuras dentales. Tomada y modificada de Hatano H. *Oral Diseases*, 18:8; 756-62, 2012. ⁶⁹

3.2.7. Línea celular del Tumor Odontogénico Epitelial Calcificante CEOT.

El Tumor Odontogénico Epitelial Calcificante (TOEC) es un tumor raro de origen epitelial, está caracterizado por la presencia de material amiloideo y es localmente invasivo y agresivo. ⁶

Recientemente Amm y colaboradores ⁷⁰ han establecido una línea celular del TOEC, a partir de fragmentos de una biopsia de un paciente de 28 años de edad con diagnóstico de TOEC en la zona posterior del hueso maxilar. Tras confirmar clínica, radiográfica e histopatológicamente el diagnóstico de TOEC, los autores procedieron a cultivar células obtenidas de la biopsia por la técnica de explantes. El cultivo celular fue nombrado población CEOT.⁷⁰

Para corroborar el origen epitelial de la población celular que se obtuvo, se analizó la presencia de citoqueratinas CK14 y CK17 mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, las cuales mostraron una tinción uniforme positiva, mientras que CK14 también fue analizada mediante qRT-PCR, (Figura 22). Además se analizaron otros marcadores de epitelio dental como la proteína de matriz del esmalte (EMP), amelogenina (AMGN), ameloblastina (AMBN), amelotina (AMTN), enamulina (ENAM) y proteína odontogénica asociada a ameloblastos (ODAM); todas ellas presentaron expresión positiva en la población de células CEOT. ⁷⁰

De manera consistente con las propiedades del tumor del cual derivan, las células CEOT son capaces de incorporar xilenol, compuesto ampliamente utilizado como indicador de mineralización *in vivo*.⁷⁰

En la población CEOT se hallaron dos mutaciones en el gen de la ameloblastina (AMBN) y dos SNP's (del inglés Single Nucleotide Polymorphisms) en el gen PTCH1.⁷⁰

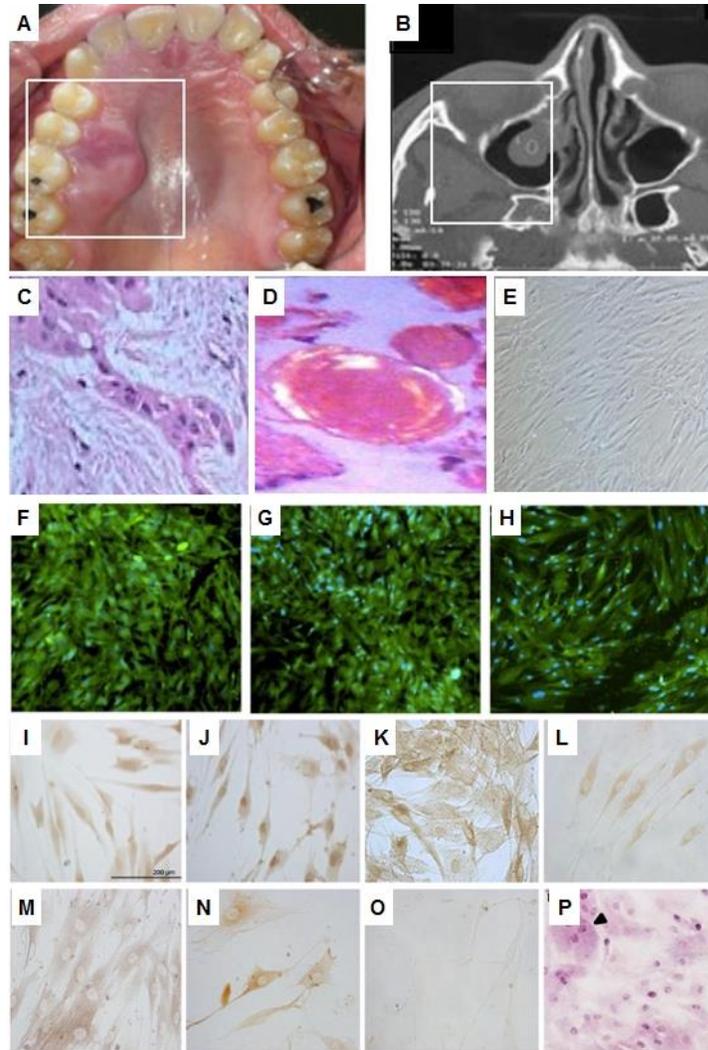


Figura 22. Línea celular CEOT. A. El paciente presentaba aumento de tamaño y dolor en la zona maxilar superior derecha posterior, el diagnóstico incluyó tomografía (B) y el estudio histopatológico confirmó la presencia de cordones epiteliales en una matriz amiloidea (C) y presencia de zonas calcificadas (D). En E, se observan células alargadas de la población CEOT. El panel F muestra la tinción con anticuerpo panqueratinas (CK14 y CK17), mientras que el panel muestra la inmunofluorescencia de CK14 y CK17 de manera individual respectivamente. I. AMBN, J. AMGN, K. AMTN, L. ENAM, M. ODAM, N. PTCH, O. control negativo representativo y P muestra una tinción de hematoxilina y eosina en donde se señala una célula gigante característica de este tumor. Tomada y modificada de Amm M, *J. Oral Pathol and Med*, 43:3; 183-190, 2014.⁷⁰

4. JUSTIFICACIÓN

La baja frecuencia de lesiones odontogénicas, incluyendo los tumores odontogénicos, dificulta el diseño de estudios de búsqueda de blancos para su tratamiento, ya que difícilmente se puede obtener una muestra lo suficientemente representativa. Actualmente y en contraste con otros tipos de tumores humanos, existe un nulo conocimiento de fármacos o blancos terapéuticos que puedan ser utilizados o adyuvantes en el tratamiento de estas neoplasias. Sumado a todo lo anterior, el desconocimiento de las bases moleculares que participan en el desarrollo de estas lesiones, hacen indispensable el establecimiento de líneas celulares como modelos de estudio y la búsqueda en ellas de moléculas que podrían estar involucradas en cualquiera de las etapas del desarrollo y progresión de dichas lesiones.

5. HIPÓTESIS

El establecimiento de líneas celulares de tumores odontogénicos y de quiste dentígero, permitirá tener modelos de estudio para realizar una búsqueda de las moléculas que podrían estar involucradas en su patogénesis.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Establecer y caracterizar líneas celulares de tumores odontogénicos y de quiste dentígero.

6.2. Objetivos específicos

- 1- Establecer cultivos primarios de tumores odontogénicos y de quiste dentígero.
- 2- Caracterizar fenotípicamente las líneas obtenidas mediante la evaluación de marcadores que expresan los cultivos.

- 3- Caracterizar ultraestructuralmente algunas de las líneas celulares establecidas.
- 4- Analizar la presencia de actividad proteolítica en las secreciones de la línea celular de quiste dentígero.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

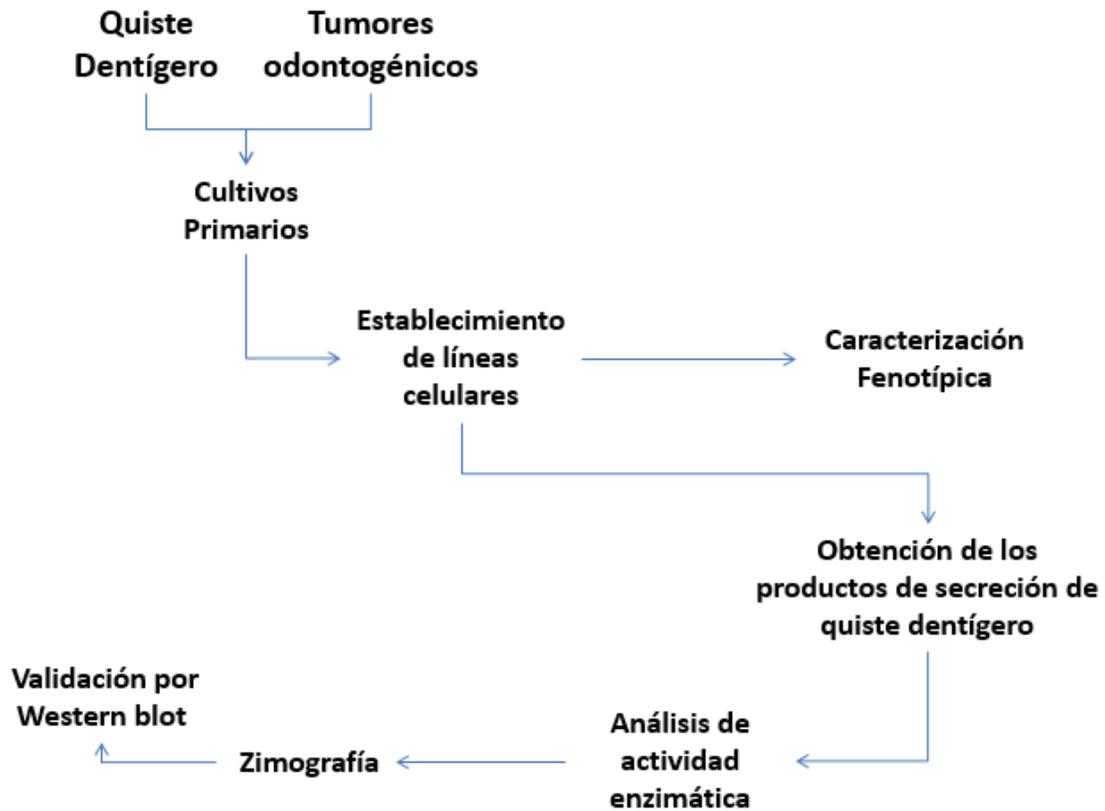


Figura 22. Estrategia experimental general. A partir de tejido fresco de tumores odontogénicos y de quiste dentígero se procedió a realizar cultivos primarios, con los cuales, fueron establecidas líneas celulares como modelos de estudio *in vitro*. Tras el establecimiento de las líneas celulares se procedió a caracterizarlas fenotípicamente.

8. METODOLOGÍA

8.1. Obtención y mantenimiento de los cultivos primarios de ameloblastoma, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentífero.

A partir de lesiones frescas obtenidas en colaboración con el Hospital Juárez de México se obtuvieron los cultivos primarios. Durante el acto quirúrgico, inmediatamente después de retirar las lesiones en los maxilares, ya sea ameloblastoma, tumor odontogénico queratoquístico o quiste dentífero, se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm³ y se colocaron en 2 ml de medio DMEM (Gibco, BRL) con solución de penicilina (100UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml) (Gibco; Life Technologies) a 4°C. Las muestras se transportaron a las instalaciones del CINVESTAV, en donde en ambiente estéril se procedió a cortar la lesión en secciones de aproximadamente 1mm³ con tijeras de iris y bisturí y a colocarlas en cajas de 6 pozos con medio de cultivo y 2% de colagenasa. Se incubaron a 37°C durante 2 horas y se centrifugaron a 153 xg, durante 5 min a 4°C, la pastilla celular se lavó dos veces con solución PBS centrifugando cada vez a 153 xg, durante 5 min a 4°C y finalmente se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM, DMEMF12 y medio RPMI (Gibco, BRL) suplementados con 5, 10 y 15% de Suero Fetal Bovino, penicilina (100UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml). Finalmente, las células se incubaron a 37°C, 5% CO₂ hasta la formación del cultivo y que llegarán a 80% de confluencia para iniciar el subcultivo.

8.1.2. Subcultivo de líneas celulares

Para subcultivar las células, se inició desechando el medio de cultivo y se lavaron las células PBS 1x, pH 7.0. Posteriormente se retiró el PBS y se agregó PBS 1x, pH 7.0-EDTA 6.8 mM. Se añadió tripsina 0.25 % (Gibco, BRL) y se distribuyó homogéneamente durante 5 min. En paralelo se agregó medio de cultivo fresco a una caja de cultivo nueva y se rotuló apuntando nombre de línea celular, número de pase y día. Una vez transcurridos los 5 min de incubación con tripsina se visualizó en microscopio el completo despegado de las células. Posteriormente se agregó

PBS 1x adicionado con suero fetal bovino (SFB) 1% mezclando con ayuda de una pipeta sobre toda la superficie. Entonces se transfirieron las células despegadas a un tubo falcón de 15 ml y se centrifugaron a 153 xg por 5 min a 4°C. Tras desechar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco, para a continuación agregarlas a la caja de cultivo con medio nuevo.

8.1.3. Congelamiento de las líneas celulares

En general, se emplearon aproximadamente 2×10^6 células por criotubo. El cultivo se procesó de manera similar a cuando se realiza un subcultivo sustituyendo el último paso de resuspensión en 1 ml de medio fresco. En su lugar, se agregó 1 ml de medio de congelamiento (500 μ l de SFB, 400 μ l de medio de cultivo completo y 100 μ l de DMSO). A continuación se cerró herméticamente el criotubo y se colocó en hielo durante aproximadamente 5 min, para finalmente transportar los tubos a -80°C, para su almacenamiento.

8.1.4 Descongelamiento de las líneas celulares

Se retiraron los criotubos de -80°C, se limpiaron con benzal y rápidamente se colocaron en baño húmedo a 37°C hasta el descongelamiento del medio. Una vez que el medio se descongeló, se transfirió el contenido a un tubo falcón y se centrifugó a 153 xg, durante 5 min a 4°C. Posteriormente se desechó el medio de congelamiento y se resuspendieron las células en medio suplementado fresco previamente templado a 37°C y se colocaron en cajas de cultivo.

8.2. Extracción de proteínas de los cultivos celulares

Las muestras se homogenizaron en 0.960 ml de solución RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% Triton X-100, 1% SDS) a 4°C mezclado con 40 μ g de cóctel inhibidor de proteasas 20 (COMPLETE ROCHE), la homogenización se llevó a cabo con agitación en hielo durante 15 minutos. El producto homogenizado se centrifugó a 20,817 xg durante 5 min a 4°C. Con el sobrenadante recuperado se procedió a realizar la cuantificación de proteínas.

8.3. Cuantificación de las proteínas purificadas.

Se atemperó la solución de Bradford (Pierce Chem) de 4°C (temperatura de almacenamiento) a temperatura ambiente, se preparó una curva estándar con proteína BSA (Bovine Serum Albumin) con rango de 0 a 25 µg/µl, colocando cantidades de 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 y 25 µl de BSA a concentración conocida de 1 mg/ml, así como la cantidad suficiente de NaCl para alcanzar un volumen total de 20 µl. De las muestras de proteínas totales problema se colocaron 1 µl. Posteriormente se adicionaron 500 µl solución de Bradford y se incubaron durante 3 min. Los estándares y la muestra se mezclaron perfectamente durante 20 s utilizando vórtex y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. La absorbancia de los estándares y la muestra de extractos se midieron en espectrofotómetro (Beckman Coulter, DU800) a 595 nm. El estándar número 1 (0.0 µg de proteína) se utilizó como blanco. Después de cuantificar los extractos totales se analizó su integridad en geles SDS-PAGE al 12%, normalmente se colocaron en cada carril 40 µg de proteínas purificadas.

8.4. Ensayos de Western blot

40 µg de muestra de extractos totales de proteínas obtenidas de las líneas celulares fueron calentadas a 90°C durante 5 min y cargadas con micropuntas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% para continuar con la separación proteica por electroforesis. Posteriormente, el gel se equilibró en 20 ml de amortiguador de transferencia (25 mM de Tris, 190 mM glicina, 20% metanol) durante 10 min. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda con una corriente de 350 mA durante 1 h. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con 25 ml de PBS- leche 5% durante 1 h. Las membranas fueron lavadas en dos ocasiones con 25 ml de PBS-Tween 0.1% durante 2 min. Después de esto, las membranas fueron incubadas con anticuerpo primario diluidas en PBS, anti-PCK (dilución 1:3300, Abcam), anti-ODAM (dilución 1:1000, Abcam) o anti-FGFR-4 (dilución 1:400, Abcam). Después, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (dilución 1:10,000 o 1: 20:000, GeneTex,

Irvine) en PBS-Tween 0.1% durante 1 hora. Las membranas se lavaron en tres ocasiones durante 10 min con 25 ml de PBS-Tween 0.1%. La unión del anticuerpo primario con la proteína de interés fue evidenciada mediante quimioluminiscencia y autoradiografía usando el kit ECL (Amersham) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

8.5. Análisis de la expresión del RNAm de los blancos seleccionados

El análisis de la expresión de los blancos seleccionados se realizó por RT-PCR como se describe a continuación.

8.5.2. Aislamiento del RNA total

El aislamiento del RNA total se realizó por extracción con una mezcla de fenol - isotiocianato de guanidina utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor. Brevemente, la pastilla celular se lisó con 200 μ l de TRIzol, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se adicionaron 40 μ l de cloroformo. Después de mezclar vigorosamente para homogenizar, se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 xg durante 15 min para obtener en la fase acuosa al RNA, el cual se precipitó con 100 μ l de isopropanol y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (TA). Se centrifugó a 12,000 xg durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de RNA, se lavó con etanol al 75%. Nuevamente se centrifugó a 12000 xg por 15 min y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla de RNA se secó durante 5 a 10 min a TA y se resuspendió en agua libre de ribonucleasas (agua tratada con dietilpirocarbonato). El RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm. La integridad del RNA se analizó en geles de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio (BrEt).

8.5.3. Síntesis del DNA complementario

Para sintetizar el DNA complementario (DNAc) se incubó 1 μ g de RNA total con 10 unidades de DNasa libre de RNasas (Roche) durante 10 min a 37 °C para así eliminar el DNA contaminante. Posteriormente, se inactivó la DNasa I adicionando 1 μ l de EDTA 25 mM a cada tubo de reacción y se incubó a 65 °C durante 15 min. A continuación se adicionó una mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 2

mM de c/u, 100 ng de oligonucleótido dT₁₈, amortiguador de reacción para la enzima Superscript II™ de Invitrogen (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 1mM), DTT 10 mM y 40 unidades del inhibidor de RNAsa RNASEOUT (Invitrogen) y se incubó a 27 °C durante 3 min. Posteriormente, se adicionaron 200 unidades de enzima transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen) y la mezcla se incubó a 42 °C durante 90 min para que la retrotranscriptasa sintetizará el DNAc. Finalmente, las muestras se guardaron a -20°C para su almacenamiento.

8.5.4. Amplificación de los genes seleccionados mediante PCR

El DNA genómico de las líneas celulares establecidas se extrajo utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) siguiendo las condiciones establecidas por el fabricante. Este DNA se utilizó para estandarizar las condiciones de amplificación por PCR de los genes de interés. La mezcla de reacción consistió de amortiguador de PCR 1x (Invitrogen), dNTPs 2 mM de c/u, 1.5 mM MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 100 ng de DNA genómico, agua, y 10 nM de los oligonucleótidos (Tabla 4). La temperatura de alineamiento fue de 54.9°C para el gen MME y de 56°C para OPN.

8.5.5. Análisis de los productos de PCR por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Los productos amplificados correspondientes a los genes seleccionados, así como los controles correspondientes fueron resueltos mediante PAGE al 6% en amortiguador TBE 1X. El gel posteriormente se tiñó con BrEt y se visualizó en transiluminador UV.

8.6. Microscopía electrónica de transmisión

Las células provenientes de un quiste dentígero (DeCy-1) fueron sembradas en cajas de cultivo de 30 mm, estas fueron crecidas hasta que lograron confluencia del 100% y formaron una monocapa. Las células fueron fijadas con 2.5% (v/v) de glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences) en 0.1 M de amortiguador de cacodilato de sodio, pH 7.2, durante 1 h. Subsecuentemente se realizó una postfijación durante 1 h con tetraóxido de osmio a 1% (w/v). La deshidratación

celular se llevó a cabo con concentraciones gradualmente incrementadas de etanol y óxido de propileno. Las células DeCy-1 fueron embebidas en resina epoxi polybed (Polysciences Inc.) que fue polimerizada a 60°C por 24 h. Finalmente, fueron obtenidas secciones de 60 nm, que fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las preparaciones fueron analizadas en el microscopio electrónico Joel JEM 1011.

8.7. Zimografía en sustrato de gelatina.

Las células DeCy-1 fueron sembradas en cajas de cultivo de 100 mm hasta alcanzar el 80% de confluencia, el medio de cultivo original fue descartado y sustituido por medio de cultivo DMEM/F12 sin suero fetal bovino. Inicialmente, la viabilidad de las células DeCy-1 fue analizada mediante ensayos de MTS (CellTiter 96 AQ, Promega) a diferentes tiempos de ayuno de suero, con el fin de elegir un tiempo con adecuada viabilidad, para recolectar el medio condicionado. El sobrenadante de las células DeCy-1 fue recolectado a las 48 h, filtrado (Millex 0.2 μ m, Millipore) y colocado en frascos de liofilización. El producto de liofilización fue resuspendido en 1 ml de PBS. Dicho sobrenadante fue analizado en geles de poliacrilamida al 10%, para ello, a 25 μ l del sobrenadante resuspendido le fueron agregados 5 μ l de amortiguador no reductor (Tris 62.5 M, Glicerol 25%, SDS 4%, y Azul de Bromofenol 0.01%, pH 6.8) y sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con 1mg/ml de gelatina (Sigma-Aldrich) o 1mg/ml de caseína (Fisher Scientific). Los geles fueron lavados con 2.5% de tritón X-100 para remover el SDS. Los geles fueron incubados en amortiguador de activación (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, CaCl₂ 5mM, 0.05% NaCl) durante 15 h a 37°C en agitación suave. Los geles fueron fijados en metanol al 30% y teñidos con azul de Coomassie G-250 en ácido acético al 10% y metanol al 7%. El sobrenadante también fue analizado mediante western blot contra tubulina (dilución 1:5000, Cell Signaling Technology) para descartar la presencia de células lisadas en el sobrenadante.

Gen	Secuencia del oligonucleótido
AMELX (NM_001142.2)	S: 5'-gccaacactccatgactcca-3' AS: 5'-gatggccaagcttcagagt-3'
MME (NM_000902.3)	S: 5'-gctgtggggaggctttatgt-3' AS: 5'-ctgggcactaaagaaggggg-3'
OPN (NM_000582.2)	S: 5'-gccgaggtgatagtgtggtt-3' AS: 5'-aacggggatggccttgtatg-3'

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en los ensayos de RT-PCR. Oligonucleótidos iniciadores usados para la amplificación de los genes de amelogenina X (AMELX), metaloendopeptidasa de membrana (MME o CD10) y osteopontina (OPN) fueron amplificados.

S: Oligonucleótido Sentido.

AS: Oligonucleótido Antisentido.

9. RESULTADOS

9.1. Muestras

Se establecieron un total de 12 cultivos (Tabla 5). De estos, cuatro correspondieron a ameloblastomas (AM), de los cuales tres fueron clasificados histopatológicamente como del tipo sólido, mientras que solo uno como unicístico. A su vez, cinco de los tumores que fueron utilizados para establecer cultivos, correspondieron a tumores odontogénicos queratoquísticos (TOQ). Además, un total de tres quistes dentígeros (QD) fueron usados para establecer cultivos. La edad promedio de los pacientes de los cuales fueron tomados los tejidos fue de 32.58 años. Siete pacientes corresponden al sexo masculino y cinco al femenino.

La mayoría de las biopsias usadas tuvieron gran tamaño (mayor a 8 cm), mientras que solo 4 midieron entre 2 y 5 cm. Solo en un caso se desconocía la presencia de nódulos linfáticos inflamados, mientras que en los once casos restantes, no presentaron inflamación en ganglios adyacentes a la zona de la tumoración, característica indicativa de ausencia de metástasis y/o transformación maligna.

Pacientes	Número
Pacientes	12
Tipo histopatológico:	
Ameloblastoma	4
- Sólido	3
- Uniquístico	1
Queratoquístico	5
Quiste dentígero	3
Sexo:	
Femenino	5
Masculino	7
Edad:	12 – 49 p= 32.58
Tamaño	
Menor a 2 cm	0
2 a 5 cm	4
Mayor a 5 cm	8
Estado nodular	
N0	11
N1	0
N2	0
Sin datos	1

Tabla 5. Características de los pacientes y de las biopsias.

9.2. Obtención de los cultivos primarios de tumores odontogénicos y quistes dentígeros.

Después de llevar a cabo el cultivo primario de los tumores odontogénicos y quistes dentígeros, se procedió a subcultivarlos. Las células de los cultivos de AM presentaron forma poliédrica redondeada, mientras que los cultivos de QD y de TOQ presentaron forma alargada (Figura 24).

Cuando hubo una evidente falta de división celular, una acumulación de estructuras atípicas en los citoplasmas, aunado a cambios de morfología y a desadherencia de un gran número de células, se consideró ese número de subcultivo como el último viable. Para los cultivos de ameloblastoma (AMELO), el número de subcultivos máximo fue de 12, correspondientes a los cultivos AMELO-3 y AMELO-4. De los cultivos de QD (Dentigerous Cyst, DeCy), actualmente la línea DeCy-1 contabiliza 52 subcultivos, mientras que de los cultivos de tumor odontogénico queratoquístico (Odontogenic Keratocystic Tumor, OKT), los llamados OKT-4 y OKT-5 fueron los cultivos de mayor número de subcultivos, presentaron 19 y 21 pases respectivamente. (Figura 25).

Debido al mejor establecimiento de la línea DeCy-1, a continuación de describirá a detalle su obtención y caracterización.

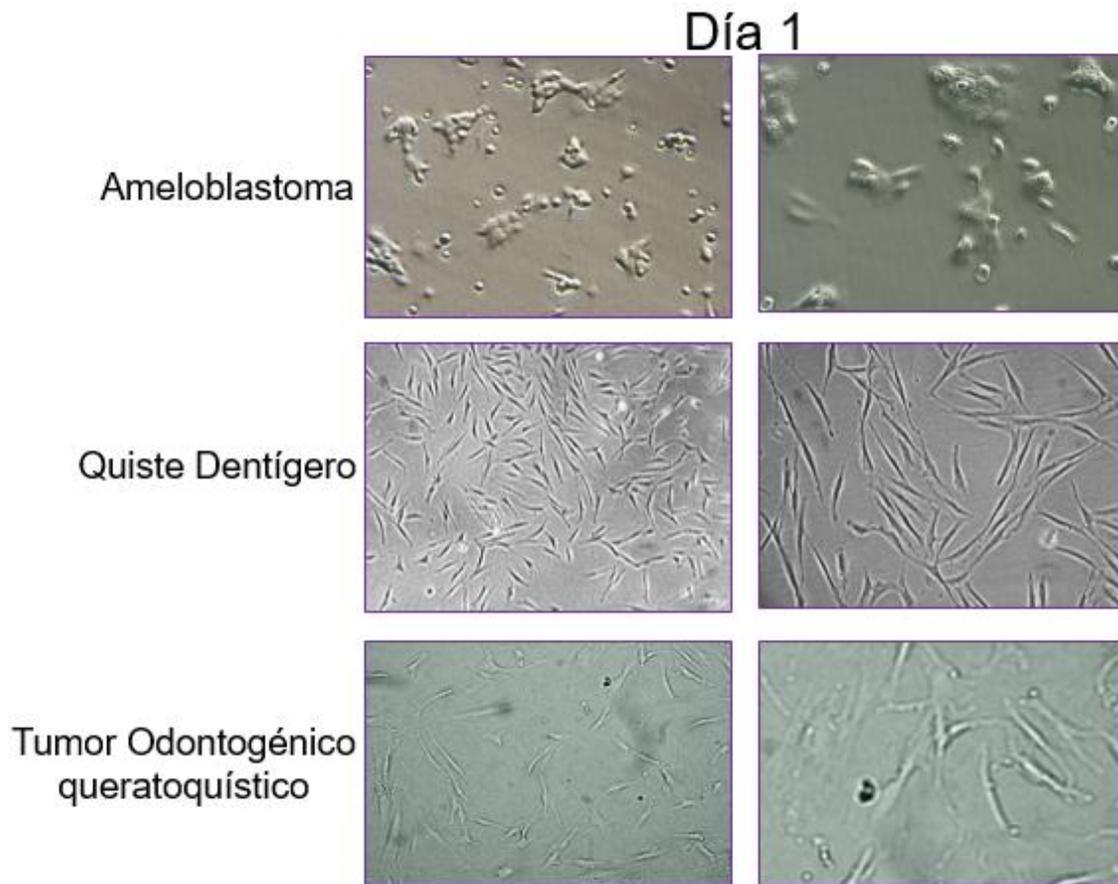


Figura 24. Características morfológicas representativas iniciales de los cultivos celulares. Se establecieron cultivos de ameloblastoma, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero. Mientras que los cultivos de quiste dentígero y tumor queratoquístico presentaron morfología alargada, los ameloblastomas presentaron morfología redondeada poligonal. Microfotografía 10 y 40X, primera y segunda columna respectivamente.

Promedio de subcultivos antes de la caída de viabilidad

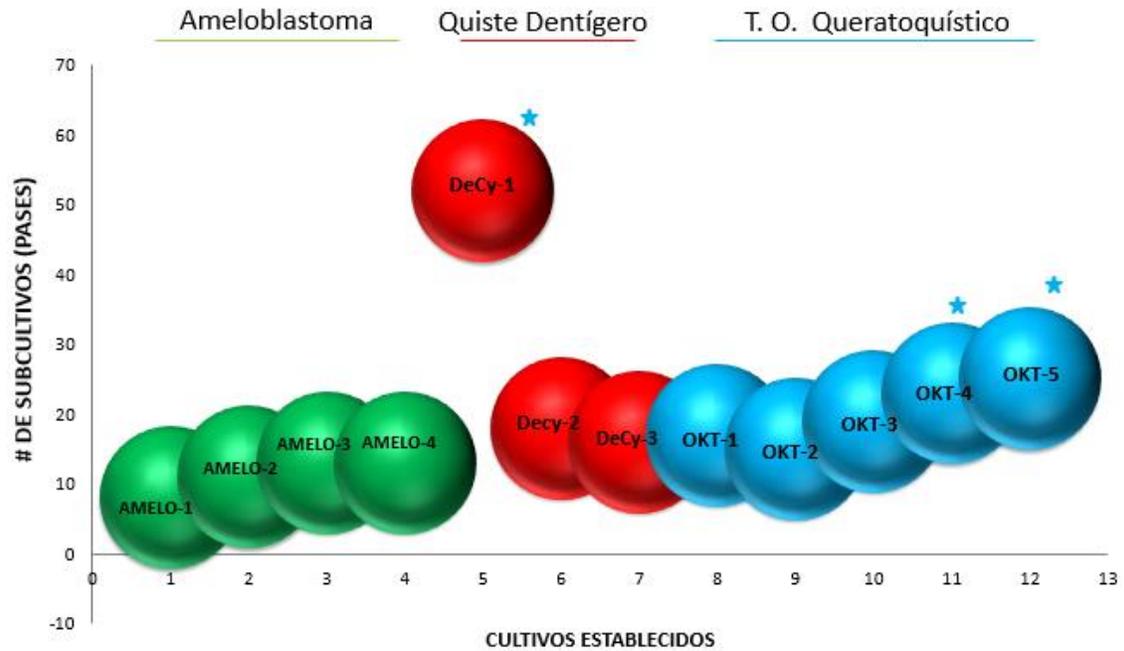


Figura 25. Número de subcultivos con células viables. En total fueron establecidos 12 cultivos, estos fueron subcultivados hasta alcanzar un límite visible de viabilidad. * Los cultivos celulares OKT-4, OKT-5 y DeCy-1, fueron los únicos viables después de 20 subcultivos.

9.3. Obtención del cultivo primario de quiste dentígero (DeCy-1).

Esta línea se obtuvo de la lesión de un paciente masculino de 44 años de edad, bajo consentimiento informado. El paciente llegó a consulta por molestias no relacionadas al quiste dentígero, y después de ser sometido a radiografías de gabinete y biopsia excisional fue diagnosticado con quiste dentígero, dicho paciente no presentaba otras enfermedades sistémicas o bucales significativas. En la radiografía de proyección ortopantomográfica se observa una zona radiolúcida rodeando la corona del tercer molar inferior izquierdo retenido (Figura 26). La tinción con hematoxilina y eosina reveló que la lesión estaba compuesta de unas seis capas de epitelio sostenido por una gruesa capa de tejido conectivo, ligeramente infiltrada por células inflamatorias (Figura 26).

Tras la tripsinización del tejido del quiste dentígero, este fue sembrado en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y Penicilina/Estreptomina en incubadora de ambiente húmedo a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂. Después de 16 horas, se apreciaron las primeras colonias en crecimiento, de un total de cinco cajas de 25 cm² sembradas, tres de ellas presentaron crecimiento de células. Estas fueron nombradas “DeCy-1” un acrónimo de Dentigerous Cyst, seguido del número “1” denotando el primer cultivo de quiste dentígero obtenido.

9.4. Morfología de las células DeCy-1 y tiempo de duplicación celular.

Las células DeCy-1 presentan morfología ligeramente triangular y alargada de aproximadamente 100 μm de largo por 20 μm de ancho, presentan prolongaciones citoplasmáticas (Figura 27, a). Las células DeCy-1 fueron subcultivadas 6 veces antes de realizar la cinética de duplicación celular. A partir de un número conocido de células sembradas inicialmente, se realizaron mediciones del número de células después de transcurrir 24, 48, 72, 96 y 120. Con estos datos se determinó que el cultivo de células DeCy-1 se duplicó en 91.68 horas, es decir en 3.82 días (Figura 27, b).

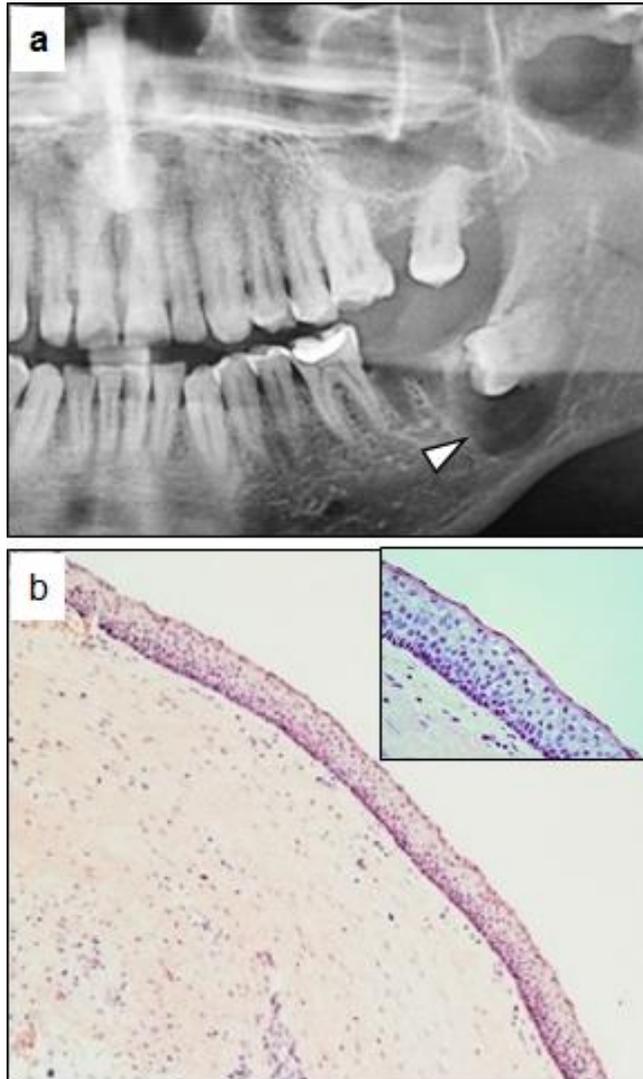


Figura 26. Lesión de donde se obtuvo el cultivo celular Dentigerous Cyst 1 (DeCy-1). El paciente fue diagnosticado con quiste dentígero después de realizada la radiografía y el estudio histopatológico de la biopsia. A) La radiografía muestra una zona radiolúcida rodeando la corona del tercer molar inferior izquierdo retenido. B) El estudio histopatológico muestra alrededor de 6 capas de epitelio sostenidas por un grueso tejido conectivo.

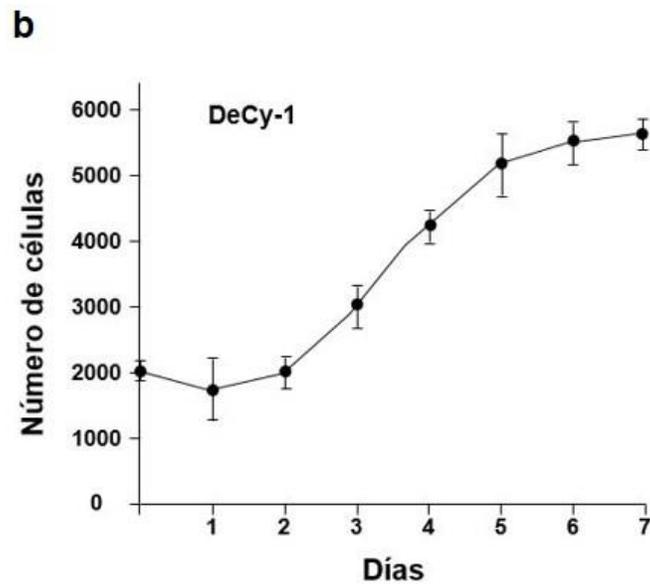
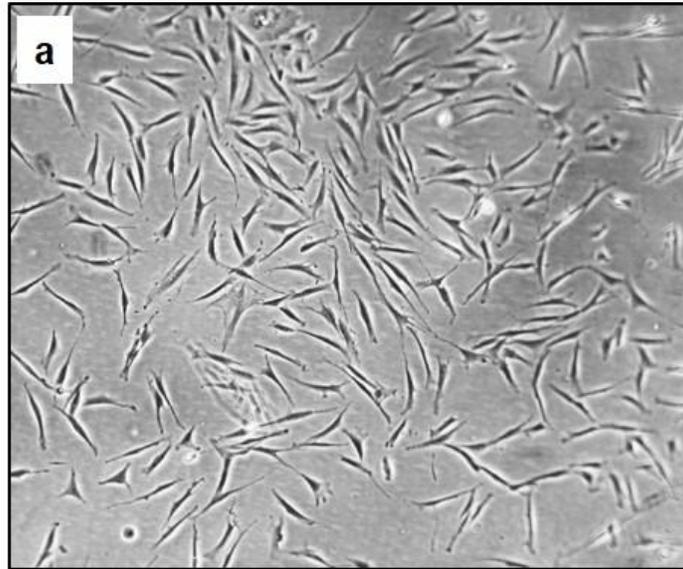


Figura 27. Obtención de la línea celular de DeCy-1 y tiempo de duplicación del mismo. A) Las células DeCy-1 presentan morfología ligeramente triangular y alargada. B) DeCy-1 duplica su población en 3.82 días.

9.5. El cultivo celular DeCy-1 expresa marcadores epiteliales, pero no expresa marcadores de fibroblastos.

El cultivo celular DeCy-1 presenta morfología alargada, característica de células tipo fibroblastos. Por lo que inicialmente las células fueron analizadas en busca de la expresión del Receptor del Factor de Crecimiento de los Fibroblastos 4 (RFCF-4). Este receptor es específico de fibroblastos y no se presenta en células epiteliales. Los resultados mostraron que las células DeCy-1 no expresaron RFCF-4, mientras que fibroblastos de ratón de la línea NIH3T3 mostraron una tinción positiva para esta proteína (Figura 28).

El resultado anterior sugirió entonces que las células DeCy-1 son de origen epitelial. Para comprobar esto se decidió analizar la expresión de citoqueratinas, ya que estas se expresan exclusivamente en células epiteliales. De inicio, el análisis de las citoqueratinas se llevó a cabo mediante inmunocitoquímica. Para ello se utilizó un anticuerpo comercial que contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales contra las citoqueratinas 5, 6 y 8. En estos ensayos se observó tinción uniforme positiva en las células DeCy-1 (Figura 29), confirmando que estas células son de origen epitelial. Interesantemente, la tinción de citoqueratinas en DeCy-1 fue uniforme tanto en citoplasma como en el núcleo, un evento inusual, ya que las citoqueratinas son proteínas de filamento intermedio del citoesqueleto. El análisis inmunohistoquímico con los mismos anticuerpos en células TOQ-1 (línea proveniente de un tumor quístico queratinizante) mostró una tinción distinta. En las células TOQ-1 se observó expresión positiva en citoplasma, pero no en el núcleo (Figura 29).

Para confirmar este hallazgo también se realizó el análisis de expresión de citoqueratinas utilizando inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. En esta ocasión se utilizaron células AMELO-2 y células HeLa como control de células epiteliales. En este ensayo, analizando diferentes cortes ópticos, también las células DeCy-1 mostraron expresión citoplasmática y nuclear de citoqueratinas, mientras que las células AMELO-2 y HeLa solo presentaron expresión citoplasmática (Figura 30).

Continuando con el análisis de la expresión de citoqueratinas, para confirmar que las células DeCy-1 son epiteliales, se procedió a analizar si las tres citoqueratinas estaban presentes en las células DeCy-1 mediante ensayos de Western blot. Estos experimentos confirmaron la expresión de las tres citoqueratinas (CQ5 de 52 kDa, CQ6 de 55 kDa y CQ8 de 58 kDa) en las células DeCy-1, aunque la expresión de CQ8 fue menor en comparación con las células HeLa usadas como control positivo (Figura 31). Las células AMELO-2 también mostraron expresión de las tres citoqueratinas con menor expresión de CQ8, mientras que las células NIH3T3, usadas como control negativo, no mostraron expresión de citoqueratinas (Figura 31).

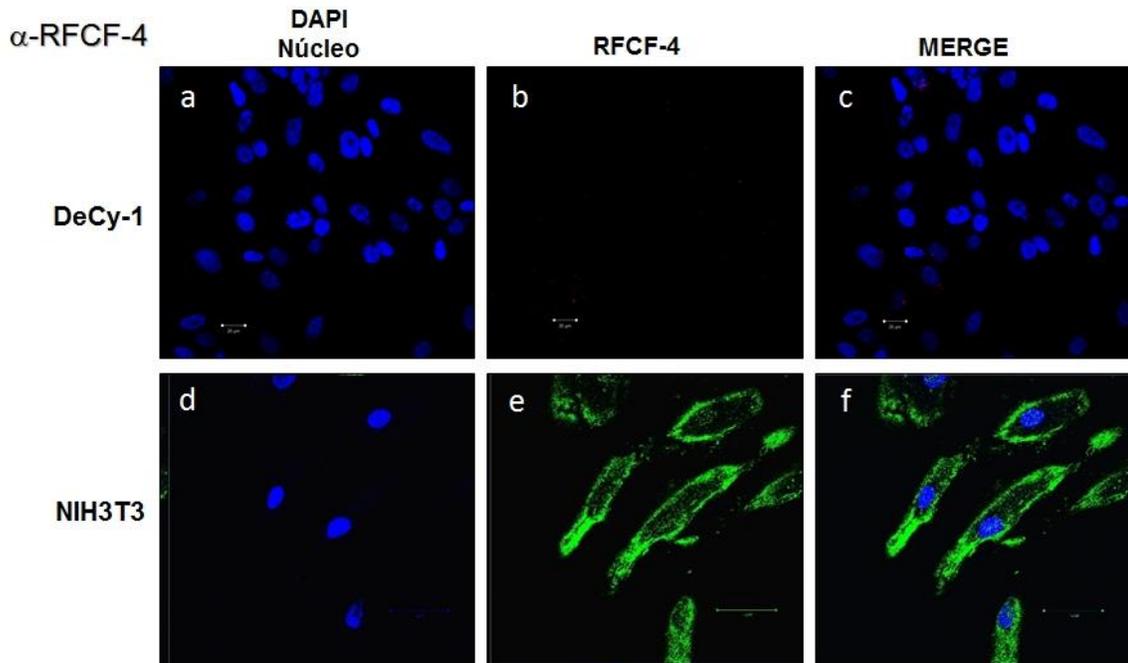


Figura 28. Las células DeCy-1 no expresan al RFCF-4. La expresión del marcador de fibroblastos RFCF-4 en células DeCy-1 se analizó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. En los paneles a, b y c se muestran las células DeCy-1 y los paneles d, e y f muestran las células NIH3T3 (fibroblastos de ratón) utilizadas como control positivo. Los paneles b y e muestran el canal verde ($\lambda=488$ nm) para la visualización del RFCF4, las células DeCy-1 no muestran expresión. Las células NIH3T3 usadas como control positivo muestran la coloración verde que evidencia la expresión de RFCF-4.

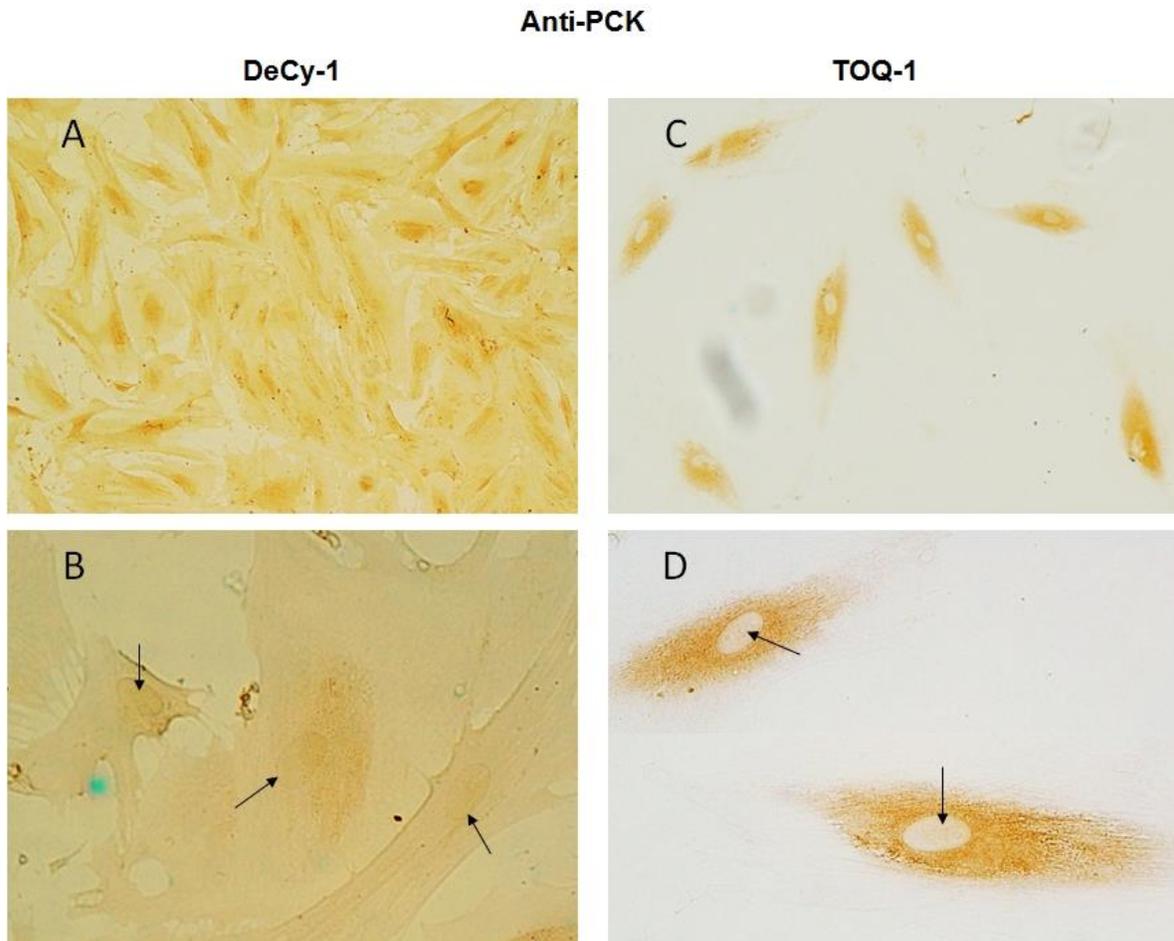


Figura 29. Expresión de citoqueratinas 5, 6 y 8 en células DeCy-1 y TOQ-1. La expresión de las citoqueratinas 5, 6 y 8 en células DeCy-1 y TOQ-1 se analizaron mediante inmunohistoquímica. La figura muestra la expresión positiva de citoqueratinas 5, 6 y 8, tanto en células DeCy-1 como en células TOQ-1. En A y B se observa la expresión positiva tanto en citoplasma como en núcleo en las células DeCy-1. A y C 40X; B y D 100X: Las flechas en B y D indican los núcleos.

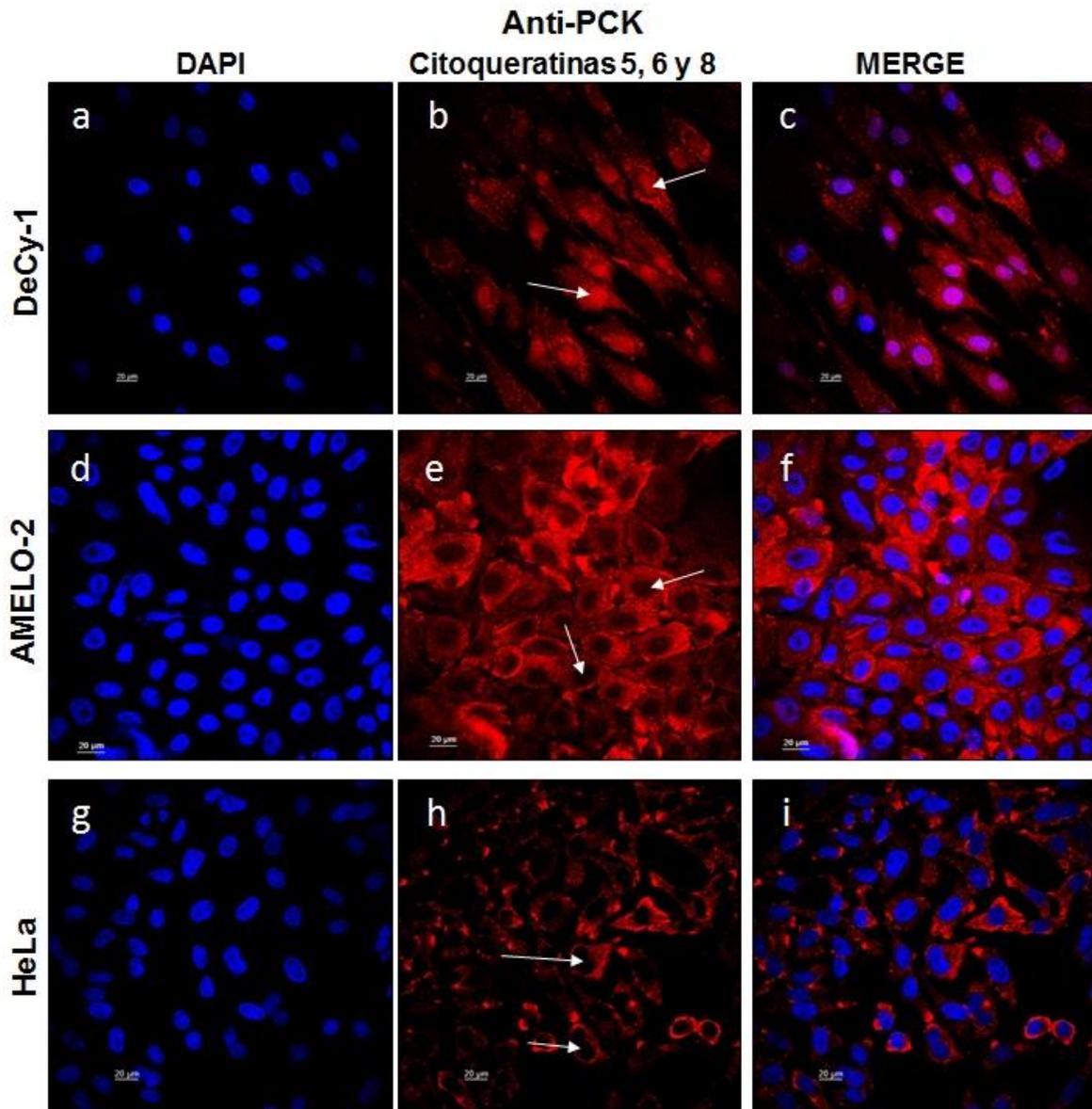


Figura 30. Expresión de citoqueratinas 5, 6 y 8 por inmunofluorescencia. La expresión de citoqueratinas en células DeCy-1, AMELO-2 y HeLa se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. En b, e y h las flechas indican algunos núcleos, donde los cortes ópticos muestran que solo las células DeCy-1 presentan expresión nuclear de citoqueratinas.

α -Citoqueratinas 5, 6 y 8

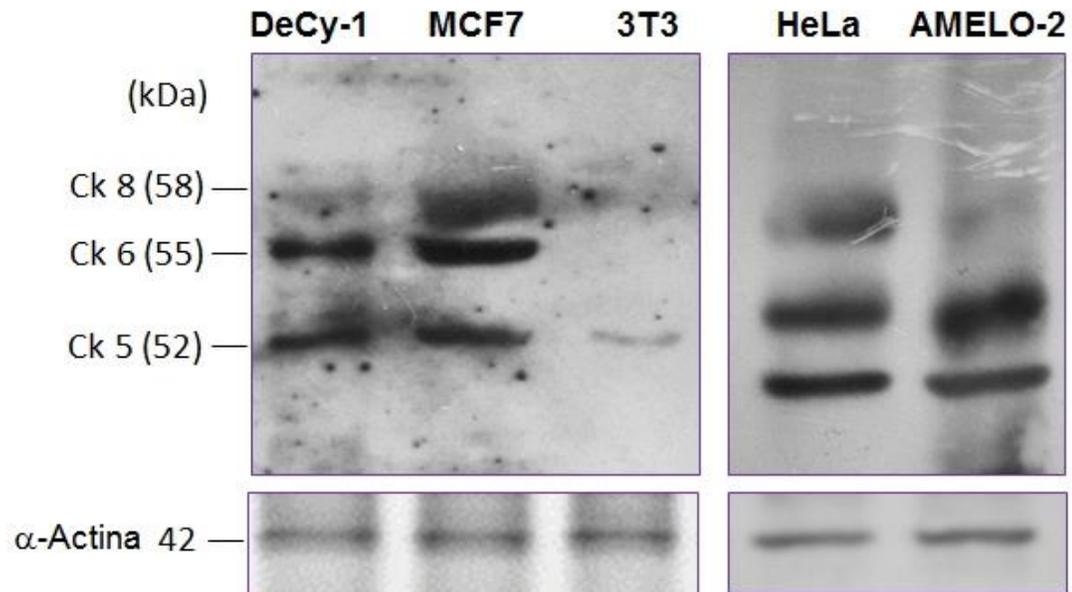


Figura 31. Expresión de citoqueratinas 5, 6 y 8 en células DeCy-1 y AMELO-2.

La expresión de CQ5, 6 y 8 fue analizada por ensayos de Western blot. En estos ensayos se observa la expresión positiva de las tres citoqueratinas en las células DeCy-1 y AMELO-2, así como en las células MCF7 y HeLa (usadas como control positivo). Las células NIH3T3 fueron usadas como control negativo (carril 3). En la parte inferior se muestra el reconocimiento de actina, la cual fue usada como control de carga.

9.6. DeCy-1 expresa ODAM.

Continuando con la caracterización del cultivo DeCy-1 y con el fin de corroborar con mayor exactitud el origen epitelial odontogénico de estas células, se analizó la expresión de la proteína ODAM (odontogenic associated protein, por sus siglas en inglés), la cual se sabe que es expresada por varias células epiteliales de origen odontogénico (REF). La presencia de esta proteína en las células DeCy-1 se analizó por Western blot y por inmunofluorescencia (Figura 32).

En los ensayos de Western blot, las células DeCy-1, así como la biopsia de un ameloblastoma sólido (usada como control positivo), mostraron expresión positiva de ODAM, pero esta proteína no se observó en células MDA-MB231 de cáncer de mama (usadas como control negativo) (Figura 32 a). Mediante inmunofluorescencia, ODAM mostró distribución uniforme en el citoplasma de las células DeCy-1 (Figura 32 b).

9.7. Las células DeCy-1 expresan CD10 y osteopontina.

Una vez que se observaron marcadores epiteliales y de ODAM en las células DeCy-1, se procedió a buscar otros marcadores que son expresados por células epiteliales de quiste dentígero, como CD10 (MME) y osteopontina (OPN) (REF). La expresión de estos genes fue analizada mediante ensayos de RT-PCR. En estos experimentos se determinó que los genes MME y OPN se expresan en las células DeCy-1, así como en los controles positivos usados: biopsias de folículo dental y de ameloblastoma, respectivamente (Figura 31). En contraste, el gen de amelogenina (AMELX) no se expresa en las células DeCy-1, pero si en ameloblastoma, dato que coincide con lo reportado anteriormente (REF).

En conjunto, el análisis de la expresión de diferentes marcadores sugieren fuertemente que la línea celular DeCy-1 está conformada por células epiteliales de origen odontogénico.

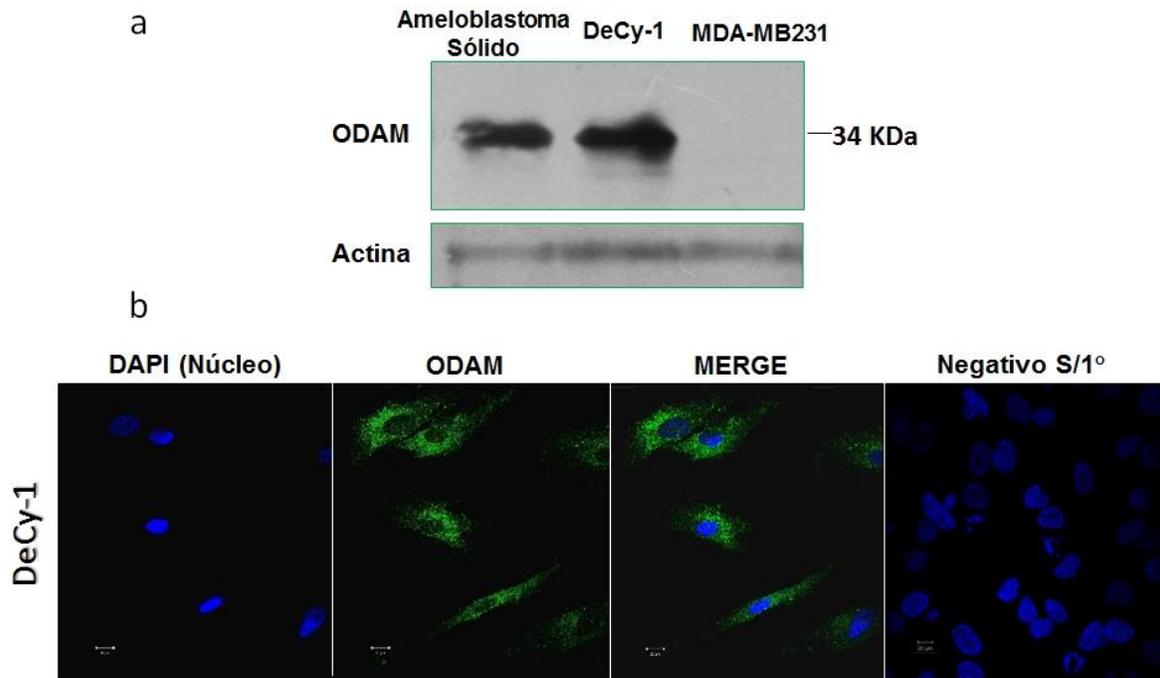


Figura 32. DeCy-1 expresa ODAM. La expresión de la proteína ODAM se analizó mediante ensayos de Wewstern blot (a) y de inmunofluorescencia (b). En (a) una biopsia de ameloblastoma sólido y células MDA-MB231 (células de cáncer de mama) fueron usadas como control positivo y negativo, respectivamente. Como control de carga se utilizó el reconocimiento de actina (panel inferior) En b se observa la localización y distribución de ODAM en las células DeCy-1, en color verde. El panel de la derecha corresponde al control negativo donde se omitió la incubación con el anticuerpo primario.

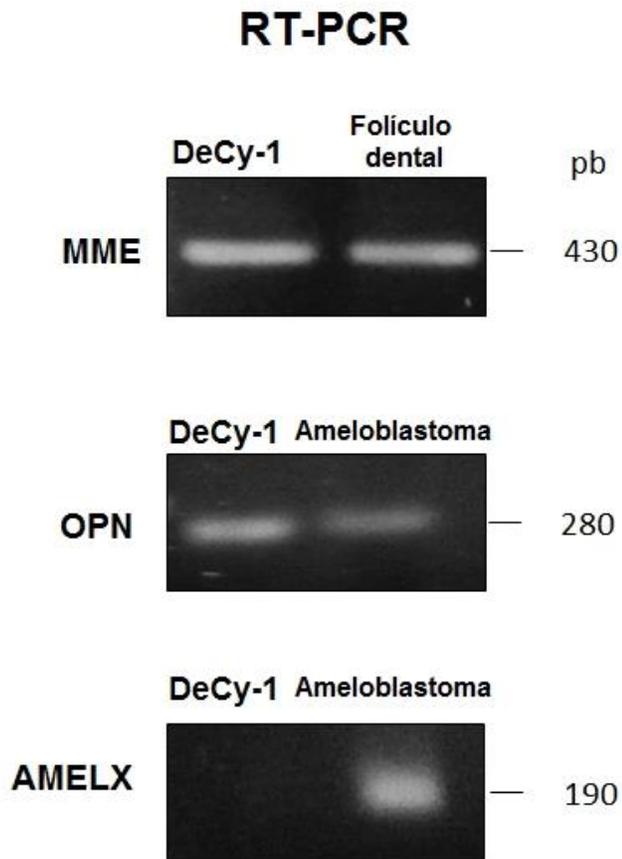


Figura 33. DeCy-1 expresa MME y OPN. La expresión de CD10 (MME), osteopontina (OPN) y amelogenina (AMELX) en células DeCy-1 se analizó mediante ensayos de RT-PCR. Las células DeCy-1 expresan el gen MME (430 pb) y el gen OPN (280 pb), pero no expresan el gen AMELX (190 pb). RNA de biopsias de folículo dental y ameloblastoma fue usado como control positivo.

9.8. DeCy-1 presenta estructuras semejantes a vesículas de secreción.

En la caracterización de la morfología de las células DeCy-1 utilizando microscopía electrónica de transmisión se observaron organelos típicos de células de mamíferos, como núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (Figura 34). También fueron localizadas estructuras típicas de células epiteliales como desmosomas (Figura 34). Sin embargo, una de las características que llamó nuestra atención fue la presencia de múltiples estructuras semejantes a vesículas de secreción (Figura 34). Estas miden alrededor de 100 nm y una parte sustancial de ellas se localizaron cercanas a la membrana celular (Figura 34). Esta característica no fue hallada en células TOQ-3, mismas que también se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 35). Estos hallazgos sugerían una alta actividad secretoria en las células DeCy-1.

9.9. DeCy-1 secreta MMP-2

Como el resultado anterior sugería un alta actividad secretoria de las células DeCy-1, se procedió a analizar la presencia de proteínas secretadas en el medio condicionado. De inicio las células DeCy-1 fueron analizadas para determinar el tiempo que permanecen viables después de mantenerlas sin suero fetal bovino, esto con el fin de elegir un tiempo adecuado para analizar su secreción. Mediante ensayos de viabilidad con MTA, se determinó que el 91.36% de las células aún permanecen viables tras 48 h posteriores a la eliminación de suero fetal bovino (Figura 36 a).

Tras determinar que a las 48 horas de ayuno las células DeCy-1 presentan una viabilidad mayor del 90%, se analizaron las secreciones utilizando el medio condicionado a las 24 y a las 48 horas. En esos ensayos se obtuvo un patrón de alrededor de 11 bandas visibles en geles teñidos con azul de Coomassie (Figura 36 b). Con el fin de descartar que las proteínas encontradas fueran producto de la lisis celular, se llevaron a cabo ensayos de Western blot contra tubulina, una proteína de localización citoplásmica, utilizando el medio condicionado. En esos ensayos el

anticuerpo contra tubulina reconoció a la proteína en extractos totales, pero no en las proteínas presentes en el medio condicionado (Figura 36 c). Este resultado sugiere que las proteínas detectadas en el medio condicionado no son producto de la lisis celular, sino que son proteínas secretadas.

Debido a que el quiste dentígero produce destrucción ósea (REF), es posible pensar que entre los productos secretados por DeCy-1 se encuentren proteasas que sean responsables de es destrucción. Así, después de analizar la integridad y número de bandas del medio condicionado de DeCy-1, se realizaron ensayos de zimografía con geles de sustrato de gelatina y activados con calcio y magnesio, para evidenciar la presencia de proteínas con actividad metaloproteolítica. Estos ensayos mostraron una banda de actividad proteolítica alrededor de los 62 kDa (Figura 37 a). Para confirmar que esta banda corresponde a una metaloproteinasa, se realizaron nuevamente los ensayos de zimografía, pero ahora en presencia del quelante EDTA. Estos ensayos mostraron la ausencia de la banda de actividad de 62 kDa (Figura 37 b), confirmando que ésta es debida a la acción de una proteinasa cuya actividad depende de iones metálicos.

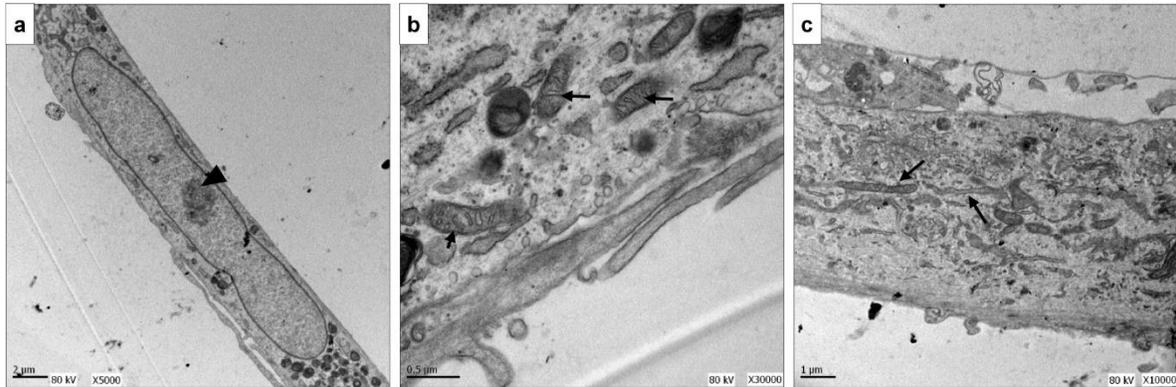
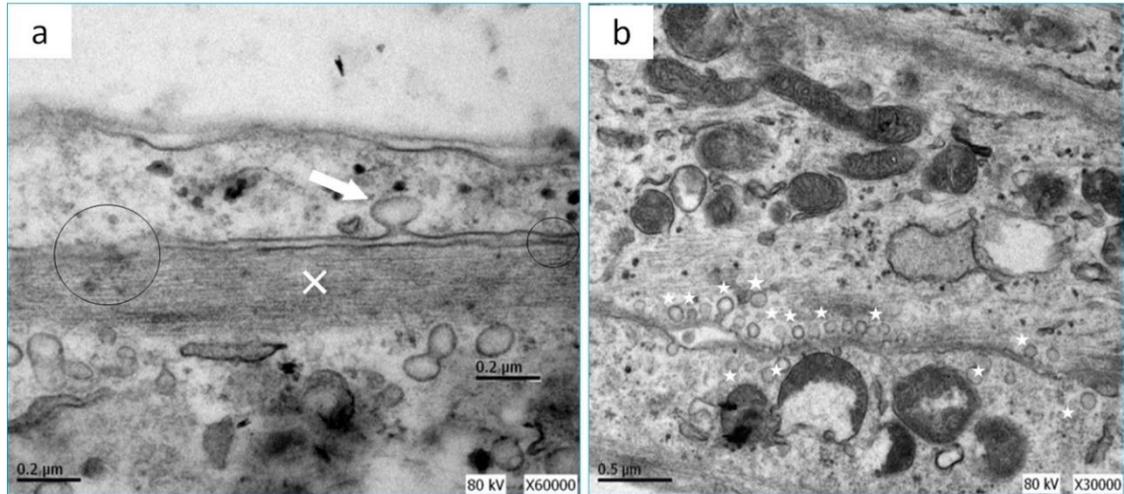


Figura 34. Características ultraestructurales de las células DeCy-1. Las células DeCy-1 fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las células muestran organelos típicos de las células de mamíferos. En a observamos el gran núcleo ovalado y el nucléolo (cabeza de flecha). b muestra mitocondrias (flecha) y en c, observamos estructuras del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (flechas).

DeCy-1



TOQ-3

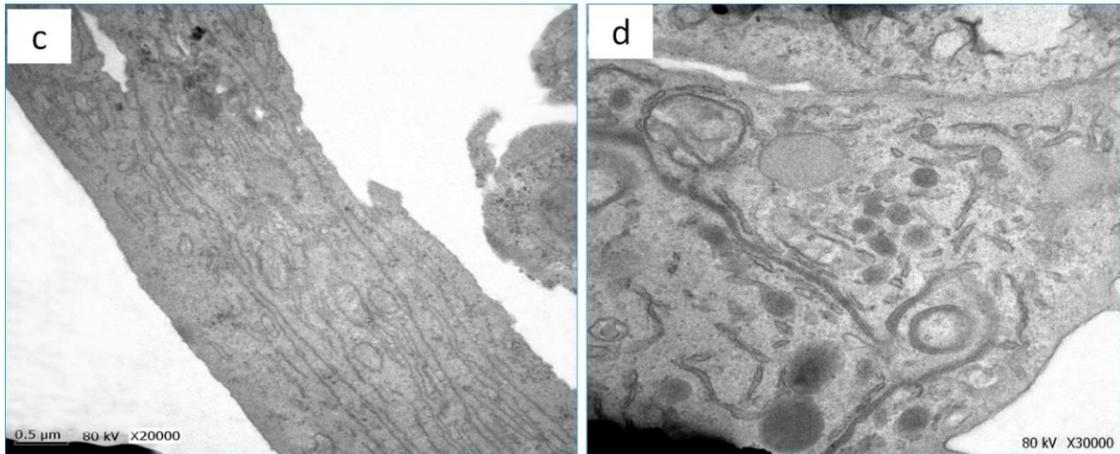


Figura 35. DeCy-1 presenta estructuras semejantes a vesículas de secreción. Las células DeCy-1 y TOQ-3 se analizaron mediante TEM. A diferencia de las células TOQ-3 (c y d), las células DeCy-1 (a y b) presentan estructuras semejantes a vesículas de secreción. En a se muestran estructuras típicas de células humanas epiteliales como los desmosomas, encerrados en un círculo. Se muestra señalado con una X las fibras del filamento intermedio, así como una vesícula coalesciendo a la membrana celular (flecha blanca). En b se muestra la interfase entre dos células y una gran cantidad de estructuras semejantes a vesículas de secreción (asterisco blanco). Los paneles c y d muestran la ultraestructura de TOQ-3, donde no se aprecian estructuras vesiculares semejantes a las de las células DeCy-1.

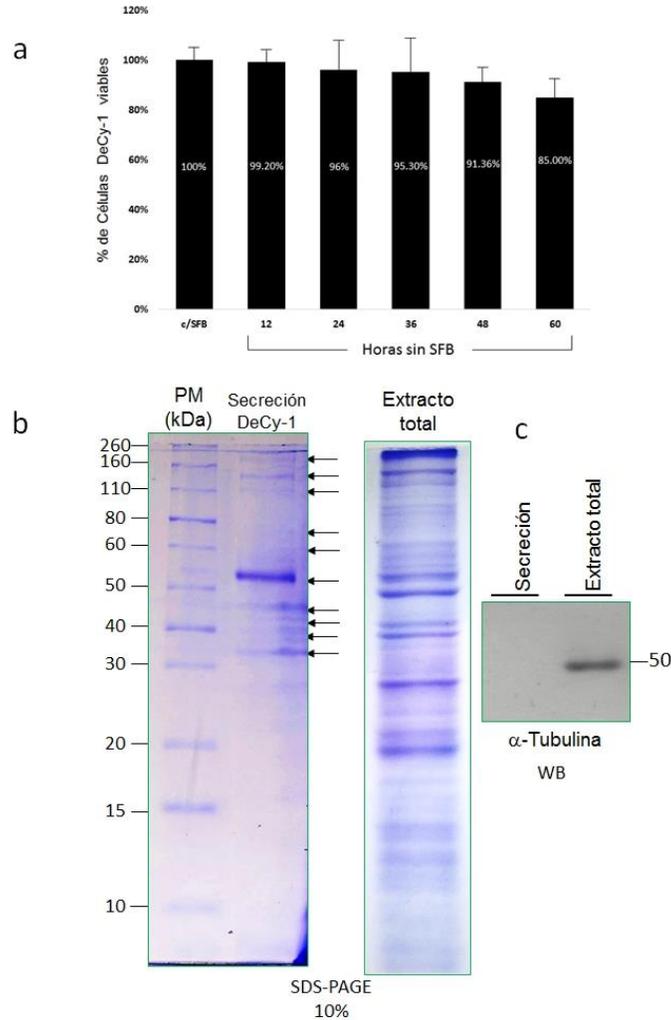


Figura 36. DeCy-1 secreta alrededor de once proteínas. (a) Las células DeCy-1 fueron sometidas a ayuno (sin suero) durante diferentes tiempos, al término de los cuales se determinó su viabilidad mediante ensayos de MTS, con la cual se determinó que la recuperación de medio condicionado podría hacerse a las 24 o a las 48 horas. (b) Análisis mediante geles de poliacrilamida del medio condicionado de las células DeCy-1, en el gel se observan aproximadamente once bandas. En el panel derecho se observa el patrón proteico del extracto total de las células DeCy-1. (c) Western blot de control contra tubulina. En el carril 1 se muestra que en la secreción de las células DeCy-1 no hay reconocimiento de la tubulina, mientras que en el carril 2 se muestra el reconocimiento de la tubulina en extractos totales de células DeCy-1.

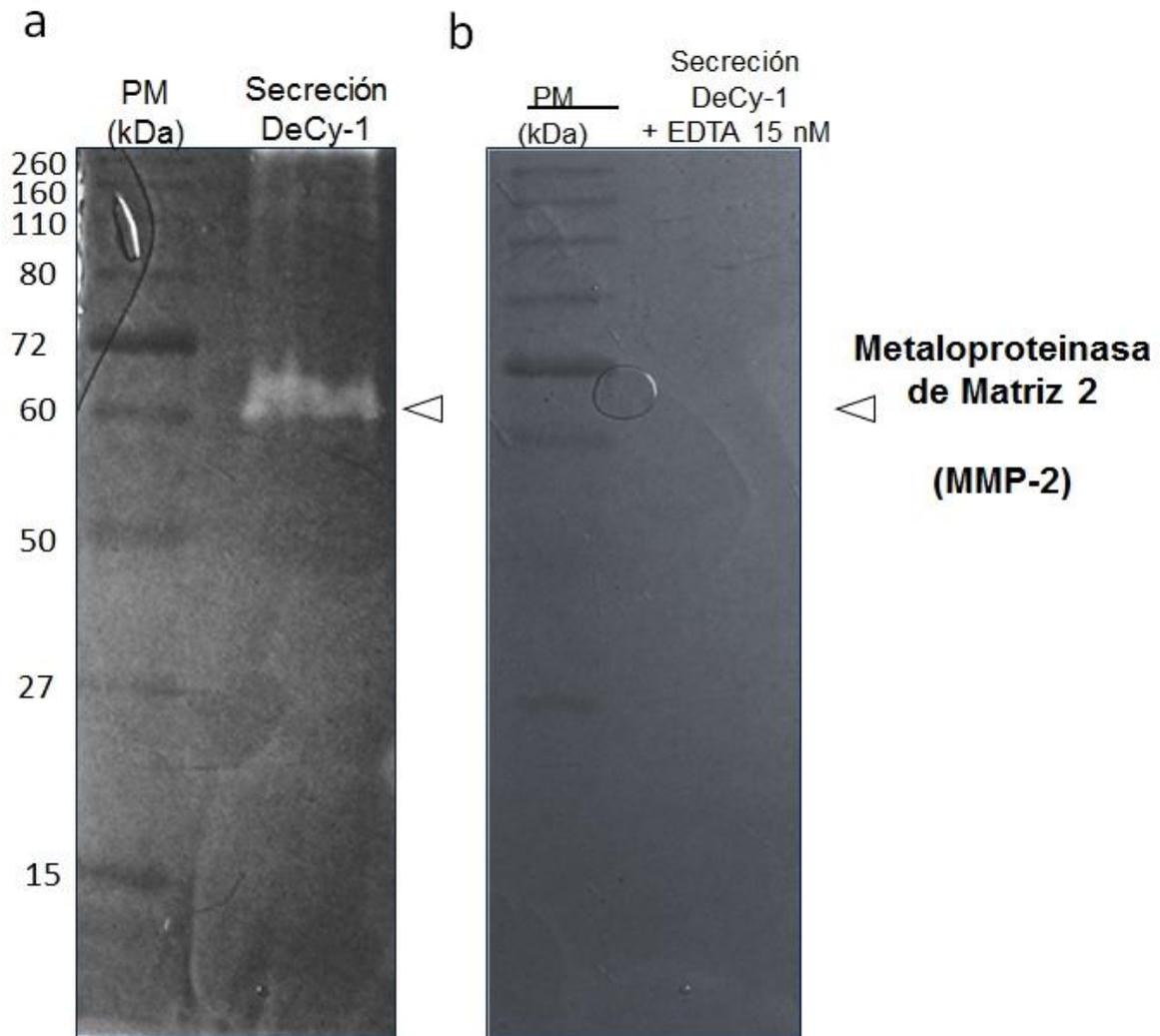


Figura 37. DeCy-1 secreta una metaloproteinasa de 62 kDa. Las proteínas recuperadas del medio condicionado de las células DeCy-1 se sometieron a ensayos de zimografía con sustrato de gelatina activado con calcio y magnesio. (a) Activación de proteinasas. (b) Activación de proteinasas en presencia del quelante EDTA. En a se observa una banda gruesa de degradación de aproximadamente 62 kDa.

10. DISCUSIÓN

El quiste dentígero (QD) es una lesión que deriva de los restos del sistema histológico y embriológico que da origen a los órganos dentarios, específicamente, se origina del epitelio reducido del esmalte, una vez que la corona del órgano dentario se ha formado.^{32, 36} El QD es el quiste odontogénico del desarrollo más común⁷¹ y generalmente tiene un comportamiento clínico moderado³⁵, pero también puede desarrollarse como una lesión de gran tamaño y ser agresiva localmente.⁷²

El QD también puede dar origen a lesiones neoplásicas a partir de su revestimiento epitelial. Tumores como ameloblastoma, fibroma ameloblástico, tumor odontogénico epitelial calcificante, tumor odontogénico adenomatoide, odontoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma mucoepidermoide, se originan frecuentemente de un QD.^{6, 32, 33, 35, 42-50}

Las bases moleculares del desarrollo de un QD, así como de su transformación neoplásica han sido poco estudiadas. El uso de líneas celulares para el estudio de lesiones de origen celular similar, como los tumores odontogénicos, han provisto de modelos para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo y patogénesis de los mismos.^{63 - 66, 68 - 70}

Esta tesis reporta el establecimiento y caracterización de un cultivo de células de QD al cual nombramos DeCy-1. Típicamente las células epiteliales presentan una morfología pequeña, poligonal y redondeada,^{63, 65, 67} sin embargo, las células DeCy-1 mostraron morfología alargada, semejante a células fibroblásticas. Interesantemente, este hecho ha sido observado antes en células de origen epitelial odontogénico. Por ejemplo, la línea celular KCOT1 derivada de un tumor odontogénico queratinizante y la línea CEOT, derivada de un tumor odontogénico epitelial calcificante

La línea celular derivada de un tumor odontogénico queratoquístico (KCOT-1),⁷³ una lesión clínica e histológicamente semejante a QD también presentó células alargadas, hecho que llamó la atención a los autores. De igual manera, otras líneas

celulares, como la línea celular CEOT del tumor odontogénico epitelial calcificante y la línea celular de odontoma mOd⁶⁹, constan de células alargadas.⁷⁰

En contraste, las líneas celulares derivadas de ameloblastomas AM-1,⁶³ HAM1, 2 y 3,⁶⁵ también provenientes de epitelio odontogénico presentan fenotipo clásico redondeado poligonal y pequeño.

Existen líneas celulares de origen odontogénico que también presentan morfología alargada, como la línea celular Mix-1, sin embargo esta línea celular fue aislada de un mixoma odontogénico, tumor de origen mesenquimal, por lo tanto se espera que sus células sean alargadas.⁶⁴

Inicialmente para asegurarnos de que las células DeCy-1 no fueran de origen mesenquimal, fue analizada la expresión del Receptor del Factor de Crecimiento de los Fibroblastos 4 (RFCF-4). Tanto los ensayos de Western blot, como los ensayos de inmunofluorescencia nos indicaron ausencia de este receptor en el cultivo celular, descartando la idea de que se trataran de células mesenquimales.

Tras notar la ausencia de expresión del RFCF-4 en DeCy-1, procedimos a evaluar marcadores generales de epitelio. Estos marcadores fueron las citoqueratinas 5, 6 y 8 (CK 5, 6 y 8). Estas citoqueratinas fueron analizadas inicialmente mediante inmunocitoquímica, y se observó expresión citoplásmica y nuclear en DeCy-1, mientras que en AMELO-2 y TOQ-3 solamente se observó expresión citoplasmática. La presencia de CK en el núcleo es un hecho inusual, ya que las CK 5, 6 y 8 son proteínas de filamento intermedio del citoesqueleto. Sin embargo, Havaki y cols.⁸² han reportado la presencia de CK8 en el núcleo de células de cáncer de mama ductal infiltrante. En estas células, CK8 y el epítotope H fueron localizados en correlación con la distribución de RNPs, los autores hipotetizan sobre la posible función de dicho complejo en la organización nuclear de la cromatina en células tumorales.⁸² Por el momento, desconocemos cuál de las tres CKs que reconocen los anticuerpos utilizados es la que DeCy-1 presenta en el núcleo, probablemente se trate de la CK8, ya que no hemos hallado reportes de presencia de CQ5 y CQ6 en localización nuclear.

Adicionalmente, DeCy-1 presenta expresión de la proteína ODAM, esta proteína fue originalmente descubierta en el material amiloideo del tumor odontogénico epitelial calcificante⁷⁴ y hasta el año 2011, se encontraba asociada únicamente a tejidos de origen odontogénico con diferentes funciones, como la mineralización del esmalte dental en etapa embrionaria,⁷⁵ maduración del órgano del esmalte⁷⁶ y activación de los restos epiteliales de Malassez durante los eventos iniciales de regeneración periodontal.⁷⁷

De manera importante, ODAM también está presente en los folículos de dientes no erupcionados⁷⁸, tejido del cual se originan los QD.⁷⁹ La expresión de ODAM en DeCy-1 confirma el origen epitelial odontogénico de estas células. Interesantemente, ODAM está presente también en tumores epiteliales de mama, riñón, estómago, ovario, y pulmón, pero no es considerado un marcador específico de cáncer.⁸⁰ De hecho, un reporte de Kestler y colaboradores indica que la sobreexpresión exógena de ODAM en células de cáncer de mama MDA-MB231 lleva a la formación de un fenotipo menos agresivo de estas células.⁸¹

Por otro lado, recientemente se demostró la expresión de los genes de neprilisina y osteopontina en el epitelio de los QD y de ameloblastoma.⁸³ Mediante ensayos de RT-PCR encontramos ambos transcritos en DeCy-1, mientras que el transcrito de amelogenina no fue detectado. Interesantemente, la expresión de este último gen está asociada a la etapa secretora de los ameloblastos maduros,^{84, 85} células que no están presentes en QD ni en el cultivo DeCy-1.

Entre las características ultraestructurales que también indican el origen epitelial de DeCy-1 encontramos desmosomas. El análisis ultraestructural también mostró varias vesículas citoplasmáticas que están adyacentes a la membrana plasmática fusionadas a ella. De manera similar, en caracterizaciones ultraestructurales previas de quistes odontogénicos (incluyendo al QD) se halló que la superficie epitelial de las biopsias presentaban irregularidades semejante a las estructuras observadas en la fusión de vesículas a la membrana celular⁸⁶, sin embargo, en estas caracterizaciones fue utilizada la técnica de microscopía electrónica de barrido,

técnica con la cual no podemos distinguir si efectivamente se tratan de vesículas de secreción.

Además, Schlosnagle and Someren ⁸⁷ describieron en la caracterización ultraestructural de un tumor odontogénico adenomatoide la presencia de espacios semejantes a ductos que son el resultado de actividad secretoria de células adyacentes a estos espacios. ⁸⁷

Adicionalmente, Mincer y McGinnis ⁸⁸ encontraron en una biopsia de ameloblastoma uniuístico una alta incidencia de actividad vesicular, sin embargo, los autores discuten la imposibilidad de determinar si dichas estructuras representan retículo endoplásmico, vesículas de secreción o invaginaciones de la membrana plasmática. ⁸⁸ De manera semejante, en el caso de Decy-1, el análisis estructural por TEM no permite discernir si las estructuras observadas se traten de vesículas con actividad secretoria o vesículas derivadas de pinocitosis.

Nosotros detectamos alrededor de once bandas proteicas en el medio condicionado de las células DeCy-1, sugiriendo que algunas o la mayoría de la estructuras vesiculares visualizadas, se traten de vesículas de secreción. Interesantemente, entre las proteínas secretadas por DeCy-1 detectamos la presencia de una banda con un peso aproximado de 62 kDa con actividad proteolítica, que coincide con el peso de la Metaloproteinasa de Matriz 2 (MMP-2).

Las Metaloproteinasas de Matriz tienen una función importante en la degradación de la matriz extracelular y hueso durante el desarrollo fisiológico de los órganos y de algunas neoplasias, así como de la invasión y la angiogénesis inducida por ciertos tumores. ⁸⁹

Particularmente, la MMP-2 puede degradar colageno tipo IV, uno de los mayores componentes de la membrana basal, esto lleva a la invasión tumoral y subsecuente metástasis. ⁹⁰ De manera importante, se ha descrito que un inhibidor de la actividad de la MMP-2 suprime la capacidad invasiva local de algunos ameloblastomas. ⁹¹ De manera similar, la MMP-2 puede ser responsable por lo menos en parte del comportamiento destructivo de los QD.

11. CONCLUSIONES

En este trabajo fue establecido por primera vez un cultivo de quiste dentígero, esta línea celular derivada del epitelio de un quiste dentígero presenta algunas características típicas de esta lesión, tales como la expresión de neprilisina, osteopontina, ODAM y citoqueratinas 5, 6 y 8, además de la ausencia de expresión de amelogenina.

Durante la caracterización de las células DeCy-1, también se encontraron hallazgos importantes, como un alto índice de tráfico vesicular, que posiblemente este repercutiendo en la capacidad secretora de esta lesión. Una de las proteínas que secreta la línea celular DeCy-1 es la metaloproteinasa de matriz 2, aunque esta enzima tiene funciones fisiológicas, puede estar cumpliendo una función en la patogénesis del QD.

Así, la línea celular DeCy-1 es un modelo que puede ser ampliamente utilizado en el estudio del comportamiento biológico de los QD y de su eventual transformación neoplásica.

12. PERSPECTIVAS

Si bien, las células DeCy-1 se han mantenido proliferativas a través de 52 subcultivos y después de tres años, es conveniente realizar ensayos en los que se induzca su inmortalidad o bien, realizar ensayos para determinar si estas células ya son inmortales.

Las células DeCy-1 expresan osteopontina, neprilisina, ODAM y CK5, 6 y 8; un estudio más completo debe integrar la búsqueda de un número mayor de marcadores relacionados a epitelio odontogénico y de QD.

Aunque las células DeCy-1 derivan de una biopsia de QD, y los hallazgos de este trabajo indican que probablemente la MMP-2 tenga una función en el comportamiento de QD, se deberán hacer diferentes experimentos en busca de la expresión de esta metaloproteinasa en biopsias derivadas de un número mayor de pacientes.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Lars Rosén Christensen, Kjeld Mollgard, Inger Kjaer, Mette Stagaard Janas. Immunocytochemical demonstration of nerve growth factor receptor (NGF-R) in developing human fetal teeth. *Anat Embryol* 188:247-255, 1993.
2. Mitsiadis TA, Luder HU. Genetic basis for tooth malformations: from mice to men and back again. *Clin Genet* 80: 319-329, 2011.
3. Cobourne MT, Mitsiadis T. Neural crest cells and patterning of the mammalian dentition. *J. Exp Zool Part B Mol Dev Evol.* 306B, 3:251-260, 2006.
4. Mitsiadis TA, Graf D. Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 87; 3: 199-211, 2009.
5. Peter R. Morgan Odontogenic tumors: a review. *Periodontology 2000.* 57:160–176, 2011.
6. Barnes L., Evenson J.W., Reichart P., Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* IARC Press, Lyon 2005.
7. Hans Peter Philipsen, Peter A. Reichart. Classification of odontogenic tumours. A historical review. *J Oral Pathol Med* 35: 525–9, 2006
8. JJ. Pindborg, F. Clausen. Classification on Odontogenic Tumors a Suggestion. *Acta Odont Scand* 16:293-301, 1958.
9. JJ. Pindborg, JR. Kramer, H. Torloni. Histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts and allied lesions. Geneva: WHO 1971.
10. H. Kramer, JJ. Pindborg, M. Shear. WHO international histological classification of tumours. Histological typing of odontogenic tumours, 2nd Heidelberg: 1992.
11. Adel K. El-Naggar. Cellular and Molecular Pathology of Head and Neck Tumors. Springerlink, Head and Neck Cancer: 57-79, 2011.

12. Vijay Ebenezer, Balakrishnan Ramalingam. A Cross-Sectional Survey of Prevalence of Odontogenic Tumours. *J. Maxillofac. Oral Surg.* 9(4):369–374. 2010.
13. Hiroyuki Okada, Hirotsugu Yamamoto, W.M. Tilakaratne. Odontogenic Tumors in Sri Lanka: Analysis of 226 Cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surg.* 65:5; 875-883, 2007.
14. Onatolu Odukoya. Odontogenic tumors: analysis of 289 Nigerian cases. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 24:10; 454–457, 1995.
15. Jing W, Xuan M, Lin Y, Wu L, Liu L, Zheng X, Tang W, Qiao J, Tian W. Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 36:1; 20-25, 2007.
16. Simon EN, Merckx MA, Vuhahula E, Ngassapa D, Stoelinga PJ. A 4-year prospective study on epidemiology and clinic pathological presentation of odontogenic tumors in Tanzania. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99:598–602, 2005.
17. Tawfik MA, Zyada MM. Odontogenic tumors in Dakahlia, Egypt: analysis of 82 cases. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 109:2; 67-73, 2010.
18. 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* 84:6; 672-675, 1997.
19. Daley TD, Wysocki GP, Pringle GA. Relative incidence of odontogenic tumors and oral and jaw cysts in a Canadian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 77:3; 276-80, 1994.

20. Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. 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* 64:9; 1343–1352, 2006.
21. Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Peñafiel C, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. *J Oral Pathol Med* 31:7; 415-420, 2002.
22. Tamme T, Soots M, Kulla A, Karu K, Hanstein SM, Sökk A, Jõeste E, Leibur E. Odontogenic tumours: A collaborative retrospective study of 75 cases covering more than 25 years from Estonia. *J Craniomaxillofac Surg* 32:3; 161-165, 2004.
23. Sriram G, Shetty RP. Odontogenic tumors: a study of 250 cases in an Indian teaching hospital. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 105:6; 14–21, 2008.
24. LA Gaitán-Cepeda, D Quezada-Rivera, F Tenorio-Rocha, ER Leyva-Huerta. Reclassification of odontogenic keratocyst as tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. *Oral Diseases* 16; 185–187, 2010.
25. Abigail Tucker and Paul Sharpe. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nature Reviews Genetics* 5; 499, 2004.
26. Hiroyuki Kumamoto. Molecular alterations in the development and progression of odontogenic tumors. *Oral Med and Pathology* 14:4; 121-130, 2010.
27. Laughlin EH. Metastasizing ameloblastoma. *Cancer* 3: 64; 776-80, 1989.
28. Candice C. Black, DO, Rocco R. Addante, DMD, Carrie A. Mohila, Lebanon, New Hampshire. Intraosseous ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110; 585-592, 2010.

29. Carolina Cavaliere Gomes, Alessandra Pires Duarte, Marina Goncalves Diniz, Ricardo Santiago Gomez. Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 39: 585–591, 2010.
30. Sanjay CJ, Chaya M David, Rachna Kaul, Ramnarayan BK, Prashanth Ramachandra. Intraosseous ameloblastoma masquerading as exophytic growth: a case report. *Imaging Science in Dentistry* 41; 89-93, 2011.
31. Rakesh S Ramesh, Suraj Manjunath, Tanveer H Ustad, Saira Pais, K Shivakumar. Unicystic ameloblastoma of the mandible – an unusual case report and review of literature *Head Neck Oncology* 2:1, 2010.
32. 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.
33. Weber AL, Easter KM. Cysts and odontogenic tumors of the mandible and maxilla. *Contemp Diagn Radio* 5:25; 1 1982.
34. Joseph A. Regezi. Odontogenic Cysts, Odontogenic Tumors, Fibrous, and Giant Cell Lesions of the Jaws *Mod Pathol* 15:3; 331–341, 2002.
35. Robert J. Scholl, Helen M. Kellett, David P. Newmann, Alan G. Lurie. Cysts and cystic lesions of the mandible: Clinical and Radiologic-Histopathologic Review. *RadioGraphics* 19: 1107-1124, 1999.
36. N. Shah, H. Thuau, T. Beale. Spontaneous regression of bilateral dentigerous cysts associated with impacted mandibular third molars. *British Dental Journal* 192:2; 75-76, 2002.

37. Alberto Consolaro. Orthodontic traction: Possible consequences for maxillary canines and adjacent teeth Part 1: Root resorption in lateral incisors and premolars. *Dental Press J Orthod* 15:4; 15-23, 2010.
38. KP Bharath, V Revathy, S Poornima, VV Subba Reddy. Dentigerous cyst in an uncommon site: A rare entity. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 29: 99-103, 2011.
39. Parvathi Devi, Thimmarasa V. Bhovi, Vishal Mehrotra, Mayuri Agarwal. Multiple Dentigerous Cysts. *J. Maxillofac. Oral Surg.* s12663-010-0090-z. 2010.
40. Ramandeep S. Narang, Adesh S. Manchanda, Preeti Arora, Kavar Randhawa. Dentigerous cyst of inflammatory origin—a diagnostic dilemma. *Annals of Diagnostic Pathology*, in press 2011.
41. Juliana de Noronha Santos Netto, Fabio Ramoa Pires, Eliene Carvalho da Fonseca, Licinio Esmeraldo Silva, Simone de Queiroz Chaves Lourenco. Evaluation of mast cells in periapical cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med* 2012.
42. 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.
43. Eichhorn W, Wehrmann M, Blessmann M, Pohlenz P, Blake F, Schmelzle R, Heiland M. Metastases in odontogenic cysts: literature review and case presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109:4; 582-586, 2010.
44. Aggarwal P, Saxena S. Aggressive growth and neoplastic potential of dentigerous cysts with particular reference to central mucoepidermoid carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 49:6; 36-39, 2011.

45. McMillan MD, Smillie AC. Ameloblastomas associated with dentigerous cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 51:5: 489-496, 1981.
46. Holmlund A, Anneroth G, Lundquist G, Nordenram A. Ameloblastomas originating from odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med* 20:7; 318-321, 1991.
47. Olson JW, Miller RL, Kushner GM, Vest TM. Odontogenic carcinoma occurring in a dentigerous cyst: case report and clinical management. *J Periodontol* 71:8; 1365-1370, 2000.
48. Warter A, George-Diolombi G, Chazal M, Ango A. Melanin in a dentigerous cyst and associated adenomatoid odontogenic tumor. *Cancer* 156:4; 786-788, 1990.
49. Johnson LM, Sapp JP, McIntire DN. Squamous cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. *J Oral Maxillofac Surg.* 52:9; 987-990, 1994.
50. SD Josell, AB Reiskin, BD Gross. Dentigerous cyst with mural ameloblastoma. *J Am Dent Assoc* 99:4; 634-636, 1979.
51. Stoelinga PJW, Bronkhorst FB. The incidence, multiple presentation and recurrence of aggressive cysts of the jaws. *J. CranioMaxFac Surg* 16: 184-95. 1988.
52. Bradley N, Thomas DM, Antoniades K, Anavi Y. Squamous cell carcinoma arising in an odontogenic cyst. *Int J Oral Maxillofac Surg* 17:4; 260-263, 1988.
53. 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.
54. Shteyer A, Lustmann J, Lewin-Epstein J. The mural ameloblastoma: a review of the literature. *J Oral Surg.* 36:11; 866-872, 1978.
55. Heikinheimo K, Jee KJ, Niini T, Aalto Y, Happonen RP, Leivo I, Knuutila S. Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. *J Dent Res.* 81:8; 525-530, 2002.

56. Carinci F, Francioso F, Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Evangelisti R, Arcelli D, Tosi L, Pezzetti F, Carinci P, Volinia S Genetic expression profiling of six odontogenic tumors. *J Dent Res* 82:7; 551-557, 2003.
57. Jijun Lim, Hyowon Ahn, Sunhong Min, Seong-Doo Hong, Jae-II Lee, Sam-Pyo Hong. Oligonucleotide microarray analysis of ameloblastoma compared with dentigerous cyst. *J Oral Pathol Med* 35: 278–285, 2006.
58. American Type Culture Collection Standards Development Organization. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nature Reviews Cancer* 10: 441- 448, 2010.
59. Simon P. Langdon. Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. *Human Press Inc.*, Totowa, NJ. 88: 3-39.
60. 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.
61. L. Hayflick, PS. Moorhead. The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research* 25; 585–621, 1961.
62. Dell'Orco RT, Mertens JG, Kruse PF Jr. Doubling potential, calendar time, and senescence of human diploid cells in culture. *Exp Cell Res.*15:77; 1; 356-360, 1973.
63. 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.* 5; 207-212, 1998.
64. 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.

65. 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.
66. 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 enamelin by transfection of hTERT and cdk4 cDNAs. *J Oral Pathol Med* 40:3; 227-234, 2011.
67. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique, 4th edn. New York: Wiley-Liss, Inc., 1991.
68. Sueli P. H. Miyagi, Karen R. N. Hiraki, Manoela D. Martins, Márcia M. Marques. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic myxoma *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Oral Science* 50:2; 187-192, 2008.
69. Hatano H, Kudo Y, Ogawa I, Shimasue H, Shigeishi H, Ohta K, Higashikawa K, Takechi M, Takata T, Kamata N. Establishment of mesenchymal cell line derived from human developing odontoma. *Oral Diseases* 18:8; 756-762, 2012.
70. Amm H.M, Rollins D.L, Ren C, Dong J, DeVilliers P, Rivera H, MacDougall M. Establishment and characterization of a primary calcifying epithelial odontogenic tumor cell population. *J Oral Pathol and Med* 43:3; 183-190, 2014.
71. Jhonson NR, Gannon OM, Savage NW, Batstone MD. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *J Investig Clin Dent* 5:1; 9-14, 2014.
72. Motamedi MH, Talesh KT. Management of extensive dentigerous cysts. *British Dent J* 198:4; 203-206, 2005.

73. 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* 287:32; 27117- 27125, 2012.
74. Solomon A, Murphy CL, Weaver K, Weiss DT, Hrcic R, Eulitz M, Donell RL, Sletten K, Westermark G, Westermark P. Calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein. *J Lab Clin Med* 142:5; 348-355, 2003.
75. Lee Hk, Park JT, Chao YS, Bae HS, Cho MI, Park JC. Odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM), via phosphorylation by bone morphogenetic protein receptor type IB (BMPRI-IB), is implicated in ameloblast differentiation. *J Cell Biochem* 113:5; 1754-1765, 2012
76. Moffat P, Wazen RM, Dos Santos Neves J, Nanci A. Characterisation of secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1: a novel basal lamina component expressed at cell-tooth interfaces. *Cell and tissue research* 358:3; 843-355, 2014.
77. Nishio C, Wazen R, Moffatt P and Nanci A. Expression of odontogenic ameloblast-associated and amelotin proteins in the junctional epithelium. *Periodontology 2000* 63: 59-66, 2013.
78. Murphy CL, Kestler DP, Foster JS, Wang S, Macy SD, Kennel SJ, Carlson ER, Hudson J, Weiss DT and Solomon A. Odontogenic ameloblast-associated protein nature of the amyloid found in calcifying epithelial odontogenic tumors and unerupted tooth follicles. *Amyloid* 15:2; 89-95, 2008.
79. Benn A and Altini M. Dentigerous cysts of inflammatory origin. A clinicopathologic study. *Oral surg, oral med, oral pathol, oral radiology, and endodontics* 81:2; 203-9, 1996.
80. Kestler DP, Foster JS, Macy SD, Murphy CL, Weiss DT and Solomon A. Expression of odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) in dental and other epithelial neoplasms. *Molecular medicine* 14:5-6; 318-326, 2008.
81. Kestler DP, Foster JS, Bruker CT, Preshaw JW, Kennel SJ, Wall JS, Weiss DT and Solomon A. ODA Expression Inhibits Human Breast Cancer

Tumorigenesis. *Breast cancer* 5: 73-85, 2011.

82. Hayaki S, Voloudakis-Baltatzis I, Goutas N, Arvanitis LD, Vassilaros SD, Arvanitis DL, Kittas C, Marinos E. Nuclear localization of cytokeratin 8 and the O-linked N-acetylglucosamine-containing epitope H in epithelial cells of infiltrating ductal breast carcinomas: a combination of immunogold and EDTA regressive staining methods. *Ultrastruct Pathol* 30:3; 177-186, 2006.

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

84. Mazumder P, Prajapati S, Lokappa SB, Gallon V and Moradian-Oldak J. Analysis of co-assembly and co-localization of ameloblastin and amelogenin. *Frontiers in physiology* 5: 274, 2014.

85. Hu JC, Sun X, Zhang C and Simmer JP. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. *European journal of oral sciences* 109:2; 125-132, 2001.

86. Philipsen HP, Chan LS, Reichart PA and Pang MK. Scanning electron microscopy of odontogenic cyst epithelium. *The Journal of the Dental Association of South Africa* 47:5; 219-223, 1992.

87. Schlosnagle DC and Someren A. The ultrastructure of the adenomatoid odontogenic tumor. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 52:2; 154-161, 1981.

88. Mincer HH and McGinnis JP. Ultrastructure of three histologic variants of the ameloblastoma. *Cancer* 30:4; 1036-1045, 1972.

89. Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R and Kizek R. Matrix metalloproteinases. *Current medicinal chemistry* 17:31; 3751-3768, 2010.

90. Yeh MW, Rougier JP, Park JW, Duh QY, Wong M, Werb Z and Clark OH. Differentiated thyroid cancer cell invasion is regulated through epidermal growth factor receptor-dependent activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2/gelatinase A. *Endocrine-related cancer* 13:4; 1173-83, 2006.

91. Zhang B, Zhang J, Huang HZ, Chen WL, Tao Q, Zeng DL, Zhang LT and Xu JH. Inhibition of ameloblastoma invasion in vitro and in vivo by inhibitor of metalloproteinase-2 activity. *Journal of oral pathology & medicine* 38:9; 731-6.