



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Análisis de la expresión de las proteínas hsp60 e integrina α 6 en
ameloblastoma y quiste dentífero”**

T E S I S

Que presenta

MARIANA RODRÍGUEZ VÁZQUEZ

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de la tesis

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Resumen

Los tumores odontogénicos (TO's) son lesiones derivadas de las células formadoras de órganos dentales o sus estructuras remanente. Entre los TO's más frecuentes se encuentra el ameloblastoma, el cual es una neoplasia benigna derivada de epitelio odontogénico con un comportamiento clínico agresivo y cuyo origen se ha sugerido de las paredes de un quiste dentígero. Debido a la falta de marcadores, su diagnóstico se basa en las evaluaciones histológicas y anatómicas, teniendo un tratamiento quirúrgico con un alto impacto físico y mental para el paciente. Por su parte, las proteínas de membrana se han relacionado con la transformación tumoral, por lo que actualmente 2/3 de los fármacos están dirigidos a estos blancos terapéuticos. Durante el trabajo de maestría, para identificar proteínas membranales con expresión diferencial entre ameloblastoma y quistes dentígeros se compararon los perfiles proteicos de membrana por SDS-PAGE y se encontraron dos bandas en el ameloblastoma que aparentemente estaban ausentes en el quistes dentígero. En esas bandas se identificaron a la integrina $\alpha 6$ y a la chaperonina HSP60. En este trabajo se analizó la expresión y localización de ambas proteínas en quiste dentígero y ameloblastoma. La integrina $\alpha 6$ se encontró sobre expresada y deslocalizada en los ameloblastomas. Por otro lado, la HSP60, la cual en células normales es una proteína mayoritariamente mitocondrial, pero que se ha encontrado en citoplasma, membrana y medio extracelular de células tumorales. En todas las variantes de ameloblastoma, HSP60 se encontró sobre expresada y se localizó en la membrana y citoplasma de las células epiteliales tumorales. Así mismo, en ensayos de wetern blot HSP60 se detectó con un peso molecular de aproximadamente 95 kDa en todos los tejidos tumorales analizados y no así en quiste dentígero y en células controles, sugiriendo que esta chaperonina podría estar asociada con otra proteína en el ameloblastoma. Los resultados obtenidos sugieren que la integrina $\alpha 6$ y HSP60 participan en el desarrollo del ameloblastoma.

Abstract

Odontogenic tumors are lesions derived from the cells that form dental organs or their remaining structures. One of the most frequent tumors is ameloblastoma, which is a benign neoplasm derived from odontogenic epithelium with an aggressive clinical behavior and whose origin has been suggested from the walls of a dentigerous cyst. Due to the lack of markers, its diagnosis is based on histological and anatomical evaluations, having a surgical treatment with a high physical and mental impact on the patient. In the other hand, membrane proteins have been related to tumor transformation, so that currently 2/3 of the drugs are directed at these therapeutic targets. During the master's work, the identification of membrane proteins with differential expression between ameloblastoma and dentigerous cysts was made, the membrane protein profiles were compared by SDS-PAGE and two bands were found in the ameloblastoma that were apparently absent in the dentigerous cysts. Integrin $\alpha 6$ and chaperonin HSP60 are identified in these bands. In this work the expression and localization of both proteins in dentigerous cysts and ameloblastomas were analyzed. Integrin $\alpha 6$ was found to be overexpressed and delocalized in ameloblastomas. HSP60, which in normal cells is a mostly mitochondrial protein, but can be found in the cytoplasm, membrane and extracellular medium of tumor cells. In all ameloblastoma variants, HSP60 was found to be over-expressed and localized to the membrane and cytoplasm of tumor epithelial cells. Likewise, in wetern blot assays, HSP60 was detected with a molecular weight of approximately 95 kDa in all tumor tissues analyzed and not in dentigerous cyst and control cells, suggesting that this chaperonin could be associated with another protein in the ameloblastoma. The results suggested that the integrin $\alpha 6$ and HSP60 participate in the development of ameloblastoma.

Índice

Índice de figuras	3
Abreviaturas	4
Tumores Odontogénicos	5
Clasificación de los Tumores Odontogénicos.....	5
Etiología de los tumores odontogénicos.....	6
Tratamiento.....	8
Ameloblastoma	8
Clasificación clínica de los ameloblastomas.....	10
a) Ameloblastoma (Ameloblastoma convencional)	10
b) Ameloblastoma uniuístico	10
c) Ameloblastoma Extraóseo o Periférico	11
Quiste dentífero	12
Relación entre el quiste dentífero y el ameloblastoma	15
Estudio de moléculas como biomarcadores	17
Moléculas estudiadas en el Ameloblastoma.....	17
Proteínas membranales	20
Comparación de proteínas membranales de Amel y QD.....	24
Justificación	28
Hipótesis.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos particulares	28
Materiales y métodos	29
Obtención de las muestras.....	29
Tinción con hematoxilina- eosina	29
Extracción de proteínas totales.....	30
Cuantificación de proteínas	30
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
Ensayos de Western blot.....	32

Inmunohistoquímica	33
Análisis de la inmunoreacción.....	34
Resultados	35
Obtención de muestras.....	36
.....	39
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
Análisis de la expresión de la integrina $\alpha 6$ en AM y QD	41
Análisis de la localización de la integrina $\alpha 6$ en AM y QD.....	43
Análisis de la expresión y localización HSP60 en AM y QD	52
Discusión	64
Integrina $\alpha 6$	64
HSP60	73
Conclusiones	85
Perspectivas	85
Bibliografía	86

Índice de figuras

Figura 1 Tipos de ameloblastoma.	12
Figura 2 Quiste dentígero.....	14
Figura 3 Ameloblastomas provenientes de quistes dentígeros.	16
Figura 4 Obtención de proteínas membranales de quiste dentígero y ameloblastoma.	26
Figura 5 Análisis de proteínas membranales diferenciales del quiste dentígero y ameloblastoma.	27
Figura 6 Score Allred.	35
Figura 7 Distribución de las muestras analizadas por inmunohistoquímica.	38
Figura 8 Patrón histológico de las lesiones analizadas.....	39
Figura 9 Corrimiento electroforético de proteínas totales de las lesiones analizadas.	41
Figura 10 Análisis de la expresión de la integrina $\alpha 6$ en las lesiones.....	42
Figura 11 Inmunodetección de la integrina $\alpha 6$ en quiste dentígero (QD).	44
Figura 12 Inmunodetección de la Integrina $\alpha 6$ en AU Mural.....	45
Figura 13 Inmunodetección de la integrina $\alpha 6$ en AU Luminal.....	46
Figura 14 Inmunodetección de la integrina $\alpha 6$ en AM Folicular.....	47
Figura 15 Inmunodetección de la integrina $\alpha 6$ en AM Plexiforme	48
Figura 16 Imágenes representativas de la detección de la integrina $\alpha 6$ en todos los tejidos analizados.....	49
Figura 17 Análisis del reconocimiento de la integrina $\alpha 6$	51
Figura 18 Expresión de HSP60 en ameloblastoma y quiste dentígero.....	53
Figura 19 Inmunodetección de HSP60 en quiste dentígero.....	56
Figura 20 Inmunodetección de HSP60 en AU Mural.....	57
Figura 21 Inmunodetección de HSP60 en AU Luminal.....	58
Figura 22 Inmunodetección de HSP60 en AM Folicular.	59
Figura 23 Inmunodetección de HSP60 en AM Plexiforme.	60
Figura 24 Imágenes representativas de la detección de HSP60 en todos los tejidos analizados. ...	61
Figura 25 Análisis del reconocimiento de HSP60.	63
Figura 26 Estructuras básicas de los sitios de adhesión donde participa la integrina $\alpha 6\beta 4$	66
Figura 27 Inmunodetección de integrina $\beta 1$	70
Figura 28 Esquema de las integrinas $\alpha 6$ y $\alpha 6p$	72
Figura 29 Funciones pro y antiapoptóticas de HSP60.	76
Figura 30 Detección inmunohistoquímica de HSP60 en Ameloblastoma	78

Abreviaturas

Amel	Ameloblastoma
TO's	Tumores odontogénicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
QD	Quiste dentífero
MMP-2	Metaloproteasa 2
SHH	Sonic hedgehog
PTCH	Patched
SMO	Smoothened
AM-1	Línea celular de ameloblastoma
PM	Proteína membranal
ET	Extracto total
IHQ	Inmunohistoquímica
IS	Intensidad
PS	Proporción
N	Núcleo
M	Membrana
C	Citoplasma
AM F	Ameloblastoma convencional de tipo folicular
AM P	Ameloblastoma convencional de tipo plexiforme
AU	Ameloblastoma uniuquístico
AU L	Ameloblastoma uniuquístico de tipo luminal
AU M	Ameloblastoma uniuquístico de tipo mural
kDa	Kilodaltones
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
CCU	Cáncer cérvico uterino

Introducción

Tumores Odontogénicos

Los tumores odontogénicos (TO's) son lesiones que derivan de los tejidos productores de dientes o de sus remanentes que quedan dentro de los tejidos mandibulares o de los tejidos blandos. Estas neoplasias pueden ser benignas o malignas con variación en su agresividad y su potencial para desarrollar metástasis (Mosqueda-Taylor 2008). Los TO's son poco frecuentes, pero pueden plantear un reto diagnóstico y terapéutico significativo (Seethala and Stenman 2017).

Estos tumores habitualmente son asintomáticos, pero pueden expandir la mandíbula y causar movilidad de los dientes, además de pérdida de hueso. En el examen microscópico, los TO's tienden a mostrar rasgos similares a los de las células o tejidos de origen. Pueden ser de tejido epitelial, mesenquimal o ambos (Regezi *et al.*, 2000).

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

Clasificación de los Tumores Odontogénicos

El principio de desarrollar un estándar internacional para la clasificación de tumores fue acordado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1952, pero las primeras ediciones de la serie de Clasificación Histológica Internacional se publicaron hasta después de 1967. La cuarta edición de la Clasificación Mundial de Tumores de Cabeza y Cuello de la Organización Mundial de la Salud se publicó recientemente ('WHO Classification of Head

and Neck Tumours' 2017) con una serie de cambios significativos con respecto a la edición anterior. En un intento de simplificar la clasificación y el diagnóstico se evitó el uso de técnicas moleculares complejas, por lo que uno de los cambios significativos fue regresar al queratoquiste odontogénico a la clasificación de quistes dentígeros (Speight and Takata 2018). Así, la nueva clasificación divide a las lesiones tumorales en malignos y benignos. Los benignos pueden ser de origen epitelial, mesenquimal o mixto (Tabla 1), esta clasificación es sin la descripción de grado de cambio (Speight and Takata 2018).

Etiología de los tumores odontogénicos

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

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

- a) La lámina dental pre-funcional (epitelio odontogénico con capacidad para producir un diente), que es más abundante en los terceros molares inferiores.
- b) La lámina dental post-funcional, un concepto que cubre los restos epiteliales como los de Serre, ubicados dentro del tejido gingival fibroso, las células epiteliales de Malassez, que descansan en el ligamento periodontal, y el epitelio reducido del órgano del esmalte, que cubre la superficie del esmalte hasta la erupción del diente.
- c) La capa de células basales del epitelio gingival, que originalmente dan lugar a la lámina dental.

Tabla 1. Clasificación de los tumores odontogénicos

Tumores odontogénicos malignos
<ul style="list-style-type: none"> Carcinomas odontogénicos <ul style="list-style-type: none"> Carcinoma ameloblástico Carcinoma intraóseo primario Carcinoma intraóseo primario Carcinoma odontogénico esclerosante Carcinoma odontogénico de células claras Carcinoma odontogénico de células fantasmas Carcinoma odontogénico Sarcomas odontogénicos
Tumores odontogénicos benignos
<ul style="list-style-type: none"> Tumores epiteliales <ul style="list-style-type: none"> Ameloblastoma <ul style="list-style-type: none"> Ameloblastoma uniuístico Ameloblastoma extraóseo / periférico Metastásico Tumor odontogénico escamoso Tumor odontogénico epitelial calcificante Tumor odontogénico adenomatoide Tumores mixtos (epitelial y mesenquimal) <ul style="list-style-type: none"> Fibroma ameloblástico Tumor odontogénico primordial Odontoma <ul style="list-style-type: none"> Odontoma compuesto Odontoma complejo Tumor dentinogénico de células fantasma Tumores mesenquimales <ul style="list-style-type: none"> Fibroma odontogénico Mixoma/ mixofibroma Cementoblastoma Fibroma cementante

- d) La papila dental, el origen de la pulpa dental, que tiene el potencial de ser inducida a producir odontoblastos y sintetizar la dentina y/o material dentinoide.
- e) El folículo dental.
- f) El ligamento periodontal, el cual tiene el potencial de inducir la producción de fibras y material mineralizado.

Tratamiento

Debido al pequeño número de casos publicados de TO's, en la actualidad no se encuentran disponibles protocolos o pautas de tratamiento específicos. La resección quirúrgica con márgenes de seguridad (0.5 mm) es el tratamiento de elección (Thompson 2006).

Las lesiones pequeñas pueden ser resueltas con enucleación y curetaje y también se cita la aplicación de sustancias criogénicas con el objetivo de anular el posible compromiso del margen de la lesión, donde el nitrógeno líquido es el más utilizado para cirugía criogénica en hueso, después de la resección de la lesión (Pogrel 1995).

Ameloblastoma

El ameloblastoma es un tipo de tumor odontogénico benigno, intraóseo, polimórfico, localmente invasivo y que presenta un patrón microscópico de tipo folicular o plexiforme que pueden llegar a unirse en forma secundaria con el epitelio bucal (Kramer *et al.*, 1992). Representa el 1% de todas las lesiones quísticas y tumorales de los maxilares, siendo un tumor derivado del epitelio odontogénico que exhibe un comportamiento clínico agresivo con alta tendencia a ser recurrente (Punnya and Rekha 2008). Esta lesión puede surgir en

un amplio rango de edad (10-92 años), siendo los 33 años la edad más común, sin tener predilección por alguno de los sexos (Punnya and Rekha 2008). El 85% de los casos ocurren en la mandíbula con predilección en las áreas molar y de rama mandibular (Punnya and Rekha 2008).

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

Radiográficamente pueden aparecer como zonas radiolúcidas uniloculares o multiloculares con bordes festoneados (Fig. 1). Frecuentemente se asocia a órganos dentarios no erupcionados o retenidos y la reabsorción radicular es común en los dientes adyacentes a la lesión (Regezi and Scuibba, 1989).

El ameloblastoma puede originarse a partir de la lámina dentaria o sus derivados: órgano del esmalte, restos epiteliales de Malassez, restos de Serres, gobernáculo o bien de quistes foliculares (Lucas 1983). Si bien su causa sigue siendo desconocida, la desregulación de algunos genes en la odontogénesis puede jugar un papel importante en su histogénesis (Thompson 2006).

Se reconocen cuatro características para identificar histológicamente a los ameloblastomas (Vickers and Gorlin 1970)

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

Clasificación clínica de los ameloblastomas

Según la clasificación de la OMS en el 2017, la clasificación del ameloblastoma se simplificó de la siguiente manera (Speight and Takata 2018):

a) Ameloblastoma (Ameloblastoma convencional)

Es el segundo tumor odontogénico más frecuente. Se origina centralmente, pero suele crecer en todas las direcciones, invadiendo el tejido local y destruyendo el hueso (Fig. 1), ya que se esparce lentamente por infiltración (Thompson 2006). Las lesiones no son encapsuladas y presentan un porcentaje de recidiva de hasta un 90 % si son tratados solo con curetaje (Adebiyi et al. 2006).

Existen dos patrones histológicos, el folicular y el plexiforme (Fig. 1), que pueden ser descritos como entidades diagnósticas (Speight and Takata 2018), sin que esto presente una relevancia clínica (Thompson 2006). El tipo folicular consiste en islas de epitelio odontogénico dentro de un estroma fibroso, las células basales son columnares, hiper Cromáticas y en forma de empalizada (Fig. 1). Las células centrales pueden estar libremente arregladas, parecidas al retículo estrellado (Fig. 1), las cuales comúnmente se vuelven quísticas y en algunas ocasiones confluentes. Por su parte, el patrón plexiforme presenta células basales acomodadas en fibras anastomosadas con un retículo estrellado escaso (Fig. 1), el estroma usualmente presenta un tipo de degeneración quística (Thompson 2006).

b) Ameloblastoma unikuístico

Esta variante de ameloblastoma fue descrito por primera vez en 1977 y en ese entonces esta lesión fue separada como una entidad distinta por ofrecer cuadros histogénicos particulares (Konouchi et al. 2006). Algunos autores opinan que este tumor se desarrolla a partir de los quistes odontogénicos preexistentes, mientras que otros sostienen que emergen *de novo* (Konouchi et al. 2006). De hecho, Robinson y Martínez plantearon que el ameloblastoma y los quistes odontogénicos tienen un ancestro común (Robinson and

Martinez 1977; Konouchi et al. 2006). Así, la transición desde un quiste no neoplásico a uno neoplásico podría ser una posibilidad.

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

El término ameloblastoma uniuístico puede ser atribuido a todas aquellas lesiones quísticas (Fig. 1) que presenten alguno de los siguientes requisitos en el contexto de su pared (Cunha et al. 2005):

Ameloblastoma uniuístico simple o luminal, donde el epitelio del quiste es homogéneamente ameloblastomatoso (Fig. 1).

Ameloblastoma uniuístico intraluminal, donde uno más nódulos ameloblastomatosos se proyectan en el lumen quístico (aspecto descrito como luminal o intraluminal), sin evidencia de infiltración de la pared fibrosa del quiste por epitelio odontogénico (Fig. 1).

Ameloblastoma uniuístico intramural, donde uno o más proyecciones epiteliales ameloblásticas proliferan en el espesor de la pared conjuntiva, ya sea del tipo folicular o plexiforme, el cual puede estar o no conectado a la cubierta epitelial del quiste; o bien, islas de tejido ameloblástico que están presentes en el interior de la pared conjuntiva en contacto directo con el epitelio de un quiste aparentemente no neoplásico.

c) Ameloblastoma Extraóseo o Periférico

Este tipo de ameloblastoma se observa como un aumento de volumen localizado en la encía (Fig. 1). Es la menos frecuente de las formas clínicas del ameloblastoma,

representando del 1 al 10% de estas lesiones (Thompson 2006). Raramente afecta el hueso adyacente y presenta muy buena evolución posterior al tratamiento quirúrgico (Smullin et al. 2008).

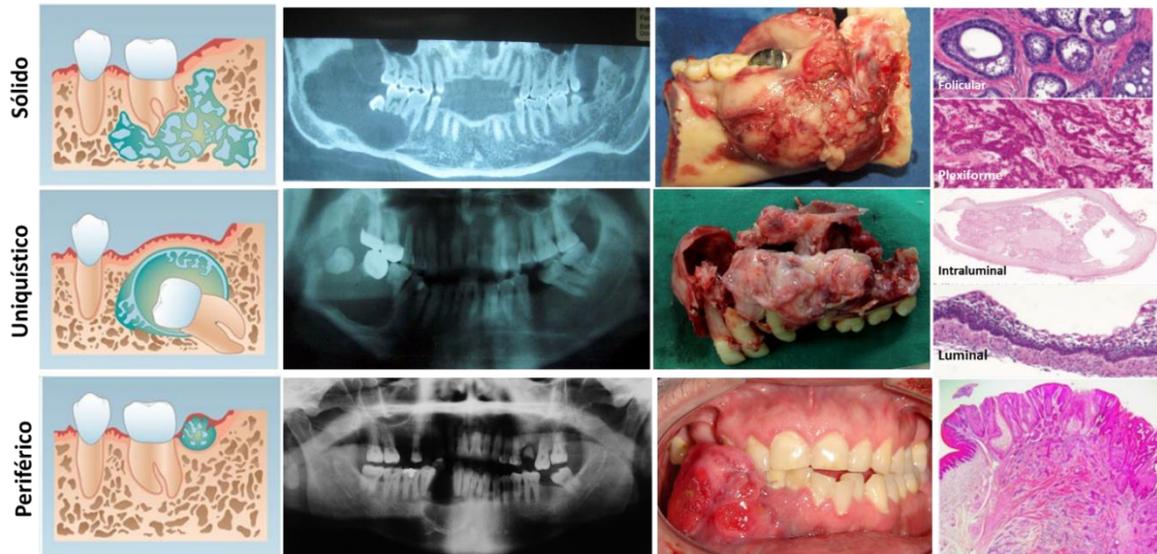


Figura 1. Tipos de ameloblastoma.

Se muestra un esquema, así como imágenes radiográficas, e histológicas de los ameloblastomas más comunes. Imágenes proporcionadas por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México.

Quiste dentígero

Los quistes odontogénicos son cavidades patológicas con revestimiento epitelial rodeados de tejido conectivo fibroso que se originan en los tejidos odontogénicos de las regiones del maxilar y la mandíbula. Causan destrucción ósea y pueden causar resorción o desplazamiento de los dientes adyacentes. Pueden ser de tipo inflamatorio o del desarrollo

(Rajendra Santosh 2020)

En frecuencia, el quiste dentígero es el segundo de todos los quistes odontogénicos y el más común del tipo del desarrollo (Scholl et al. 1999; Narang et al. 2012). Un quiste dentígero rodea la corona de un diente no erupcionado por la expansión de su folículo dental y está unido al límite amelodentinario (Fig. 2a-d) (Scholl et al. 1999). Esta lesión es la causa más frecuente de radiopacidad presente alrededor de un diente no erupcionado (Scholl et al. 1999). Histopatológicamente, está conformado por una cavidad tapizada de epitelio escamoso hiperplásico no queratinizado hacia el lumen. Una cápsula de tejido conectivo con presencia de infiltrado inflamatorio da soporte al epitelio (Fig. 2f). Las células epiteliales que recubren esta lesión pueden aparecer de forma aplanada o cuboidal y suelen presentarse en 2 a 6 capas (Fig. 2f) (Devi et al. 2015).

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

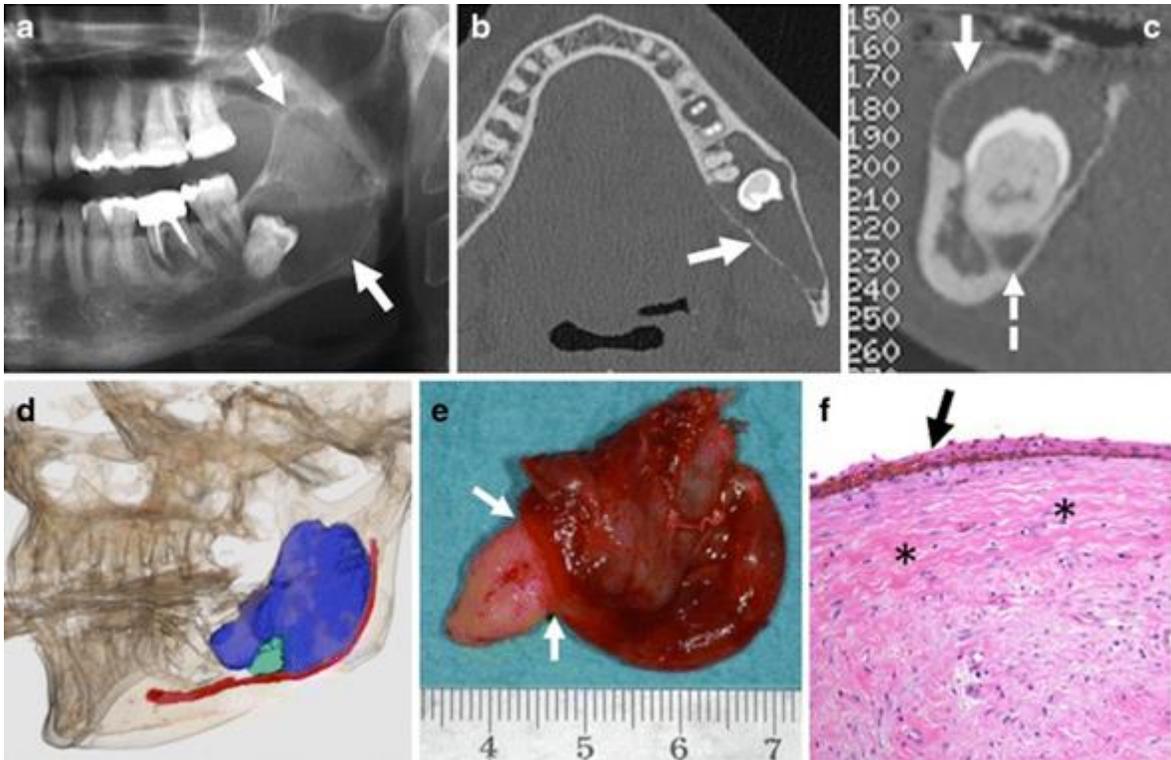


Figura 2. Quiste dentígero.

(a-c) Imágenes radiográficas, lesión radiolúcida unilocular bien definida (flechas gruesas) que rodean un diente no erupcionado. (d) Reconstrucción tridimensional que muestra la relación del QD (azul) con el diente no erupcionado (verde) y el dentario inferior (rojo). (e) Quiste dentígero, las flechas indican a la lesión quística rodeando la corona dental (f) aspecto histológico. La flecha indica el epitelio con 2 a 3 células epiteliales

Tomado de Insights Imaging, 2014

Relación entre el quiste dentífero y el ameloblastoma

En la pared de un quiste dentífero pueden desarrollarse tumores odontogénicos benignos como ameloblastomas, tumores adenomatoides y tumores mucoepidermoides, así como tumores malignos (carcinomas) (Weber 2003). Clínica y radiográficamente el ameloblastoma uniuístico y el quiste dentífero son idénticos (Masthan et al. 2011). De hecho, algunos tipos de ameloblastoma uniuístico que histológicamente presentan pequeñas islas de epitelio ameloblástico (Fig. 3) pueden ser erróneamente diagnosticados como quistes dentíferos, éstos suelen tratarse como un quiste dentífero, llevando a cabo una enucleación simple, lo cual predispone a la reaparición del ameloblastoma (Dunsche et al. 2003).

Scholl *et al.* (1999) afirman que aproximadamente el 50% de los ameloblastomas se originan de las paredes de un quiste dentífero, constituyendo una entidad bien definida llamada ameloblastoma mural, mientras que otro trabajo argumenta hasta un 85% de los casos y una edad promedio de 21.8 años al momento de su diagnóstico (Shteyer et al. 1978).

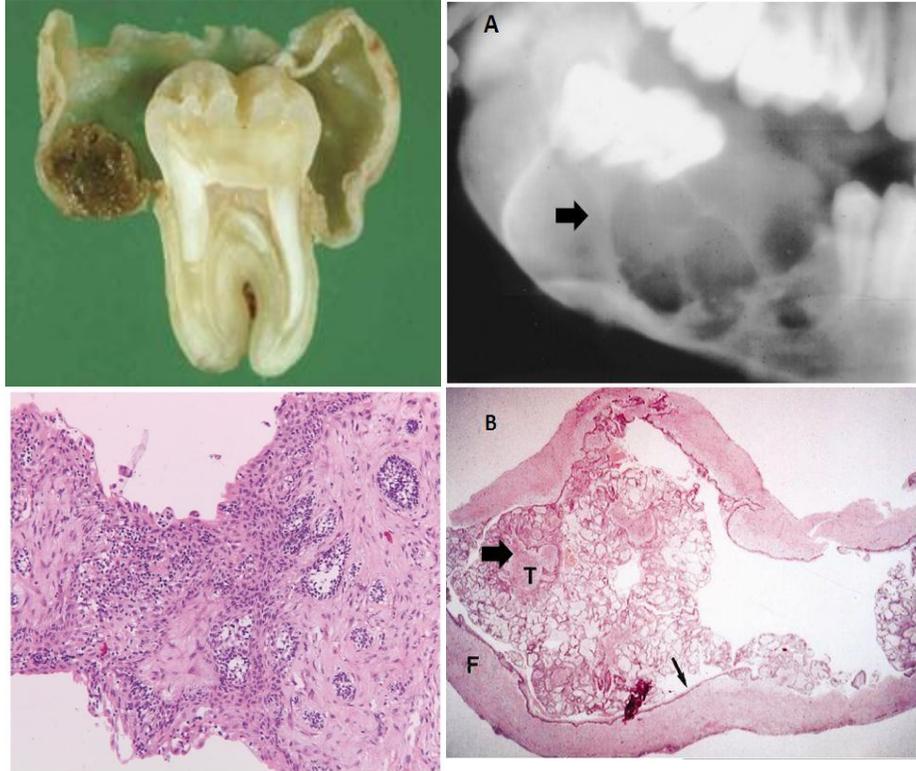


Figura 3. Ameloblastomas provenientes de quistes dentígeros.

Entre el 50% y el 85% de los ameloblastomas murales se originan en la pared de un quiste dentígero. Quiste relacionado a la corona de un diente no erupcionado. (A) Radiografía del quiste dentígero, se marca la lesión con una flecha. (B) Histológicamente se observa la cavidad conformada por el quiste, con crecimiento de una masa tumoral hacia el interior y que deriva del epitelio (flecha). Tomada y modificada de Scholl, 1999

Estudio de moléculas como biomarcadores

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

Moléculas estudiadas en el Ameloblastoma

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

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

Desde 1995 se ha estudiado la proliferación celular en los ameloblastomas con Ki67, el

núcleo inmunorreactivo a esta molécula se ha encontrado mayoritariamente en las células periféricas tipo ameloblastos en las áreas folicular y plexiforme de los ameloblastomas convencionales, así como en las células basales de los ameloblastomas unicuísticos (Bologna-Molina et al. 2008). Por esto se ha sugerido que la proliferación celular, y por lo tanto el crecimiento del ameloblastoma, está centrado en las zonas periféricas de la lesión compuestas de células tipo ameloblastos (Jaaskelainen et al. 2002).

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

La ameloblastina es la proteína más importante involucrada en la citodiferenciación dental y se expresa en altos niveles durante la diferenciación del epitelio (Gomes et al. 2010). Se expresa en ameloblastos diferenciados, pero también se ha identificado en las células epiteliales del ameloblastoma, sólo que en estas lesiones, el gen presenta mutaciones somáticas que no se presentan en la mucosa oral normal (Tsujiyama et al. 2005; Takata et al. 2000; Snead et al. 1992; Saku et al. 1992).

Con respecto a las proteinasas de matriz, se ha reportado que la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) puede suprimir el comportamiento invasivo local de los ameloblastomas tanto *in vitro* como *in vivo* (Gomes et al. 2010). Por otra parte, se han propuesto diferentes moléculas para diferenciar varias lesiones odontogénicas (Cairns et al. 2010). Por ejemplo, calretinina se expresa específicamente en las áreas del ameloblastoma donde se localizan células parecidas al retículo estrellado, por lo que se le ha considerado como un posible marcador clínico de epitelio ameloblástico neoplásico (DeVilliers et al. 2008; Altini et al. 2000).

La vía de señalización "Sonic hedgehog" (SHH) es importante para la organogénesis, ya que regula la proliferación y diferenciación de los ameloblastos, y se ha visto que está involucrada con la proliferación del ameloblastoma (Kanda et al. 2013). SHH es una proteína secretada que activa a un complejo receptor de membrana formado por patched (PTCH) y

smoothened (SMO), ambas proteínas contienen siete pasos transmembranales (Ingham and McMahon 2001). En ausencia de SHH, PTCH inhibe a SMO, pero si SHH se une a PTCH se activan las proteínas GLI (Ingham and McMahon 2001), las cuales funcionan como factores de transcripción que activan a otros genes blanco que van a conducir a la proliferación y diferenciación celular (Ren et al. 2012); entonces, la activación aberrante de la vía de señalización SHH puede resultar en la formación tumoral (Ruiz et al. 2002; Hahn et al. 1999).

En un estudio inmunohistoquímico realizado en 29 ameloblastomas (17 foliculares y 12 plexiformes) en los que se analizó la expresión de las moléculas SHH y PTCH, se encontró que ambas proteínas se expresaron tanto en encía normal, como en ameloblastoma, sólo que esta expresión fue más marcada en el citoplasma de las células de encía que en el ameloblastoma; sin embargo, el ameloblastoma también mostró inmunodetección en la membrana celular (Kanda et al. 2013).

En otro estudio a un cultivo celular de ameloblastoma (AM-1) que expresaba PTCH se le adicionó un anticuerpo neutralizante para SHH, el cual suprimió la proliferación de éstas células y también la translocación al núcleo de GLI1 y GLI2, pero no de GLI3 (Kanda et al. 2013). También en la presencia del anticuerpo neutralizante, la expresión de BCL2 (proteína anti-apoptótica) disminuyó, mientras que BAX (proteína pro-apoptótica) aumentó (Kanda et al. 2013). La misma supresión de la proliferación ocurrió al adicionarle el fármaco ciclopamina, el cual inhibe las respuestas de los invertebrados a la vía de la familia Hedgehog (Cooper et al. 1998). Estos resultados sugieren que ésta vía de señalización está constitutivamente activa en el ameloblastoma (Kanda et al. 2013), lo cual también se ha encontrado en varios tipos de muestras fijadas e incluidas en parafina. Sweeney y colaboradores (2014) identificaron mutaciones oncogénicas en las vías Hedgehog y MAPK en más del 80% de los ameloblastomas mediante un análisis genómico. Interesantemente, las mutaciones en SMO son comunes en los ameloblastomas del maxilar, mientras que las mutaciones en BRAF son predominantes en los tumores de la mandíbula (Kurppa et al. 2014; Sweeney et al. 2014). Se ha demostrado que una alteración frecuente en la proteína

SMO es el cambio de un residuo de leucina en posición 412 por un residuo de fenilalanina (L412F), lo que activa la ruta de Hedgehog y que ésta puede ser inhibida por el trióxido de arsénico (ATO), un medicamento contra la leucemia aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA).

De manera similar, las células de ameloblastoma que albergan una mutación BRAF activadora (V600D) son sensibles al inhibidor vemurafenib (Kurppa et al. 2014; Sweeney et al. 2014). Estos resultados sugieren que estos medicamentos pudieran tener un efecto terapéutico. Sin embargo, existe un porcentaje de ameloblastomas que no presentan mutación en esas proteínas, por lo que es necesario la búsqueda de otros blancos para el tratamiento complementario de esta neoplasia. Por otra parte, no está claro si MAPK y las mutaciones de la ruta de Hedgehog representan dos subclases moleculares de ameloblastoma, como lo sugieren Sweeney y colaboradores (Sweeney et al. 2014), o si las mutaciones en SMO funcionan como eventos secundarios con la activación de la ruta de MAPK como el motor esencial de la patogénesis, como lo sugieren otros autores (Brown et al. 2014), pero BRAF y SMO fueron los dos genes mutados con mayor frecuencia en ambos estudios y las mutaciones en estos genes se excluyeron mutuamente en todos, menos tres casos (16% de los casos mutados de SMO). Sin embargo, las mutaciones en SMO con frecuencia ocurrieron junto con mutaciones en RAS (37% de los casos mutados en SMO) y mutaciones en FGFR2 (32% de los casos mutados en SMO). El 16% de las mutaciones en SMO ocurrieron en ausencia de mutaciones en la vía MAPK, lo que representa el 4% de los ameloblastomas en general (Brown and Betz 2015).

Así, actualmente existen diferentes estudios inmunohistoquímicos que muestran la expresión diferencial de moléculas en las células del ameloblastoma, pero hay pocos estudios que muestren información sobre proteínas membranales con expresión diferencial en este tipo de lesiones.

Proteínas membranales

La membrana plasmática mantiene las barreras esenciales entre el citoplasma y el medio

extracelular, contiene proteínas que median algunas de las funciones celulares, actuando como sensores de las señales extracelulares, transportadores de moléculas específicas y como el punto de unión de la membrana con el citoesqueleto, la matriz extracelular y las células adyacentes (Leth-Larsen et al. 2010).

Las proteínas de membrana representan un tercio de las proteínas codificadas por el genoma (Josic and Clifton 2007), y aproximadamente el 50% de la masa de la membrana celular (Huber et al. 2003). También, más de dos tercios de las drogas existentes y futuras tienen como blanco proteínas de membrana (Rabilloud 2003; Hopkins and Groom 2003, 2002). Las membranas celulares son hidrofóbicas y por lo tanto solo son solubles en soluciones que contienen detergentes. La mayoría de las proteínas de membrana tienen numerosas modificaciones postraduccionales, como glicosilación, fosforilación y sulfatación, esto es la razón de su heterogeneidad extremadamente alta (Josic and Clifton 2007).

Los cambios fenotípicos asociados a la transformación maligna, que incluyen la proliferación celular, adhesión y migración, continuamente son mediados o iniciados por proteínas asociadas a la membrana plasmática, como los receptores membranales (Lund et al. 2009), los cuales son proteínas transmembranales que se unen a moléculas de señalización hidrofílicas que no pueden cruzar la bicapa lipídica y que actúan como transductores de señales para regular procesos celulares, por lo que esos receptores son moléculas clave para la sobrevivencia celular, y por lo tanto son considerados como blancos terapéuticos (Lund et al. 2009). Las interacciones entre proteínas y receptores son independientes de la síntesis proteica, por lo que la proteómica se ha convertido en la principal forma de abordar la señalización y regulación de los receptores membranales (Lund et al. 2009).

El caracterizar marcadores de la superficie celular en tipos celulares específicos a distintos niveles de diferenciación, o diferentes estadios de la enfermedad, puede ser una forma de identificar marcadores moleculares potenciales para su subsecuente uso como blancos terapéuticos, que pueden ser reconocidos, ya sea por anticuerpos monoclonales o bien por

moléculas biológicas pequeñas (Josic and Clifton 2007). Un ejemplo de esto es la disminución en la expresión de HLA clase I en algunos tumores en comparación con células normales (Lund et al. 2009).

En diferentes tipos de cáncer se han encontrado proteínas específicas de tumor utilizando diferentes técnicas, entre las que se encuentran la detección diferencial de cDNA's y la purificación de las proteínas de la superficie reconocidas por algunos tipos de anticuerpos tumorales (Adam et al. 2003), ya que las células cancerosas presentan alteraciones en los niveles de expresión de proteínas de membrana particulares. Entre estas alteraciones puede ocurrir la sobre expresión de algún tipo de receptor, como se encontró con HER-2 (Cuesta-Mejías et al. 2001), el cual puede contribuir al crecimiento celular tumoral activado por ligandos circulantes o producidos. Otro tipo de alteración puede ser la falta o disminución en la expresión de algunas moléculas de adhesión, lo que permite a las células tumorales separarse del tumor primario y esparcirse (Leth-Larsen, Lund, and Ditzel 2010).

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

Los cultivos celulares actualmente son más utilizados para el fraccionamiento celular, debido a que las células pueden ser manipuladas con mayor éxito que las células derivadas de tejidos. Sin embargo, tras la homogeneización, los cultivos celulares son más difíciles de fraccionar que la mayoría de los tejidos, posiblemente por diferencias en la organización de

su citoesqueleto (Huber et al. 2003). Por otra parte, el fraccionamiento celular se puede lograr mediante centrifugaciones diferenciales, debido a que cada organelo tiene tamaño, densidad, carga y otras propiedades características de las cuales depende la separación (Huber et al. 2003). En general, casi todos los procedimientos de preparaciones membranales se inician con una incubación en soluciones hipotónicas del tejido o las células a usar, seguido de una homogeneización y remoción del núcleo y detritus celulares mediante la centrifugación a bajas velocidades (Huber et al. 2003). Así, después de la primera centrifugación, se obtiene el sobrenadante post nuclear para posteriormente realizarle un protocolo de fraccionamiento celular que consiste en una sedimentación por centrifugación que separa la fracción total de membranas de todas las proteínas solubles (Huber et al 2003). Además, el subfraccionamiento de las membranas plasmáticas se ha realizado mediante el uso de gradientes de sacarosa para la posterior identificación de proteínas específicas de organelos mediante electroforesis en dos dimensiones (2-DE); sin embargo, mediante este método la membrana plasmática co-purifica con Golgi y endosomas tempranos (Josic and Clifton 2007), por lo que es recomendable evaluar la integridad funcional y mecánica de los organelos, lo cual se puede realizar mediante diversos métodos. El inmunomarcaje para seguir la distribución de marcadores específicos de organelos puede ser usado, así como un análisis morfológico de todas las fracciones mediante microscopía electrónica (Huber et al. 2003).

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

Las proteínas integrales de membrana se caracterizan por poseer al menos un dominio hidrofóbico que interactúa directamente con el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica (Tanford and Reynolds 1976). Los detergentes no iónicos son ampliamente utilizados para la solubilización y caracterización de estas proteínas (Helenius et al. 1979). Durante la

solubilización, el detergente no iónico reemplaza a la mayoría de las moléculas de lípidos en contacto con el dominio hidrofóbico de la proteína integral de membrana y lleva a la formación de una micela mixta de proteína-detergente (Tanford and Reynolds 1976). Varias de las propiedades de esta micela mixta, como el tamaño y la hidrofilia dependerán de la proteína solubilizada, así como de las propiedades del detergente presente en el complejo. En contraste con las proteínas integrales de membrana que tienen una estructura anfifílica, las proteínas hidrofílicas o solubles en agua muestran poca o ninguna interacción hidrofóbica con detergentes no iónicos y sus propiedades fisicoquímicas se espera que no sean influenciadas por la presencia del detergente en la solución (Rubin and Tzagoloff 1973; Tanford and Reynolds 1976).

El detergente no iónico de uso más común para el fraccionamiento de proteínas membranales es el Tritón- X100, ya que claramente forma soluciones micelares a temperatura ambiente. Conforme la temperatura se va aumentando, el peso molecular micelar aumenta y a los 64 °C la solución se vuelve turbia (Dennis 1974; Bordier 1981). A esta temperatura, llamada punto de nube, se produce una separación de fases microscópica en la solución que podría deberse a la asociación secundaria de micelas pequeñas en grandes agregados de micelas (Weckstrom 1985). Con un mayor aumento de temperatura la separación de fases continúa hasta que se forman dos fases enriquecidas en detergente (Bordier 1981). Toda esta sección se queda completamente desconectada de lo que sigue.

Tendrías que explicar qué tipo de fraccionamiento realizaste y luego pasar a la descripción de lo que encontraste.

Comparación de proteínas membranales de Amel y QD

En mi trabajo de tesis de maestría (Rodríguez-Vázquez, 2015) se realizó un análisis comparativo de las proteínas de membrana del ameloblastoma, en sus variantes convencional y unguístico y del quiste dentífero (Fig. 4). Para comprobar la purificación de

las proteínas de membrana se realizó un ensayo de western blot utilizando un anticuerpo contra una proteína específica de la membrana celular, la E-cadherina, la cual se detectó en la fracción de proteínas de membrana, pero no en las proteínas citoplásmicas (Fig. 4), indicando un fraccionamiento apropiado. Al comparar los perfiles de las proteínas de membrana de las diferentes lesiones se encontraron dos bandas de aproximadamente 95 y 55 kDa que se detectaron en los dos tipos de ameloblastoma, pero no en el quiste dentígero (Fig. 5A), por lo que estas bandas fueron las seleccionadas para ser analizadas por espectrometría de masas. En la banda de un peso aproximado de 95 kDa se identificó a HSP60 (Fig. 5B) (Rodríguez-Vázquez, 2015), una proteína mitocondrial que en algunos tumores se transloca a citoplasma, membrana plasmática e incluso es secretada (Cappello and Zummo 2005). En esta banda también se identificó a la periostina y a la enzima piruvato cinasa (Fig. 5B) (Rodríguez-Vázquez, 2015). Por otra parte, en la banda de aproximadamente 55 kDa se identificó a vinculina, plectina y a la integrina $\alpha 6$ (Fig. 5B) (Rodríguez-Vázquez, 2015).

Así, nuestros resultados anteriores sugieren que la integrina $\alpha 6$ y la proteína HSP60 con posible localización membranal podrían tener un papel importante en el desarrollo del ameloblastoma, y, por lo tanto, podrían ser consideradas como posibles blancos terapéuticos y/o diagnósticos para esta lesión. Sin embargo, se requiere del análisis de estas proteínas en un mayor número de ameloblastomas y quistes dentígeros para comprobar esta hipótesis.

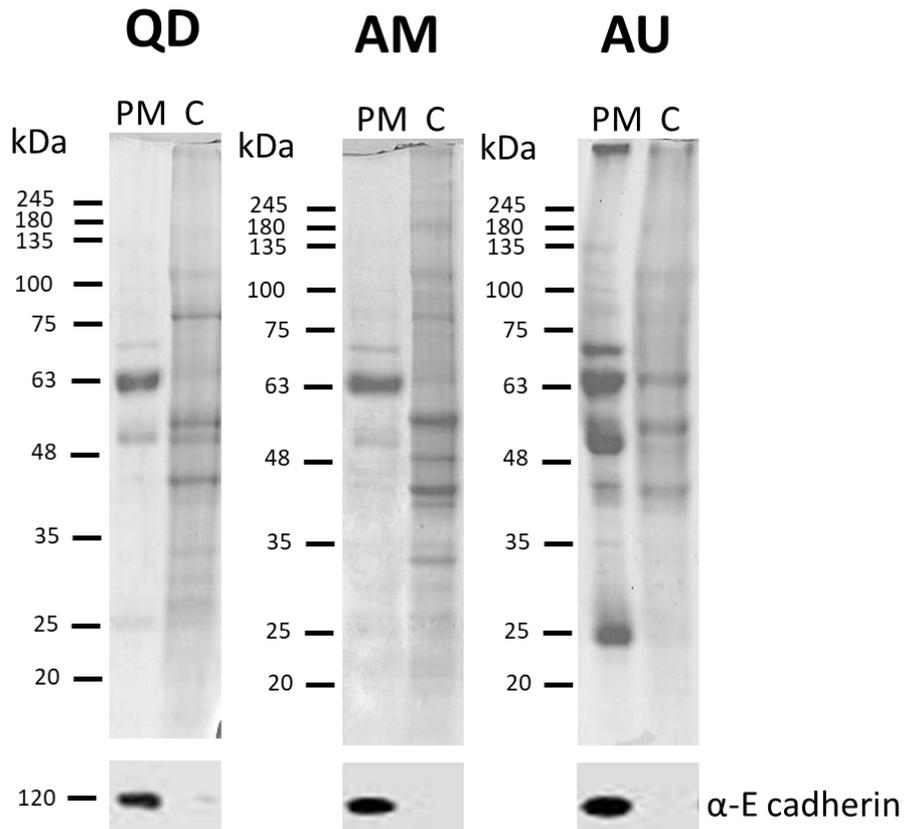
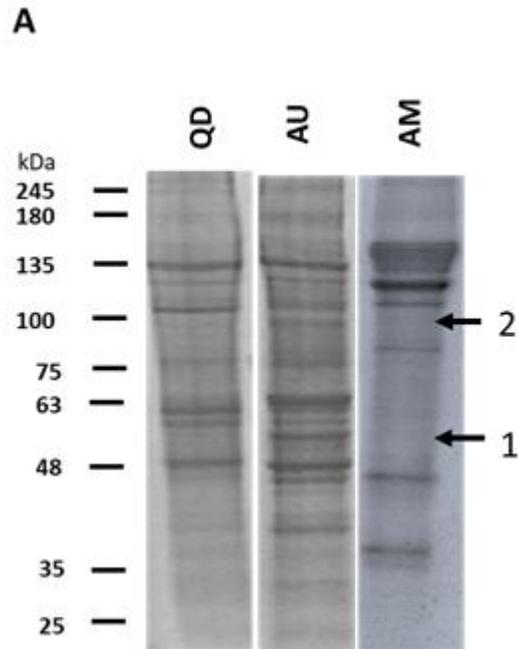


Figura 4. Obtención de proteínas membranales de quiste dentífero y ameloblastoma. Se realizó el fraccionamiento de proteínas membranales (MP) y extractos citoplasmáticos (C) de ameloblastomas convencionales (AM), ameloblastomas uniuquísticos (UA) y quistes dentíferos (QD) y su integridad se analizó mediante SDS-PAGE. En la parte inferior se muestran los ensayos de western blot utilizando un anticuerpo contra la proteína de membrana E-cadherina para confirmar el fraccionamiento (Rodríguez-Vázquez, 2015).



	Accession	Description	Score	Coverage	MW [kDa]	calc. pI
1	IPI00291175.7	Isoform 1 of Vinculin	64.68	14.92	116.6	6.09
	IPI00398776.3	Isoform 7 of Plectin	32.93	2.28	512.3	5.77
	IPI00921080.1	Isoform 7 of Integrin alpha-6	21.10	6.81	106.5	7.66
2	IPI00784154.1	60 kDa heat shock protein, mitochondria	19.90	9.95	61.0	5.87
	IPI00910262.1	Isoform 4 of Periostin	18.86	9.45	83.8	8.18
	IPI00479186.7	Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	223.24	55.37	57.9	7.84

Figura 5. Análisis de proteínas membranales diferenciales del quiste dentífero y ameloblastoma.

(A) Tras el fraccionamiento celular se realizó un análisis comparativo entre las proteínas que se expresan en el quiste dentífero (QD), en el ameloblastoma convencional (AM) y en el ameloblastoma unicístico (AU). Las flechas indican bandas que se encontraron en el AM y no así en el QD. (B) Identificación por espectrometría de masas de las proteínas en las bandas con expresión diferencial (Rodríguez-Vázquez, 2015).

Justificación

Nuestros estudios previos han sugerido una variación en la expresión de la integrina $\alpha 6$ y HSP60 en la superficie del ameloblastoma comparado con el quiste dentígero.

El análisis de la expresión de estas proteínas en más muestras de quiste dentígero y ameloblastoma será de gran ayuda para confirmar su localización membranal en la lesión tumoral, además de analizar su probable sobre expresión. El corroborar los resultados previos, permitirá determinar si estas proteínas participan en el desarrollo del ameloblastoma y por lo tanto, se podría proponer su uso como biomarcadores y/o blancos terapéuticos

Hipótesis

Las proteínas integrina $\alpha 6$ y HSP60 se sobre expresan y presentan una localización subcelular atípica en ameloblastoma.

Objetivo general

Analizar y comparar la expresión y localización subcelular de integrina $\alpha 6$ y HSP60 en ameloblastoma y quiste dentígero.

Objetivos particulares

1. Analizar la localización y comparar la expresión de integrina $\alpha 6$ en ameloblastoma y quiste dentígero.
2. Analizar la localización y comparar la expresión de HSP60 en ameloblastoma y quiste dentígero.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras

Las muestras de ameloblastoma y quiste dentígero para el análisis mediante electroforesis y western blot fueron proporcionadas por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Juárez de México, bajo el convenio HJM1996/11.03.08

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

Las muestras incluidas en parafina utilizadas para los análisis inmunohistoquímicos fueron facilitadas por el servicio de diagnóstico histopatológico del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Tinción con hematoxilina- eosina

Para el análisis microscópico, las muestras de tejido se fijaron en formol al 10%, se procesaron por la técnica convencional de la parafina y se realizaron cortes de aproximadamente 3 µm de grosor con un micrótopo RM2145 (Leica Microsystems AG). Posteriormente, se realizó el desparafinado de las muestras mediante su incubación durante 20 min a 60 °C. Entonces, las muestras se sumergieron en xilol durante 10 o 15 min, se hidrataron incubando 5 min consecutivamente con alcohol absoluto, alcohol al 96% y alcohol al 70%. Seguido de ello, las muestras se lavaron con agua destilada, y se introdujeron en hematoxilina (Vector Laboratories) durante 5 min. Enseguida se lavaron con agua destilada durante 2 min y finalmente se tiñeron con eosina alcohólica (Vector

Laboratories) durante 1 min. Posteriormente, se realizó la deshidratación de las muestras utilizando alcohol al 70%, alcohol al 96% y alcohol absoluto. Por último, las muestras se montaron con resina sintética (Medio rápido de montaje, Vector Laboratories) y los cortes se analizaron mediante un microscopio óptico (Olympus).

Extracción de proteínas totales

La preparación de las proteínas totales se basó en la extracción selectiva (Abdel-Aziz and Amin, 2012). Brevemente, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se realizó una disrupción mecánica. Después, los tejidos se homogeneizaron en amortiguador de muestra para isoelectroenfoque (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, amortiguador IPG 2%, DTT 40 mM y agua MQ) en presencia de inhibidores de proteasas (Complete™ Roche Germany). Posteriormente, las muestras se homogeneizaron utilizando un sonicador dando cuatro pulsos de 30 s cada uno a una amplitud de 80%, todo esto en hielo para evitar el calentamiento de las muestras. El material insoluble se removió mediante centrifugación (20,000 xg por 5 min a 4 °C) y las proteínas del sobrenadante se precipitaron con acetona-ácido tricloroacético (TCA). Para ello, a cada volumen de muestra se le agregaron 8 volúmenes de acetona a -20 °C y un volumen de TCA al 100%, se mezcló por inversión cinco veces y se incubó a -20 °C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 20,000 xg por 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 ml de acetona a -20 °C. Posteriormente, la muestra se sometió a una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones y el sobrenadante se eliminó con la ayuda de puntas estériles. Después se eliminaron los restos de acetona dejando secar la pastilla. Finalmente, el botón perfectamente seco se resuspendió en 300 µl de PBS estéril.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante la utilización del kit DC Protein Assay (BIO RAD). Para ello, se preparó una curva estándar con proteína BSA (Bovine Serum

Albumin) con rango de 0 a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, colocando cantidades de 0, 0.5, 1, 3 y 5 μl de BSA a concentración de 1 mg/ml, así como la cantidad suficiente de agua para alcanzar un volumen total de 5 μl . De la muestra de proteínas totales problema se colocó 1 μl . Entonces, se adicionaron 25 μl de la solución A' (solución alcalina de tartrato de cobre más reactivo S), 200 μl del reactivo B (reactivo de Folin) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia de los estándares y de la muestra de extractos se midió en un espectrofotómetro (Beckman) a 750 nm. El estándar número 1 se utilizó como blanco de las lecturas. Con los valores de absorbancia obtenidos con las muestras de BSA se realizó una curva estándar y los valores de las muestras a analizar se interpolaron en esa curva. Después de cuantificar los extractos, su integridad se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS (SDS-PAGE).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A 40 μg de proteínas totales se les agregó amortiguador de muestra (Tris-HCl pH 6.8 62.5mM, glicerol 25%, SDS 2%, azul bromofenol 0.01%), se incubaron a 90 °C durante 5 min y se cargaron con micropuntas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS). Para ello, el gel separador se preparó con los siguientes reactivos: acrilamida 10%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, SDS al 0.1%, persulfato de amonio (PSA) 0.1% y 0.15% de TEMED; mientras que el gel concentrador se preparó con acrilamida 6%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS al 0.1%, PSA 0.1% y 0.15% de TEMED; como amortiguador de corrida se utilizó una solución Tris 0.25 M, Glicina 1.9 M y 0.1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 100 V por 140 min. Después, las proteínas se tiñeron durante 1 h con azul de Coomassie G-250 al 0.25% a temperatura ambiente y en agitación. Para desteñir los geles, éstos se incubaron en agitación en una solución de etanol al 5% y ácido acético al 7% hasta que las bandas de las proteínas se vieron azules sobre el fondo transparente. En ese momento, los geles se transfirieron a un recipiente con agua destilada y se realizó un registro fotográfico del gel teñido.

Ensayos de Western blot

Para los ensayos de Western blot, las proteínas se separaron mediante PAGE-SDS como se mencionó anteriormente. Después, el gel se equilibró con el amortiguador de transferencia (Tris 0.25M, Glicina 1.9M y 20% de metanol) durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se formó un “sándwich” sujeto por un folder de plástico con la parte oscura hacia abajo, con los siguientes elementos: una fibra Scotch, luego un papel filtro previamente equilibrado en el amortiguador de transferencia sobre el cual se colocó el gel y luego una membrana de nitrocelulosa. A continuación, se agregaron dos papeles filtro, otra fibra Scotch y el folder se cerró, para ser colocado en la cámara de electroforesis (Bio-Rad), orientando la parte oscura del folder hacia el polo negativo y el papel de nitrocelulosa hacia el polo positivo. Las proteínas del gel se transfirieron al papel de nitrocelulosa a 350 mA durante 90 min (o bien toda la noche a 25 mA) utilizando un baño de hielo. Posteriormente, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau al 0.01% por 2 min para visualizar la correcta transferencia de las proteínas, después se destiñó y se bloqueó con PBS-Tween 0.05% y leche descremada al 5% durante 2 h a temperatura ambiente. Enseguida, se incubó con el anticuerpo primario contra las proteínas de interés: anticuerpo policlonal de conejo contra integrina $\alpha 6$ (Abcam, dilución 1:8000) y anticuerpo monoclonal de ratón contra HSP60 (Abcam, dilución 1:10000) en PBS-Tween al 0.05% con 5% de leche durante toda la noche a 4°C, en movimiento. Posteriormente, la membrana se lavó cinco veces durante 10 min con PBS y se incubó durante 90 min a 37°C en movimiento con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo o de ratón, según correspondiera, acoplado a peroxidasa (Invitrogen). La membrana de nitrocelulosa se lavó cinco veces durante 10 min con PBS y la unión antígeno-anticuerpo se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL plus (Amersham), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Como un control de carga, las mismas membranas se sometieron a ensayos de western blot utilizando un anticuerpo contra la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Santa Cruz biotechnology, dilución 1:4000).

Inmunohistoquímica

Para determinar la localización subcelular de las proteínas de interés se realizó inmunohistoquímica en cortes de tejidos. La fijación de los tejidos se hizo en paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y posteriormente se incluyeron en parafina para realizar los cortes de un espesor de 4 μm con el micrótomo. Los cortes se colocaron en porta objetos previamente cargados con silano. Las secciones de tejidos se desparafinaron al incubarlas durante 24 h a 60 °C, posteriormente se realizaron lavados sumergiendo las muestras y con la siguiente secuencia; xilol (dos veces), xilol:etanol (50:50), alcohol absoluto (dos veces), etanol 90%, Etanol 80% y etanol 70%. Cada lavado fue de 5 min. Para la reactivación de los sitios antigénicos, los portaobjetos se incubaron en solución de citratos al 0.01 M a 100 °C por 3 min, colocadas en un vaso de Coplin, y se colocaron en un horno de microondas por 4 min a una potencia de 7, dejando enfriar por 5 min con la tapa puesta y 1 h sin la tapa. Entonces, se realizaron cinco lavados de 2 min cada uno con agua destilada. Las laminillas fueron marcadas con un lápiz hidrófobo para delimitar la zona donde se aplicaron las soluciones, se colocaron en una cámara húmeda y se añadió el bloqueador de peroxidasa (mouse/rabbit inmunodetector peroxidase blocker-Bio SB) por 5 min. Posteriormente se colocaron los anticuerpos primarios anti-integrina $\alpha 6$ (dilución 1:150) o anti-HSP60 (dilución 1:200) durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Después de cinco lavados durante 5 min con PBS se colocó el anticuerpo secundario (inmunodetector Biotin Link) y se incubó por 10 min para posteriormente realizar tres lavados de 3 min con un amortiguador salino de Tris (TBS) 1x. Entonces, se colocó la peroxidasa exógena (Immunodetector HRP Label) por 10 min, se lavó con agua corriente por 5 min y se realizaron cinco lavados con agua desionizada por 3 min cada uno. Se preparó el DAB de acuerdo con las instrucciones del fabricante: a 1 ml de amortiguador se adicionó una gota del cromógeno, se colocó en los tejidos y se incubó por 5 min. Las laminillas se colocaron en vasos de Coplin por 5 min al chorro de agua corriente y se lavaron con agua bidestilada por 5 min para sumergirlos posteriormente en un vaso de Coplin de vidrio con hematoxilina de Gills por 5 min para realizar la contratinción. Entonces, se eliminó la hematoxilina y se lavó a chorro de agua corriente tras realizar baños secuenciales de alcohol

y xylol para la deshidratación. Finalmente, las muestras se analizaron bajo un microscopio óptica (80i Eclipse, Nikon). Los controles negativos de cada muestra se obtuvieron al sustituir el anticuerpo primario por PBS.

Análisis de la inmunoreacción

Para obtener valores de positividad de inmunodetección en las diferentes lesiones se utilizó el método “Score Allred”, el cuál es un sistema de puntuación clínica que se basa en un examen visual de múltiples campos dentro de un solo corte de tejido teñido con inmunohistoquímica (IHQ), del cual se ha demostrado su valor para determinar la agresividad de cánceres específicos (Choudhury *et al.*, 2010). En este sistema de puntuación se asignó un valor numérico a la intensidad de la tinción general y otro al patrón de tinción. Para el valor numérico de intensidad (IS) se asignó un sistema de 4 puntos: 0, 1, 2 y 3 (negativo, tinción clara, media y oscura, respectivamente). Por otra parte, también se asignó un valor numérico al porcentaje de células teñidas [proporción score (PS)]: 0 (negativo), 1 (la tinción de al menos 1 de 100 células), 2 (la tinción de al menos 1 de 10 células), 3 (la tinción de al menos 1 de 3 células), 4 (la tinción de al menos 2 de 3 células) y 5 (todas las células teñidas) (Fig. 6). Al sumar ambas puntuaciones, se obtuvo un valor de 0 a 8, donde de 0 a 2 se determinó como detección negativa y de 3 a 8 como detección positiva (Choudhury *et al.* 2010).

La inmunoreacción de las muestras se analizó por medio del programa Image J[®] ajustado a la escala micrométrica en un microscopio óptico (80i Eclipse, Nikon) con cámara digital para el análisis de imagen por campo y el porcentaje de células positivas. Para medir la intensidad se realizó la cuantificación de máximo 100 células teñidas de color marrón (positivas) con la herramienta “multipoint”. Posteriormente, para medir la proporción se procedió a convertir las fotografías a escala de grises, ya marcadas para conteo celular, y obteniendo las densidades ópticas. Se tomaron 3 fotomicrografías a 40x de las áreas con un mayor número de células positivas a cada marcador inmunohistoquímico. Las imágenes fueron

guardadas en formato .jpg para su posterior análisis. Para obtener las categorías de inmunoexpresión nulo (0), leve (+), moderado (++) e intenso (+++), se procedió a calibrar por medio de escala de grises asignando por rangos de densidad óptica a cada una de las categorías de inmunoexpresión. Para determinar la inmunolocalización de las proteínas, las laminillas se observaron a 40x en el microscopio óptico (80i Eclipse, Nikon) registrando su patrón de expresión en la base de datos como (N) para núcleos, (C) para citoplasmas y (M) para membranas.

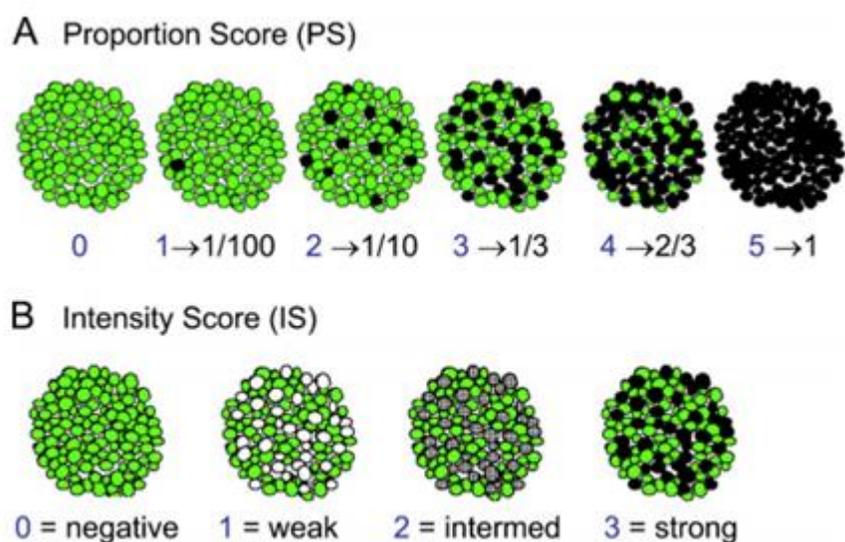


Figura 6. Score Allred.

Dibujos que representan la metodología para el cálculo de la puntuación de Allred. El verde identifica células sin teñir, mientras que los colores grises, gris oscuro y negro identifican células teñidas a diferentes intensidades. (A) Serie en la que la intensidad de tinción es constante (al máximo), y la proporción de células teñidas aumenta de izquierda a derecha. (B) Serie en el que la proporción de teñido de las células son constantes (a 1/3), y la intensidad de tinción aumenta de izquierda a derecha (de ninguno al máximo) (Choudhury et al. 2010)

Resultados

Obtención de muestras

En el presente estudio, se obtuvieron proteínas totales de biopsias de ameloblastoma y quistes dentígeros que fueron obtenidas del Hospital Juárez de México, bajo el convenio número HJM1996/11.03.08. Todos los tejidos fueron previamente diagnosticados histológicamente por un experto del mismo Hospital. Para este trabajo se obtuvieron un total de 26 biopsias, las cuales incluyeron 5 quistes dentígeros y 21 ameloblastomas, de los cuales 10 fueron ameloblastomas convencionales y 11 correspondieron a ameloblastomas unicuésticos.

Por otra parte, para el estudio inmunohistoquímico se analizaron 18 ameloblastomas y 4 quistes dentígeros (Fig. 7) que se obtuvieron del servicio diagnóstico histopatológico del departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la división de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. En este caso las muestras de ameloblastoma (Amel) quedaron conformadas de la siguiente manera: 15 correspondieron al sexo masculino (84%) y 3 (16%) al sexo femenino; 17 (95%) se localizaron en la zona mandibular y sólo 1 (5%) en maxilar (Fig. 8). El rango de edad varió de entre los 12 y 55 años (Fig. 7).

Para determinar el tipo y patrón histológico de los ameloblastomas, se tiñeron con hematoxilina y eosina cortes de estas lesiones y se analizaron por microscopía óptica (Fig. 8). En este análisis se encontraron 12 muestras (67%) que se clasificaron como ameloblastomas convencionales (AM) con dos patrones de crecimiento: folicular (AM F, 8 muestras) (Fig. 8B) y plexiforme (AM P, 4 muestras) (Fig. 8C). Los AM F presentaron islas y cordones de epitelio odontogénico separadas por un estroma fibroso maduro, en la periferia de las islas y cordones epiteliales se identificó la presencia de células en empalizada con polarización nuclear invertida, la organización de las células epiteliales dentro de los folículos se presentó de forma laxa, exhibiendo una morfología ahusada y

estelar que recuerdan el retículo estrellado del órgano del esmalte (Fig. 8B). Por su parte, los AM P se observaron largas bandas y cordones de células epiteliales que aparecen rodeando áreas centrales de estroma fibroso, presentaron células columnares en empalizada con polarización nuclear invertida y áreas centrales laxas que recuerdan al retículo estrellado. Estos cordones celulares se encontraron soportados por un estroma rico en fibras colágenas maduras (Fig. 8C).

Por otra parte, seis lesiones (33%) se clasificaron como ameloblastomas unicuésticos (AU), tres del subtipo mural (AU M) y tres del subtipo luminal (AU L) (Fig. 8 D,E). Los AU presentaron proliferación epitelial en islas y cordones de diferentes tamaños dentro de la pared fibrosa (Fig. 8D). Las muestras de AU L presentaron proyecciones hacia el espacio luminal, donde predominó el patrón plexiforme (Fig. 8E).

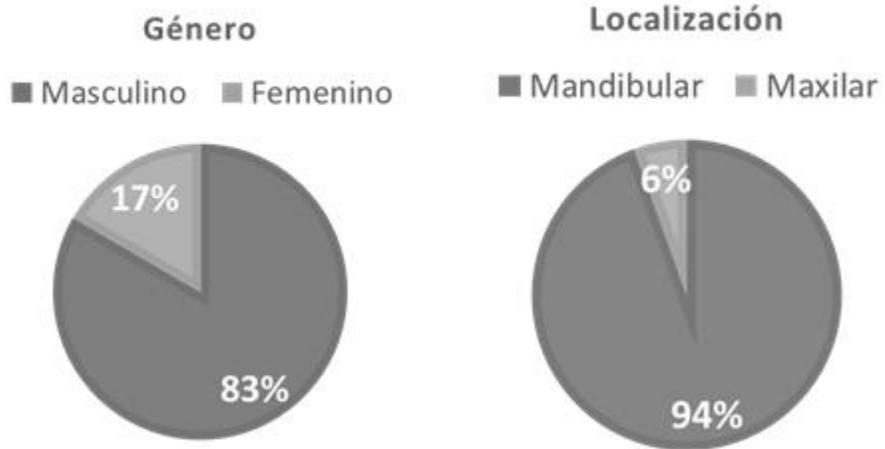
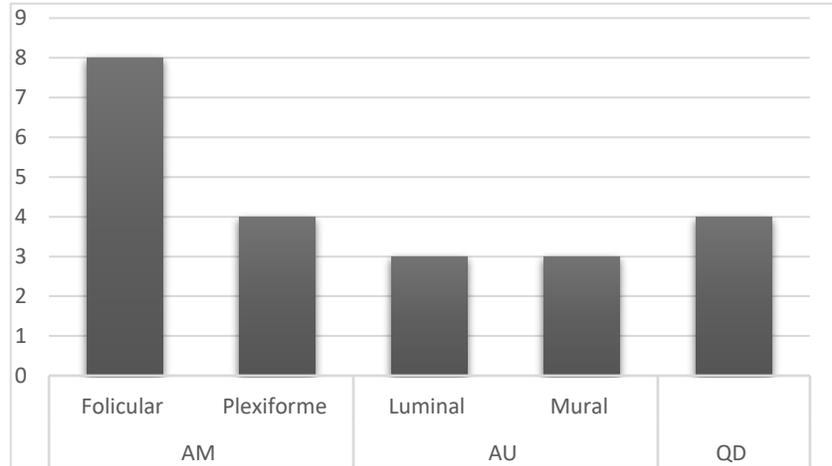


Figura 7. Distribución de las muestras analizadas por inmunohistoquímica.

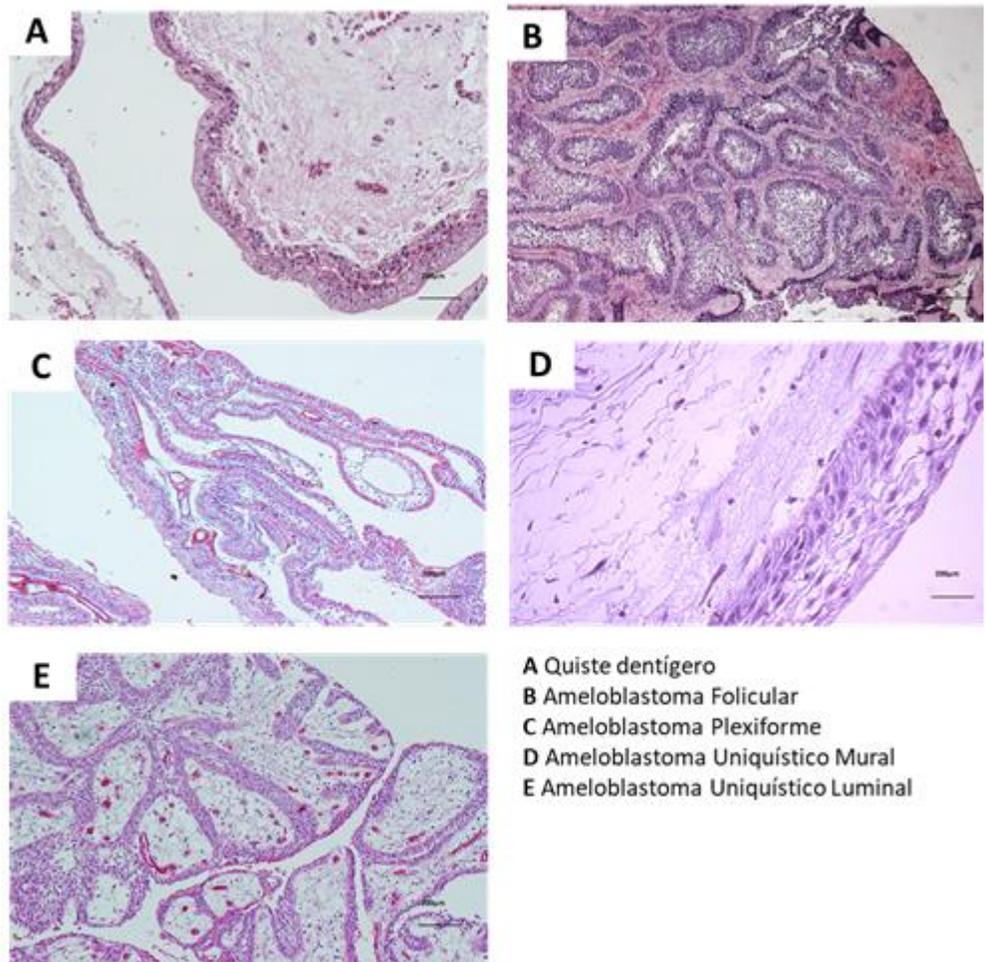


Figura 8. Patrón histológico de las lesiones analizadas.

Cortes de ameloblastomas se tiñeron con H&E y se analizaron por microscopía óptica. (A) Quiste dentigero. (B) Ameloblastoma folicular I, (C) Ameloblastoma plexiforme, (D) Ameloblastoma Uniquístico Mural, (E) Ameloblastoma Uniquístico Luminal.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Con el fin de analizar la expresión de las proteínas de interés (integrina $\alpha 6$ y Hsp60) en los diferentes ameloblastomas y quistes dentígeros, se obtuvieron los extractos totales de cada tejido y sus perfiles proteicos se analizaron mediante el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida-SDS al 10% teñidos con azul de Coomassie. Cabe mencionar que cada una de las lesiones se analizaron por triplicado y en todas las réplicas de cada lesión se observó el mismo patrón de bandas proteicas sin degradación aparente (datos no mostrados). Si tienes 3 réplicas podrías incluir un resultado representativo

Una vez comprobada la reproducibilidad del patrón electroforético de cada lesión, se realizó el análisis de 5 QD, 10 AM y 10 AU (Fig. 9). En las muestras (excepto las nombradas como AU 2, AM 3 Y AM 5, que no tuvieron una cantidad suficiente de proteínas) se puede observar una buena integridad, con bandas definidas desde menores a 14 kDa hasta mayores a 230 kDa, sin degradación aparente y un patrón electroforético similar para cada tipo de lesión (Fig. 9). Las muestras que no mostraron una cantidad suficiente de proteínas se precipitaron con acetona-TCA y se resuspendieron en un menor volumen. Al analizar nuevamente esos extractos mediante SDS-PAGE, sólo la muestra AM 3 no mostró una cantidad suficiente de proteínas (datos no mostrados), por lo que esa lesión no se analizó en los siguientes experimentos.

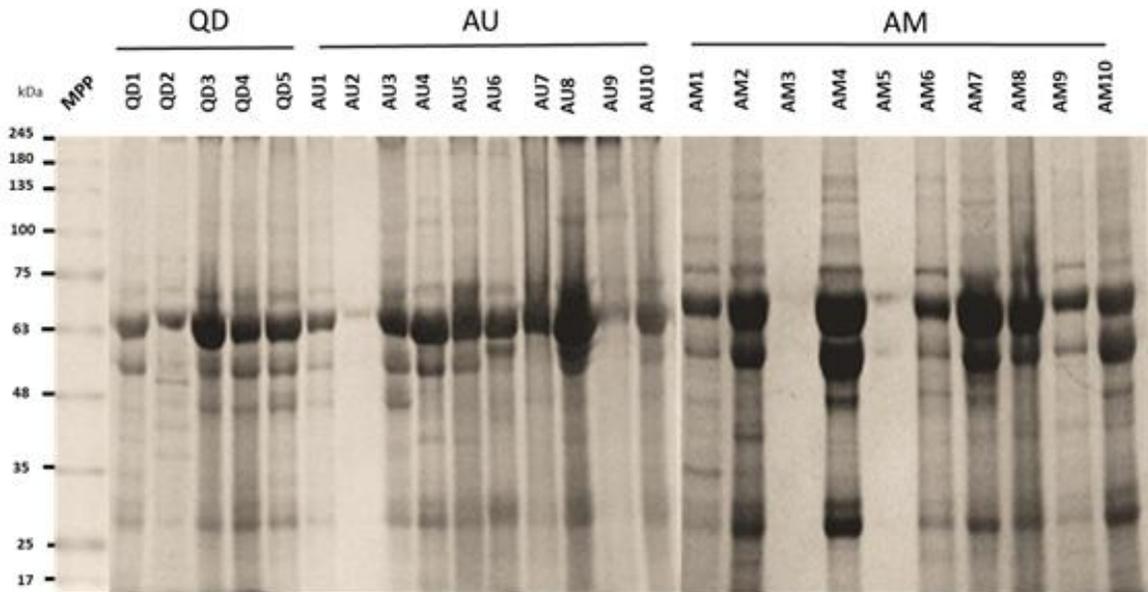


Figura 9. Corrimiento electroforético de proteínas totales de las lesiones analizadas. Los extractos proteicos de las diferentes lesiones se analizaron por SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. En total se analizaron cinco quistes dentígeros (QD), diez ameloblastomas uniuquísticos (AU) y diez ameloblastomas convencionales (Amel)

Análisis de la expresión de la integrina $\alpha 6$ en AM y QD

Una vez corroborados los patrones protéicos de las muestras, se analizó lapresencia y los nive es de expresión de la integrina $\alpha 6$ en las diferentes lesiones mediante ensayos de western blot. En la figura 10A se muestra un ejemplo del reconocimiento de la integrina $\alpha 6$ en cada lesión, en donde podemos observar que en las tres diferentes lesiones se detectaron tres bandas, una de 110 kDa, correspondiente al peso esperado para la cadena pesada de esta proteína, otra de 30 kDa, correspondiente a la cadena ligera, y una más de 70 kDa, a la que se ha denominado integrina $\alpha 6p$ (Davis et al. 2001). Como control de carga se analizó el reconocimiento de la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en las mismas muestras (Fig. 10A). Estos ensayos se realizaron por triplicado en cada una de las muestras y para obtener datos semicuantitativos del nivel de expresión de la integrina

$\alpha 6$ en cada lesión, las bandas reconocidas por el anticuerpo se analizaron por densitometría y se normalizaron con los datos obtenidos para GAPDH. Los resultados mostraron que existe una tendencia de mayor expresión de las tres bandas en los AU y de la banda de 30 kDa en AM con respecto a los QD (Fig. 10 D), pero sin diferencias estadísticamente significativas. En contraste, las bandas de 110 y 70 kDa en AM si mostraron una mayor expresión con respecto a QD y AU ($p < 0.05$) (Fig. 10 B,C).

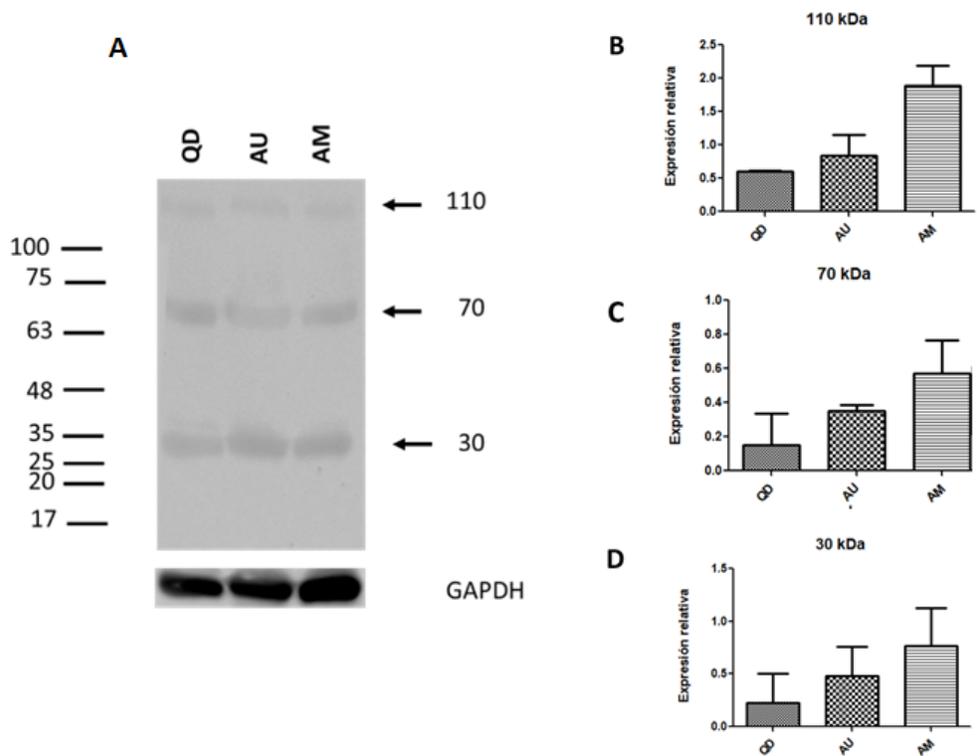


Figura. 10 Análisis de la expresión de la integrina $\alpha 6$ en las lesiones. Hace falta la abreviatura kDa arriba de los pesos moleculares

(A) Los extractos totales de quiste dentígero (QD), ameloblastoma uniuquístico (AU) y ameloblastoma convencional (AM) se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a ensayos de western blot utilizando un anticuerpo contra la integrina $\alpha 6$. En la parte inferior se muestra el reconocimiento por el anticuerpo contra GAPDH, utilizado como control de carga. (B-D) Análisis estadístico de la expresión relativa de las bandas de 110 (B), 70 (C) y 30 kDa (D) reconocidas por el anticuerpo contra la integrina $\alpha 6$.

Análisis de la localización de la integrina $\alpha 6$ en AM y QD

Como se mencionó en la introducción, normalmente la integrina $\alpha 6$ forma dímeros con las subunidades $\beta 1$ y $\beta 4$ y tiene como ligando a la laminina, por lo que esta se espera que esta integrina se localice en la membrana basal de las células epiteliales. Para determinar su localización en los cortes de QD, AU y AM se realizaron ensayos de inmunohistoquímica. En dos de los cuatro casos de QD analizados, la integrina $\alpha 6$ se observó de una manera leve en la parte apical de las células epiteliales de los quistes, así como en el infiltrado de células inflamatorias, y debido a la presencia de éstas, el recubrimiento epitelial presentó células con hiperplasia (Fig. 11, asterisco). En dos de los tres (66%) ameloblastomas uniuquísticos de tipo mural se detectó de manera leve a la integrina $\alpha 6$ en la membrana basal de las células epiteliales (Fig. 12). Por otra parte, la intensidad del reconocimiento fue diferente en los dos subtipos de AU, ya que ésta fue mayor en los de tipo luminal, pues dos de los tres tumores analizados presentan una detección moderada de la proteína integrina $\alpha 6$ en las células epiteliales tumorales, tanto en su parte apical como en la basal (Fig. 13). En los ameloblastomas convencionales se observó una mayor detección de la integrina $\alpha 6$ con respecto a los AU (Fig. 14, 15). En siete de los 8 (88%) ameloblastomas de tipo folicular (AM F) el anticuerpo detectó a esta integrina de una manera intensa en las células epiteliales de la membrana basal (Fig. 14); mientras que dos de los cuatro (50%) ameloblastomas de tipo plexiforme dieron una inmunopositividad leve y homogénea a la integrina $\alpha 6$ (Fig. 15).

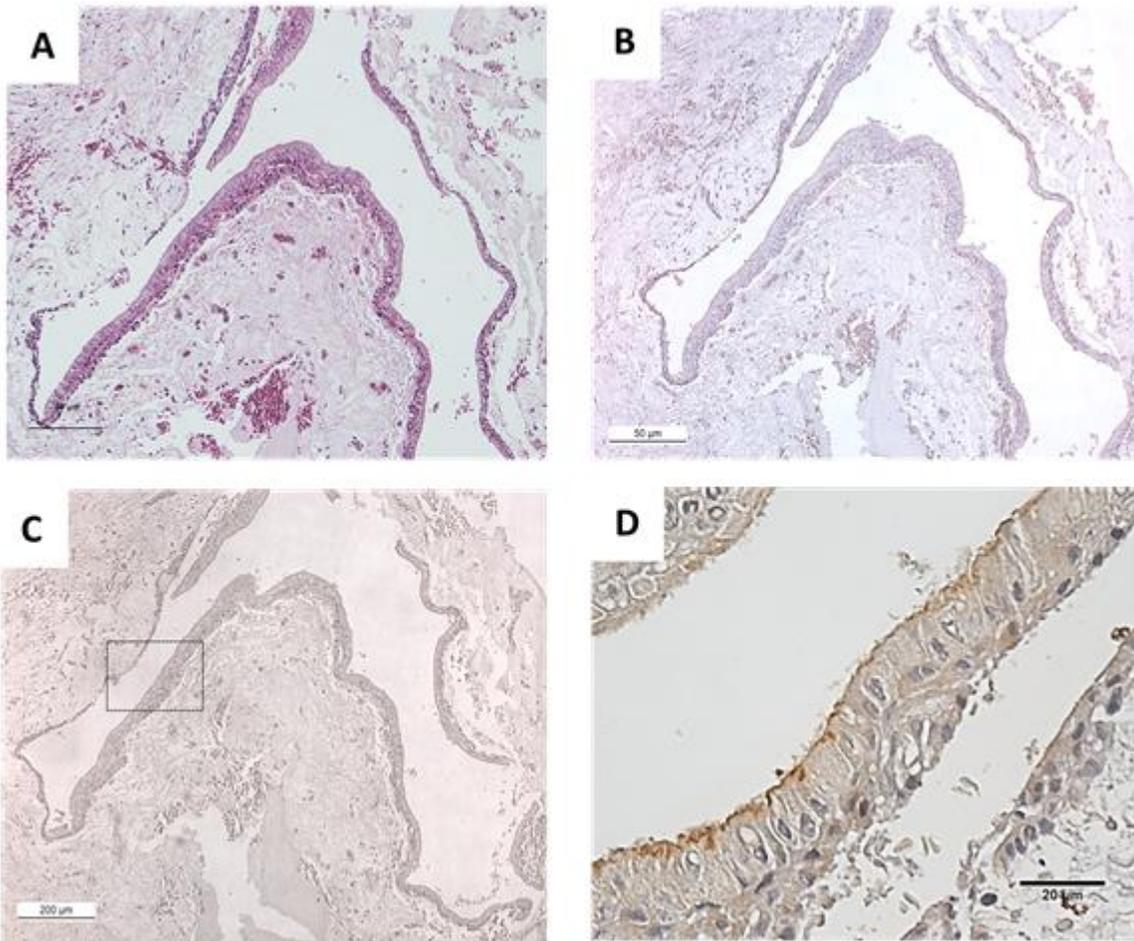


Figura 11. Inmunodetección de integrina $\alpha 6$ en quiste dentígero (QD).

Cortes histológicos de QD se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra integrina $\alpha 6$. (A) Corte teñido con hematoxilina y eosina (H&E) donde se observa la presencia de restos epiteliales (cabezas de flecha) e infiltrado de células inflamatorias (flechas). (B) Control negativo donde se omitió la incubación con el anticuerpo contra integrina $\alpha 6$. (C) IHC a una amplificación de 10X. (D) Amplificación a 63X del recuadro en C.

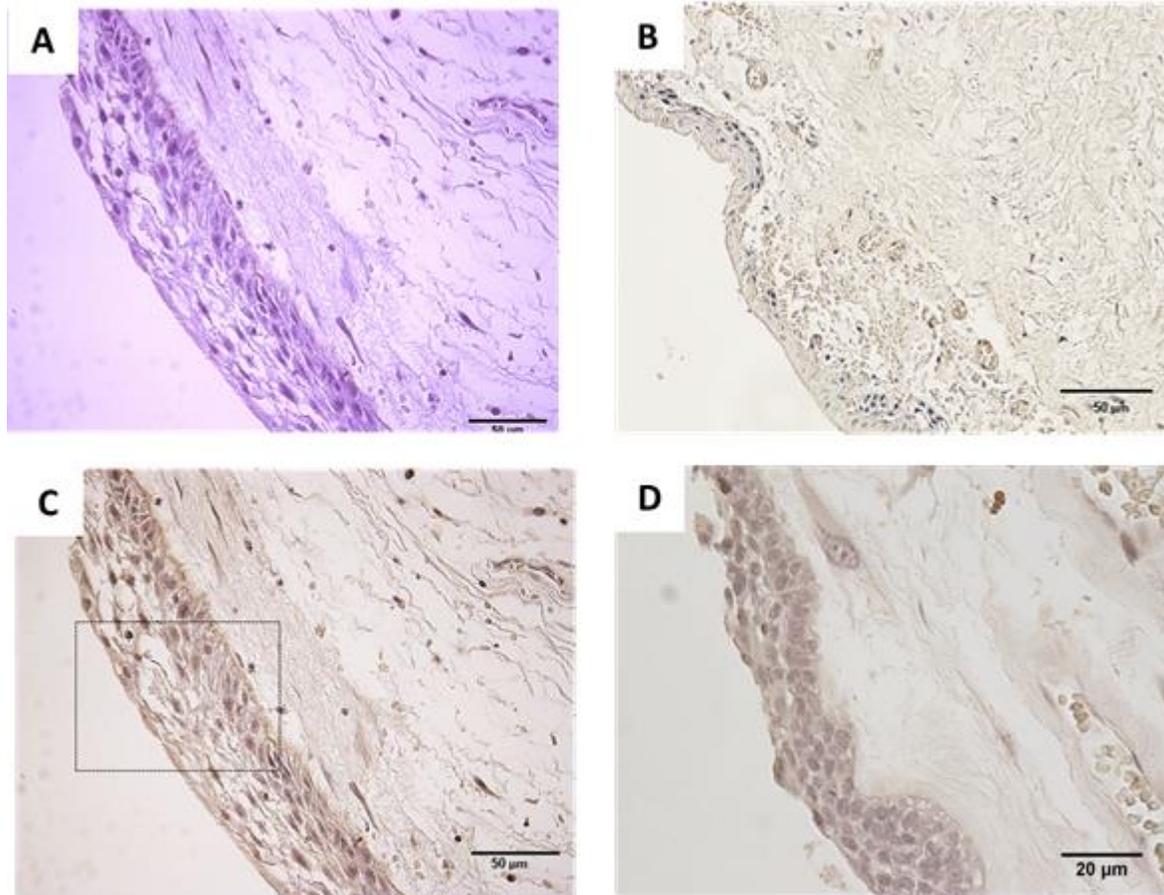


Figura 12. Inmunodetección de Integrina $\alpha 6$ en AU Mural.

Cortes histológicos de AU M se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra la integrina $\alpha 6$. (A) Corte teñido con hematoxilina y eosina (H&E). (B) Control negativo donde se omitió la incubación con el anticuerpo contra integrina $\alpha 6$. (C) IHC a una amplificación de 10X. (D) Amplificación a 63X del recuadro en C.

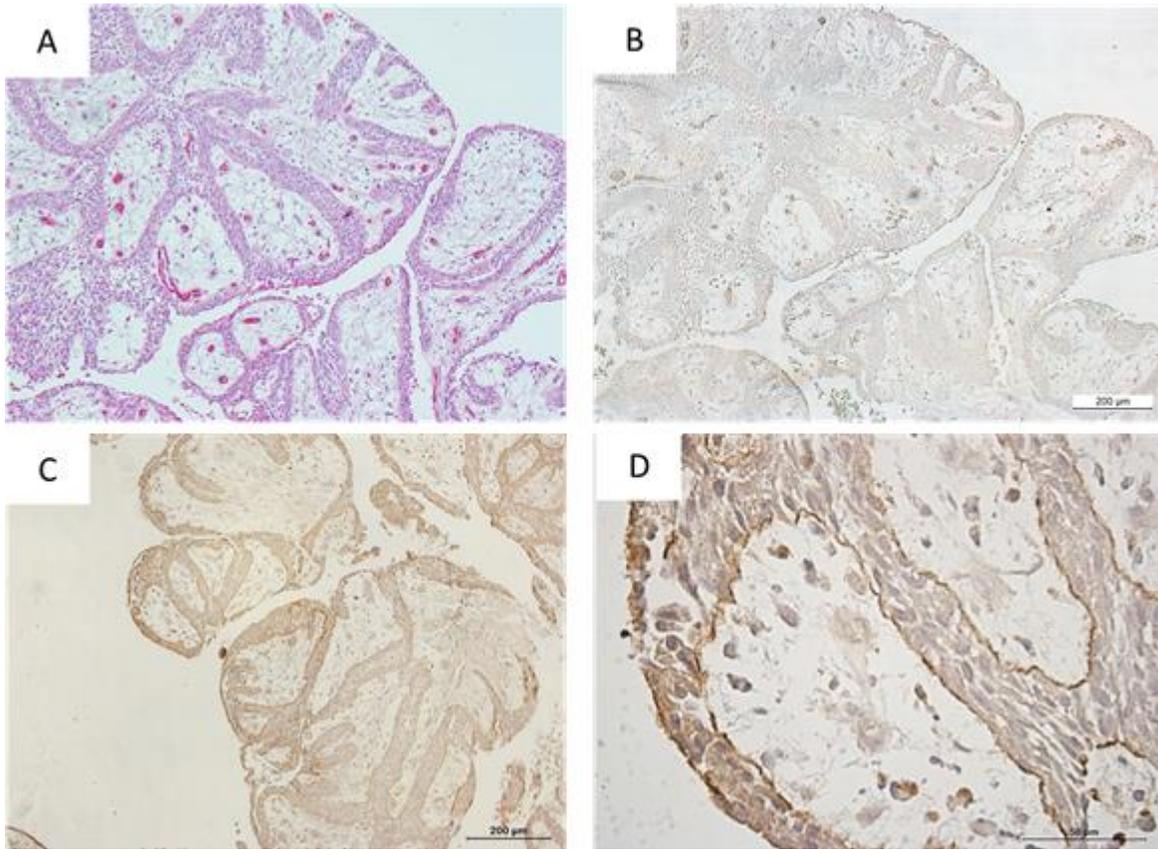


Figura 13. Inmunodetección de integrina $\alpha 6$ en AU Luminal.

Cortes histológicos de AU L se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra la integrina $\alpha 6$. (A) Corte teñido con hematoxilina y eosina (H&E). (B) Control negativo donde se omitió la incubación con el anticuerpo contra integrina $\alpha 6$. (C) IHC a una amplificación de 10X. (D) Amplificación a 63X del recuadro en C, se observa detección del anticuerpo en la parte basal y apical de las células epiteliales.

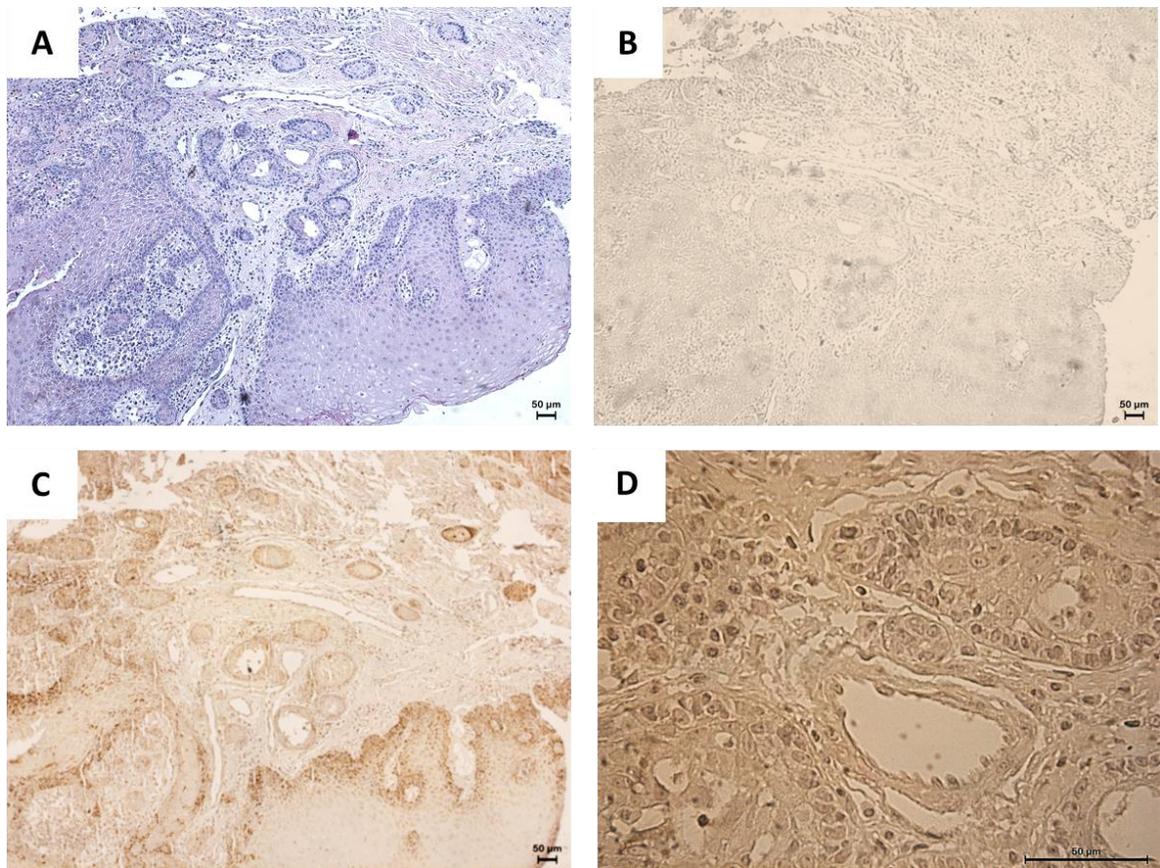


Figura 14. Inmunodetección de integrina $\alpha 6$ en AM Folicular.

Cortes histológicos de AM F se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra la integrina $\alpha 6$. (A) Corte teñido con hematoxilina y eosina (H&E). (B) Control negativo donde se omitió la incubación con el anticuerpo contra integrina $\alpha 6$. (C) IHC a una amplificación de 10X. (D) Amplificación a 63X del recuadro en C.

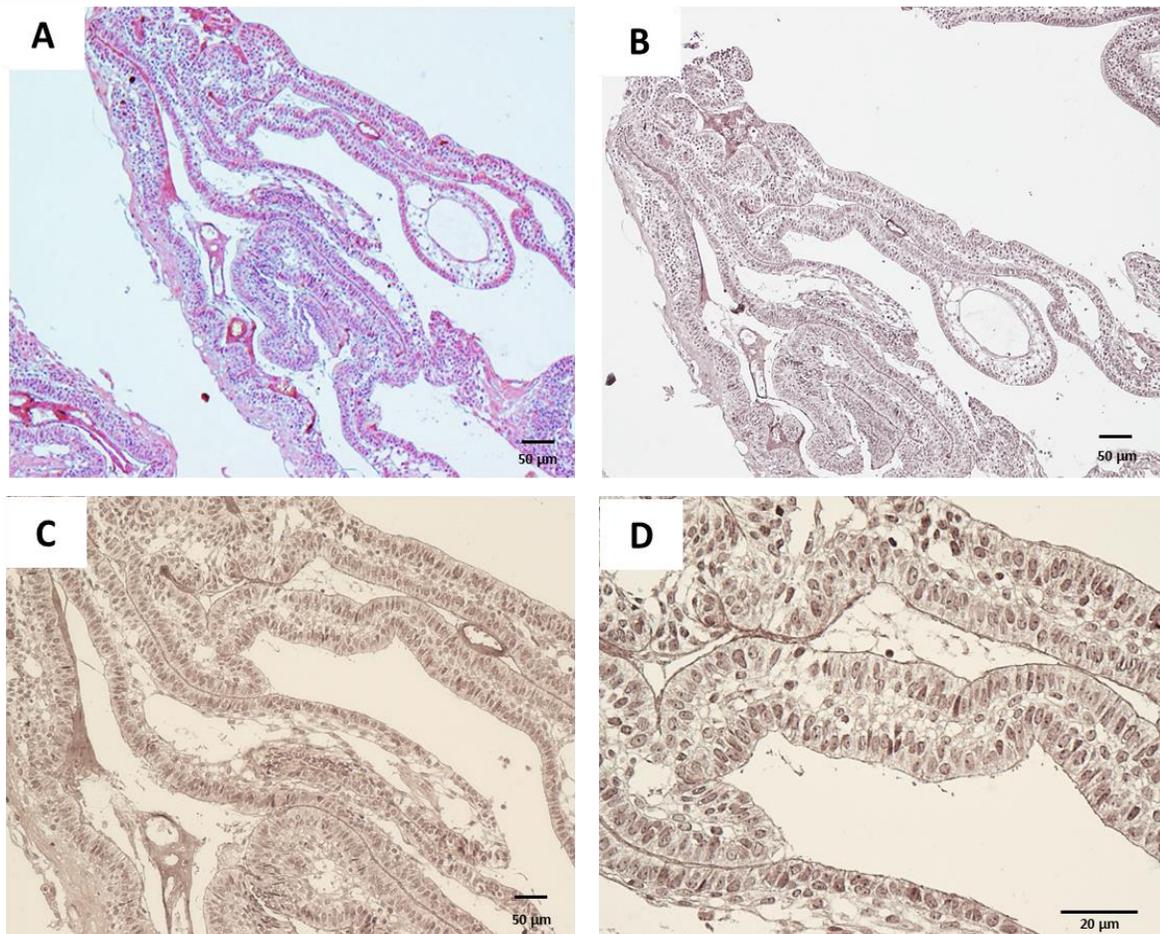


Figura 15. Inmunodetección de integrina $\alpha 6$ en AM Plexiforme

Cortes histológicos de AM P se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra la integrina $\alpha 6$. (A) Corte teñido con hematoxilina y eosina (H&E). (B) Control negativo donde se omitió la incubación con el anticuerpo contra integrina $\alpha 6$. (C) IHC a una ampliación de 10X. (D) Amplificación a 63X del recuadro en C.

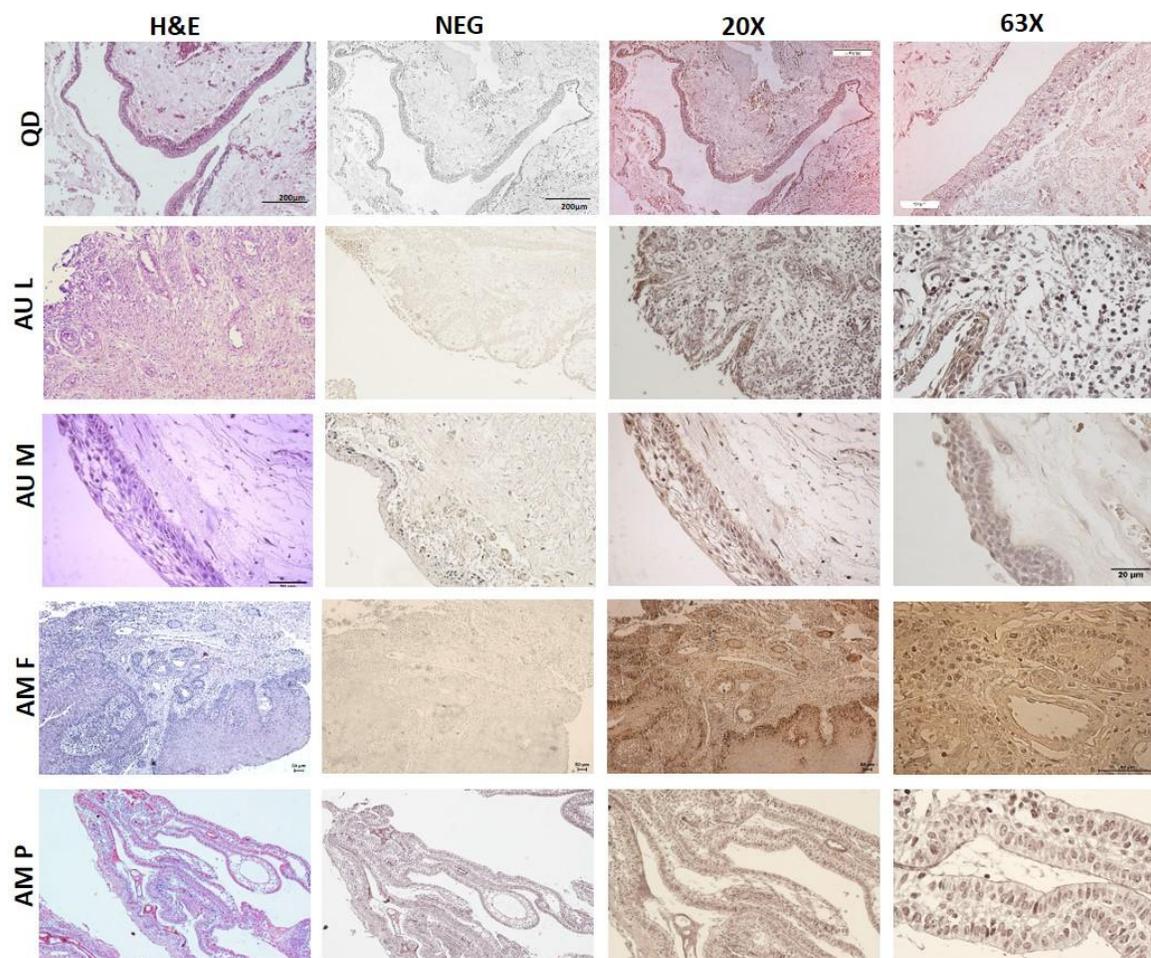


Figura 16. Imágenes representativas de la detección de la integrina $\alpha 6$ en todos los tejidos analizados

Para obtener valores de positividad de la inmunodetección de la integrina $\alpha 6$ en las diferentes lesiones se utilizó el método "Score Allred" como se mencionó en Materiales y Métodos. La detección de la integrina $\alpha 6$ fue positiva (>3 en el puntaje Score Allred) en 15 de las 22 muestras analizadas (68%). La proteína se localizó, como se esperaba, en la membrana plasmática en esas muestras (15), de las cuales en 14 la intensidad de la expresión fue leve y en una moderada. De las siete muestras negativas (32%) 2 fueron quistes dentígeros, un ameloblastoma unicístico luminal, un ameloblastoma unicístico mural, un ameloblastoma folicular y dos ameloblastomas plexiformes.

La figura 17 muestra una imagen representativa de la tinción obtenida en las diferentes lesiones. Con la herramienta multipoint del programa Image J[®] se cuantificó el porcentaje de células detectadas por el anticuerpo. Los resultados mostraron que los ameloblastomas tienen un mayor porcentaje de células positivas (Fig. 17 A). Además, utilizando el programa Image J[®] se calculó el área detectada por el anticuerpo y se realizó un análisis de la intensidad de la detección de la integrina $\alpha 6$ para cada tipo de lesión. En la figura 17B podemos observar que todos los ameloblastomas presentaron un aumento estadísticamente significativo en la detección de la integrina $\alpha 6$. Con estos datos, podemos establecer que todos los tipos de ameloblastoma presentaron una sobre expresión de la integrina $\alpha 6$ en comparación con el QD. No se encontraron diferencias significativas en la detección de la integrina $\alpha 6$ entre los dos tipos histológicos de AU ni entre los dos tipos histológicos de AM. Sin embargo, el ameloblastoma convencional presentó un aumento estadísticamente significativo en la detección de la integrina $\alpha 6$ en comparación con ambos tipos histológicos de ameloblastoma unicístico, en mayor medida al compararlo con el de tipo mural, el cual de todos los tipos histológicos del ameloblastoma es en el que se detecta menos a la integrina $\alpha 6$.

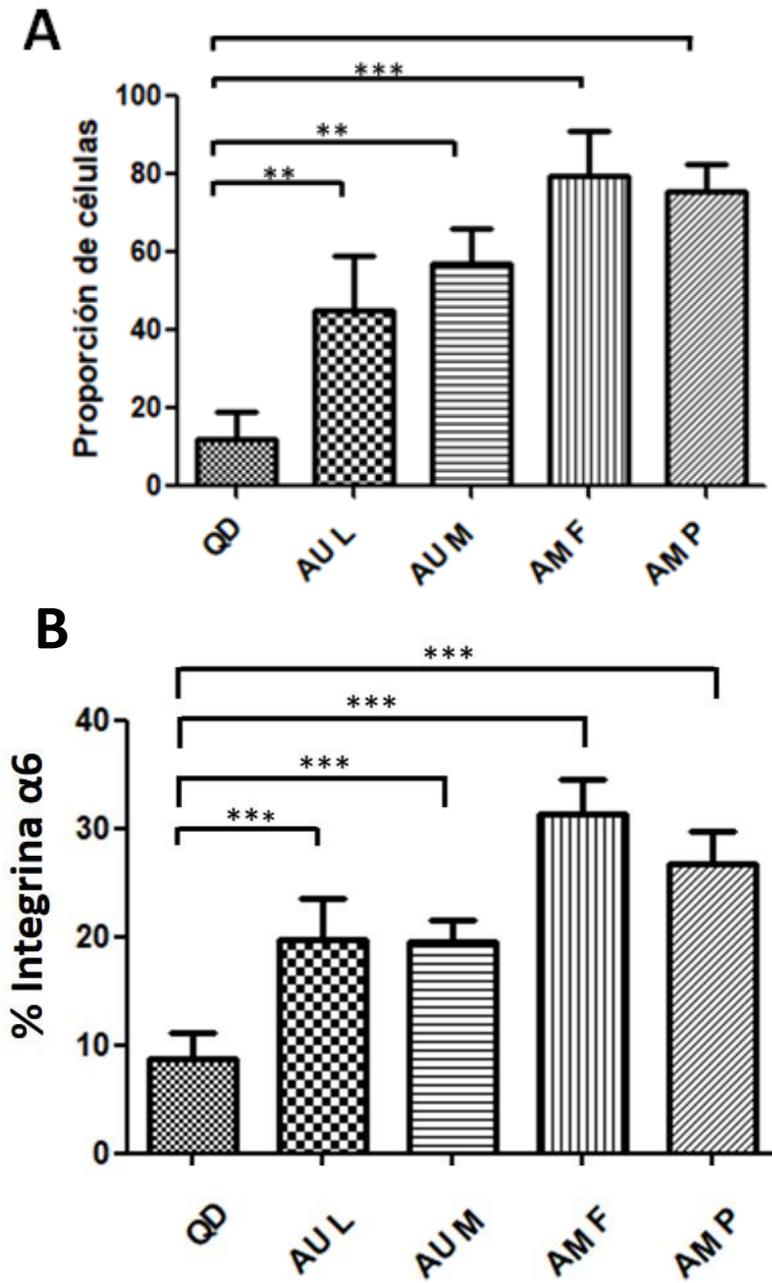


Figura 17. Análisis del reconocimiento de la integrina $\alpha 6$.

La proporción del número de células positivas (A) y de la intensidad (B) del inmunomarcaje de la integrina $\alpha 6$ en las diferentes muestras se analizó como se describió en Materiales y métodos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.005$

Análisis de la expresión y localización HSP60 en AM y QD

En los ensayos de western blot, el anticuerpo contra HSP60 detectó una sola banda de aproximadamente 95 kDa en todas las muestras de ameloblastoma no importando su tipo histológico (Fig. 18A). Este resultado coincidió con el peso molecular de la banda donde se identificó por espectrometría de masas a HSP60 en las proteínas de membrana del ameloblastoma (Rodríguez-Vázquez 2015); sin embargo, el peso esperado de la proteína es de 60 kDa. Para analizar si ésta es una condición particular del ameloblastoma o si es debido a un error en el procesamiento de las muestras se realizaron ensayos de western blot, bajo las mismas condiciones, utilizando muestras de quiste dentígero, de diferentes líneas celulares (HeLa, MDA, MCF7) y de una muestra de tejido con cáncer cérvico-uterino (CCU). En estos experimentos, tanto en los extractos totales de las biopsias de CCU, como en las líneas celulares se detectó claramente una banda con el peso esperado de 60 kDa (Fig. 18B). Por su parte, en las muestras de quiste dentígero se observó una muy ligera detección de la misma banda de 60 kDa (Fig. 18B). Cabe señalar que todos los ensayos se realizaron por triplicado y en cada ensayo cuando se utilizó un anticuerpo contra GAPDH se detectó una banda de 36 kDa, indicando que todas las muestras contenían aproximadamente la misma cantidad de extracto (Figura 18A, B). Al realizar el análisis de la expresión relativa de HSP60 en cada lesión podemos establecer que ambos tipos de ameloblastoma presentaron una sobre expresión de HSP60 comparada con el QD y no existieron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de esta chaperonina al comparar el ameloblastoma uniuístico y el ameloblastoma convencional (Fig. 18C).

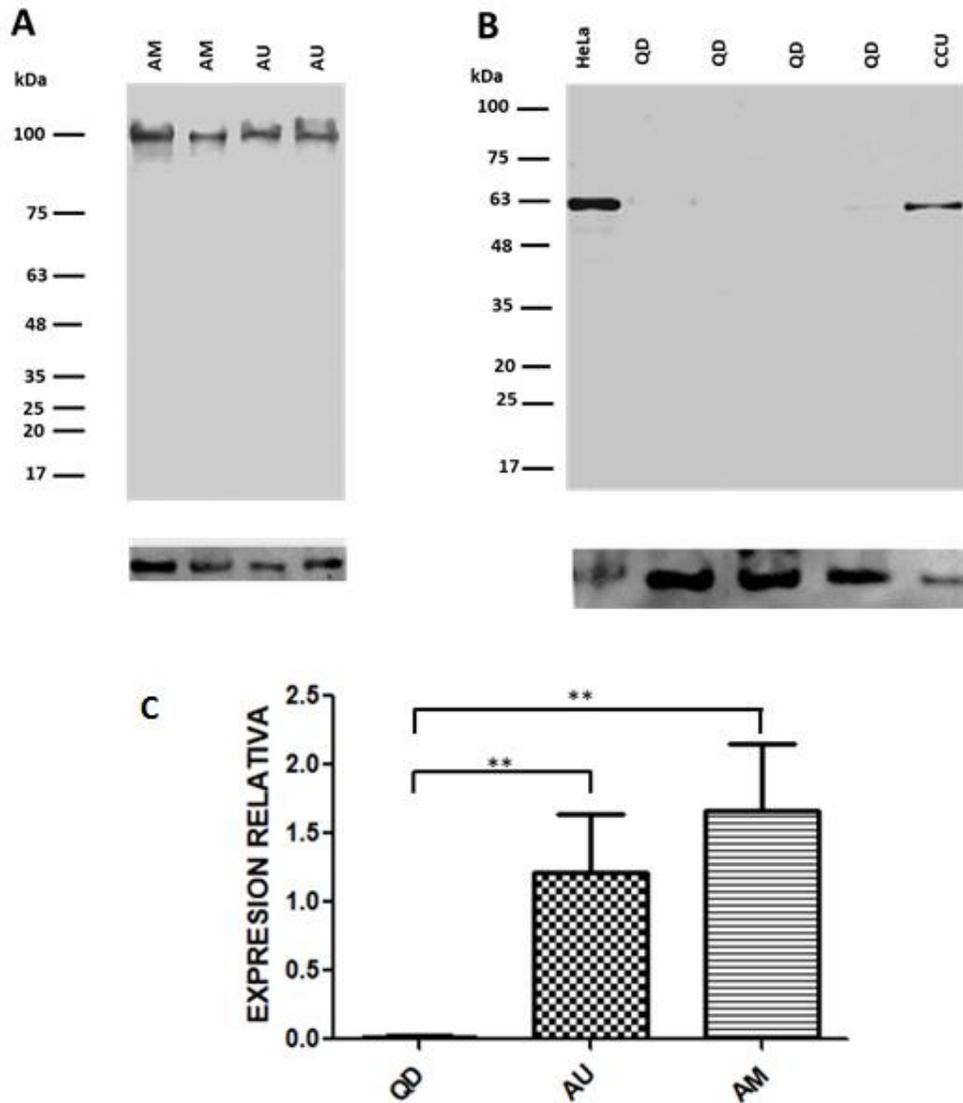


Figura 18. Expresión de HSP60 en ameloblastoma y quiste dentífero.

Los extractos totales de las diferentes muestras se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a ensayos de western blot utilizando un anticuerpo contra HSP60. (A) Ensayo de western blot en ameloblastoma convencional (AM) y ameloblastoma uniuquístico (AU). (B) Ensayos de western blot en quistes dentíferos, células HeLa y cáncer cervicouterino (CCU). En la parte inferior de cada panel se muestra el reconocimiento por el anticuerpo contra GAPDH, utilizado como control de carga. (C) Análisis de la expresión relativa de HSP60 en QD, AU y Amel. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.005$.

Al analizar la expresión de HSP60 por inmunohistoquímica se detectó su localización en diferentes sitios: núcleo, citoplasma y membrana plasmática. Para investigar la intensidad y proporción del inmunomarcaje se hizo el análisis mediante Score Allred como se mencionó en Materiales y métodos. La detección de HSP60 fue positiva (>3 en el puntaje Score Allred) en el 21 de las 22 muestras analizadas (95%) (Tabla 2), únicamente un quiste dentígero resultó positivo en la membrana de las células epiteliales apicales de manera leve, dos presentaron una detección moderada en el citoplasma y uno fue negativo. La mayoría de la detección en los ameloblastomas fue en las células epiteliales de tipo ameloblástico y en el caso del ameloblastoma uniuquístico de tipo mural también se detectó inmunomarcaje en las células de tipo retículo estrellado presentes en el interior de las islas tumorales de la cápsula de tejido conjuntivo (Tabla 2). En el 85 % de las muestras positivas (n=19) HSP60 presentó una localización membranal, de las cuales 8 tuvieron un marcaje de manera moderada, 6 de manera leve y 5 de manera intensa (Tabla 2). En 17 de las 22 muestras (77%), HSP60 se localizó en el citoplasma de las células, en 4 (18%) de manera baja y 13 (59%) de manera moderada (Tabla 2). Únicamente las 4 muestras correspondientes al AM de tipo plexiforme tuvieron una detección (aunque de manera leve) del anticuerpo HSP60 en el núcleo de las células epiteliales (Tabla 2).

Los quistes dentígeros presentaron una detección leve de HSP60 tanto en membrana como en citoplasma de las células epiteliales que rodean al quiste. De manera interesante, la presencia de HSP60 presentó un ligero aumento en las células de la capa más cercana a la luz del quiste (Fig. 19). Los AU de tipo mural presentaron inmunodetección de HSP60 en las células basales del revestimiento epitelial y en las islas epiteliales de una manera leve en citoplasma y moderado en la membrana plasmática (Fig. 20), de la misma manera se detectó positividad en las células tipo retículo estrellado presentes en estas islas (Fig. 20, cabezas de flecha). Por su parte, los ameloblastomas uniuquísticos de tipo luminal presentaron una detección intensa de HSP60 en la membrana de las células de la capa de revestimiento epitelial y de una manera moderada en el citoplasma de estas (Fig. 21).

También algunas células del estroma del AU luminal se encontraron teñidas de manera baja (Fig. 21).

La inmunodetección de HSP60 en los ameloblastomas convencionales fue mayor en comparación con los AU, pero algo notorio de la expresión de esta proteína en los AM es que en todos se observó un patrón de detección granular, tanto en la membrana como en el citoplasma de las células con cambio ameloblástico (Fig. 22). Como se mencionó anteriormente, en los AM de tipo plexiforme HSP60 se detectó también en el núcleo celular (Figura 23).

Tabla 2. Análisis de la intensidad de detección de la HSP60 en las muestras analizadas

	Positivo N (%)	Leve	Moderado	Intenso
Intensidad de la expresión	16 68%	15 63%	1 5%	--
Nuclear	2 9%	2 9%	--	--
Citoplasma	0	0	0	--
Membrana plasmática	15 68%	14 63%	1 5%	--
Negativo	6 28%	--	--	--

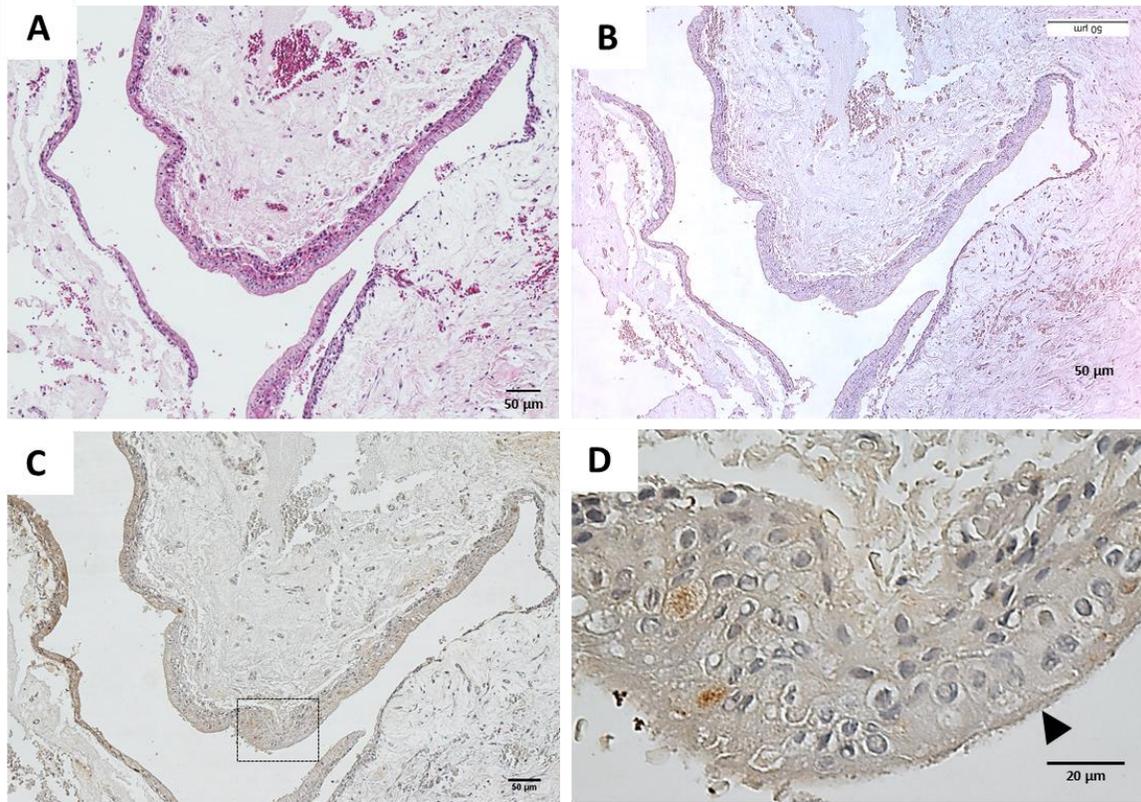


Figura 19. Inmunodetección de HSP60 en quiste dentígero.

Cortes histológicos de QD se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra HSP60. (A) Corte teñido con hematoxilina y eosina (H&E). (B) Control negativo donde se omitió la incubación con el anticuerpo contra HSP60. (C) IHC a una amplificación de 10X. (D) Amplificación a 63X del recuadro en C. La cabeza de flecha indica la detección leve en las células epiteliales

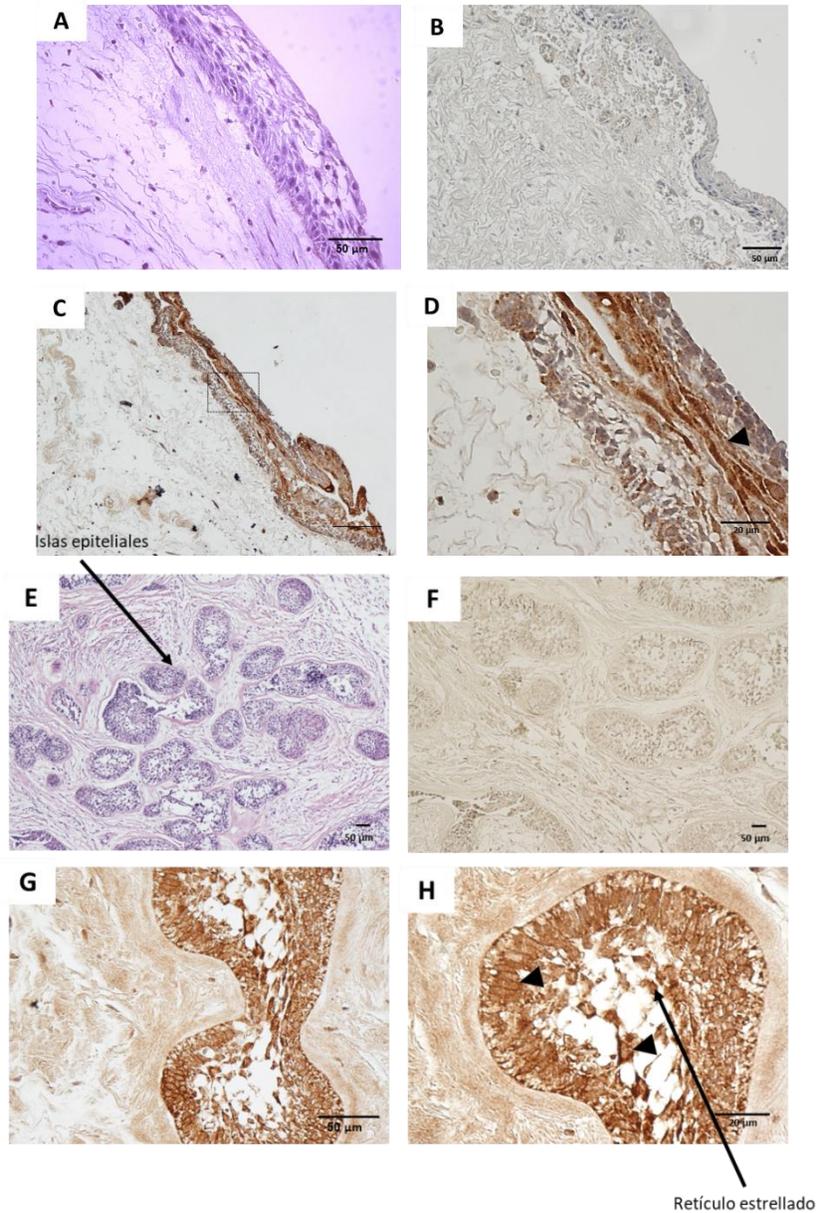


Figura 20. Inmunodetección de HSP60 en AU Mural.

Cortes histológicos de AU mural se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra HSP60. (A-D) Corte hacia la luz del quiste. (G-H) Corte mostrando islas de células epiteliales en la capsula de tejido conectivo. (A, E) cortes teñidos con H&E. (E, F) Controles negativos omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. (C, D, G, H) IHC de HSP60. (A-C, E, F) amplificación de 10X. (D) Amplificación a 63X del recuadro en C. (G, H) amplificación a 63X. Las cabezas de flecha señalan las células de tipo retículo estrellado

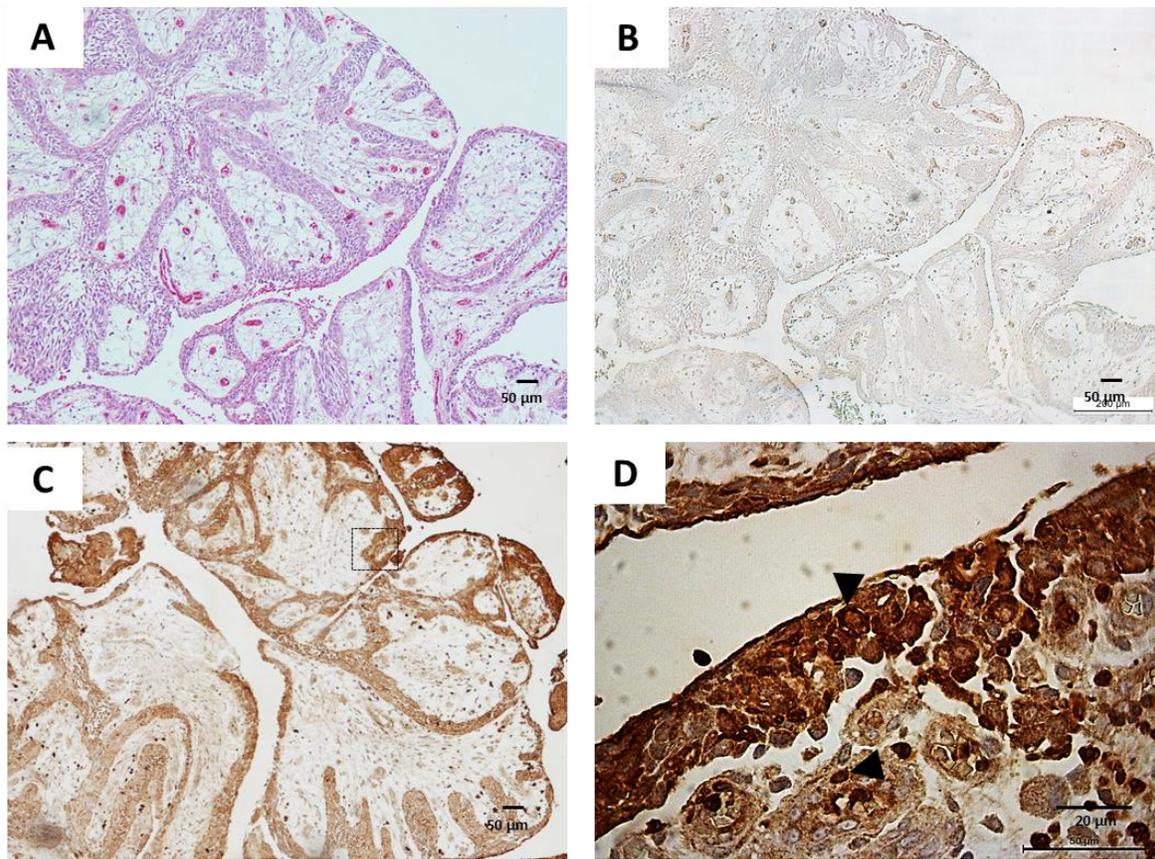


Figura 21. Inmunodetección de HSP60 en AU Luminal.

Cortes histológicos de AU L se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra HSP60. (A) Corte teñido con H&E. (B) Control negativo omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. (C) IHC de HSP60 a una amplificación de 10X. (D) Amplificación a 63X del área marcada en el recuadro de C.

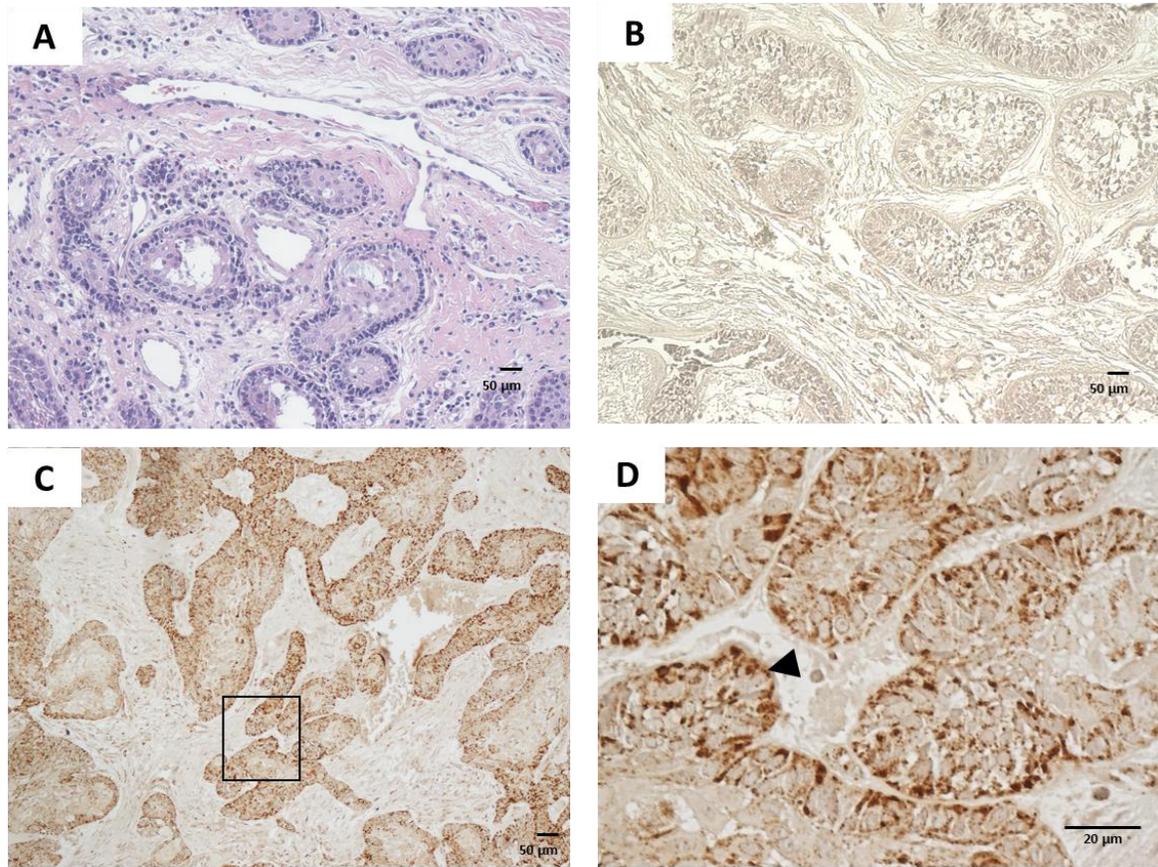
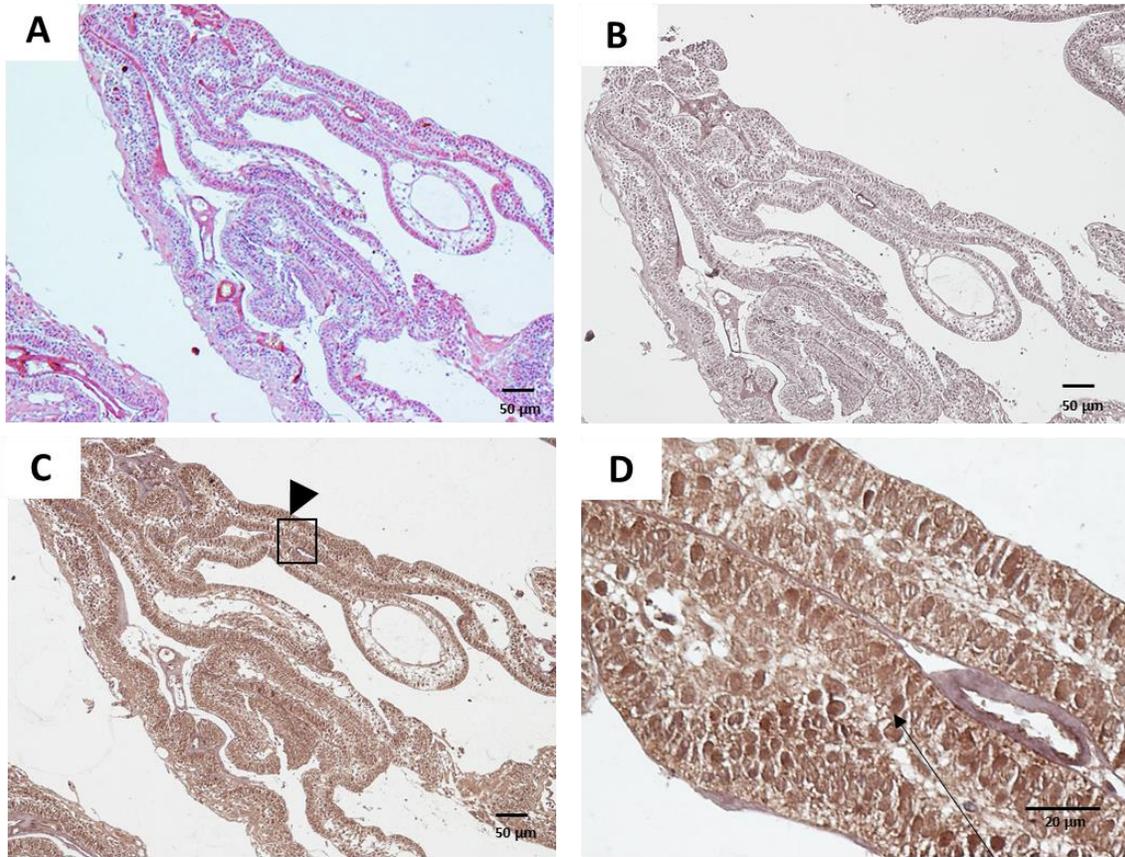


Figura 22. Inmunodetección de HSP60 en AM Folicular.

Cortes histológicos de AM F se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra HSP60. (A) Corte teñido con H&E. (B) Control negativo omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. (C) IHC a una amplificación a 10X. (D) Amplificación del recuadro en C, donde se puede observar una detección granular moderada en la membrana de las células epiteliales tumorales y leve en su citoplasma (cabeza de flecha).



Núcleos

Figura 23. Inmunodetección de HSP60 en AM Plexiforme.

Cortes histológicos de AM P se sometieron a ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo contra HSP60. (A) Corte teñidos con H&E. (B) Control negativo omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. (C) IHC de HSP60 a una amplificación de 10X. (D) Amplificación a 63x del recuadro en C, donde se puede observar una detección moderada en los núcleos de las células epiteliales tumorales.

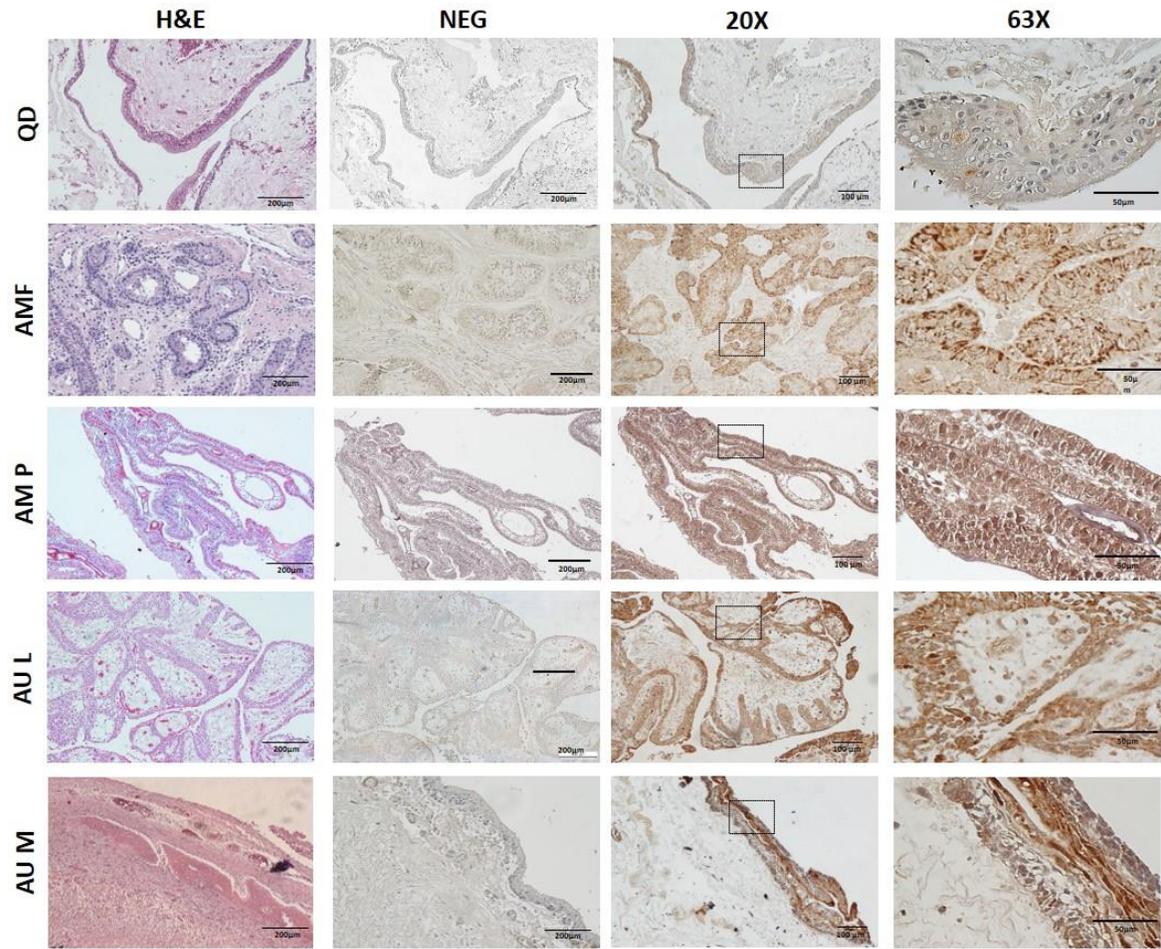


Figura 24. Imágenes representativas de la detección de HSP60 en todos los tejidos analizados.

En la figura 24 se muestra una comparación de la inmunohistoquímica de HSP60 para todas las lesiones analizadas. Tanto el análisis de la proporción como de la intensidad de inmunodetección de HSP60 mostraron que esta proteína presentó una mayor expresión en todos los tipos histológicos de ameloblastoma comparado con QD ($P < 0.005$) (Fig 26). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos histológicos de AU ni tampoco en la comparación de los tipos histológicos folicular y plexiforme de los AM. Al realizar una comparación de los AM con los AU encontramos que los AU de tipo luminal presentaron una mayor área de expresión de HSP60 comparado con los AM de ambos tipos (Fig. 25).

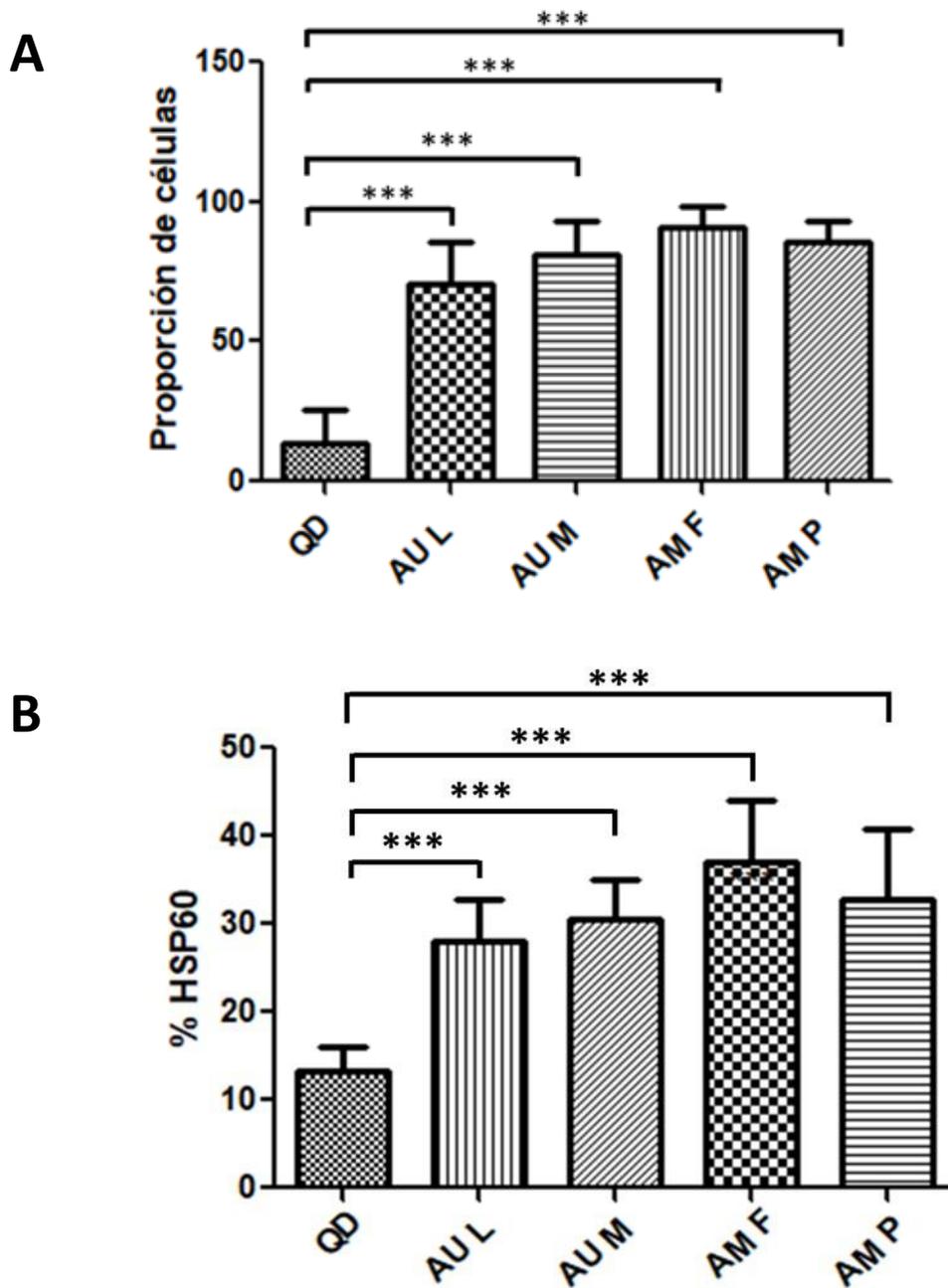


Figura 25 Análisis del reconocimiento de HSP60.

La proporción del número de células positivas (A) y de la intensidad (B) del inmunomarcaje de HSP60 en las diferentes muestras se analizó como se describió en Materiales y Métodos. *** $p < 0.005$

Discusión

Debido a la gran importancia diagnóstica y terapéutica de las proteínas de membrana en otros tipos de tumores (Hopkins and Groom 2002, 2003; Rabilloud 2003), y a la poca o nula información de las proteínas de membrana de los ameloblastomas y los quistes dentígeros, en nuestros estudios previos extrajimos proteínas de membrana de ameloblastomas y quistes dentígeros y al compararlos identificamos la expresión diferencial de algunas bandas en geles de poliacrilamida (Rodríguez-Vázquez, 2015). Algunas de estas bandas se encontraron en los ameloblastomas, pero no en los quistes dentígeros. Debido a la información que se encuentra en la literatura acerca del cambio ameloblástico de las paredes de los quistes dentígeros que se presentan en un alto porcentaje (Scholl et al. 1999), consideremos importante identificar cuáles eran las proteínas contenidas en las bandas diferenciales. Entre las proteínas que se identificaron se encuentran vinculina, plectina, interina $\alpha 6$, HSP60, periostina y PKM2 (Rodríguez-Vázquez, 2015).

En este trabajo analizamos la expresión y localización de la integrina $\alpha 6$ y de la HSP60 en ameloblastoma y quiste dentígero para así poder corroborar su localización membranal y su posible sobre expresión, así como su posible deslocalización en los ameloblastomas comparados con el quiste dentígero.

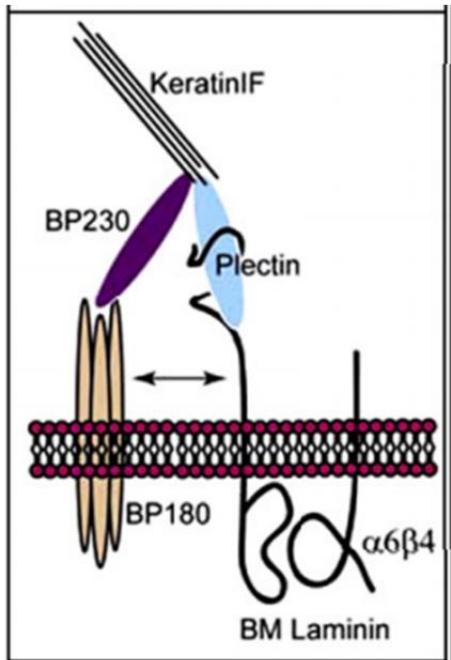
Integrina $\alpha 6$

En la banda de aproximadamente 55 kDa se identificó mediante espectrometría de masas, entre otras proteínas, a la subunidad $\alpha 6$ de la integrina (Rodríguez-Vázquez, 2015). Esta fue una de nuestras proteínas de estudio en este trabajo, ya que para la translocación celular y la invasión tumoral se requiere un desajuste en la adhesión a la matriz extracelular mediada por las integrinas (Varner and Cheresh 1996). En particular para los ameloblastomas, algunos reportes han demostrado la expresión inmunohistoquímica de algunas integrinas, sugiriendo que tienen un papel importante en la invasión local y en las características

arquitectónicas de los tejidos (Modolo et al. 2004; Souza Andrade et al. 2007). Pero, la expresión comparativa de estos receptores en quistes dentígeros y ameloblastomas no se ha reportado hasta el momento.

La subunidad $\alpha 6$ de la integrina puede formar heterodímeros con las subunidades $\beta 1$ y $\beta 4$ y ambos heterodímeros son receptores para laminina (Arnaout 2002). Cabe señalar, que entre las proteínas identificadas en las bandas diferenciales del ameloblastoma también se encontraron a plectina y vinculina, las cuales están ampliamente descritas en adhesiones celulares y se asocian intracelularmente con la cola citoplasmática de la subunidad $\beta 4$ del heterodímero $\alpha 6\beta 4$. A plectina se le localiza en hemidesmosomas y a vinculina en adhesiones focales (Ivaska et al. 2007) (Figura 26).

Hemidesmosomas



Adhesiones focales

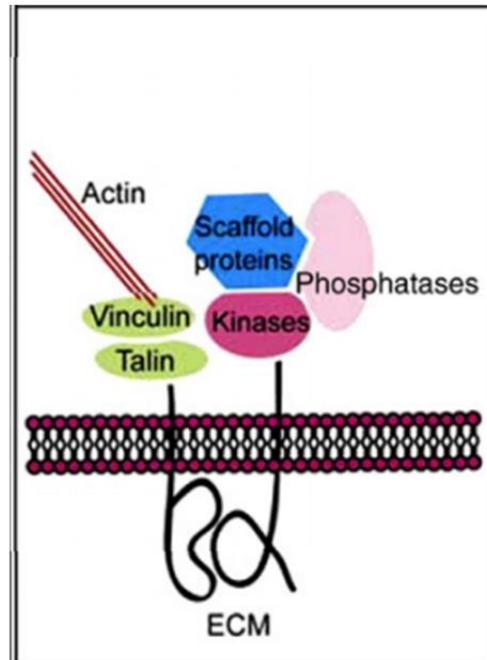


Figura 26. Estructuras básicas de los sitios de adhesión donde participa la integrina $\alpha_6\beta_4$.

En la parte basal de los queratinocitos, la integrina $\alpha_6\beta_4$ de los hemidesmosomas se une a plectina, mientras que, en las adhesiones focales, la cola citoplásmica de la subunidad β_4 se une a proteínas del cito esqueleto como vinculina (Ivaska et al. 2007)

La transformación maligna se caracteriza por la desorganización del citoesqueleto, disminución de la adhesión y alteración de las respuestas dependientes de la adhesión. Estudios acerca de la expresión de integrinas en células transformadas sugieren que varias subunidades pueden contribuir positiva o negativamente al fenotipo celular transformado (Ruoslahti 1992), pero no sólo por el aumento o disminución de su expresión, sino también un hallazgo consistente es la falta de organización espacial de la expresión de las integrinas en tumores epiteliales (Mizejewski 1999). En carcinomas, su disposición espacial se vuelve

bastante desordenada, con un efecto difuso y distribución celular menos abundante. Estos cambios en la distribución de la integrina en la superficie celular pueden afectar la afinidad de unión al ligando y correlacionarse con una desorganización concomitante de la estructura de la membrana basal (Mizejewski 1999).

Ha quedado claro que la integrina $\alpha 6\beta 4$, un componente principal de los hemidesmosomas, es capaz de transducir señales de la matriz extracelular al interior de la célula, las cuales modulan críticamente la organización del citoesqueleto, la proliferación, la apoptosis y la diferenciación (Borradori and Sonnenberg 1999). En células de epitelios estratificados, la integrina $\alpha 6\beta 4$ forma adhesiones celulares fuertes mediante hemidesmosomas en la parte basal celular formando una unión de la laminina de la matriz extracelular con la citoqueratina de los filamentos intermedios, vía plectina (Fig. 26) (Ivaska et al. 2007).

Por su parte, las adhesiones focales contienen proteínas del citoesqueleto como vinculina o talina y son estructuras ligadas a filamentos de actina que son dinámicas y son los lugares donde las integrinas unen a la matriz extracelular con el citoesqueleto celular y reclutan una red compleja de proteínas de andamiaje y señalización (Geiger et al. 2001). Varios estados de enfermedad que involucran células epiteliales se han asociado con alteraciones en los heterodímeros que contienen a la integrina $\alpha 6$. Los ratones que carecen de la integrina $\alpha 6$ se desarrollarán completamente al nacer, pero mueren poco después debido a ampollas graves en la piel y otros epitelios (Georges-Labouesse et al. 1996). Las alteraciones en la integrina $\alpha 6$ y/o una deficiencia en la unión con la integrina $\beta 4$, se asocian con atresia pilórica y epidermólisis ampollosa de unión, una enfermedad ampollosa humana del epitelio (Brown et al. 1996).

En tejidos normales. la integrina $\alpha 6$ se localiza en la membrana basal de las células epiteliales, específicamente en la interfase del tejido conectivo y epitelial. En nuestros análisis inmunohistoquímicos de los quistes dentígeros se pudo observar la detección de esta proteína en las células epiteliales de la pared del quiste, como era de esperarse, aunque de una manera leve. Interesantemente, se observó una mayor expresión de la integrina $\alpha 6$

en la membrana de las células epiteliales de los ameloblastomas tanto convencionales como unicuésticos, pero es ligeramente superior en los ameloblastomas convencionales, los cuales tienen un fenotipo más agresivo que los ameloblastomas de tipo unicuéstico (Reichart et al. 1995). En los ameloblastomas de tipo folicular se observó a la integrina $\alpha 6$ en el lugar esperado de su detección, sin embargo, en las demás lesiones analizadas, se observó su localización en las membranas de las células epiteliales que están hacia la luz de los quistes que se forman en los ameloblastomas.

La progresión tumoral exige una pérdida de la capacidad adhesiva entre las células tumorales y a la vez producir una degradación enzimática de la matriz extracelular mediante la producción de enzimas secretadas por las propias células tumorales o por células estromales activadas. Por último, las células tumorales pueden migrar hacia sitios lejanos y formar metástasis. En la cicatrización del epitelio bucal se altera la composición de la matriz extracelular que rodea a los queratinocitos, por lo que éstos necesitan ajustar sus receptores para poder interactuar con ella (Larjava et al. 2011). Así, las integrinas de los queratinocitos del borde de la herida disuelven sus conexiones hemidesmosomales con la membrana basal, y la distribución de la integrina $\alpha 6\beta 4$ se vuelve difusa alrededor de los queratinocitos basales (Borradori and Sonnenberg 1999). Interesantemente, la integrina $\alpha 6\beta 4$ facilita la reepitelización al apoyar la señalización, vía EGF (Russell *et al.* 2003). Por lo anterior, sugerimos que en los ameloblastomas, a comparación de los quistes dentígeros, hay una disolución de los hemidesmosomas que unen a las células, similar a lo que sucede en la cicatrización del epitelio bucal.

Parece que la integrina $\beta 1$ (la cual forma un heterodímero con la subunidad $\alpha 6$) es fundamental para la reepitelización de heridas, ya que la migración de queratinocitos y la reepitelización se ven gravemente comprometida en ratones “knockout” para esta subunidad (Grose et al. 2002).

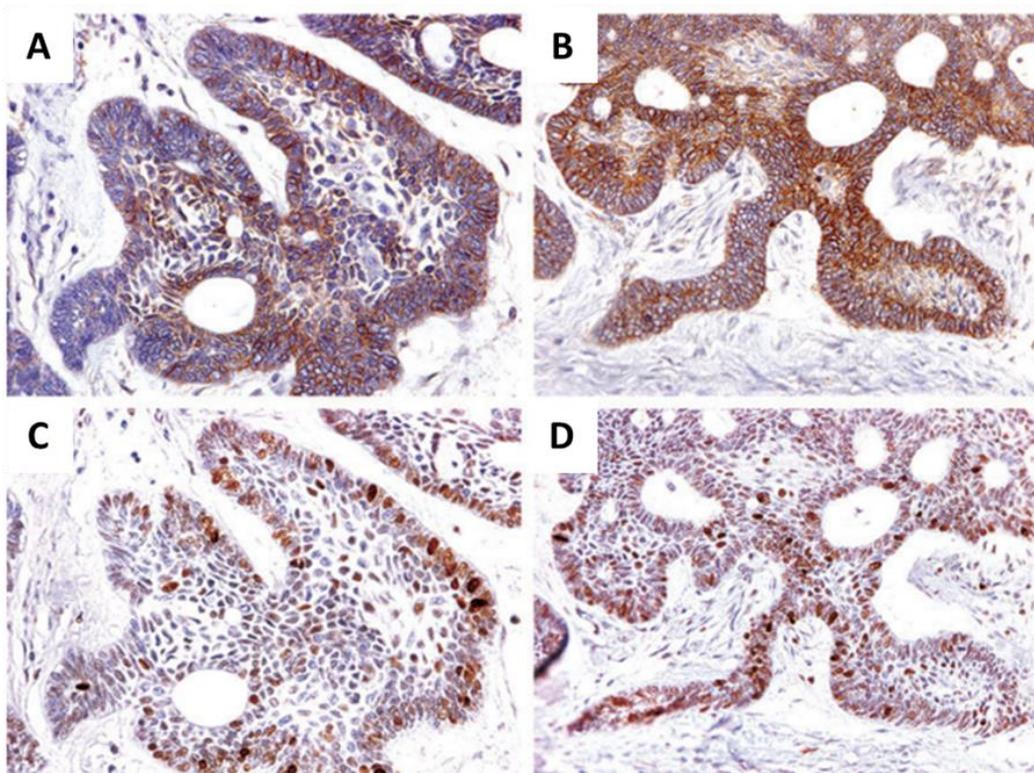
Por otra parte, en cáncer de páncreas el heterodímero $\alpha 6\beta 4$ puede ser un receptor para la periostina (Gonzalez-Gonzalez and Alonso 2018), una de las proteínas identificadas con

expresión diferencial entre quiste dentífero y ameloblastoma (Rodríguez-Vázquez 2015). La periostina es una proteína de matriz extracelular, principalmente expresada en el periostio (Merle and Garnero 2012) y en el ligamento periodontal (Horiuchi et al. 1999) y que es secretada, lo cual le permite interactuar con diferentes tipos de integrinas (Hoersch and Andrade-Navarro 2010) y favorecer el fenotipo tumoral (Xiao et al. 2015). Además, se sabe que esta proteína es secretada durante la odontogénesis (Ruan et al. 2009). Así, es posible que exista una relación entre la expresión diferencial de la integrina $\alpha 6$ y la presencia de periostina en ameloblastoma.

En general, el aumento de la expresión de periostina se relaciona con un comportamiento agresivo en diferentes tipos de cáncer y, debido a que se secreta, se ha considerado la posibilidad de utilizarlo como biomarcador sérico (Gonzalez-Gonzalez and Alonso 2018). De manera interesante, su expresión no se ve aumentada en tumores primarios, solo en los tumores secundarios y reapariciones tumorales, por lo que se ha relacionado con invasión y metástasis (Gonzalez-Gonzalez and Alonso 2018). Como los tumores odontogénicos no presentan metástasis y debido a la dificultad para la obtención de muestras con estas características se decidió no analizar su expresión en este trabajo.

Como se ha mencionado anteriormente, la integrina $\alpha 6$ también puede formar heterodímeros con la subunidad $\beta 1$, la cuál ha sido más estudiada en ameloblastomas por diversos autores (Ahsan et al. 2011; Modolo et al. 2004; Souza Andrade et al. 2007). En algunos estudios se observó una ligera disminución en la expresión de la integrina $\beta 1$ en ameloblastoma (de Souza Andrade et al. 2008) en comparación con el germen y la lámina dentales (Modolo et al. 2004). La subunidad $\beta 1$, mediante su isoforma $\beta 1C$ puede prevenir la progresión del ciclo celular lo que juega un papel en la proliferación y el control de la diferenciación celular (Meredith et al. 1995), por lo que una disminución en la expresión de $\beta 1$ se ha relacionado con su anclaje y crecimiento celular independiente? (Suzuki and Takahashi 1999).

Cuando se analizó por inmunohistoquímica la expresión de $\beta 1$ en 15 casos de ameloblastoma convencional (Ahsan et al. 2011), se observó que esta subunidad se expresaba únicamente en el citoplasma de células basales de los ameloblastomas foliculares (Fig. 27 A), mientras que en los de tipo plexiforme observaron una inmunodetección intensa en la misma zona en las células basales y en el área subnuclear de su citoplasma (Fig. 27B), por lo que se sugirió que la integrina $\beta 1$ juega in papel en la interacción con los componentes de la membrana basal, posiblemente recolectando señales de proliferación, ya que la detección de un marcador de proliferación (PCNA) se traslapaba con el inmunomarcaje de $\beta 1$ (Fig. 27C, D) (Ahsan et al. 2011).



(A,B) y PCNA (C, D) en ameloblastomas foliculares (A,C) y plexiformes (B Y D). Tomado de Ahsan *et al.*, 2011

En cuanto a la detección de la integrina $\alpha 6$ mediante western blot, recordemos que detectamos 3 bandas de 110, 70 y 30 kDa, tanto en QD como en los diferentes tipos de ameloblastoma. La integrina $\alpha 6$ es un polipéptido que contiene 1050 aminoácidos que se procesa en una cadena pesada de 110 kDa y una cadena ligera de 30 kDa unidos por un puente disulfuro (Tamura et al. 1990). Existe una variante inicialmente identificada en líneas celulares de carcinoma prostático, que se ha denominado integrina $\alpha 6p$, la cual tiene un peso molecular de 70 kDa y contiene las secuencias de aminoácidos correspondientes a la cadena ligera y a la cadena pesada, con el dominio extracelular acortado, al cual le falta el dominio de unión al ligando (Fig. 28) (Springer 1997), lo que puede repercutir en la migración celular. La variante $\alpha 6p$ se puede unir tanto a la subunidad $\beta 1$ como a $\beta 4$ y se puede mantener en la superficie celular hasta tres veces más que la $\alpha 6$ completa (Davis et al. 2001). Así, las bandas detectadas en quiste dentígero y ameloblastoma pueden corresponder a la cadena pesada, la cadena ligera y a la variante $\alpha 6p$. Dado que esta última se detectó también en el quiste dentígero sugerimos que esta variante puede afectar la adhesión y/o migración celular desde esta lesión no tumoral.

En cáncer epitelial se ha indicado la existencia de una disminución de la integrina $\alpha 6\beta 4$ y una persistencia en la expresión de $\alpha 6\beta 1$, relacionándolo con la progresión tumoral (Cress et al. 1995). La abundancia de las integrinas $\alpha 6$ y $\beta 1$ dependen del citoesqueleto de actina, mientras que la producción total de $\alpha 6$ se encuentra inalterada, pero la expresión y la localización en la superficie celular de la integrina $\alpha 6p$ es dependiente de la despolimerización de actina, lo que sugiere que la formación de la $\alpha 6p$ ocurre después del procesamiento proteolítico de la $\alpha 6$ en la superficie celular (Davis et al. 2002).

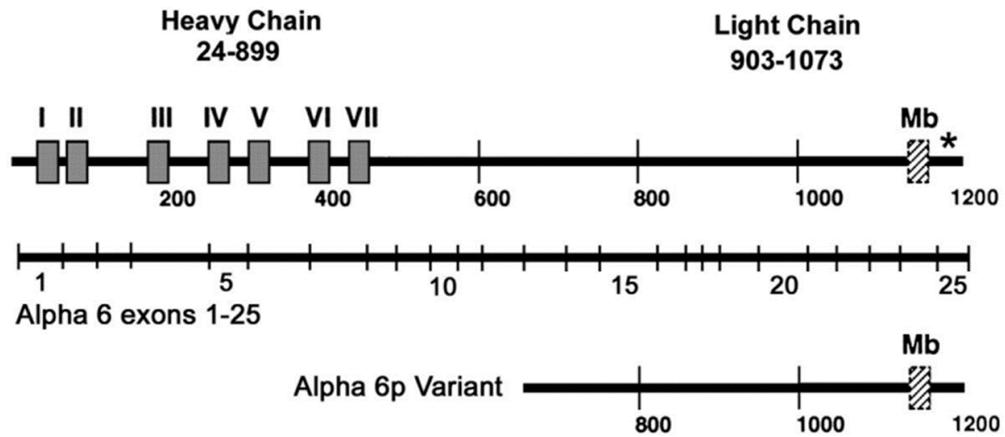


Figura 28. Esquema de las integrinas $\alpha 6$ y $\alpha 6p$.

En el esquema se muestran las variantes completa y $6p$, en la parte de enmedio se muestran los exones 1 a 25 del gen codificante. Los dominios repetidos (rectángulos sombreados) se indican con números romanos (I – VII). Los supuestos dominios de unión a ligando y a catión están contenidos entre los dominios repetidos III y IV y V y VI, respectivamente. Tomado de (Davis et al. 2001).

HSP60

En nuestro trabajo previo, en la banda de expresión diferencial de 95 kDa entre quiste dentígero y ameloblastoma se identificó mediante espectrometría de masas a la chaperonina de 60 kDa (HSP60) (Rodríguez-Vázquez, 2015), por lo que en el presente trabajo se analizó la expresión de esta proteína en quiste dentígero y en diferentes variantes del ameloblastoma. En esta banda también se identificaron a proteínas tales como a la periostina y PKM2 (Rodríguez-Vázquez, 2015), las cuales analizaremos más adelante.

Un campo muy activo es el estudio del papel de HSP's en la carcinogénesis, y de las posibles aplicaciones de detección y cuantificación de HSP en tejidos y fluidos biológicos para el diagnóstico de cáncer y, por extensión, para evaluar el pronóstico, para monitorear la progresión de la enfermedad y para desarrollar herramientas terapéuticas basadas en estas proteínas (Ciocca and Calderwood 2005; Calderwood *et al.* 2006). Entre todas las chaperonas, HSP60 ha mostrado tener potencial en las áreas de detección, pronóstico, prevención y tratamiento en varios tipos de cáncer (Cappello *et al.* 2008).

Hsp60 pertenece a las chaperoninas de grupo I y se localiza en la matriz mitocondrial, donde participa en el plegamiento de las proteínas mitocondriales (Gupta and Austin 1987), pero entre 15 y 20 % de esta proteína se ha encontrado en sitios extramitocondriales, como el citosol, la superficie celular y el espacio extracelular (Soltys and Gupta 1996); sin embargo, las funciones que realiza en esos sitios no están totalmente estudiadas. Interesantemente, en condiciones patológicas HSP60 se acumula en sitios extramitocondriales (Czarnecka *et al.* 2006; Chandra *et al.* 2007), donde puede participar en funciones tanto de pro-sobrevivencia o pro-muerte celular (Fig. 29) (Chandra *et al.* 2007). La HSP60 de superficie se ha asociado con transporte membranal y señalización (Dziewanowska *et al.* 2000; Cappello *et al.* 2018) y un incremento de HSP60 en la membrana plasmática es una señal de daño para el sistema inmune que lleva a la activación y maduración de células dendríticas y a la generación de una respuesta antitumoral mediada por células T (Feng *et al.* 2002; Osterloh *et al.* 2004). De hecho, el reconocimiento de HSP60 por linfocitos T gamma delta participa en la lisis de las células tumorales (Fig. 29 A) (Laad *et al.* 1999). Por el contrario, la

HSP de superficie participa en la metástasis de carcinoma pancreático (Fig. 29 B) (Piselli *et al.* 2000). Por lo tanto, HSP60 puede tener efectos opuestos con respecto a la supervivencia celular, en algunos casos tiene un papel citoprotector, pero en otros estimula la apoptosis (Cappello *et al.* 2008). Debido a esto, la presencia y niveles de HSP60 en células tumorales puede dar información útil para combatir el cáncer, ya sea por su inhibición (si participa en el crecimiento tumoral) o su incremento (si aumenta la apoptosis), además de establecer la diagnosis y la prognosis (Cappello *et al.* 2008).

Así, dependiendo de su origen, esta chaperonina puede tener acciones pro o anti apoptóticas (Chandra *et al.* 2007). Si tiene origen mitocondrial y se libera al citoplasma después de estrés celular o pérdida de potencial transmembranal, HSP60 activa a la pro caspasa 3 actuando como un factor pro-apoptótico (Chandra *et al.* 2007), o bien inhibe a la pro-caspasa 3 y tiene un efecto anti-apoptótico (Fig. 29 C) (Chandra *et al.* 2007).

La función de la HSP60 en el citoplasma durante la apoptosis crea bastantes conflictos, ya que es capaz de regular la apoptosis de las células tumorales a través de la interacción con varios reguladores anti-apoptóticos o pro-apoptóticos como Bax, Bak, p21, p53 y survivina (Fig. 29D) (Ghosh *et al.* 2008; Ikawa and Weinberg 1992; Kirchhoff *et al.* 2002). El papel de HSP60 citosólico en la regulación de la apoptosis se ha demostrado en diferentes estudios (Samali *et al.* 1999), pues en el citosol tiene una función pro-supervivencia en miocitos cardiacos (Kirchhoff *et al.* 2002), carcinoma hepatocelular (Huang *et al.* 2018) y cáncer de mama. Contradictorio a esto, la interacción entre HSP60 y procaspasa-3 se ha demostrado en células HeLa y Jurkat, debido a que HSP60 facilita la maduración de procaspasa-3 de una manera dependiente de ATP (Xanthoudakis *et al.* 1999).

Por su parte, survivina, el miembro más pequeño de la familia de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), regula la división celular e inhibe la apoptosis bloqueando la activación de la pro-caspasa (Fig. 29 E) (Mita *et al.* 2008). Esta proteína se expresa en muy bajo nivel o está totalmente ausente en los tejidos sanos, pero en tejidos fetales y varios tipos de cáncer se encuentra sobre expresada (Garg *et al.* 2016; Li, Hu, and Li 2018). Durante estímulos de

muerte, el complejo HSP60-survivina se puede formar en la mitocondria (Ghosh et al. 2008). Se ha demostrado que HSP60 y survivina se acumulan en el citosol, acompañadas de cantidades decrecientes de ellas en las mitocondrias (Huang and Yeh 2019), lo que puede contribuir a la apoptosis (Dohi et al. 2004). En cambio, la formación *de novo* o la introducción de este complejo al citosol resulta en una función de citoprotección (Huang and Yeh 2019).

Antiapoptosis

Proapoptosis

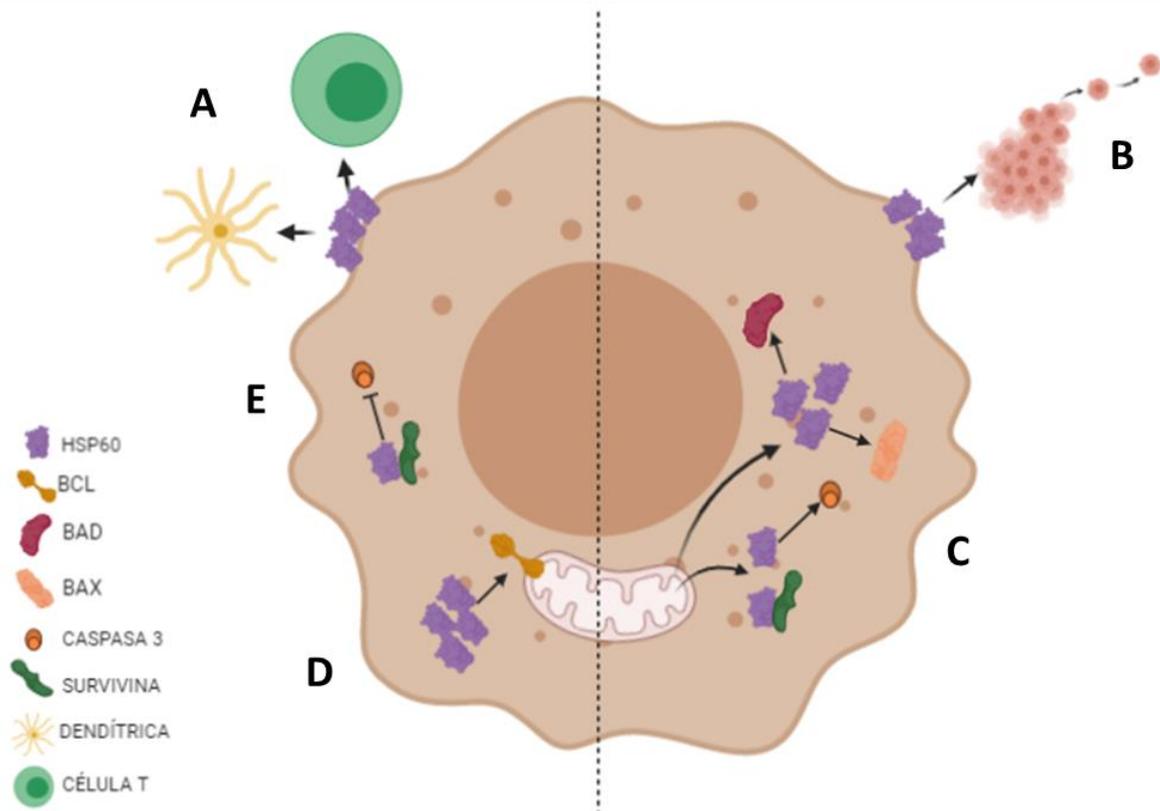


Figura 29. Funciones pro- y anti-apoptóticas de HSP60.

HSP60, tiene funciones en la apoptosis de células tumorales de acuerdo con su localización. (A) En la membrana celular puede ser señal de alerta para el sistema inmune y puede activar a células T y a células dendríticas. (B) En el carcinoma pancreático la HSP60 membranal participa en la metástasis tumoral. (C) Si HSP60 se libera de la matriz de la mitocondria al citoplasma celular, puede activar a proteínas pro-apoptóticas como caspasa 3, BAD y BAX. Si HSP60 se encuentra “*de novo*” en el citoplasma puede activar proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 (D) e inactivar proteínas pro-apoptóticas como la caspasa 3 (E).

Particularmente, HSP60 en regiones orales ha sido detectada por técnicas inmunohistoquímicas en el epitelio basal de la mucosa oral y sus niveles fueron significativamente más elevados en el liquen plano que en fibromas orales (Chaiyarit et al. 1999). Por otra parte, esta chaperonina se encontró ausente en carcinomas de células escamosas de la lengua, pero presente en el epitelio normal, así como una presencia discontinua en lesiones displásicas, sugiriendo que la producción de HSP60 disminuye progresivamente con la progresión de la carcinogénesis (Ito et al. 1998). Estos datos sugieren que la chaperonina puede ser considerada como una señal de alerta al evaluar lesiones de lengua (Cappello et al. 2008)

Previamente, en nuestro equipo de trabajo se realizó un estudio comparativo de los perfiles en dos dimensiones de proteínas expresadas en diferentes lesiones odontogénicas, entre las que se encuentran el quiste dentígero, el ameloblastoma unicístico, el ameloblastoma convencional y el carcinoma ameloblástico (García-Muñoz et al., 2014). En ese estudio se encontró un gran número de proteínas con expresión diferencial entre las lesiones. Aunque todos los perfiles compartieron varias proteínas, los perfiles del carcinoma ameloblástico y el ameloblastoma convencional fueron los más parecidos entre sí y entre las proteínas que se sobre expresaron en el carcinoma ameloblástico en comparación con el ameloblastoma convencional se encontró a HSP60, sugiriendo que esta proteína aumenta su expresión conforme aumenta el grado de lesión en este tipo de tumores.

Por otra parte, Kumamoto *et al.* (2002) realizaron un estudio inmunohistoquímico en 36 ameloblastomas convencionales (21 foliculares y 15 plexiformes) en donde encontraron la inmunodetección de HSP60 de forma granular en el citoplasma de las células periféricas columnares. También en las células endoteliales y los fibroblastos estromales se detectó inmunoreacción. Aunque en este trabajo se describió que el tejido oral normal mostraba una inmunodetección de HSP60 similar a lo encontrado en nuestro trabajo, este resultado no fue publicado no entendí esta parte (Kumamoto et al. 2002). Por su parte, los 5 carcinomas ameloblásticos analizados se describieron con una reactividad difusa en casi todas las células neoplásicas (Kumamoto et al. 2002) (Fig. 30).

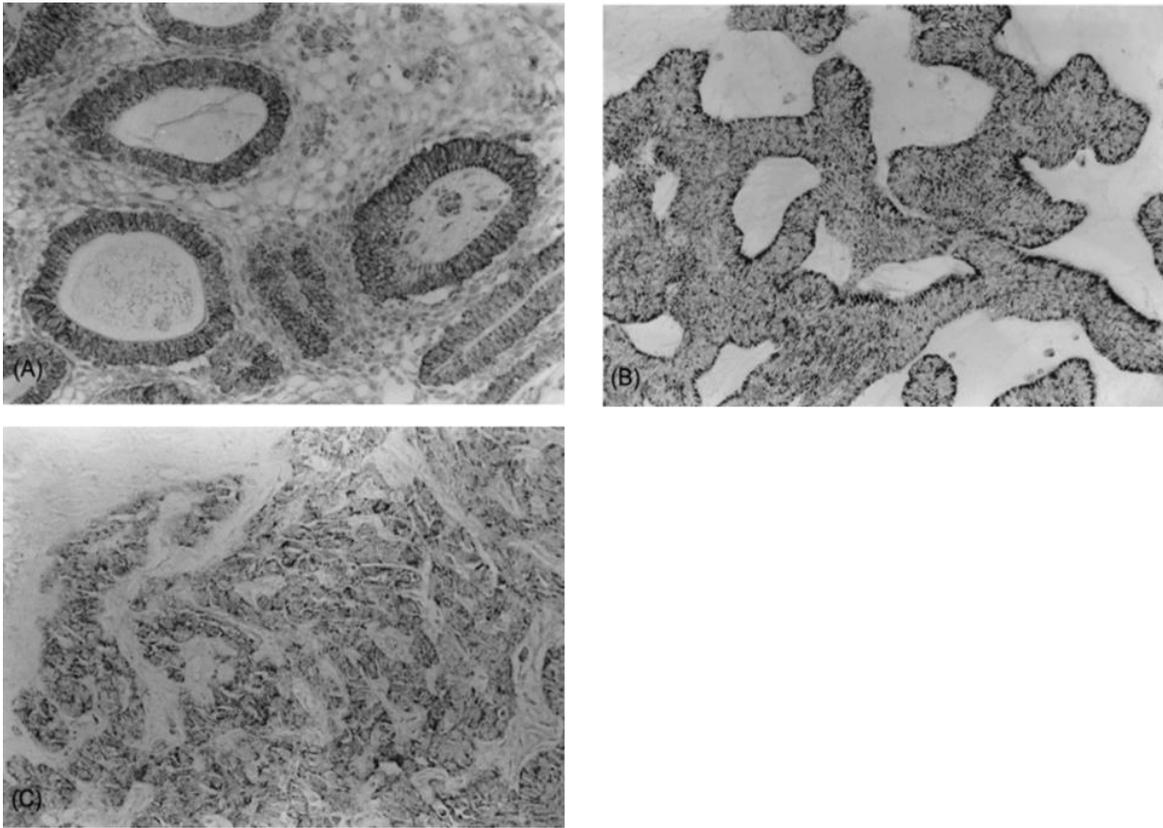


Figura 30. Detección inmunohistoquímica de HSP60 en Ameloblastoma

Los ameloblastomas foliculares y plexiformes (A, B), así como el carcinoma ameloblástico (C) mostraron una reactividad granular de HSP60 en células columnares o cuboidales. (Kumamoto et al. 2002)

Al igual que dicho estudio, nosotros localizamos a la HSP60 de forma granular en los ameloblastomas convencionales. La detección granular en el citoplasma sugiere una localización mitocondrial de esta proteína (Kumamoto et al. 2002). Sin embargo, a diferencia de ese estudio, en nuestros ensayos se detectó a HSP60 en más variantes de

ameloblastoma y en quistes dentígeros. Por otra parte, en el presente trabajo localizamos a HSP60 en la membrana celular de los ameloblastomas.

En concordancia con nuestros estudios previos, donde sugerimos una expresión diferencial de HSP60 entre quiste dentígero y ameloblastoma, en este trabajo se detectó en mayor cantidad a la chaperonina en los ameloblastomas. Incluso, uno de los quistes dentígeros analizados por inmunohistoquímica y dos por western blot mostraron una detección muy leve de esta proteína. En todas las muestras de ameloblastoma, la detección de HSP60 fue de moderada a intensa, tanto en el citoplasma como en la membrana de las células epiteliales. Así mismo, no hubo diferencias significativas en la expresión entre los tipos histológicos de ameloblastomas uniuquísticos ni entre los tipos de ameloblastomas convencionales, pero sí se observó diferencia al comparar los ameloblastomas uniuquísticos con los convencionales, los cuales tienen una mayor detección.

A pesar de ser una proteína mitocondrial de 60 kDa, en este estudio localizamos a HSP60 de una manera intensa en la membrana de los ameloblastomas y por ensayos de western blot fue detectada en un peso de aproximadamente 95 kDa, mientras que los quistes dentígeros y en los controles positivos se detectó la banda esperada de 60 kDa, aunque en concordancia con los ensayos de inmunohistoquímica la detección fue muy leve en quistes dentígeros. Este resultado concuerda con la mayor inmunodetección de esta chaperonina en muestras de astrocitoma, células epiteliales de mucosa con inflamación crónica de la enfermedad de Crohn y área de metaplasia oncótica de tiroiditis de Hashimoto, las cuales presentan intensa inmunopositividad citoplasmática en contraste con la casi ausencia de reacción en los tejidos control de cerebro normal, mucosa colónica normal y bocio de la tiroides (Cappello et al. 2018) .

Algo interesante a destacar es la detección de HSP60 de manera intensa en la membrana y moderada en el citoplasma de las células tipo retículo estrellado que podemos observar en los ameloblastomas. Recordemos que en condiciones normales el retículo estrellado lo podemos observar únicamente en la odontogénesis, donde el órgano del esmalte de los gérmenes dentarios se caracteriza histológicamente por la presencia de este tipo celular

(Ida-Yonemochi et al. 2005) el cual, entre sus funciones está la captación de agua, lo que conlleva a la separación de las células y al aumento del espacio intracelular que contiene una matriz hidrófila rica en glucosaminoglucanos y ácido hialurónico, teniendo una función metabólica y morfogenética. Previamente se ha demostrado la presencia de moléculas de la matriz extracelular en el retículo estrellado, tales como syndecan-1, fibronectina y laminina 5 (Thesleff et al. 1981), así como moléculas funcionales como BMP-2, BMP-4 (Vainio et al. 1993) y FGF-2 (Cam et al. 1990). Sin embargo, estas investigaciones no tenían un punto de vista específico en términos de cómo funcionan las moléculas de matriz extracelular en este medio en particular. Algunos autores han propuesto llamar a estas células como estroma intraepitelial (Ida-Yonemochi et al. 2011). Cuando se encuentran dentro de un ameloblastoma ayudan a las células tumorales a sobrevivir o incluso proliferar bajo hipoxia, donde los vasos sanguíneos no pueden llegar debido a la presencia de membranas basales epiteliales (Ida-Yonemochi and Saku 2006)

Como encontramos una expresión diferencial tanto en la integrina $\alpha 6$ como en la HSP60 en el ameloblastoma, es posible que pueda existir una asociación física entre estas proteínas en este tipo de tumor, ya que la HSP60 de superficie celular se ha encontrado asociada a la integrina $\alpha 3\beta 1$ en células metastásicas de cáncer de mama y se ha implicado en la adhesión a nódulos linfáticos y osteoblastos, cuya asociación fue inhibida mediante una droga que se une a HSP60, la mizoribina (Barazi et al. 2002).

Además de la localización de HSP60 en la superficie celular, también se ha detectado a esta chaperonina en el medio extracelular (Nativel et al. 2019). Hay varias vías por las cuales HSP60 puede ser secretada, ya sea por una secreción activa, cuando se libera por un mecanismo celular, o una secreción pasiva, cuando se libera durante la apoptosis o la necrosis. Cuando HSP60 extracelular se deriva de células dañadas, se denomina patrón molecular asociado al daño (DAMP) o alarminas, conocidas por activar el sistema inmune a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Nativel et al. 2019). HSP60 puede liberarse pasivamente durante la necrosis o durante la apoptosis (Lehnardt et al. 2008) y tiene un efecto proinflamatorio cuando se libera durante la necrosis pero no

durante la apoptosis (Basu et al. 2000), aunque se deben realizar estudios adicionales para definir el efecto inflamatorio de HSP60 liberado por apoptosis y necrosis.

Por otra parte, uno de los mecanismos implicados en la secreción activa de HSP60 es la vía clásica de secreción de proteínas que pasa por el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Arya et al. 2015). Por lo tanto, la proteína se sintetiza y se secreta directamente, sin embargo, la señal inicial que determina esta vía de secreción aún no se ha descrito (Nativel et al. 2019). Además, HSP60 no contiene un dominio transmembranal, por lo que HSP60 debe cargarse en la membrana celular a través de proteínas asociadas. Un segundo mecanismo de secreción activa involucra exosomas y canales lipídicos (Chen et al. 2006; Gupta and Knowlton 2007). Se ha reportado que HSP60 está anclado a los exosomas; por lo tanto, la presencia de HSP60 en la superficie celular puede ser una condición necesaria para la liberación a través de la vía de secreción activa (Campanella et al. 2012).

Las células tumorales pueden secretar HSP60 vía exosomas, donde la proteína se encuentra en la membrana, lo que puede estar indicando que HSP60 funciona como un ligando para receptores de superficie de células que sean blanco para este tipo de exosomas, por ejemplo las células del sistema inmune (Campanella et al. 2012). La HSP60 extracelular puede asociarse a un gran número de receptores de superficie tales como CD14, CD40 y TLR's (Pockley and Multhoff 2008), lo que puede producir efectos anti-inflamatorios (Steinhoff et al. 1999; Pockley et al. 2007), ya que en tumores orales la HSP60 extracelular puede ser un ligando para los linfocitos T $\gamma\delta$ determinando supresión anti-tumoral (Atre et al. 2006; Thomas et al. 2000). La secreción de HSP60 también puede llegar al torrente sanguíneo y ser detectada tanto en individuos sanos como en pacientes con cáncer colorrectal (Hamelin et al. 2011). Por lo anterior, sería importante determinar si la HSP60 producida en los ameloblastomas se secreta, ya sea a saliva, torrente sanguíneo o al contenido de los quistes formados por los ameloblastomas; además de analizar el efecto de la HSP60 secretada en el comportamiento de este tipo de tumores.

Es interesante que sólo haya un gen que codifica para esta proteína, sólo un mRNA y sólo una proteína. Sin embargo, la chaperonina puede encontrarse en el citoplasma, la

membrana celular e incluso en el medio extracelular, lo que se supone que la localización de HSP60 se determina sólo durante sus etapas postraduccionales (Nativel et al. 2019).

Por su parte, en los ensayos de western blot, todas las muestras de ameloblastoma analizadas presentaron una banda de aproximadamente 95 kDa y no de 60 kDa como era de esperarse; sin embargo, el peso molecular esperado se detectó tanto en los tejidos control como en los quistes dentígeros. Una posibilidad en el cambio del peso molecular de HSP60 en los tejidos tumorales es por la potencial presencia de modificaciones postraduccionales. Alternativamente, esto puede deberse a su asociación con otras proteínas para poder así ubicarse en la superficie celular. Específicamente en los ameloblastomas de tipo plexiforme, observamos detección de HSP60 en el núcleo e interesantemente, mediante espectrometría de masas localizamos en la misma banda de 95 kDa a la piruvato cinasa isoforma 2 (PKM2), la cual es una enzima glucolítica que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP, generando ATP y presenta dos isoformas, PKM1 y PKM2 (Jiang et al. 2010). La isoforma 1 de esta cinasa (PKM1) se expresa preferentemente en tejidos adultos, mientras que PKM2 se expresa abundantemente en tejidos embrionarios y tumores que proliferan rápidamente (Jiang et al. 2010). Durante la carcinogénesis se ve una disminución en la expresión de PKM1 y un aumento en la expresión de PKM2 (Mazurek 2011). El metabolismo de las células tumorales se caracteriza por el consumo abundante de glucosa y la glucólisis aeróbica y PKM2 juega un papel decisivo en la glucólisis, contribuyendo significativamente al efecto Warburg, el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la división celular, la metástasis y la apoptosis (He et al. 2017). PKM2 existe como un tetrámero activado o un dímero con baja actividad en las células cancerosas. El dímero desplaza el glucometabolismo celular hacia la oxidación anaeróbica para proporcionar la energía necesaria, los productos metabólicos intermedios y el potencial redox para las células tumorales y las células embrionarias que proliferan rápidamente (Christofk et al. 2008; Tamada et al. Saya 2012). PKM2 citoplasmático se transloca a las mitocondrias bajo estrés oxidativo, donde fosforila Bcl2, lo que previene su degradación mediada por la ligasa Cul3-RBX1, aumenta la resistencia a la apoptosis de las

células tumorales y promueve la gliomagénesis (Yang et al. 2011). Por su parte, en células tumorales, la activación del receptor EGFR induce la translocación de PKM2 al núcleo donde se une a la β -catenina llevando a la expresión de la ciclina D1, activando así la proliferación de las células tumorales, lo que se ha correlacionado con los grados de malignidad y pronóstico del glioma (Yang et al. 2011). Aunque las localizaciones principales de PKM2 han sido descritas en citoplasma y núcleo, recientemente se encontró una porción de esta enzima en una fracción membranal y que es requerida para la unión de las células endoteliales durante la angiogénesis (Gómez-Escudero et al. 2019). Concordante con la expresión de PKM2 en células tumorales, en este trabajo se detectó a esta isoforma en el ameloblastoma. Así es posible, que en esta lesión estén interactuando HSP60 (60 kDa) y PKM2 (58 kDa) dando lugar a la banda de 95 kDa. Además, por inmunohistoquímica se detectó a HSP60 principalmente en la membrana plasmática de todos los tipos de ameloblastoma y en la variante plexiforme además se encontró en el núcleo, por lo que una posibilidad es que la asociación con PKM2 sea la responsable de la translocación de la chaperonina a esos sitios. Sin embargo, esta hipótesis debe ser comprobada experimentalmente.

A pesar de ser un tumor benigno, el ameloblastoma tiene un tratamiento invasivo ya que su progresión es impredecible y presenta una alta tasa de recurrencia, varios casos recurrentes han demostrado tener cambios malignos en el ameloblastoma existente, los que se denominan carcinoma ameloblástico de tipo secundario (Yang et al. 2017). A pesar de estos problemas en el tratamiento y predicción oportuna de recurrencia, no existe información en la literatura y mucho menos investigación clínica sobre posibles marcadores que nos ayuden a predecir el comportamiento de este tipo de lesiones.

Debido a que el ameloblastoma es una lesión tumoral poco frecuente, pocos estudios clínicos se han podido desarrollar para poder establecer diferentes estadios de las lesiones con el fin de ofrecer un diagnóstico oportuno y por lo tanto un tratamiento adecuado a cada tipo de lesión. Por lo anterior el procedimiento actual es muy agresivo y aun así, la tasa

general de recurrencia del ameloblastoma con los métodos actuales de tratamiento es aproximadamente del 10% (Pogrel and Montes 2009).

Yang et al. (2017) analizaron los factores clínicos asociados con la recurrencia temprana y el cáncer y propusieron un sistema de estadificación para predecir la recurrencia temprana y la cancerización. Las tres etapas propuestas son de acuerdo con el tumor primario, antes de la cirugía inicial: etapa I, el diámetro máximo del tumor ≤ 6 cm; estadio II, el diámetro máximo del tumor > 6 cm o invasión tumoral al seno maxilar / piso orbital / tejido blando; y en el estadio III, invasión a la base del cráneo o la metástasis en los ganglios linfáticos regionales (Yang et al. 2017). Estos estadios tienen una correlación significativa con la recurrencia a pesar del método de cirugía implementado y de la variante histológica del ameloblastoma (Yang et al. 2017). También concluyen que la edad del paciente, el sitio, el método quirúrgico y el estadio del tumor se correlacionaron con la cancerización (Yang et al. 2017). Al evaluarse el tiempo de recurrencia desde el momento de la primera cirugía hasta el diagnóstico de recurrencia, la mediana del tiempo fue de 34.0 meses (Yang et al. 2017).

El presente trabajo, presenta un acercamiento a posibles nuevas maneras de diagnosticar, categorizar e incluso tratar lesiones tumorales, haciendo un estudio dirigido específicamente a proteínas que se ven sobre expresadas en los ameloblastomas al compararlo con uno de sus posibles orígenes, el quiste dentígero. En primera instancia, los resultados obtenidos del análisis de la localización de la integrina $\alpha 6$, nos pueden ayudar a planear el tipo de cirugía a la cual se va a recurrir. Esto debido a que, en la variante menos agresiva de ameloblastoma (uniquístico mural) es en la única lesión en la que detectamos de una manera leve y en el lugar esperado a esta proteína. Debido a lo anteriormente mencionado de esta proteína, su detección moderada o intensa de manera desorganizada en los ameloblastomas, nos podría estar dando información sobre un diferente estadio de la lesión en la cual, podemos pensar en una mayor migración de las células tumorales y por lo tanto, una resección en bloque con márgenes de seguridad sería la opción quirúrgica ya

que la lesión tumoral podría presentar extensión tumoral más allá de los márgenes clínicamente apreciables.

Por otra parte, ya que la presencia membranal de la HSP60 podría ser una condición necesaria para su secreción, es de nuestro interés evaluar la presencia de esta proteína en sangre y saliva de pacientes con ameloblastomas y así mismo en pacientes sometidos a la eliminación quirúrgica de este tipo de lesiones. Nuestros resultados sugieren que esta proteína es importante para la biología tumoral y su detección en sangre o saliva nos podría ayudar al diagnóstico e incluso al control de pacientes para evitar de alguna manera la recurrencia de los ameloblastomas.

Conclusiones

En este trabajo se logró comprobar la sobre expresión de la integrina $\alpha 6$ y HSP60 en las variantes de ameloblastoma en comparación con quistes dentígeros, así como la deslocalización de ambas proteínas en los ameloblastomas.

Perspectivas

- Determinar qué proteínas interaccionan tanto con la integrina $\alpha 6$ como con la HSP60 en ameloblastomas.
- Analizar la detección de HSP60 en sangre, saliva y contenido quístico de pacientes con tumores odontogénicos.
- Determinar el papel que desempeñan la sobre expresión y deslocalización de ambas proteínas en el desarrollo del ameloblastoma
- Analizar la posible utilidad de la integrina $\alpha 6$ y/o HSP60 en el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y/o terapéuticos en la recurrencia del ameloblastoma.

Bibliografía

- Adam, P. J., R. Boyd, K. L. Tyson, G. C. Fletcher, A. Stamps, L. Hudson, H. R. Poyser, N. Redpath, M. Griffiths, G. Steers, A. L. Harris, S. Patel, J. Berry, J. A. Loader, R. R. Townsend, L. Daviet, P. Legrain, R. Parekh, and J. A. Terrett. 2003. 'Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer', *J Biol Chem*, 278: 6482-9.
- Adebiyi, K. E., V. I. Ugboko, G. O. Omoniyi-Esan, K. C. Ndukwe, and F. O. Oginni. 2006. 'Clinicopathological analysis of histological variants of ameloblastoma in a suburban Nigerian population', *Head Face Med*, 2: 42.
- Ahsan, M. S., M. Yamazaki, S. Maruyama, T. Kobayashi, H. Ida-Yonemochi, M. Hasegawa, A. Henry Ademola, J. Cheng, and T. Saku. 2011. 'Differential expression of perlecan receptors, alpha-dystroglycan and integrin beta1, before and after invasion of oral squamous cell carcinoma', *J Oral Pathol Med*, 40: 552-9.
- Alfred L. Weber, Takashi Kaneda, Steven J. Scrivani, and Shahid Aziz. 2003. 'Jaw: Cysts, Tumors, and Nontumorous Lesions', *Head and Neck Imaging*,: 930-94.
- Altini, M., H. Coleman, C. Doglioni, G. Favia, and E. Maiorano. 2000. 'Calretinin expression in ameloblastomas', *Histopathology*, 37: 27-32.
- Arnaout, M. A. 2002. 'Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion', *Immunol Rev*, 186: 125-40.
- Arya, R. K., A. Singh, N. K. Yadav, S. H. Cheruvu, Z. Hossain, S. Meena, S. Maheshwari, A. K. Singh, U. Shahab, C. Sharma, K. Singh, T. Narender, K. Mitra, K. R. Arya, R. K. Singh, J. R. Gayen, and D. Datta. 2015. 'Anti-breast tumor activity of Eclipta extract in-vitro and in-vivo: novel evidence of endoplasmic reticulum specific localization of Hsp60 during apoptosis', *Sci Rep*, 5: 18457.
- Atre, N., L. Thomas, R. Mistry, K. Pathak, and S. Chiplunkar. 2006. 'Role of nitric oxide in heat shock protein induced apoptosis of gammadeltaT cells', *Int J Cancer*, 119: 1368-76.
- Baak, J. P., F. R. Path, M. A. Hermsen, G. Meijer, J. Schmidt, and E. A. Janssen. 2003. 'Genomics and proteomics in cancer', *Eur J Cancer*, 39: 1199-215.
- Barazi, H. O., L. Zhou, N. S. Templeton, H. C. Kruttsch, and D. D. Roberts. 2002. 'Identification of heat shock protein 60 as a molecular mediator of alpha 3 beta 1 integrin activation', *Cancer Res*, 62: 1541-8.
- Basu, Sreyashi, Robert J. Binder, Ryuichiro Suto, Kirstin M. Anderson, and Pramod K. Srivastava. 2000. 'Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-κB pathway', *International Immunology*, 12: 1539-46.
- Bologna-Molina, R., A. Mosqueda-Taylor, E. Lopez-Corella, O. P. Almeida, D. Carrasco-Daza, F. Garcia-Vazquez, J. E. Farfan-Morales, M. E. Irigoyen-Camacho, and P. Damian-Matsumura. 2008. 'Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas', *Oral Oncol*, 44: 805-11.
- Bordier, C. 1981. 'Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution', *J Biol Chem*, 256: 1604-7.
- Borradori, L., and A. Sonnenberg. 1999. 'Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes', *J Invest Dermatol*, 112: 411-8.
- Brown, N. A., and B. L. Betz. 2015. 'Ameloblastoma: A Review of Recent Molecular Pathogenetic Discoveries', *Biomark Cancer*, 7: 19-24.

- Brown, N. A., D. Rolland, J. B. McHugh, H. C. Weigelin, L. Zhao, M. S. Lim, K. S. Elenitoba-Johnson, and B. L. Betz. 2014. 'Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma', *Clin Cancer Res*, 20: 5517-26.
- Brown, T. A., S. G. Gil, V. P. Sybert, G. G. Lestringant, G. Tadini, R. Caputo, and W. G. Carter. 1996. 'Defective integrin alpha 6 beta 4 expression in the skin of patients with junctional epidermolysis bullosa and pyloric atresia', *J Invest Dermatol*, 107: 384-91.
- Cairns, L., A. Naidu, C. M. Robinson, P. Sloan, J. M. Wright, and K. D. Hunter. 2010. 'CD56 (NCAM) expression in ameloblastomas and other odontogenic lesions', *Histopathology*, 57: 544-8.
- Calderwood, S. K., M. A. Khaleque, D. B. Sawyer, and D. R. Ciocca. 2006. 'Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis', *Trends Biochem Sci*, 31: 164-72.
- Cam, Y., M. R. Neumann, and J. V. Ruch. 1990. 'Immunolocalization of transforming growth factor beta 1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of in vitro production of transforming activity', *Arch Oral Biol*, 35: 813-22.
- Campanella, C., F. Bucchieri, A. M. Merendino, A. Fucarino, G. Burgio, D. F. Corona, G. Barbieri, S. David, F. Farina, G. Zummo, E. C. de Macario, A. J. Macario, and F. Cappello. 2012. 'The odyssey of Hsp60 from tumor cells to other destinations includes plasma membrane-associated stages and Golgi and exosomal protein-trafficking modalities', *PLoS One*, 7: e42008.
- Cappello, F., E. Conway de Macario, L. Marasà, G. Zummo, and A. J. Macario. 2008. 'Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy', *Cancer Biol Ther*, 7: 801-9.
- Cappello, F., E. Conway de Macario, F. Rappa, G. Zummo, and A. J. L. Macario. 2018. 'Immunohistochemistry of Human Hsp60 in Health and Disease: From Autoimmunity to Cancer', *Methods Mol Biol*, 1709: 293-305.
- Cappello, F., and G. Zummo. 2005. 'HSP60 expression during carcinogenesis: a molecular "proteus" of carcinogenesis?', *Cell Stress Chaperones*, 10: 263-4.
- Chaiyarit, P., A. H. Kafrawy, D. A. Miles, S. L. Zunt, M. L. Van Dis, and R. L. Gregory. 1999. 'Oral lichen planus: an immunohistochemical study of heat shock proteins (HSPs) and cytokeratins (CKs) and a unifying hypothesis of pathogenesis', *J Oral Pathol Med*, 28: 210-5.
- Chandra, D., G. Choy, and D. G. Tang. 2007. 'Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3', *J Biol Chem*, 282: 31289-301.
- Chen, W., J. Wang, C. Shao, S. Liu, Y. Yu, Q. Wang, and X. Cao. 2006. 'Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells', *Eur J Immunol*, 36: 1598-607.
- Choudhury, K. R., K. J. Yagle, P. E. Swanson, K. A. Krohn, and J. G. Rajendran. 2010. 'A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images', *J Histochem Cytochem*, 58: 95-107.
- Christofk, H. R., M. G. Vander Heiden, M. H. Harris, A. Ramanathan, R. E. Gerszten, R. Wei, M. D. Fleming, S. L. Schreiber, and L. C. Cantley. 2008. 'The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth', *Nature*, 452: 230-3.
- Ciocca, D. R., and S. K. Calderwood. 2005. 'Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications', *Cell Stress Chaperones*, 10: 86-103.
- Cooper, M. K., J. A. Porter, K. E. Young, and P. A. Beachy. 1998. 'Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling', *Science*, 280: 1603-7.

- Cress, A. E., I. Rabinovitz, W. Zhu, and R. B. Nagle. 1995. 'The alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in human prostate cancer progression', *Cancer Metastasis Rev*, 14: 219-28.
- Cuesta-Mejías, T., H. Mendoza-Ramón, J. Alcaraz-Silva, J. Evaristo-Torres, and C. Ortiz-Hidalgo. 2001. '[Biomarkers in breast cancer with high over-expression of HER2 protein]', *Ginecol Obstet Mex*, 69: 161-6.
- Cunha, E. M., A. V. Fernandes, M. A. Versiani, and A. M. Loyola. 2005. 'Unicystic ameloblastoma: a possible pitfall in periapical diagnosis', *Int Endod J*, 38: 334-40.
- Czarnecka, A. M., C. Campanella, G. Zummo, and F. Cappello. 2006. 'Mitochondrial chaperones in cancer: from molecular biology to clinical diagnostics', *Cancer Biol Ther*, 5: 714-20.
- Davis, T. L., F. Buerger, and A. E. Cress. 2002. 'Differential regulation of a novel variant of the alpha(6) integrin, alpha(6p)', *Cell Growth Differ*, 13: 107-13.
- Davis, T. L., I. Rabinovitz, B. W. Futscher, M. Schnolzer, F. Burger, Y. Liu, M. Kulesz-Martin, and A. E. Cress. 2001. 'Identification of a novel structural variant of the alpha 6 integrin', *J Biol Chem*, 276: 26099-106.
- de Souza Andrade, E. S., M. C. Miguel, R. de Almeida Freitas, L. Pereira Pinto, and L. Batista de Souza. 2008. 'Immunoexpression of integrins in ameloblastoma, adenomatoid odontogenic tumor, and human tooth germs', *Int J Surg Pathol*, 16: 277-85.
- Dennis, E. A. 1974. 'Formation and characterization of mixed micelles of the nonionic surfactant Triton X-100 with egg, dipalmitoyl, and dimyristoyl phosphatidylcholines', *Arch Biochem Biophys*, 165: 764-73.
- Devi, P., V. B. Thimmarasa, V. Mehrotra, and M. Agarwal. 2015. 'Multiple dentigerous cysts: a case report and review', *J Maxillofac Oral Surg*, 14: 47-51.
- DeVilliers, P., H. Liu, C. Suggs, D. Simmons, B. Daly, S. Zhang, E. Raubenheimer, A. Larsson, and T. Wright. 2008. 'Calretinin expression in the differential diagnosis of human ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor', *Am J Surg Pathol*, 32: 256-60.
- Dohi, T., E. Beltrami, N. R. Wall, J. Plescia, and D. C. Altieri. 2004. 'Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis', *J Clin Invest*, 114: 1117-27.
- Dunsche, A., O. Babendererde, J. Luttges, and I. N. Springer. 2003. 'Dentigerous cyst versus unicystic ameloblastoma--differential diagnosis in routine histology', *J Oral Pathol Med*, 32: 486-91.
- Dziewanowska, K., A. R. Carson, J. M. Patti, C. F. Deobald, K. W. Bayles, and G. A. Bohach. 2000. 'Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells', *Infect Immun*, 68: 6321-8.
- Feng, H., Y. Zeng, M. W. Graner, and E. Katsanis. 2002. 'Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells', *Blood*, 100: 4108-15.
- Garg, H., P. Suri, J. C. Gupta, G. P. Talwar, and S. Dubey. 2016. 'Survivin: a unique target for tumor therapy', *Cancer Cell Int*, 16: 49.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada. 2001. 'Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 793-805.
- Georges-Labouesse, E., N. Messaddeq, G. Yehia, L. Cadalbert, A. Dierich, and M. Le Meur. 1996. 'Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice', *Nat Genet*, 13: 370-3.
- Ghosh, J. C., T. Dohi, B. H. Kang, and D. C. Altieri. 2008. 'Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis', *J Biol Chem*, 283: 5188-94.
- Gomes, C. C., A. P. Duarte, M. G. Diniz, and R. S. Gomez. 2010. 'Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis', *J Oral Pathol Med*, 39: 585-91.

- Gómez-Escudero, J., C. Clemente, D. García-Weber, R. Acín-Pérez, J. Millán, J. A. Enríquez, K. Bentley, P. Carmeliet, and A. G. Arroyo. 2019. 'PKM2 regulates endothelial cell junction dynamics and angiogenesis via ATP production', *Sci Rep*, 9: 15022.
- Gonzalez-Gonzalez, L., and J. Alonso. 2018. 'Periostin: A Matricellular Protein With Multiple Functions in Cancer Development and Progression', *Front Oncol*, 8: 225.
- Grose, R., C. Hutter, W. Bloch, I. Thorey, F. M. Watt, R. Fassler, C. Brakebusch, and S. Werner. 2002. 'A crucial role of beta 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair', *Development*, 129: 2303-15.
- Gupta, R. S., and R. C. Austin. 1987. 'Mitochondrial matrix localization of a protein altered in mutants resistant to the microtubule inhibitor podophyllotoxin', *Eur J Cell Biol*, 45: 170-6.
- Gupta, Sanjiv, and A. A. Knowlton. 2007. 'HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292: H3052-H56.
- Hahn, H., L. Wojnowski, G. Miller, and A. Zimmer. 1999. 'The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models', *J Mol Med (Berl)*, 77: 459-68.
- Hamelin, C., E. Cornut, F. Poirier, S. Pons, C. Beaulieu, J. P. Charrier, H. Haïdous, E. Cotte, C. Lambert, F. Piard, Y. Ataman-Önal, and G. Choquet-Kastylevsky. 2011. 'Identification and verification of heat shock protein 60 as a potential serum marker for colorectal cancer', *Febs j*, 278: 4845-59.
- He, Xia, Suya Du, Tiantian Lei, Xiang Li, Yilong Liu, Hailian Wang, Rongsheng Tong, and Yi Wang. 2017. 'PKM2 in carcinogenesis and oncotherapy', *Oncotarget*, 8: 110656-70.
- Helenius, A., D. R. McCaslin, E. Fries, and C. Tanford. 1979. 'Properties of detergents', *Methods Enzymol*, 56: 734-49.
- Hoersch, S., and M. A. Andrade-Navarro. 2010. 'Periostin shows increased evolutionary plasticity in its alternatively spliced region', *BMC Evol Biol*, 10: 30.
- Hopkins, A. L., and C. R. Groom. 2002. 'The druggable genome', *Nat Rev Drug Discov*, 1: 727-30.
- . 2003. 'Target analysis: a priori assessment of druggability', *Ernst Schering Res Found Workshop*: 11-7.
- Horiuchi, K., N. Amizuka, S. Takeshita, H. Takamatsu, M. Katsuura, H. Ozawa, Y. Toyama, L. F. Bonewald, and A. Kudo. 1999. 'Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta', *J Bone Miner Res*, 14: 1239-49.
- Huang, Y. H., K. H. Lin, J. S. Yu, T. J. Wu, W. C. Lee, C. C. Chao, T. L. Pan, and C. T. Yeh. 2018. 'Targeting HSP60 by subcutaneous injections of jetPEI/HSP60-shRNA destabilizes cytoplasmic survivin and inhibits hepatocellular carcinoma growth', *Mol Carcinog*, 57: 1087-101.
- Huang, Y. H., and C. T. Yeh. 2019. 'Functional Compartmentalization of HSP60-Survivin Interaction between Mitochondria and Cytosol in Cancer Cells', *Cells*, 9.
- Huber, L. A., K. Pfaller, and I. Vietor. 2003. 'Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics', *Circ Res*, 92: 962-8.
- Ida-Yonemochi, H., M. S. Ahsan, and T. Saku. 2011. 'Differential expression profiles between α -dystroglycan and integrin β 1 in ameloblastoma: two possible perlecan signalling pathways for cellular growth and differentiation', *Histopathology*, 58: 234-45.
- Ida-Yonemochi, H., K. Ohshiro, W. Swelam, H. Metwaly, and T. Saku. 2005. 'Perlecan, a basement membrane-type heparan sulfate proteoglycan, in the enamel organ: its intraepithelial localization in the stellate reticulum', *J Histochem Cytochem*, 53: 763-72.

- Ida-Yonemochi, Hiroko, and Takashi Saku. 2006. 'Perlecan, a Heparan Sulfate Proteoglycan, Is a Major Constituent of the Intraepithelial Stroma Functioning in Tooth Morphogenesis', *Journal of Oral Biosciences*, 48: 233-43.
- Ikawa, S., and R. A. Weinberg. 1992. 'An interaction between p21ras and heat shock protein hsp60, a chaperonin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 2012-6.
- Ingham, P. W., and A. P. McMahon. 2001. 'Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles', *Genes Dev*, 15: 3059-87.
- Ito, T., R. Kawabe, Y. Kurasono, M. Hara, H. Kitamura, K. Fujita, and M. Kanisawa. 1998. 'Expression of heat shock proteins in squamous cell carcinoma of the tongue: an immunohistochemical study', *J Oral Pathol Med*, 27: 18-22.
- Ivaska, J., H. M. Pallari, J. Nevo, and J. E. Eriksson. 2007. 'Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling', *Exp Cell Res*, 313: 2050-62.
- Jaaskelainen, K., K. J. Jee, I. Leivo, I. Saloniemi, S. Knuutila, and K. Heikinheimo. 2002. 'Cell proliferation and chromosomal changes in human ameloblastoma', *Cancer Genet Cytogenet*, 136: 31-7.
- Jiang, J. K., M. J. Walsh, K. R. Brimacombe, D. Anastasiou, Y. Yu, W. J. Israelsen, B. S. Hong, W. Tempel, S. Dimov, H. Veith, H. Yang, C. Kung, K. E. Yen, L. Dang, F. Salituro, D. S. Auld, H. W. Park, M. G. Vander Heiden, C. J. Thomas, M. Shen, and M. B. Boxer. 2010. 'ML265: A potent PKM2 activator induces tetramerization and reduces tumor formation and size in a mouse xenograft model.' in *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program* (National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD)).
- Josic, D., and J. G. Clifton. 2007. 'Mammalian plasma membrane proteomics', *Proteomics*, 7: 3010-29.
- Kanda, S., T. Mitsuyasu, Y. Nakao, S. Kawano, Y. Goto, R. Matsubara, and S. Nakamura. 2013. 'Anti-apoptotic role of the sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma', *Int J Oncol*, 43: 695-702.
- Kirchhoff, S. R., S. Gupta, and A. A. Knowlton. 2002. 'Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury', *Circulation*, 105: 2899-904.
- Konouchi, H., J. Asaumi, Y. Yanagi, M. Hisatomi, N. Kawai, H. Matsuzaki, and K. Kishi. 2006. 'Usefulness of contrast enhanced-MRI in the diagnosis of unicystic ameloblastoma', *Oral Oncol*, 42: 481-6.
- Kramer, I. R., J. J. Pindborg, and M. Shear. 1992. 'The WHO Histological Typing of Odontogenic Tumours. A commentary on the Second Edition', *Cancer*, 70: 2988-94.
- Kumamoto, H., T. Suzuki, and K. Ooya. 2002. 'Immunohistochemical analysis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and heat shock proteins (HSPs) in ameloblastomas', *J Oral Pathol Med*, 31: 605-11.
- Kurppa, K. J., J. Caton, P. R. Morgan, A. Ristimaki, B. Ruhin, J. Kellokoski, K. Elenius, and K. Heikinheimo. 2014. 'High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma', *J Pathol*, 232: 492-8.
- Laad, A. D., M. L. Thomas, A. R. Fakih, and S. V. Chiplunkar. 1999. 'Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells', *Int J Cancer*, 80: 709-14.
- Larjava, H., L. Koivisto, L. Hakkinen, and J. Heino. 2011. 'Epithelial integrins with special reference to oral epithelia', *J Dent Res*, 90: 1367-76.
- Lehnardt, S., E. Schott, T. Trimbuch, D. Laubisch, C. Krueger, G. Wulczyn, R. Nitsch, and J. R. Weber. 2008. 'A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS', *J Neurosci*, 28: 2320-31.

- Leth-Larsen, R., R. R. Lund, and H. J. Ditzel. 2010. 'Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery', *Mol Cell Proteomics*, 9: 1369-82.
- Li, D., C. Hu, and H. Li. 2018. 'Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells', *Biomed Rep*, 8: 399-406.
- Lucas, R.B.. 1983. *Pathology of Tumours of the Oral Tissues* (New York, Churchill Livingstone).
- Lund, R., R. Leth-Larsen, O. N. Jensen, and H. J. Ditzel. 2009. 'Efficient isolation and quantitative proteomic analysis of cancer cell plasma membrane proteins for identification of metastasis-associated cell surface markers', *J Proteome Res*, 8: 3078-90.
- Masthan, K., Sriraman Rajkumari, M. Deepasree, Narayanasamy Babu, and Leena Sankari. 2011. 'Neoplasms associated with odontogenic cysts', *Journal of Dentistry and Oral hygiene*, 3: 123-30.
- Mazurek, S. 2011. 'Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells', *Int J Biochem Cell Biol*, 43: 969-80.
- Meredith, J., Jr., Y. Takada, M. Fornaro, L. R. Languino, and M. A. Schwartz. 1995. 'Inhibition of cell cycle progression by the alternatively spliced integrin beta 1C', *Science*, 269: 1570-2.
- Merle, B., and P. Garnero. 2012. 'The multiple facets of periostin in bone metabolism', *Osteoporos Int*, 23: 1199-212.
- Mita, A. C., M. M. Mita, S. T. Nawrocki, and F. J. Giles. 2008. 'Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics', *Clin Cancer Res*, 14: 5000-5.
- Mizejewski, G. J. 1999. 'Role of integrins in cancer: survey of expression patterns', *Proc Soc Exp Biol Med*, 222: 124-38.
- Modolo, F., M. T. Martins, S. V. Loducca, and V. C. de Araujo. 2004. 'Expression of integrin subunits alpha2, alpha3, alpha5, alphaV, beta1, beta3 and beta4 in different histological types of ameloblastoma compared with dental germ, dental lamina and adult lining epithelium', *Oral Dis*, 10: 277-82.
- Mosqueda-Taylor, A. 2008. 'New findings and controversies in odontogenic tumors', *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 13: E555-8.
- Narang, R. S., A. S. Manchanda, P. Arora, and K. Randhawa. 2012. 'Dentigerous cyst of inflammatory origin-a diagnostic dilemma', *Ann Diagn Pathol*, 16: 119-23.
- Nativel, Brice, Cynthia Planesse, Philippe Gasque, Christine Robert Da Silva, Olivier Meihac, and Wildriss Viranaïcken. 2019. 'Biology of Extracellular HSP60.' in Alexander A. A. Asea and Punit Kaur (eds.), *Chaperokine Activity of Heat Shock Proteins* (Springer International Publishing: Cham).
- Osterloh, A., F. Meier-Stiegen, A. Veit, B. Fleischer, A. von Bonin, and M. Breloer. 2004. 'Lipopolysaccharide-free heat shock protein 60 activates T cells', *J Biol Chem*, 279: 47906-11.
- Philipsen, H. P., P. A. Reichart, and T. Takata. 2001. 'Desmoplastic ameloblastoma (including "hybrid" lesion of ameloblastoma). Biological profile based on 100 cases from the literature and own files', *Oral Oncol*, 37: 455-60.
- Piselli, P., S. Vendetti, D. Vismara, R. Cicconi, F. Poccia, V. Colizzi, and A. Delpino. 2000. 'Different expression of CD44, ICAM-1, and HSP60 on primary tumor and metastases of a human pancreatic carcinoma growing in scid mice', *Anticancer Res*, 20: 825-31.
- Pockley, A. G., B. Fairburn, S. Mirza, L. K. Slack, K. Hopkinson, and M. Muthana. 2007. 'A non-receptor-mediated mechanism for internalization of molecular chaperones', *Methods*, 43: 238-44.
- Pockley, A. G., and G. Multhoff. 2008. 'Cell stress proteins in extracellular fluids: friend or foe?', *Novartis Found Symp*, 291: 86-95; discussion 96-100, 37-40.

- Pogrel, M. A. 1995. 'The management of lesions of the jaws with liquid nitrogen cryotherapy', *J Calif Dent Assoc*, 23: 54-7.
- Pogrel, M. A., and D. M. Montes. 2009. 'Is there a role for enucleation in the management of ameloblastoma?', *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38: 807-12.
- Punnya, A. V., and K. Rekha. 2008. "'Ameloblastoma with mucous cells": review of literature and presentation of 2 cases', *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106: e20-6.
- Rabilloud, T. 2003. 'Membrane proteins ride shotgun', *Nat Biotechnol*, 21: 508-10.
- Rajendra Santosh, A. B. 2020. 'Odontogenic Cysts', *Dent Clin North Am*, 64: 105-19.
- Regezi, J.A., J.J. Sciubba, and J.P. Gómez. 2000. *Patología bucal: correlaciones clinicopatológicas* (McGraw-Hill Interamericana).
- Reichart, P. A., H. P. Philipsen, and S. Sonner. 1995. 'Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases', *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 31b: 86-99.
- Ren, C., H. M. Amm, P. DeVilliers, Y. Wu, J. R. Deatherage, Z. Liu, and M. MacDougall. 2012. 'Targeting the sonic hedgehog pathway in keratocystic odontogenic tumor', *J Biol Chem*, 287: 27117-25.
- Robinson, L., and M. G. Martinez. 1977. 'Unicystic ameloblastoma: a prognostically distinct entity', *Cancer*, 40: 2278-85.
- Rowley, J. D. 2001. 'Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited', *Nat Rev Cancer*, 1: 245-50.
- Ruan, K., S. Bao, and G. Ouyang. 2009. 'The multifaceted role of periostin in tumorigenesis', *Cell Mol Life Sci*, 66: 2219-30.
- Rubin, M. S., and A. Tzagoloff. 1973. 'Assembly of the mitochondrial membrane system. IX. Purification, characterization, and subunit structure of yeast and beef cytochrome oxidase', *J Biol Chem*, 248: 4269-74.
- Ruiz i Altaba, A., P. Sanchez, and N. Dahmane. 2002. 'Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells', *Nat Rev Cancer*, 2: 361-72.
- Ruoslahti, E. 1992. 'The Walter Herbert Lecture. Control of cell motility and tumour invasion by extracellular matrix interactions', *Br J Cancer*, 66: 239-42.
- Russell, A. J., E. F. Fincher, L. Millman, R. Smith, V. Vela, E. A. Waterman, C. N. Dey, S. Guide, V. M. Weaver, and M. P. Marinkovich. 2003. 'Alpha 6 beta 4 integrin regulates keratinocyte chemotaxis through differential GTPase activation and antagonism of alpha 3 beta 1 integrin', *J Cell Sci*, 116: 3543-56.
- Saku, T., H. Okabe, and H. Shimokawa. 1992. 'Immunohistochemical demonstration of enamel proteins in odontogenic tumors', *J Oral Pathol Med*, 21: 113-9.
- Samali, A., J. Cai, B. Zhivotovsky, D. P. Jones, and S. Orrenius. 1999. 'Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells', *Embo j*, 18: 2040-8.
- Sandra, F., N. Nakamura, T. Mitsuyasu, Y. Shiratsuchi, and M. Ohishi. 2001. 'Two relatively distinct patterns of ameloblastoma: an anti-apoptotic proliferating site in the outer layer (periphery) and a pro-apoptotic differentiating site in the inner layer (centre)', *Histopathology*, 39: 93-8.
- Scholl, R. J., H. M. Kellett, D. P. Neumann, and A. G. Lurie. 1999. 'Cysts and cystic lesions of the mandible: clinical and radiologic-histopathologic review', *Radiographics*, 19: 1107-24.
- Seethala, R. R., and G. Stenman. 2017. 'Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumors of the Salivary Gland', *Head Neck Pathol*, 11: 55-67.
- Shafer WG, Levy BM. 1986. *Tratado de patología bucal* (Interamericana).

- Shteyer, A., J. Lustmann, and J. Lewin-Epstein. 1978. 'The mural ameloblastoma: a review of the literature', *J Oral Surg*, 36: 866-72.
- Smullin, S. E., W. Faquin, S. M. Susarla, and L. B. Kaban. 2008. 'Peripheral desmoplastic ameloblastoma: report of a case and literature review', *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 105: 37-40.
- Snead, M. L., W. Luo, D. D. Hsu, R. J. Melrose, E. C. Lau, and G. Stenman. 1992. 'Human ameloblastoma tumors express the amelogenin gene', *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 74: 64-72.
- Soltys, B. J., and R. S. Gupta. 1996. 'Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells', *Exp Cell Res*, 222: 16-27.
- Souza Andrade, E. S., M. C. da Costa Miguel, L. P. Pinto, and L. B. de Souza. 2007. 'Ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor: the role of alpha2beta1, alpha3beta1, and alpha5beta1 integrins in local invasiveness and architectural characteristics', *Ann Diagn Pathol*, 11: 199-205.
- Speight, P. M., and T. Takata. 2018. 'New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours', *Virchows Arch*, 472: 331-39.
- Springer, T. A. 1997. 'Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 65-72.
- Steinhoff, U., V. Brinkmann, U. Klemm, P. Aichele, P. Seiler, U. Brandt, P. W. Bland, I. Prinz, U. Zügel, and S. H. Kaufmann. 1999. 'Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells', *Immunity*, 11: 349-58.
- Suzuki, K., and K. Takahashi. 1999. 'Reduced substratum adhesion and decreased expressions of 1 and 4 integrins in human breast cancer cells with a property of anchorage-independent growth', *Int J Oncol*, 14: 897-904.
- Sweeney, R. T., A. C. McClary, B. R. Myers, J. Biscocho, L. Neahring, K. A. Kwei, K. Qu, X. Gong, T. Ng, C. D. Jones, S. Varma, J. I. Odegaard, T. Sugiyama, S. Koyota, B. P. Rubin, M. L. Troxell, R. J. Pelham, J. L. Zehnder, P. A. Beachy, J. R. Pollack, and R. B. West. 2014. 'Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas', *Nat Genet*, 46: 722-5.
- Takata, T., M. Miyauchi, I. Ogawa, Y. Kudo, T. Takekoshi, M. Zhao, S. Sato, H. Nikai, and K. Komiyama. 2000. 'Immunoexpression of transforming growth factor beta in desmoplastic ameloblastoma', *Virchows Arch*, 436: 319-23.
- Tamada, M., M. Suematsu, and H. Saya. 2012. 'Pyruvate kinase M2: multiple faces for conferring benefits on cancer cells', *Clin Cancer Res*, 18: 5554-61.
- Tamura, R. N., C. Rozzo, L. Starr, J. Chambers, L. F. Reichardt, H. M. Cooper, and V. Quaranta. 1990. 'Epithelial integrin alpha 6 beta 4: complete primary structure of alpha 6 and variant forms of beta 4', *J Cell Biol*, 111: 1593-604.
- Tanford, C., and J. A. Reynolds. 1976. 'Characterization of membrane proteins in detergent solutions', *Biochim Biophys Acta*, 457: 133-70.
- Thesleff, I., H. J. Barrach, J. M. Foidart, A. Vaheri, R. M. Pratt, and G. R. Martin. 1981. 'Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development', *Developmental Biology*, 81: 182-92.
- Thomas, M. L., U. C. Samant, R. K. Deshpande, and S. V. Chiplunkar. 2000. 'gammadelta T cells lyse autologous and allogenic oesophageal tumours: involvement of heat-shock proteins in the tumour cell lysis', *Cancer Immunol Immunother*, 48: 653-9.
- Thompson, L. 2006. 'World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours', *Ear Nose Throat J*, 85: 74.

- Tsujigiwa, H., H. Nagatsuka, P. P. Han, M. Gunduz, C. H. Siar, S. Oida, and N. Nagai. 2005. 'Analysis of amelogenin gene (AMGX, AMGY) expression in ameloblastoma', *Oral Oncol*, 41: 843-50.
- Vainio, S., I. Karavanova, A. Jowett, and I. Thesleff. 1993. 'Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development', *Cell*, 75: 45-58.
- Varner, J. A., and D. A. Cheresh. 1996. 'Integrins and cancer', *Curr Opin Cell Biol*, 8: 724-30.
- Vickers, R. A., and R. J. Gorlin. 1970. 'Ameloblastoma: Delineation of early histopathologic features of neoplasia', *Cancer*, 26: 699-710.
- Weckstrom, K. 1985. 'Aqueous micellar systems in membrane protein crystallization. Partial miscibility of a nonionic surfactant in the presence of salt or polyethylene glycol', *FEBS Lett*, 192: 220-4.
- 'WHO Classification of Head and Neck Tumours.' in. 2017. 4th Edition (ed.).
- Xanthoudakis, S., S. Roy, D. Rasper, T. Hennessey, Y. Aubin, R. Cassady, P. Tawa, R. Ruel, A. Rosen, and D. W. Nicholson. 1999. 'Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis', *Embo j*, 18: 2049-56.
- Xiao, Z. M., X. Y. Wang, and A. M. Wang. 2015. 'Periostin induces chemoresistance in colon cancer cells through activation of the PI3K/Akt/survivin pathway', *Biotechnol Appl Biochem*, 62: 401-6.
- Yamamoto, T., E. Ueta, K. Yoneda, and T. Osaki. 1990. 'Peripheral ameloblastoma: case report with immunohistochemical investigation', *J Oral Maxillofac Surg*, 48: 197-200.
- Yang, Rong, Zheqi Liu, Sandhya Gokavarapu, Canbang Peng, Tong Ji, and Wei Cao. 2017. 'Recurrence and cancerization of ameloblastoma: multivariate analysis of 87 recurrent craniofacial ameloblastoma to assess risk factors associated with early recurrence and secondary ameloblastic carcinoma', *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, 29: 189-95.
- Yang, W., Y. Xia, H. Ji, Y. Zheng, J. Liang, W. Huang, X. Gao, K. Aldape, and Z. Lu. 2011. 'Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation', *Nature*, 480: 118-22.
- Yavagal, C., R. T. Anegundi, and S. Shetty. 2009. 'Unicystic plexiform ameloblastoma: an insight for pediatric dentists', *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 27: 70-4.