



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Facultad de Odontología
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA



PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DEL TUMOR ODONTOGÉNICO PRIMORDIAL

DRA. VANESA PEREIRA PRADO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
OPCIÓN BIOLOGÍA ORAL**

**ESCUELA DE GRADUADOS – FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY – MAYO 2019**

A mis papás,

mi mayor orgullo, inspiración y fuerza.

Gracias a ustedes soy quien soy,

gracias a ustedes lo puedo todo, los amo...

... A mis abuelos,

por ser la luz desde arriba...

... A mi hermana,

porque la quiero y porque sí...

PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DEL TUMOR ODONTOGÉNICO PRIMORDIAL

Tesis de maestría presentada al Programa de Maestría Académica en Ciencias Odontológicas- opción Biología Oral, Facultad de Odontología, Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magister en Ciencias Odontológicas – Opción Biología Oral.

Equipo de investigación

Autora: Dra. Vanesa Pereira Prado.

Tutor: Dr. Ronell Bologna Molina

Co-tutor: Dr. Adalberto Mosqueda Taylor

Co-tutor: Dr. Toshinari Mikami

El trabajo fue realizado en el Área de Patología Molecular Estomatológica, en la Facultad de Odontología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, constando de estancias de desarrollo y análisis en la Universidad Autónoma Metropolitana, México, así como con el apoyo de la Iwate Medical University, Japón.

Contacto: Dra. Vanesa Pereira Prado

Celular: 095 18 33 18

Mail: vanesapereira91@hotmail.com

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que contribuyeron tanto directa como indirectamente a la realización de este trabajo.

Gracias a la Universidad Autónoma Metropolitana de México, especialmente al Dr. Adalberto Mosqueda por las muestras de tumor odontogénico primordial, así como a la Iwate Medical University, en especial al Dr. Toshinari Mikami; y a la Universidad de la República en Uruguay, por las muestras de germen dentario.

Gracias a Eduardo Farfán del Instituto Nacional de Pediatría, por haber estandarizado la técnica de inmunohistoquímica y por habernos impartido los cursos correspondientes.

Gracias a mi compañera Gabriela Vigil, por su ayuda y apoyo durante la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

Gracias a mis profesores por todas sus enseñanzas y consejos que me ayudaron a crecer como persona y como profesional. Gracias y mis mejores deseos a mis compañeros de maestría, con quienes recorrí este camino y compartí lindos momentos, todo esfuerzo tiene su recompensa, los admiro.

Miles de gracias al Dr. Ronell Bologna, por esta oportunidad y este nuevo camino dentro de la Odontología.

Resumen

Los tumores odontogénicos son lesiones relativamente raras y poco frecuentes, pero relevantes debido a que pueden desarrollar un comportamiento agresivo, destructivo y mutilante y que en ocasiones pueden llegar a comprometer la vida del paciente. El tumor odontogénico primordial es un descubrimiento reciente dentro de esta clasificación, caracterizado por ser un tejido fibroso celular variable con áreas similares a la papila dental, cubiertas por un epitelio cuboide- columnar que se asemeja al epitelio interno del órgano del esmalte, rodeado al menos parcialmente por una cápsula fibrosa delgada.

En este trabajo se busca estudiar la histogénesis y comportamiento tumoral del tumor odontogénico primordial a través del análisis inmunohistoquímico de los componentes epiteliales y mesenquimáticos mediante diferentes biomarcadores que han sido abordados en otros tipos de neoplasias benignas y malignas, demostrando su utilidad pronóstica, siendo en algunos casos visualizados como posibles blancos terapéuticos.

La inmunoexpresión de 24 anticuerpos diferentes fue evaluada en 7 casos de tumor odontogénico primordial, así como en 7 germenos dentarios. Las células epiteliales que rodean la periferia del tumor mostraron inmunopositividad para DSPP, citoqueratina 14 y 19, mientras que Amelogenina, Glut-1, MOC-31, Caveolina-1, Galactina-3, PITX2, p53, Bax, Bcl2, Survivin y PTEN mostraron variable expresión en áreas focales. El componente mesenquimal del tumor fue positivo para Vimentina, Syndecan-1, PITX2, CD105, CD34, Ciclina D1, Bax, Bcl2, Survivina y p53. Por su parte PTEN y CD90 mostraron moderada positividad mesenquimal. BRAF V600E y

Calretinina fueron negativos para todas las muestras. Los marcadores de proliferación celular Ki-67 y MCM-7 fueron expresados en menos del 5% de las células tumorales.

De acuerdo con estos resultados, podemos concluir que el tumor odontogénico primordial es un tumor benigno con actividad epitelio-mesenquimal desarrollado durante etapas inmaduras, o primordiales, del proceso de formación dental.

PALABRAS CLAVE: tumor odontogénico primordial, germen dental, perfil inmunohistoquímico.

Abstract

Odontogenic tumors are rare and not frequent lesions, though relevant due to their aggressive, destructive behavior and in occasions could compromise the life of the patient. Primordial odontogenic tumor is a recent discovery in this classification, characterized by being a variable cellular fibrous tissue with areas similar to dental papilla, surrounded by a cuboidal to columnar epithelium that resembles to the inner epithelium of the enamel organ, surrounded at least partially by a fibrous thin capsule.

The present study aims to comprehend the histogenesis and tumoral behavior of primordial odontogenic tumor through immunohistochemical analysis of epithelial and mesenchymal compartments using different biomarkers known in other benign and malignant neoplasms, showing their prognostic value, being considered in some cases as possible therapeutic targets.

The immunoexpression of 24 different biomarkers was evaluated in 7 cases of primordial odontogenic tumor, as well as in 7 dental germs. Epithelial cells that surround the periphery of the tumor showed immunopositivity for DSPP, cytokeratin 14 and 19, whereas amelogenin, Glut-1, MOC-31, Caveolin-1, Galectin-3, PITX2, p53, Bax, Bcl2, Survivin and PTEN showed a variable expression in focal areas. Mesenchymal component of the tumor was positive for Vimentin, Syndecan-1, PITX2, CD105, CD34, Cyclin D1, Bax, Bcl2, Survivin and p53. On the other hand, PTEN and CD90 showed moderated mesenchymal positivity and BRAF V600E and Calretinin were negative for the whole sample. Proliferation markers Ki-67 and MCM-7 were expressed in less than 5% of tumoral cells.

According to these results, we could conclude that primordial odontogenic tumor is a benign tumor with epithelial-mesenchymal activity, developed during immature or primordial stages of tooth development.

KEY WORDS: primordial odontogenic tumor, dental germ, immunohistochemical profile.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1) INTRODUCCIÓN.....	Pág.15
2) MARCO TEÓRICO.....	Pág.16
• Odontogénesis y germen dentarios.....	Pág.16
• Tumores odontogénicos.....	Pág.23
• Tumores odontogénicos benignos mixtos.....	Pág.27
• Tumor odontogénico primordial.....	Pág.27
• Conceptos generales de biomarcadores.....	Pág.32
• Biomarcadores relacionados con la Histogénesis.....	Pág.33
• Biomarcadores relacionados con el Transporte de glucosa.....	Pág.42
• Biomarcadores relacionados con la Proliferación celular.....	Pág.43
• Biomarcadores relacionados con el proceso de Angiogénesis.....	Pág.46
• Biomarcadores relacionados con la Apoptosis.....	Pág.48
• Biomarcadores de Supresión Tumoral y Factores de Transcripción.....	Pág.50
• Biomarcadores relacionados con Mutaciones previamente reportadas.....	Pág.53
3) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	Pag.55
4) JUSTIFICACIÓN.....	Pag.55

5) OBJETIVOS	Pág.56
6) METODOLOGÍA.....	Pág.57
• Diseño del estudio.....	Pág.57
• Tamaño de la muestra.....	Pág.57
• Criterios de inclusión y exclusión.....	Pág.57
• Definición y operacionalización de las variables.....	Pág.58
• Procedimientos.....	Pág.60
• Consideraciones Éticas.....	Pág.66
7) RESULTADOS.....	Pág.67
8) DISCUSIÓN.....	Pág.78
9) EXPRESIÓN COMPARATIVA INMUNOHISTOQUÍMICA DEL TUMOR ODONTOGÉNICO PRIMORDIAL Y OTROS TUMORES ODONTOGÉNICOS.....	Pág.85
10) CONCLUSIONES.....	Pág.88
11) CRONOGRAMA.....	Pág.90
12) REFERENCIAS.....	Pág.91
13) ANEXOS.....	Pág.110

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

Cuadro 1. Etapas de la odontogénesis.

Cuadro 2. Clasificación de Tumores Odontogénicos.

Cuadro 3. Distribución de los casos de tumores odontogénicos por país entre los años 1993 y 2011.

Cuadro 4. Distribución de características clínicas y radiográficas, tratamiento y seguimiento de los casos del tumor odontogénico primordial.

Cuadro 5. Resumen de biomarcadores abordados según su función.

Cuadro 6. Operacionalización de las variables independientes.

Cuadro 7. Cuantificación de las proteínas cuya inmunexpresión se presenta en el citoplasma, membrana y núcleo en el tumor odontogénico primordial.

Cuadro 8. Cuantificación de las proteínas cuya inmunexpresión se presenta en el citoplasma, membrana y núcleo en germen dental.

FIGURAS

Figura 1. Esquematización de la gradación citoplasmática-membrana.

Figura 2. Esquema de la secuencia y orden que llevará el conteo celular.

Figura 3. Tumor odontogénico primordial. (A) El epitelio muestra expresión variable de CK19, 400x. (B) Expresión epitelial constante de CK14, 200x. (C) Expresión de Amelogenina en células cúbicas y columnares, 200x. (D) Syndecan-1 se expresa intensamente en el mesénquima pero no en todo el epitelio de recubrimiento, 200x. (E) Expresión variable de PITX2 en epitelio y mesénquima, x400. (F) Expresión de Glut-1 en el epitelio odontogénico, 200x. (G) MOC-31 expresado únicamente en áreas localizadas del epitelio, 200x. (H) Algunas células epiteliales muestran positividad para Vimentina, 400x.

Figura 4. Tumor odontogénico primordial. (A) Expresión de Ki-67 en células epiteliales, 400x. (B) índice de proliferación celular significativamente alto entre las células subepiteliales de la condensación mesenquimal comparada con la encontrada en otras áreas mesenquimales tumorales, 200x. (C) Expresión de Galectina-3 en células epiteliales, 100x. (D, E, F) Expresión de Bax, Bcl2 y Survivina, 400x. (G) p53 fue encontrado en el componente mesenquimal y el epitelio circundante, 400x. (H) Expresión de Ciclina D1, 400x.

Figura 5. Tumor odontogénico primordial. (A) Fuerte positividad para CD34 en las células mesenquimales localizadas en contacto o próximas al epitelio odontogénico y en vasos sanguíneos, 200x. (B) Expresión de DSPP en el epitelio odontogénico tumoral, 200x. (C) Expresión de Caveolina-1 en el epitelio odontogénico, 400x. (D) Leve expresión de PTEN en áreas focales epiteliales, 400x.

Figura 6. Germen dentario. (A) Intensa expresión de Amelogenina en el epitelio interno del órgano del esmalte en el tercio cervical, 400x. (B) Expresión intensa de MOC-31, 400x. (C) Vimentina se observa expresada de manera intensa en el mesénquima, 100x. (D) Syndecan-1 se expresa de manera débil a moderada en zonas focales epiteliales y mesenquimáticas, 200x. (E) expresión débil-moderada de PITX2 en el epitelio odontogénico, 100x. (F) expresión focal de GLUT-1 en el epitelio odontogénico, 100x.

Figura 7. Germen dentario. (A) Expresión de Ciclina D1 en el epitelio, vasos sanguíneos y mesénquima, 100x. (B) Expresión intensa de MCM7 en el epitelio odontogénico y mesénquima subepitelial condensado, 200x. (C) Expresión focal de BAX en el epitelio interno del órgano del esmalte y de menor intensidad en el mesénquima circundante, 400x. (D) Expresión de CD34 en vasos sanguíneos, 200x.

INTRODUCCIÓN

Los tumores odontogénicos (TODs) derivan de los tejidos producto de la odontogénesis o sus remanentes, los cuales se encuentran confinados en los huesos maxilares o los tejidos blandos adyacentes. Biológicamente algunas de estas lesiones son hamartomas que muestran diversos grados de diferenciación, mientras que otros comprenden tanto neoplasias benignas como malignas que exhiben variable agresividad y potencial metastásico (1).

En el 2014 se descubre una nueva entidad tumoral perteneciente a este grupo de tumores y se propone su nombre como “Tumor odontogénico primordial“(TOP), considerando su posible desarrollo de las primeras etapas de la odontogénesis (2).

Hasta la fecha, menos de 15 casos de TOP han sido reportados en la literatura, siendo identificados como lesiones radiolúcidas bien definidas, adyacentes a la corona de un diente no erupcionado, produciendo diferentes grados de expansión ósea, resorción radicular y desplazamiento de piezas próximas (2).

El objetivo del presente estudio se centra en caracterizar a TOP tanto histopatológicamente como inmunohistoquímicamente mediante el uso de un gran panel de anticuerpos, y compararlos con su expresión en germen dentario, los cuales representan la contraparte normal del tumor.

MARCO TEÓRICO

ODONTOGÉNESIS Y GERMENES DENTARIOS

La odontogénesis es el proceso de formación de las piezas dentarias, el cual comienza en la sexta semana de gestación en el embrión humano. Las células totipotenciales que darán origen a dichas piezas dentarias derivan del ectodermo del primer arco faríngeo y del ectomesénquima de la cresta neural, y conforman el denominado germen dental (3). El germen dental formado se encuentra organizado en tres componentes principales: el órgano del esmalte, la papila dental y el saco o folículo dental.

El órgano del esmalte se encuentra compuesto por el epitelio externo e interno, el retículo estrellado y el estrato intermedio. Las células del epitelio interno dan lugar a los ameloblastos que producirán el esmalte y formarán parte del epitelio reducido del esmalte luego de la maduración. La localización donde el epitelio externo e interno del órgano del esmalte confluye se denomina cresta cervical (3). El crecimiento de la cresta cervical hacia la profundidad de los tejidos forma la vaina epitelial radicular de Hertwig, que determinará la forma radicular de cada diente.

La papila dental contiene células que se desarrollan en odontoblastos, formadores de dentina, y las células mesenquimáticas responsables de la formación de la pulpa (3). La unión entre la papila dental y el epitelio interno del órgano del esmalte determinará la forma coronaria dental (4).

El saco o folículo dental da lugar a tres líneas celulares importantes: los cementoblastos, osteoblastos y fibroblastos. Los cementoblastos son formadores del cemento dental, los osteoblastos forman el hueso alveolar que rodea las raíces dentarias,

mientras que los fibroblastos se encuentran involucrados en el desarrollo del ligamento periodontal que conecta al diente con el hueso alveolar a través del cemento (5).

El proceso de odontogénesis se sistematiza para su estudio en una serie de fases consecutivas que se denominan fase de brote, casquete, y campana (Cuadro 1) (6). Estas fases se dividen en un intento de categorizar los cambios que toman lugar en el desarrollo del diente.

El inicio del desarrollo dental está impulsado por la proliferación del epitelio bucal para formar una banda de tejido celular con una configuración en herradura, llamada lamina dental, en el mesénquima continuo donde aparecerán los maxilares y la mandíbula. En el sitio de cada futuro diente hay una proliferación adicional de células originadas en la lámina dental que producen un brote celular redondeado, uno para cada diente, que se proyecta dentro del tejido mesenquimático subyacente. Esta proliferación celular epitelial dental del mesénquima corresponde a la etapa de brote, y representa el órgano del esmalte inicial (3).

Gradualmente, esta masa celular redondeada aumenta de tamaño y adquiere una concavidad en el lado opuesto al de su origen en la lámina dental. Ahora se dice que el órgano del esmalte está en la etapa de casquete. Su crecimiento y desarrollo ulteriores lo llevan a la etapa de campana, en donde el órgano del esmalte posee cuatro capas celulares identificables:

- Epitelio externo del esmalte
- Epitelio interno del esmalte
- Estrato intermedio
- Retículo estrellado

En esta etapa se destaca la formación y diferenciación estructurada de las células. Comienza la formación de la papila dental por la producción de sustancias extracelulares por parte de células ectomesenquimáticas, formando un punto de crecimiento a partir del cual se desarrolla el germen dental. Una nueva condensación ectomesenquimática pasa a rodear el órgano del esmalte y limitar la papila dental, formando el saco o folículo dental (3).

La etapa de campana se caracteriza por los procesos de histodiferenciación y morfodiferenciación, dividiéndose en etapa temprana y avanzada de campana (3).

Los preodontoblastos que derivan de la cresta neural y están alineados próximos a las células del epitelio interno del esmalte, adoptan una configuración cilíndrica y un aspecto epitelial. Estas células pasarán a ser los odontoblastos que formarán la dentina. Las células del epitelio interno del esmalte pasarán a ser los ameloblastos y tendrán a cargo, junto con las células del estrato intermedio, la producción del esmalte. La lámina dental se degenera en las etapas iniciales justo antes de la dentinogénesis y la amelogénesis, lo cual separa el primordio del diente en desarrollo de su sitio de origen (3).

Existe una inducción recíproca entre la formación de la dentina y del esmalte; la formación de la dentina debe suceder necesariamente antes que la del esmalte. Generalmente, el esmalte se produce en dos etapas: las fases secretora y de maduración (4). Las proteínas y la matriz orgánica comienzan su mineralización en la fase secretora; la fase de maduración completa este proceso.

Durante la fase secretora, los ameloblastos producen proteínas del esmalte para fraguar su matriz, que es mineralizada parcialmente por la enzima fosfatasa alcalina,

depositándolo sobre zonas adyacentes, externas, a las cúspides. Luego este depósito continúa de dentro hacia fuera (6).

Durante la fase de maduración, los ameloblastos transportan algunas de las sustancias empleadas en la fase secretora fuera del esmalte. Dicho transporte suele consistir en proteínas requeridas para la completa mineralización del diente, como es el caso de la amelogenina, ameloblastina, esmaltina y tuftelina (6).

La formación de la dentina, conocida como dentinogénesis, es la primera característica identificable del estado de corona en el desarrollo dentario. Los distintos estados en su formación repercuten en la clasificación de los diferentes tipos de dentina: predentina, dentina primaria, dentina secundaria y dentina terciaria.

Los odontoblastos empiezan a segregar una matriz orgánica a su alrededor y en contacto con el epitelio interno del esmalte, cercano al área de la futura cúspide del diente, y migran hacia el centro del diente, formando una invaginación denominada proceso odontoblástico (3). Por ello, la dentina se forma centrípetamente. El proceso odontoblástico origina una secreción de cristales de hidroxiapatita, que mineralizan la matriz, en un área laminar denominada predentina (6). Los odontoblastos se hipertrofian y colaboran en la elaboración de una matriz extracelular rica en colágeno, que resulta crucial en la nucleación heterogénea durante el proceso de mineralización, si bien también intervienen lípidos, fosfoproteínas y fosfolípidos secretados (6).

La dentina secundaria se produce después de que surja la raíz dentaria, y finaliza a una velocidad mucho menor y de forma heterogénea a lo largo del diente (3).

La dentina terciaria, también conocida como dentina reparadora, se produce como respuesta a estímulos como las caries o el bruxismo (3).

La formación del cemento se conoce como cementogénesis, y ocurre tardíamente en el desarrollo dentario; las células responsables de este proceso se conocen como cementoblastos. Existen dos tipos de cemento: el acelular y el celular (3).

El cemento acelular aparece primero en la odontogénesis. Los cementoblastos se diferencian a partir de células foliculares, que sólo afloran en la superficie del diente cuando la cubierta epitelial de la raíz de Hertwig ha comenzado a retraerse. Los cementoblastos segregan fibrillas de colágeno a lo largo de la superficie radicular antes de migrar fuera del diente. En cuanto lo hacen, más colágeno es depositado para incrementar la robustez y longitud de las fibras colágenas. No obstante, intervienen también otro tipo de proteínas diferentes, como la sialoproteína del hueso o la osteocalcina, también secretadas (4). La mineralización de esta matriz rica en proteínas fibrilares indica el momento en el cual los cementoblastos migran abandonando el cemento, y estableciéndose en la estructura ligamentaria del periodonto.

El cemento celular se desarrolla después de que la mayoría de los procesos de odontogénesis hayan finalizado; de hecho, lo hace cuando el diente se pone en contacto oclusal (3). Este tipo de cemento se forma alrededor de los ligamentos del periodonto, y por ello, los cementoblastos que segregan la matriz componente del cemento se quedan incluidos en ella, dotándolo del componente de celularidad (3).

El periodonto, como estructura de soporte del diente, posee como componentes al cemento, ligamentos del periodonto, encía y hueso alveolar. El cemento es la única parte correspondiente al diente. El hueso alveolar rodea las raíces de los dientes proporcionándoles soporte y una oquedad que los albergue. Los ligamentos del periodonto conectan el hueso alveolar con el cemento. Y, finalmente, la encía es el tejido visible en la cavidad oral que rodea a todas las anteriores estructuras.

Luego de formadas todas las estructuras que conforman a la futura pieza dentaria en función, se produce el proceso de erupción dental, el cual corresponde al momento en que el diente sobresale de la encía y es visible. Aunque los investigadores están de acuerdo en que se trata de un proceso complejo, existe incertidumbre sobre el mecanismo inherente a su control (3).

Las interacciones epitelio mesenquimáticas son típicas de la odontogénesis. El desarrollo embrionario ectodérmico presenta estas interacciones para permitir la formación de órganos altamente especializados. Para que ocurran estas interacciones hay un sistema de mensajeros entre el epitelio y el mesénquima, marcando la importancia de la señalización celular (7). Durante la etapa de brote el mesénquima odontogénico adquiere la habilidad de inducir al epitelio a sintetizar proteínas del esmalte. Por tanto, estas interacciones constituyen el mecanismo único que regula el desarrollo del órgano dental (8). Diversos experimentos determinan que el epitelio y el tejido mesenquimal de un diente en desarrollo, al estudiarse por separado como unidades aisladas, en la etapa de brote, casquete y campana, proliferan sin formar estructuras dentales reconocibles (9-11).

CUADRO 1. Etapas de la odontogénesis (3).

ETAPA	INICIO	CARACTERÍSTICAS
BROTE	5-6° semana de vida intrauterina	Proliferación del epitelio bucal originando el órgano del esmalte, diferenciación de células mesenquimáticas formando la papila dental.
CASQUETE	10° semana de vida intrauterina	Diferenciación de células ubicadas a nivel de la concavidad del casquete a ameloblastos, formación del epitelio interno del esmalte. La papila dental empuja al epitelio interno y se invagina.
CAMPANA	12° semana de vida intrauterina	Desaparición parcial de la conexión con el epitelio bucal. Diferenciación de capas del órgano del esmalte. Mayor invaginación del epitelio interno.

TUMORES ODONTOGÉNICOS

Los TODs son lesiones que se encuentran exclusivamente a nivel de los huesos maxilares y mucosa bucal que los reviste, derivando de células epiteliales, mesenquimales y/o ectomesenquimales que son o fueron parte del proceso de odontogénesis (12).

Los TODs constituyen un grupo de enfermedades de particular interés cuyo comportamiento biológico va desde tipo hamartomatoso o proliferaciones de tejido no neoplásicas, hasta neoplasias benignas y malignas con potencial metastásico. Su etiología es desconocida, ya que la mayoría suele aparecer de forma esporádica y sin causa aparente (13).

CLASIFICACIÓN

En el 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) modificó la clasificación de los TODs, la cual está basada principalmente en su comportamiento, dividiéndolos así en malignos (carcinomas y sarcomas), benignos y no neoplásicos, agregando a su vez las subdivisiones de tumores óseos y cartilagosos, quistes, lesiones fibro óseas y óseo condromatosas, y desórdenes hematolinfoideos (1). Además, los tumores benignos se subdividen dependiendo del tipo de tejido odontogénico involucrado en: tumores compuestos por epitelio odontogénico con estroma fibroso y maduro sin ectomesénquima odontogénico, tumores mixtos epiteliales y mesenquimáticos y tumores derivados del mesénquima o ectomesénquima (Cuadro 2). La clasificación histológica incluye más de 30 entidades; sin embargo, algunas de estas lesiones son extremadamente raras (14).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La mayoría de los TODs se presentan de forma intraósea en el esqueleto maxilofacial, mientras que los tumores extraóseos aparecen en la encía o en la mucosa alveolar. Las características clínicas de los TODs suelen ser inespecíficas: los tumores benignos muestran un crecimiento expansivo lento y casi siempre asintomático; en contraste, el dolor es el primer y más común síntoma en los tumores malignos, seguido por un rápido aumento de volumen (15).

Otras características como la localización, género y la edad (sobre todo en pacientes jóvenes, ya que los tumores odontogénicos contienen tejidos similares a los presentes en el germen dentario), pueden ser muy valiosas al momento en el que se ha establecido el diagnóstico diferencial. Sin embargo, es importante destacar que, debido a la similitud entre algunos de estos tumores, en la mayoría de las ocasiones el diagnóstico definitivo se determina mediante el estudio histopatológico de la lesión (15).

Cuadro 2. Clasificación de Tumores odontogénicos (1).

Tumores Malignos	Carcinoma	Ameloblástico Primario intraóseo Odontogénico esclerosante Odontogénico de células claras Odontogénico de células fantasma
	Sarcoma Odontogénico	
	Carcinosarcoma Odontogénico	
Tumores Benignos	Derivado del epitelio odontogénico con estroma fibroso maduro sin ectomesénquima odontogénico	Ameloblastoma Ameloblastoma uniuquístico Ameloblastoma extraóseo periférico Ameloblastoma metastásico

		Tumor odontogénico escamoso Tumor odontogénico epitelial calcificante Tumor odontogénico adenomatoide
	Mixtos epiteliales mesenquimáticos	Fibroma ameloblástico Tumor odontogénico primordial Odontoma compuesto Odontoma complejo Tumor dentinogénico de células fantasma
	Mesenquimáticos	Fibroma odontogénico Mixoma odontogénico Cementoblastoma Fibroma cemento osificante

EPIDEMIOLOGÍA

Los TODs representan hasta el 1 % del total de las lesiones orales, y su incidencia es menor al 0.5 de casos por cada 100,000 habitantes (1).

Existen datos de países como Brasil, Canadá, Chile, China, Estados Unidos, Estonia, Japón, México y Nigeria que muestran diferencias marcadas en la frecuencia de los tumores odontogénicos benignos, sin embargo, se ha encontrado que los tres más comunes son: el odontoma, el ameloblastoma y el mixoma odontogénico (Cuadro 3.) (16).

Cuadro 3. Distribución de los casos de tumores odontogénicos por país entre los años 1993 y 2011 (17).

País/Autores	Ameloblastomas (%)	Mixoma odontogénico (%)	Tumor odontogénico adenomatoide (%)	Fibroma ameloblástico (%)
CANADÁ <i>Daley et.al</i>	79 (13.5)	24 (5.4)	14 (3.1)	7 (1.6)
MÉXICO <i>Mosqueda-Taylor et al</i>	83 (23.7)	62 (17.7)	25 (7.1)	5 (1.4)
CHINA <i>Lu et al</i>	445 (58.6)	64 (8.4)	63 (8.3)	14 (1.8)
CHILE <i>Ochsenius et al.</i>	74 (20.4)	32 (8.8)	24 (6.6)	2 (0.6)
ESTONIA <i>Tamme et al.</i>	19 (25.3)	9 (12)	1 (1.3)	12 (16)
NIGERIA <i>Ladeine et al.</i>	201 (63)	21 (6.5)	24 (7.5)	6 (2)
TANZANIA <i>Simon et al.</i>	93 (80.1)	8 (7)	1 (0.9)	2 (1.7)
BRASIL <i>Fernandes et al.</i>	154 (45.2)	31 (9.1)	13 (3.8)	6 (1.76)
TURQUÍA <i>Olgac et al.</i>	133 (25.2)	83 (15.7)	11 (2)	8 (1.5)
INDIA <i>Sriram et al.</i>	154 (61.6)	15 (6.0)	31 (12.4)	2 (0.8)
USA <i>Buchner et al.</i>	127 (11.7)	24 (2.2)	19 (1.7)	17 (1.6)

TUMORES ODONTOGÉNICOS BENIGNOS MIXTOS

Los tumores odontogénicos benignos mixtos son aquellos que se encuentran originados por un componente mesenquimático y epitelial, donde el mesénquima se asemeja a la papila dental mientras que el epitelio se asemeja al epitelio odontogénico del órgano del esmalte. Dentro de esta clasificación encontramos al fibroma ameloblástico, al odontoma compuesto y complejo, al tumor dentinogénico de células fantasma y al tumor odontogénico primordial. Algunos de estos tumores presentan a su vez en su componente tejidos duros mineralizados. Por lo general la mayoría de estos tumores, de frecuencia variable, se presentan a edades tempranas, a excepción del tumor dentinogénico de células fantasma que tiene una media de 40 años, y con preferencia en el sector posterior mandibular, a excepción del odontoma compuesto que presenta predilección por el sector anterior maxilar (1).

TUMOR ODONTOGÉNICO PRIMORDIAL

El tumor odontogénico primordial es una neoplasia benigna mixta, la evidencia de su origen odontogénico es avalada por su exclusiva localización en la zona de erupción dentaria y su asociación con la ausencia clínica o falta de erupción de algún diente, así como la presencia de tejido odontogénico (1).

Mosqueda Taylor y cols. fueron los primeros en describir esta lesión tumoral en 2014 (2), y a la fecha existen reportados menos de 15 casos en todo el mundo (Cuadro 4.) (2, 18-24). La edad de estos pacientes va de un rango entre 3-19 años, con una media de 11.2, siendo más prevalente en el sexo masculino con una relación masculino-femenino 9:5.

Cuadro 4. Distribución de características clínicas y radiográficas, tratamiento y seguimiento de los casos de TOP (2, 18-24).

Año y Autor	Edad	Género	Localización	Hallazgos RX	Tratamiento	Seguimiento
Mosqueda Taylor A et al. 2014	16	M	Sector posterior mandibular izquierdo, del 1er molar al ángulo mandibular	RL, UL, 55X50mm, 3er molar	Enucleación junto con 3er molar	Pérdida del seguimiento
Mosqueda Taylor A et al. 2014	18	M	Sector posterior mandibular izquierdo, del 1er molar al ángulo mandibular	RL, UL, 45X40mm, 3er molar	Enucleación junto con 3er molar	20 años
Mosqueda Taylor A et al. 2014	16	M	Sector posterior mandibular izquierdo, del 1er molar al ángulo mandibular	RL, UL 65X50mm, 3er molar	Enucleación junto con 3er molar	10 años
Carlos R, 2014	3	F	Sector posterior mandibular izquierdo, del 1er molar temporario a la rama ascendente	RL, BL, 90X70mm, 2do temporario y 1er molar permanente	Enucleación junto con 1er y 2do molar temporario	9 años
Pirez FR, 2014	13	F	Sector posterior mandibular izquierdo, del segundo premolar al tercio superior de la rama ascendente	RL, BL, 80X50mm, 3er molar	Enucleación junto con 3er molar, 1er y 2do molar	3 años

Mosqueda Taylor A et al. 2014	3	F	Sector posterior maxilar izquierdo, del 1er molar temporario al piso del seno maxilar y la tuberosidad	RL, UL, 35X30mm, 2do molar temporario y 1er molar permanente	Enucleación junto con 2do molar temporario y 1er molar permanente	6 meses
Slater LJ et al. 2016	8	F	Sector posterior maxilar izquierdo, del 1er molar temporario	RL, UL,	Enucleación junto con 1er molar temporario	16 meses
Ando T et al. 2017	19	M	Sector posterior mandibular izquierdo, del 1er molar al ángulo mandibular	RL, UL, 3er molar	Enucleación junto con 3er y 2do molar	Sin datos de seguimiento
Toshinari M et al. 2017	5	M	Sector posterior mandibular derecho, del canino deciduo al 2do molar temporario	RL, 2do molar temporario	Enucleación junto con 2do molar temporario	7 meses
Amer H et al. 2018	2	M	Sector posterior mandibular	RL, BL, molar temporario	Enucleación	2 años
Pardhe N et al. 2018	17	M	Sector posterior mandibular izquierdo, del primer premolar al primer molar permanente	RL, BL, tercer molar	Enucleación y extracción del tercer molar	6 meses
Almazyad A et al. 2018	15	F	Sector posterior mandibular derecho	RL, BL, tercer molar	Enucleación y extracción del tercer molar	3 meses

Almazyad A et al. 2018	18	M	Sector posterior mandibular derecho	RL, UL, tercer molar	Enucleación y extracción del tercer molar	20 meses
Bomfim B et al. 2018	4	M	Sector posterior mandibular izquierdo	Relaciona al segundo molar deciduo	Enucleación	Sin datos

RL radiolúcida, UL unilocular, BL bilocular.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS RADIOGRÁFICAS

Clínicamente, las lesiones hasta el momento descritas se presentaron de forma intraósea con un leve cambio de coloración y abultamiento a nivel mucoso, con una marcada preferencia a nivel mandibular, con una proporción de incidencia mandibular-maxilar de 12:2 (2).

Radiográficamente se observa como una lesión radiolúcida bien definida adyacente a la corona de un diente no erupcionado (más comúnmente el tercer molar inferior), produciendo una aparente relación pericoronal con la pieza. Se presenta asintomática, pero puede causar diferentes grados de expansión ósea, reabsorción radicular de piezas adyacentes y migración dental. A su vez, se ha relacionado con molestias al tragar en casos de ubicarse en el sector posterior mandibular invadiendo parte de la oro faringe (2).

Al realizar la enucleación tumoral, macroscópicamente se presentan como un tumor sólido blanquizco más frecuentemente multilobulado y sin espacios quísticos, que tiende a ser encapsulado o al menos bien definido respecto a las estructuras que lo rodean (2). Se ha encontrado que, en la mitad de los casos reportados, la corona del diente en relación se encontraba embebida en el tumor, siendo fácilmente desprendida en el resto de los casos, sin formación de estructura quística (2).

CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Microscópicamente se encuentra formado por un tejido fibroso variablemente celular, con fibroblastos fusiformes y estelares con poca producción de colágeno. Se observan áreas similares a la papila dental del germen dentario, cubiertas por un epitelio cuboide- columnar que se asemeja al epitelio interno del órgano del esmalte, rodeado al menos parcialmente por una cápsula fibrosa delgada. El hecho de que el epitelio se encuentre localizado periféricamente recuerda a la relación entre el epitelio interno del esmalte inmaduro y la papila dental primitiva, sin observar efectos inductivos ectomesenquimáticos, similar a las primeras etapas del desarrollo dental, mostrando falta de habilidad de seguir una evolución inductiva normal para producir las etapas subsiguientes de histo y morfo diferenciación de los tejidos dentales (2). Hasta el momento no hay evidencia de una diferenciación odontoblástica ni de producción de dentina-esmalte u otro tejido duro (2).

Varios autores han sugerido que las filas epiteliales cuboidales y escamosas desde las capas del medio al epitelio externo corresponden al epitelio externo del órgano del esmalte y el estrato intermedio, sugiriendo la heterogeneidad del grado de diferenciación en las capas epiteliales (18-20).

Se ha realizado el estudio inmunohistoquímico de estas lesiones contra Vimentina, Alfa-SMA, Desmina, S100, CD34, Ki-67, CK5, CK14 y CK19. Las células mesenquimales se presentaron positivas para Vimentina, pero negativas para Alpha-SMA, Desmina, S100 y CD34. El índice de proliferación celular, estudiado por la expresión de Ki-67 demostró ser >2%. Por su parte, el componente epitelial se observó positivo para CK5 y CK14, siendo de expresión variable a nivel de las células columnares para CK19 (2). De todas formas, estos hallazgos distan de ser suficientes

para determinar el comportamiento tumoral de estas lesiones, requiriendo así de mayores estudios con una gama más amplia de biomarcadores.

DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO

Ya fue mencionado anteriormente que diversos tumores odontogénicos pueden compartir características clínicas y radiográficas, por lo que en un gran número de casos el diagnóstico definitivo se establece mediante un estudio histopatológico; TOP no es la excepción. Los tumores son tratados mediante enucleación total y extracción de la/s pieza/s dentaria/s en relación al tumor sin recurrencias reportadas luego de un seguimiento de 6 meses a 20 años (2).

CONCEPTOS GENERALES DE BIOMARCADORES

Los cambios moleculares y genéticos asociados con el desarrollo y progresión de los TODs incluyen el estudio de oncogenes, genes de supresión tumoral, oncovirus, factores de crecimiento, telomerasas, factores controladores del ciclo celular, factores relacionados con la apoptosis, moléculas de adhesión celular, proteínas de matriz, factores angiogénicos y citoquinas, entre otros (25).

Las denominadas biomoléculas son todas las moléculas de naturaleza orgánica con diferentes grados de complejidad, estructura y distribución. Sin embargo, no todas las biomoléculas son utilizadas como biomarcadores moleculares. Un biomarcador molecular es una biomolécula que ha sido estudiada y caracterizada con el potencial de permitir la identificación de un fenómeno particular a nivel de espacio y tiempo en un organismo (25). Estos biomarcadores pueden clasificarse según su aplicación, determinado por el National Health Institute USA 2001 en: biomarcadores diagnóstico, pronóstico, predictivos, y de investigación. A su vez, según su función a nivel tisular pueden diferenciarse en proteínas que forman parte de los procesos de histogénesis,

transporte de glucosa, proliferación celular, angiogénesis, apoptosis, supresión tumoral, así como también integrar un grupo de marcadores ya conocidos por representar mutaciones reportadas en un amplio rango de tumores (26).

Es por esto que el conocimiento de los mecanismos moleculares relacionados al desarrollo tumoral contribuye al entendimiento de la evolución de los TO, y pueden guiarnos al desarrollo de nuevos conceptos en su manejo terapéutico y pronóstico (27).

BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA HISTOGÉNESIS

CITOQUERATINAS 14 Y 19

Las citoqueratinas comprenden un grupo de 20 polipéptidos, las cuales se dividen en ácidas (grupo 1) y básicas (grupo 2). Componen el citoesqueleto de las células epiteliales, por lo que son utilizadas como marcadores de las mismas durante la diferenciación celular. La citoqueratina 19 (CK19) se encuentra presente en los filamentos intermedios del citoesqueleto. La inmunotinción de CK19 resulta positiva en epitelios simples, sin embargo, también resulta positiva en células basales del epitelio escamoso estratificado gingival, la lámina dental del epitelio odontogénico, el órgano del esmalte y los restos epiteliales de Malassez; es por ello que se sugiere el uso de CK19 para identificar tanto al epitelio odontogénico, como a las células basales (28, 29).

Los patrones de inmunoexpresión de las citoqueratinas durante la odontogénesis varían con respecto a células específicas, así como a las diferentes etapas de desarrollo y diferenciación epitelial. La citoqueratina 14 (CK14) es una de las cuales se presenta de manera constante en todas las etapas del desarrollo dental y en la mayoría de las células epiteliales neoplásicas de los tumores odontogénicos. En contraste, la CK19 aumenta su

expresión una vez que las células del epitelio interno del órgano del esmalte se diferencian en ameloblastos potenciales (30).

AMELOGENINA

La proteína amelogenina se encuentra presente en la matriz del esmalte inmaduro sintetizada por ameloblastos jóvenes, siendo degradada por completo por enzimas extracelulares durante la maduración del esmalte (90%) (31). Conjuntamente con las citoqueratinas pueden utilizarse no sólo para el diagnóstico tumoral, sino que también para determinar el grado de maduración y diferenciación del mismo.

Amelogenina es una proteína hidrofóbica de 20-kDa, que determina el largo y grosor de los cristales de apatita que formarán el tejido dentario. Recientemente se ha descubierto su aplicación en enfermedad periodontal, permitiendo la regeneración tisular, además de su posible potencial osteogénico. Datos que avalan el uso de marcadores inmunohistoquímicos para las células mesenquimáticas sugieren que amelogenina tiene la capacidad de inducir el reclutamiento de las células madre directa o indirectamente durante la regeneración del tejido periodontal (32). Se ha determinado a su vez el potencial de amelogenina para modificar la expresión de citoqueratinas, cambiando de un microambiente pro inflamatorio a uno anti inflamatorio (33).

En el campo de la patología tumoral odontogénica, Kumamoto et al. (1980) examinaron la expresión de amelogenina mediante la técnica de inmunohistoquímica en varios tumores odontogénicos benignos y malignos, siendo hoy en día reconocida por su potencial en la identificación del componente epitelial odontogénico (34, 35).

SIALOFOSFOPROTEÍNA DENTINARIA

La sialofosfoproteína dentinaria (DSPP) es un precursor proteico no colagenoso que se encuentra dividido en tres formas maduras: la sialoproteína dentinaria (DSP), la glicoproteína dentinaria (DGP) y la fosfoproteína dentinaria (DPP), por el clivaje mediante las metaloproteinasas de la matriz 2 y 20. DSPP es una glicoproteína producida por osteoblastos, miembro de la familia de proteínas que unen integrinas (SIBILING = Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins) al igual que la sialoproteína ósea, la proteína de la matriz dentinaria, la osteopontina, y la fosfoglicoproteína de la matriz extracelular. Tanto DSP como DPP son en un principio proteínas de la matriz extracelular de la dentina del diente en desarrollo, en donde DSP forma parte del proceso de dentinogénesis y DPP de la unión al calcio para facilitar la mineralización inicial de la matriz colágena dentinaria (36).

La unión de esta proteína activa con la integrina $\beta 6$ promueve la migración, diferenciación y mineralización de las células mesenquimales. A su vez, puede estimular la fosforilación de ERK1/2 y la quinasa p38 (37).

Mutaciones a nivel de DSPP se relacionan con la dentinogénesis imperfecta, una enfermedad progresiva caracterizada por piezas dentales debilitadas de color parduzco poco resistentes a la fractura (36).

A su vez, se ha encontrado esta proteína a nivel de glándulas salivales y en cáncer de próstata, indicando que su expresión no se encuentra restringida a tejidos mineralizados o en proceso de mineralización (38, 39). En estos tejidos se cree tiene un rol de regular de manera directa o indirecta un gran número de factores de transcripción, moléculas de la matriz, y los niveles de fosfato del suero (40).

PITX2

PITX2 es una proteína expresada selectivamente en las etapas tempranas de la morfogénesis, en el desarrollo dentario, en el ectodermo oral y en el epitelio bucal, con un rol importante a su vez para el desarrollo de tejidos que formarán los ojos, el corazón, el cerebro, entre otros (41). Las células mesenquimáticas envían señales para mantener los niveles de expresión de PITX2 en el epitelio a lo largo de la odontogénesis, mediante las interacciones epitelio-mesénquima, gracias a la activación de la vía de señalización de Wnt/beta catenina, de la cual PITX2 es tanto producto como regulador (42).

Esta proteína es un factor de transcripción inicialmente identificado como responsable del síndrome humano de Rieger, una condición autosómica dominante que causa el desarrollo de anomalías a nivel de procesos dentarios, debido a la señalización celular y determinación de fases, en donde la migración y expansión celular a nivel del ectodermo en desarrollo falla en su progreso para pasar la etapa de brote (43, 44). Se ha observado hipoplasia del esmalte, así como anodoncia en casos de falla de producción de esta proteína (45).

Diversos estudios han asociado los niveles de expresión de PITX2 con la agresividad tumoral, recurrencia y metástasis, estudiándolo en casos de carcinoma ameloblástico, ameloblastoma uniuquístico y ameloblastoma multiquístico, cáncer colorrectal, de tiroides y de glándula pituitaria (46-48). Estos estudios lo asocian con la activación de oncogenes por parte de PITX2, desencadenando una cascada de activación cuesta abajo promoviendo la formación de patrones carcinogénicos.

GALECTINA-3

Galectina-3 es una lectina miembro de la familia de unión de lectinas beta galactosa involucrada en diversos eventos biológicos incluyendo la embriogénesis, adhesión celular, proliferación, apoptosis y regulación del sistema inmune, entre otros (49). Bajo mecanismos aún no esclarecidos, esta lectina puede ser secretada extracelularmente, interactuando con una variedad de glicoproteínas de superficie celular como son receptores de factores de crecimiento, integrinas y cadherinas (50).

Los cambios a nivel de la expresión de galectina-3 son comúnmente observados en condiciones de cáncer, relacionados con la regulación de la expresión genética cuando su localización es nuclear, afectando a la expresión de ciclina D1. Nakahara et al. sugirieron que su sobreexpresión intracelular favorece la transformación neoplásica, la progresión del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis (51). A su vez, induce la migración de células tumorales, endoteliales y leucocitos, favoreciendo desde la salida de las células tumorales de un microambiente estresante para su adaptación y supervivencia o la entrada de las células endoteliales y leucocitos al microambiente tumoral (52).

Se ha estudiado a nivel de cáncer de páncreas, gástrico, colon, hígado, lengua y tiroides, observando una expresión incrementada, relacionado con la progresión neoplásica y potencial metastásico (53-58). Sin embargo, hay reportes contradictorios en cáncer de mama, próstata y endometrio, en donde se observa que la expresión de galectina-3 se encuentra reducida (59-62).

MOC-31

MOC-31, también conocido como Ep-CAM (antígeno epitelial específico) es una glicoproteína de expresión epitelial tanto a nivel de tejidos normales como tumorales, considerado una molécula de adhesión celular que permite la formación de uniones estrechas entre las células epiteliales. Se encuentra localizada a nivel de la membrana celular y el citoplasma en todas las células epiteliales, con excepción de la mayoría de los epitelios escamosos, hepatocitos, tejido renal próximo a células tubulares, células parietales gástricas y células mioepiteliales (63).

Ha sido ampliamente utilizado dentro de un panel de anticuerpos para el diagnóstico diferencial de adenocarcinomas y mesoteliomas, así como tumores de origen desconocido. Es un marcador negativo para mesoteliomas y su expresión negativa ha demostrado excluir el adenocarcinoma de pulmón (63).

A su vez, es utilizado para estudiar el comportamiento tumoral donde en cierto tipo de tumores se ha observado que puede afectar de manera negativa la formación del complejo cadherina-catenina, afectando a su vez la señalización epitelial y diferenciación celular (63). Su expresión reducida se correlaciona con pobre supervivencia en tejidos cancerosos, así como con la activación de procesos de invasión y proliferación tumoral (64, 65). Algunos estudios determinan que es útil para demostrar la diferenciación de células epiteliales en casos donde las anti-citoqueratinas no son claramente positivas o en casos donde un falso positivo para las citoqueratinas no puede ser excluido, como ser en células sub mesoteliales (64).

VIMENTINA

Vimentina es una proteína que compone los filamentos intermedios tipo III a nivel de las células mesenquimales, conformando el citoesqueleto, desempeñando un rol significativo al anclar la posición de las organelas al citosol (66). Cumple un rol como regulador del transporte vesicular de las integrinas hacia la membrana celular, así como también de promover la formación, maduración y fuerza adhesiva de las adhesiones focales (66). Es utilizada como un marcador de células que derivan del mesénquima o que se encuentran bajo una transición epitelio-mesenquimal, caracterizada por la sobreexpresión de marcadores mesenquimales, y la baja expresión de proteínas de adhesión estructural (67).

Durante el desarrollo embrionario normal, la expresión de Vimentina se encuentra aumentada, mientras en el adulto pasa a ser limitada al tejido conjuntivo, células mesenquimales y musculares (66). A nivel de patología tumoral, esencialmente se asocia con un fenotipo metastásico y un pobre pronóstico del desarrollo de la enfermedad, al encontrarse principalmente sobre-regulada en el estroma celular y menos regulada en las células epiteliales cancerígenas (68). Al participar como activador de la cascada de señalización de MAPK (proteín quinasa activada por mitógenos), varios autores sugieren que su desregulación puede conllevar a vías de la carcinogénesis, promoviendo la migración y proliferación celular (69, 70).

SYNDECAN-1

Syndecan-1, también conocido como CD138, es un miembro de la familia de proteoglicanos transmembrana heparán sulfato, involucrado en los procesos de adhesión celular. Se expresa en células endoteliales, fibroblastos y células inflamatorias, sin embargo, su máxima expresión se da en células epiteliales (incluyendo epitelio

odontogénico) (71). La familia de syndecans en mamíferos comprende 4 miembros, cada uno codificado por distintos genes: syndecan-1, syndecan-2, syndecan-3 y syndecan-4. Syndecan-1 se expresa predominantemente en la superficie basolateral de células epiteliales, uniendo los componentes de la matriz extracelular (distintos tipos de colágeno, fibronectina, trombospondina, tenascina) y asociándolos con el citoesqueleto de actina. Es esencial para el mantenimiento de la morfología del epitelio y la organización del citoesqueleto, así como para la relación entre la célula y la matriz extracelular (71). Esta proteína interactúa con los componentes de la matriz extracelular y participa en la promoción de la proliferación celular, regulando el crecimiento celular al interactuar con proteínas de la familia de los factores de crecimiento asociados a heparina. Por tanto, esta proteína juega un rol en la maduración epitelial, en donde el grado de diferenciación epitelial se asocia directamente con la expresión de syndecan-1 (72).

Syndecan-1 ha sido estudiada a nivel de germines dentarios por Vaino et al, quienes reportaron su intensa expresión mesenquimal pero no epitelial, en células proliferantes durante el proceso de odontogénesis, sugiriendo su interacción con los factores de crecimiento (73). Además, la acumulación de ARN de syndecan-1 en el mesénquima se mostró más intensa en el avance de la morfogénesis hacia la fase de casquete, perdiendo su expresión en la fase de campana (74).

CD90

CD90 es una glicoproteína de membrana y citoplasma asociada al glicosilfosfatidil inositol, la cual es expresada en una gran cantidad de células diferentes como fibroblastos, neuronas, células circulatorias y células endoteliales de la microvasculatura, así como también ha sido establecido como un marcador de un

amplio rango de células madre (75-77). Es considerado un regulador vital de las interacciones entre célula-célula y célula-matriz extracelular, participando en procesos de migración celular y fibrosis.

Su expresión en el estroma tumoral se relaciona con la progresión de la enfermedad y se ha estudiado en varios tumores malignos dentro de los cuales encontramos al carcinoma hepatocelular (78), cáncer de esófago (79), glioma (80) y adenocarcinoma pancreático (81). A su vez, a nivel tumoral se ha sugerido su posible rol dentro de los procesos de crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, migración y angiogénesis, no observándose funciones, principalmente angiogénicas, en estados embrionarios (82,83).

CALRETININA

Calretinina es una proteína ligada al calcio, la cual forma parte de la familia de proteínas de mano EF. Esta proteína se encuentra expresada ampliamente en tejidos neurales tanto del sistema nervioso central como del sistema nervioso periférico (84). Se ha postulado su posible función en procesos de apoptosis y reguladores de calcio, participando a su vez en la proliferación celular, diferenciación y transformación neoplásica (84).

Varios estudios demuestran el valor de calretinina en la diferenciación de células mesoteliales (85).

Estudios realizados a nivel de cáncer de mama determinan que la expresión de calretinina es encontrada en una gran variedad de casos pobremente diferenciados, así como en aquellos de origen mesenquimal, demostrando que esta proteína se encuentra intensamente expresada cuando el tumor mamario es de alto grado e invasivo. Por lo tanto, puede sugerirse que la alta expresión de calretinina se podría asociar con un

pronóstico adverso, por lo que se sugiere puede ser utilizado como un marcador pronóstico (86).

Un estudio realizado por Altini et al. determinó que tanto los ameloblastomas unicuísticos como sólidos multiquísticos mostraron una expresión de calretinina casi exclusiva de las células del retículo estrellado, y considerando positivas las células epiteliales que carecían de características ameloblásticas (87). Esto permite suponer que a mayor diferenciación epitelial menor expresión de calretinina, pudiendo considerar este marcador como de diagnóstico diferencial entre quistes odontogénicos y tumores ameloblásticos (87).

BIOMARCADORES RELACIONADOS CON EL TRANSPORTE DE GLUCOSA

GLUT-1

La glicoproteína glut-1 (glucosa transporter one) forma parte de la familia de transportadores de glucosa relacionada con la hipoxia, que actúan a través de la membrana plasmática, facilitando el pasaje de glucosa de la circulación a los tejidos y viceversa (88).

Como es sabido, las células tumorales realizan procesos metabólicos que aumentan los niveles de glucosa e inhiben la fosforilación oxidativa. El aumento de la glicólisis es una de las características de las células cancerígenas que les permite compensar la extracción insuficiente de glucosa para así continuar su crecimiento y proliferación incontrolada (88). La sobreexpresión de glut-1, ha sido observada en diferentes carcinomas, en donde se correlaciona con la agresividad tumoral, sugiriendo su valor

como marcador pronóstico, así como también la presencia de glut-1 en la periferia tumoral demuestra la función de un proceso invasivo (87, 89).

Sin embargo, varios estudios en melanoma cutáneo determinan que hay una baja expresión de glut-1 a nivel de células tumorales en comparación con la piel normal (90, 91), y lo mismo sucede en el adenocarcinoma colorrectal, en donde glut-1 tiene una correlación inversa con la proliferación celular (92). Estudios a nivel de carcinoma de células escamosas demuestran que la expresión de glut-1 es mayor en aquellos pobremente diferenciados, mientras que los que se encuentran bien diferenciados muestran ausencia de expresión de la proteína (91).

BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Estudios recientes sobre la biología de los tumores han sugerido múltiples mecanismos básicos que pueden ser usados por las células neoplásicas para tener una ventaja de crecimiento sobre el tejido normal. Las células neoplásicas pueden mostrar un aumento en la división celular o una disminución de los mecanismos apoptóticos, así como utilizar enzimas capaces de degradar la matriz extracelular y de este modo lograr infiltrarse en el tejido subyacente, y así proliferar (93).

Ki-67

Ki-67 es una proteína nuclear no histónica relacionada con la proliferación celular y la mitosis, la cual se expresa en las células durante las fases activas de su ciclo (G1, S, G2, M) y que está ausente en aquellas en estado de reposo (G0), así como en la fase temprana de G1 y en los procesos de reparación del ADN (94). Debido a su ausencia en células quiescentes (fase G0), esta proteína se convirtió en un marcador de proliferación

tumoral ampliamente utilizado en los campos de la investigación y de la patología, siendo una proteína más sensible comparada con otros marcadores de proliferación celular (94). Se ha demostrado que la distribución topográfica de Ki-67 es dependiente del ciclo celular: en G1 se encuentra localizada predominantemente en la región perinuclear, en fases más tardías, también puede ser detectado dentro del núcleo (sobre todo en la matriz nuclear). Durante la mitosis, Ki-67 se encuentra presente en todos los cromosomas y aparece como una estructura reticulada rodeando los cromosomas en metafase. Ki-67 disminuye rápidamente durante la anafase y la telofase, concluyendo que es degradado con una vida media biológica de menos de una hora (95).

MCM-7

Las proteínas de mantenimiento minicromosomal (MCM: minichromosome maintenance proteins) forman un complejo de 7 moléculas que actúan como helicasas replicativas en la síntesis del ADN (96). Diversos estudios han demostrado su uso como marcadores de proliferación para predecir el comportamiento de diversas neoplasias, ya que, en comparación con el marcador Gold standard Ki-67, varias proteínas del complejo MCM se expresan en la fase temprana de G1 (96).

Para que el genoma se replique solo una vez por cada ciclo celular, en la fase S debe haber puntos de control que impidan el comienzo de una nueva fase S antes de la mitosis (97). El mecanismo molecular que permite la replicación del ADN una sola vez por ciclo celular tiene como protagonista a esta familia de proteínas. Dichas proteínas forman anillos heteroexaméricos de complejos MCM2-7 que actúan como helicasas de replicación de ADN asegurando una eficiente duplicación del genoma en la fase S. Se une a los orígenes de la replicación junto con las proteínas del complejo de reconocimiento de origen (ORC) y actúan permitiendo el comienzo de la replicación. Su

unión al ADN se regula durante el ciclo celular de manera que la proteína MCM solo se puede unir a los ORC durante G1, lo que permite iniciar la replicación de ADN una vez que la célula entra en fase S. No pueden comenzar una nueva replicación hasta que la célula atraviese la mitosis y entre en la fase G1 del siguiente ciclo (97).

CICLINA D1

Dentro de la familia de ciclinas la más estudiada es la ciclina D1, la cual es una subunidad reguladora de proteínas quinasas a través del avance de la fase G1 del ciclo celular, promoviendo la progresión del mismo, modulando la actividad mitocondrial, el crecimiento celular, la reparación del ADN y la migración celular (98). Las ciclinas tipo D (D1, D2, D3) y sus protein-quinatas catalíticas CDK4 y CDK6 promueven la progresión del ciclo celular a través del punto de restricción durante la fase G1 para trascender la fase S (99). La activación del complejo ciclina D1-CK4/6 promueve la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, inactivándola, inhibiendo la supresión tumoral, promoviendo el pasaje celular de G1 a S y por lo tanto la síntesis de ADN favoreciendo la proliferación celular. Las ciclinas D dependen de las señales mitógenas extracelulares que regulan su transcripción, traducción y estabilidad proteica, causando su desintegración en ausencia de las mismas, impidiendo así el pasaje de la célula a la fase S (100). Estas señales son mediadas principalmente por las vías de Ras-Raf-MEK-Erk (MAPK), que si se encuentran sobreestimuladas producen la sobreexpresión de ciclina D1, como sucede en diferentes tumores (101, 102).

La sobreexpresión de ciclina D1 se correlaciona con la diferenciación tumoral, la pobre supervivencia y el incremento de las metástasis en diferentes tipos de cáncer como los linfomas (103), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (104), cáncer de mama (105) y cáncer gástrico (106), entre otros.

BIOMARCADORES RELACIONADOS CON EL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, y reside en un proceso complejo que incluye degradación de la matriz extracelular, migración y proliferación de células endoteliales, diferenciación capilar y anastomosis (107). El crecimiento de muchos tumores se encuentra mediado por la proliferación de nuevos vasos sanguíneos, los cuales permiten el intercambio de nutrientes, oxígeno y productos de desecho. La angiogénesis es un proceso esencial en la progresión tumoral, así como un factor relacionado con su agresividad (108).

CD34

La proteína CD34 integra una familia de sialomucinas compuesta por 3 miembros: el antígeno CD34, podocalixina y endoglicano; los cuales comparten patrones de expresión, pero a su vez, cada proteína se expresa de forma única en cierto tipo de tejidos (109).

CD34 es una glicoproteína transmembrana de células madre hematopoyéticas. Es un antígeno de células precursoras del sistema hematopoyético, cuya detección a través de la inmunohistoquímica puede ser útil para identificar células leucémicas y tumores vasculares; igualmente se ha utilizado para precisar el diagnóstico de numerosos tumores de partes blandas con apariencia fusocelular (110). Esta proteína es inicialmente detectada en las células del sistema linfohematopoyético, precursoras de la serie mieloide y presentes en la médula ósea; se observa también en endotelio vascular, en células dendríticas de la dermis superior, en el endoneuro, y en diversos tumores de partes blandas como el tumor fibroso solitario, el dermatofibrosarcoma protuberans, el

sarcoma epitelioides, los tumores del estroma gastrointestinal, los lipomas atípicos y fusocelulares, y el sarcoma de Kaposi (110). Se utiliza para determinar la densidad microvascular intratumoral por ser un antígeno endotelial, que mide de forma cuantitativa la angiogénesis (111). La sobreexpresión de esta proteína se correlaciona con un pronóstico pobre en varios tumores (111).

CD105

La proteína CD105, también conocida como endogleína, es una glicoproteína de membrana, y actúa como receptor tipo III de los factores de crecimiento beta1. Su función consiste en modular el proceso de angiogénesis mediante la regulación de la proliferación, diferenciación y migración de las células endoteliales (112). Su expresión es característica para marcar los vasos sanguíneos recién formados o que se encuentran en proceso de formación (112). La pérdida de la proteína endogleína resulta en un número reducido de eritrocitos primitivos, así como también en la desregulación de los genes relacionados con la hematopoyesis. Por otra parte, la expresión de altos valores de esta proteína se asocia con condiciones de alteración en la estructura vascular como ocurre en procesos de angiogénesis, reparación de heridas e inflamación (113).

Se ha determinado que la densidad microvascular de endogleína es un factor pronóstico negativo en varios tumores sólidos (114).

BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS

En los tejidos adultos la muerte celular programada, más conocida con el nombre de apoptosis, suele equilibrarse exactamente con la división celular, a menos que el tejido este creciendo o contrayéndose (115). La apoptosis es regulada en gran medida por la familia de genes BCL2, la cual codifica un gran número de proteínas intracelulares; algunas de estas son anti-apoptóticas (bcl2, bcl-x1), mientras que otras son pro-apoptóticas (bcl-xs, bak y bax) (115).

BAX

Bax es una proteína pro apoptótica, estimuladora de la apoptosis a través del estrés mitocondrial (116). Tras la activación por estimulación de bax, ésta forma oligómeros y se desplaza desde el citosol a la membrana mitocondrial. A través de las interacciones con proteínas formadoras de poros en la membrana mitocondrial, bax incrementa la permeabilidad membranal, conduciendo a la liberación del citocromo C. La activación mitocondrial de la caspasa-9 y la iniciación de la activación de la cascada de las caspasas mediante el citocromo C conduce a la apoptosis. El citocromo C junto con ATP y el factor activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) forman un complejo llamado apoptosoma, que regula la activación de la caspasa-9 que a su vez activará el mecanismo extrínseco a las caspasas 3,6 y 7 de la apoptosis (116).

BCL-2

La proteína anti apoptótica o inhibidora de la apoptosis bcl2 es codificada por un protooncogen y se inmuoexpresa en el citoplasma al estar ubicada en la membrana mitocondrial (117). Actúa fijando proteínas del citosol en la membrana mitocondrial, bloqueando así la liberación del citocromo C mitocondrial, impidiendo la activación de

las procaspasas. Entre dichas proteínas fijadas esta Apaf-1, al secuestrarla impide que se forme el complejo con caspasa-9 y citocromo C, por lo que no se activa la cascada de caspasas, e incluso no permite la liberación del citocromo C de la mitocondria (117). Bcl2 también puede impedir la formación de canales mitocondriales por parte de bax, que permitirían que salga el citocromo C (117).

La relación entre estas proteínas determina el rango de supervivencia o muerte celular. Cuando predomina bax por sobre bcl2, se activa la vía de la apoptosis y se reprime la acción de bcl2 (118). Cuando se altera la regulación de las funciones de estas proteínas se puede dar el crecimiento incontrolado de las células, característico de los tumores.

SURVIVINA

Survivina es una proteína que forma parte del grupo de proteínas de inhibición apoptótica (IAP) (119). Se expresa durante el desarrollo embrionario, raramente expresada en tejidos adultos, y puede estar sobre regulada en procesos proliferativos malignos (119). Debido a esto, muchos autores la consideran como un blanco ideal para la terapéutica del cáncer (120, 121). Actúa inhibiendo la vía intrínseca de la apoptosis y más específicamente a la proteína bax cuando se encuentra en el citoplasma; también regula la división celular (reportada en fases G2-M del ciclo celular) y la proliferación celular cuando está en el núcleo (120).

La sobreexpresión de Survivina en tumores se asocia con agresividad tumoral, pobre pronóstico, resistencia a la terapia y alta probabilidad de recurrencia. La baja expresión de Survivina induce la apoptosis de células cancerígenas y suprime el crecimiento tumoral (121).

BIOMARCADORES DE SUPRESIÓN TUMORAL Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los genes supresores tumorales son aquellos que protegen a la célula de pasar de su fisiología normal a las vías carcinógenas (122). Cuando se produce su mutación, causando la pérdida o reducción de su función, las células pueden progresar a estados cancerígenos, en combinación con otros cambios genéticos y metabólicos. Como los oncogenes, los genes supresores de tumores tienen funciones diversas en la regulación del crecimiento, la diferenciación celular y la muerte celular programada (apoptosis) (122). Tanto la activación de los oncogenes como la inactivación de los genes supresores tumorales son pasos críticos en la iniciación y progresión del tumor. Con el paso del tiempo, el daño acumulado en varios genes es el responsable del incremento de la capacidad de proliferar, de invadir otros tejidos y generar metástasis, característico de células cancerosas. Las proteínas supresoras tumorales, codificadas por dichos genes, pueden producir un efecto represivo en la regulación del ciclo celular o promover la apoptosis de las mismas cuando se encuentran en vías de progresar a un tumor (122).

En biología molecular y genética, un factor de transcripción es una proteína que se une a secuencias específicas de ADN adyacentes a los genes, controlando así la transcripción de la información genética de ADN a ARN mensajero (123). Los factores de transcripción son estimulados por señales citoplasmáticas, adquiriendo la capacidad de regular la expresión genética en el núcleo activando o reprimiendo la transcripción de diversos genes. Ciertos factores de transcripción pueden sufrir mutaciones que los mantienen continuamente activos sin necesidad de señales externas, transformándose así en oncogenes. Esto puede dar lugar al crecimiento incontrolado de las células y por tanto a las vías de la carcinogénesis (123).

p53

El gen supresor tumoral y factor de transcripción P53 es un regulador negativo en el control de la proliferación celular, que actúa a través de la fosfoproteína nuclear p53, bloqueando la replicación del ADN al detener el ciclo celular en G1 cuando éste está dañado, haciendo posible su reparación (124). Si las alteraciones del ADN son muy extensas y el daño no puede ser reparado, la proteína p53 induce la apoptosis. Cuando el gen P53 está inactivado, las células continúan replicándose (sin la corrección de las mutaciones del ADN) y se produce una inestabilidad genética con un alto riesgo de acumulación de alteraciones múltiples que conducen a la formación de un tumor (124). Por lo tanto, desempeña un papel trascendental en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, progresión del ciclo celular, diferenciación celular, reparación del ADN y apoptosis (118).

El regulador principal de p53 es Mdm2, que puede accionar la degradación de p53 por ubiquitinación, actuando directamente sobre la proteína en el núcleo e indirectamente en el citoplasma. La expresión de Mdm2, a su vez, está regulada por p53 de forma que se mantengan los niveles de p53 bajos una vez que se ha reparado el daño celular. La fosforilación de p53 la libera de su asociación con Mdm2, por lo que su vida media aumenta y puede ejercer su función de factor transcripcional, aumentando la expresión de genes importantes para la reparación del daño en el ADN (como GADD45), para inhibir la progresión a través del ciclo celular (como p21) y para promover la apoptosis en caso necesario (como bax) (125).

PTEN

La fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) es una enzima que cataliza la hidrólisis del grupo fosfato del carbono 3 del fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), considerada un supresor tumoral que desfosforila las proteínas en los residuos tirosina, serina y treonina y posee actividad lípido-fosfatasa a nivel de PI3 (126). Al antagonizar la ruta PI3-ATK/PKB (proteín kinasa B) mediante su desfosforilación, modula la progresión del ciclo celular, pudiendo inhibir la migración celular, la proliferación mediada por integrinas, y la formación de adhesiones focales (126). Se presenta tanto a nivel nuclear, citoplasmático y extracelular, teniendo más relevancia clínica a nivel nuclear.

Se considera que la pérdida de PTEN resulta en la activación de la vía MAPK provocando una alteración de la expresión genética, dando como resultado un comportamiento tumoral agresivo, así como también una constante activación de la vía PI3K (127). Diversos estudios asocian la pérdida de PTEN con la presencia de tumores y metástasis, con la proliferación celular y angiogénesis, así como con el detenimiento de la supresión del tumor (127).

CAVEOLINA-1

La proteína estructural Caveolina-1 es el principal componente estructural de las caveolas o invaginaciones de la membrana plasmática y juega un papel importante en la señalización celular (128). El gen que codifica a Caveolina-1, CAV-1, es un gen supresor tumoral y regulador negativo de la cascada Ras-p42/44 MAPK. Esta proteína se encarga de la unión de las integrinas con la tirosina quinasa previo al inicio de la vía Ras-MAPK para promover la progresión del ciclo celular. Dichas integrinas son glicoproteínas que se encargan de la unión célula-matriz extracelular, así como célula-

célula, actuando como receptores de membrana y a su vez jugando un papel primordial en la migración celular y la señalización celular (129). Las conexiones de los componentes de la matriz extracelular pueden causar una señal que será transmitida al interior de la célula por medio de una quinasa conectada a la integrina, la cual puede dar lugar a diversos procesos celulares como ser el crecimiento, la división, la diferenciación o la apoptosis celular. Por lo cual, si Caveolina-1 no une la integrina con la tirosina quinasa, la señalización celular se verá afectada provocando alteraciones en los procesos celulares que median (129).

La expresión de Caveolina-1 varía en respuesta a exposiciones tóxicas y elevadas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno. La persistente supresión de Caveolina-1 promueve la aparición de fenotipos patógenos, y varios estudios lo asocian con estados avanzados de cáncer de mama y próstata, relacionando la disminución de Caveolina-1 con estados avanzados, recurrencia luego del tratamiento, metástasis y un pronóstico desfavorable (130).

BIOMARCADORES RELACIONADOS CON MUTACIONES PREVIAMENTE REPORTADAS

BRAF V600E

Las investigaciones realizadas en melanomas cutáneos han evidenciado que un 50% de estos exhibían mutaciones en B-RAF, la cual se ha denominado mutación V600E como resultado de la sustitución de una valina (V) por un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 600 de la cadena poli peptídica de B-RAF (131).

La mutación B-RAF V600E juega un papel importante en los eventos de proliferación y supervivencia de las células, a través de la activación de la vía MAPK. Recientemente se ha reportado que la desregulación de la vía de señalización MAPK ha

sido comprobada ser un paso crítico para la patogénesis del ameloblastoma, relacionándolo con la mutación de B-RAF V600E (132).

Hasta la fecha la mutación B-RAF V600E también ha sido identificada en el fibroma ameloblástico (2/2) y fibrodentinoma (1/1), así como en el carcinoma ameloblástico (3/8) y carcinoma odontogénico de células claras (1/1), pero no en otros tumores odontogénicos (132, 133).

Cuadro 5. Resumen de biomarcadores abordados según su función.

FUNCIÓN	BIOMARCADORES										
HISTOGÉNESIS	CK14	CK19	Amelogenina	DSPP	PITX2	Galectina-3	MOC-31	Vimentina	Syndecan-1	CD 90	Calretinina
TRANSPORTE DE GLUCOSA	Glut-1										
PROLIFERACIÓN CELULAR	Ki-67				MCM-7			Ciclina D1			
ANGIOGÉNESIS	CD34						CD105				
APOPTOSIS	Bax				Bcl2				Survivina		
SUPRESIÓN TUMORAL Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	p53				PTEN				Caveolina-1		
MUTACIONES REPORTADAS	BRAF V600E										

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TOP es una neoplasia benigna mixta que afecta principalmente el complejo maxilo-mandibular y que ha sido recientemente descrita, encontrando los primeros casos reportados a partir del año 2014.

El interés por el estudio a nivel molecular del tumor odontogénico primordial radica en la falta de información sobre la expresión de los diversos biomarcadores que ayuden a comprender la histogénesis y el comportamiento biológico, para así caracterizar esta lesión.

JUSTIFICACIÓN

El realizar un estudio con marcadores relacionados con la histogénesis tumoral, metabolismo glucosídico, proliferación celular, angiogénesis, apoptosis, supresión tumoral y proteínas con mutaciones reportadas, nos permitirá comprender el comportamiento de esta nueva entidad. Del mismo modo, contribuye a generar nuevo conocimiento sobre la génesis del tumor, mismo que podría contribuir al desarrollo de nuevos conceptos terapéuticos, o brindar información relevante sobre nuevos marcadores pronósticos y de avance tumoral de utilidad para el manejo del paciente.

Por lo tanto en este trabajo nos proponemos investigar el perfil inmunohistoquímico de TOP a través de los biomarcadores DSPP, PITX2, CK14, CK19, Amelogenina, Vimentina, Calretinina, Syndecan-1, Glut-1, Galectina-3, Ki-67, MCM-7, Ciclina D1, p53, Caveolina-1, BRAF V600E, MOC-31, CD34, CD105, Bcl2, Bax, Survivina, CD90, PTEN y su comparación con la inmunoexpresión en germen dentarios.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer la inmunexpresión de las proteínas, DSPP, PITX2, CK14, CK19, Amelogenina, Vimentina, Calretinina, Syndecan-1, Glut-1, Galectina-3, Ki-67, MCM-7, Ciclina D1, p53, Caveolina-1, BRAF V600E, MOC-31, CD34, CD105, Bcl-2, Bax, Survivina, CD90, PTEN, asociadas al origen y comportamiento tumoral en el tumor odontogénico primordial.

Objetivos específicos

1. Determinar la inmunexpresión de DSPP, PITX2, CK14, CK19, Amelogenina, Vimentina, Calretinina, Syndecan-1, Glut-1, Galectina-3, Ki-67, MCM-7, Ciclina D1, p53, Caveolina-1, BRAF V600E, MOC-31, CD34, CD105, Bcl-2, Bax, Survivina, CD90, PTEN en TOP.
2. Determinar y correlacionar la inmunexpresión de las proteínas DSPP, PITX2, CK14, CK19, Amelogenina, Vimentina, Calretinina, Syndecan-1, Glut-1, Galectina-3, Ki-67, MCM-7, Ciclina D1, p53, Caveolina-1, BRAF V600E, MOC-31, CD34, CD105, Bcl-2, Bax, Survivina, CD90, PTEN con su inmunexpresión en germenes dentarios.
3. Correlacionar la inmunexpresión de las proteínas DSPP, PITX2, CK14, CK19, Amelogenina, Vimentina, Calretinina, Syndecan-1, Glut-1, Galectina-3, Ki-67, MCM-7, Ciclina D1, p53, Caveolina-1, BRAF V600E, MOC-31, CD34, CD105, Bcl-2, Bax, Survivina, CD90, PTEN con posibles factores pronósticos como localización, edad, género, tamaño tumoral y recurrencia.

METODOLOGÍA

Diseño de estudio

Se trata de un estudio analítico, observacional, transversal y retrospectivo.

Tamaño de la muestra

Se incluyeron un total de 7 especímenes de tejidos de la región maxilofacial producto de biopsia incisional con diagnóstico histopatológico previo de tumor odontogénico primordial, así como 7 casos de germen dentarios.

El tipo de muestreo fue no probabilístico, sino por conveniencia. La muestra se encuentra representada por todas las historias clínicas y muestras tumorales con diagnóstico histopatológico previo de tumor odontogénico primordial en el período anterior existente hasta el año 2018. Las muestras de TOP provinieron de cuatro centros diferentes de patología oral en América Latina (México, Brasil y Guatemala) y de Japón. Las muestras de germen dentarios provinieron de la Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, UdelaR, Uruguay.

Se realizó por muestra, un total de 24 cortes para la técnica inmunohistoquímica y un corte para tinción con Hematoxilina y Eosina.

Criterios de inclusión:

- Muestras que corresponden al diagnóstico histopatológico de tumor odontogénico primordial.
- Muestras exentas de errores de manejo durante el procesamiento.

Criterios de exclusión:

- Aquellos especímenes que al ser revalorados y reclasificados no fueron diagnosticados como tumor odontogénico primordial.
- Aquellos especímenes que se encontraron en mal estado y que no fueron útiles o representativos.

Definición y operacionalización de las variables:

VARIABLES DEPENDIENTES:

- Tumor odontogénico primordial.
- Germen dentario.

VARIABLES INDEPENDIENTES:

- Inmunoexpresión de los biomarcadores DSPP, PITX2, CK14, CK19, Amelogenina, Vimentina, Calretinina, Syndecan-1, Glut-1, Galectina-3, Ki-67, MCM-7, Ciclina D1, p53, Caveolina-1, BRAF V600E, MOC-31, CD34, CD105, Bcl-2, Bax, Survivina, CD90, PTEN (Cuadro 6).

Cuadro 6. Operacionalización de las variables independientes

Anticuerpo	Clona	Dilución	Expresión
Amelogenina	Santa Cruz/F-11	1 : 100	Membrana/citoplasma
CK19	Genetex/policlonal	1 : 100	Membrana/citoplasma
CK14	Biocare/LL002	1:100	Membrana/citoplasma
Vimentina	DAKO/V 9	1:100	Membrana/citoplasma
Calretinina	DAKO/DAK-CALERET 1	1 : 100	Nuclear

Syndecan-1	DAKO/MI15	1 : 100	Membrana/citoplasma
Glut-1	GeneTex/E107	1 : 100	Membrana/citoplasma
Galectina-3	Bio SB/9C4	1:50	Membrana/citoplasma
Ki-67	DAKO/MIB1	1 : 100	Nuclear
MCM-7	Leica/ DCS-141.1	1:100	Nuclear
Ciclina D1	DAKO/DCS-6	1:50	Nuclear
p53	Bio SB/D07	1:200	Nuclear
Caveolina-1	Santa Cruz/policlonal	1:100	Membrana/citoplasma
BRAF V600E	Bio SB/RM8	1:100	Nuclear
MOC-31	DAKO/MOC-31	1:50	Membrana/citoplasma
CD34	Biocare/QBEnd10	1:100	Membrana/citoplasma
CD105	DAKO/SN6h	1:100	Membrana/citoplasma
Bcl2	Biocare/100/D5	1:100	Membrana Nuclear
Bax	DAKO	1:200	Membrana Nuclear

Survivina	GENE TEX	1:200	Nuclear
CD90	STEMCELL/5E10	1:100	Membrana/citoplasma
PTEN	Santa Cruz	1:100	Nuclear
PITX2	Abcam	1:50	Membrana/citoplasma
DSPP	Thermo Fisher	1:50	Membrana/citoplasma

PROCEDIMIENTOS

Obtención, fijación e inclusión de los especímenes en bloques de parafina. Cortes.

Todas las muestras fueron obtenidas mediante biopsia incisional, posteriormente fueron fijadas en formaldehído al 10% durante un período determinado de tiempo (más de 24hs). Finalmente fueron incluidas en bloques de parafina.

Las laminillas en las cuales fueron colocados los cortes, fueron sometidas a un proceso de silanización, el cual consiste en limpiarlas con una gasa, para posteriormente sumergirlas durante 10 minutos en 250ml de poly-l-lisina (solución adherente de tejidos) a una concentración de 10x; por último, se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Los cortes fueron realizados en un micrótomo calibrado con un grosor de 2 μ a una inclinación de 10°. Fueron llevados a una tina con agua a temperatura de 40°C y colocados en las laminillas previamente silanizadas.

Técnica de inmunohistoquímica.

Para el proceso de desparafinación, las laminillas fueron colocadas en una rejilla metálica y puestas dentro de una estufa de desparafinado a 60°C durante una hora. Posteriormente fueron cambiadas a rejillas de plástico y sumergidas en un depósito con xilol durante 5 minutos; los residuos de parafina fueron eliminados mediante 15 baños en otro depósito de xilol. Se considera un baño como una sumergida instantánea.

Los cortes se hidrataron en un tren de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 96, 80, 70 y 50%) y dos lavados con agua destilada, realizando 15 baños en cada uno.

La recuperación antigénica o desenmascaramiento de los epítopes fue realizada mediante el método de olla a presión-horno de microondas. La solución desenmascaradora que fue utilizada dependió de cada uno de los anticuerpos, así como de las recomendaciones del fabricante, por lo general solución de citrato de sodio 10mM (pH 6.2).

La olla a presión fue precalentada con 500ml de agua destilada durante 5 minutos en el horno de microondas a máxima potencia (750W). Mientras, las laminillas fueron colocadas cuidadosamente dentro de los vasos coplin con la zona esmerilada hacia arriba, la solución desenmascaradora fue agregada a los vasos tomando como referencia de tope dicha zona esmerilada. Los vasos fueron cerrados con fuerza y luego abiertos un poco e introducidos dentro de la olla a presión cuidadosamente, la cual fue puesta nuevamente dentro del horno de microondas programado 7 minutos a máxima potencia. Se esperó hasta que el sonido de la válvula de escape de la olla a presión fuera constante durante 15 segundos, a partir de los cuales se contó un minuto y se detuvo el temporizador del horno de microondas. La olla fue sacada del microondas y se esperó

hasta que la válvula bajara para poder abrirla (8 minutos), se sacaron los vasos y se colocaron abiertos dentro de un recipiente con agua corriente durante 10 minutos, observando durante este tiempo cómo es que la solución pasaba de turbia y se iba aclarando progresivamente.

Los vasos fueron vaciados y se enjuagaron 3 veces con agua destilada teniendo cuidado en colocar el dedo índice sobre los bordes de las laminillas para que, de este modo, el agua no cayera directamente sobre ellas.

Las peroxidasas endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno al 0.9%, seguidos por 3 lavados con agua destilada.

Las laminillas fueron cuidadosamente montadas en los cover-plates (sistema por capilaridad) con agua destilada y colocadas en los racks. Para verificar el correcto sellado entre el cover-plate y la laminilla, fue agregado al depósito formado por estas dos estructuras PBS a 1x durante 5 minutos.

Se incubaron los anticuerpos primarios monoclonales contra DSPP, PITX2, CK14, CK19, Amelogenina, Vimentina, Calretinina, Syndecan-1, Glut-1, Galectina-3, Ki-67, MCM-7, Ciclina D1, p53, Caveolina-1, BRAF V600E, MOC-31, CD34, CD105, Bcl-2, Bax, Survivina, CD90, PTEN (Cuadro 6), por un período de 45 min. El anticuerpo monoclonal correspondiente fue agregado (80µl) con una micropipeta y colocado en el depósito formado entre el cover-plate y la laminilla cuidando no tocar las paredes; la tapa del rack fue colocada.

Posteriormente, los cortes fueron incubados con el segundo anticuerpo biotinilado anti-ratón/anti-conejo y con el complejo streptavidina/peroxidasa (LSA-B + Labeled streptavidin-biotin, Dako Corporation, Carpinteria CA, USA) por 30 min. cada uno con lavados intermedios con PBS al 1x.

Los productos de la reacción fueron visualizados con sustrato de 3,3'-diaminobenzidina-H₂O₂ (Dako Corporation, Carpintería, CA, USA). Se realizó el revelado al microscopio óptico, secando las laminillas con una gasa limpia previo agregado de la diaminobenzidina. Posteriormente las laminillas fueron lavadas con agua destilada cuidando que los excedentes cayeran en un recipiente con cloro y luego fueron colocadas en una rejilla sumergida en agua corriente a temperatura ambiente.

Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer durante 5 minutos, fueron lavadas con agua corriente para eliminar los excesos de hematoxilina y luego fijadas mediante 10 baños de hidróxido de amonio (todas estas soluciones a temperatura ambiente), para nuevamente ser lavadas con agua corriente. Las laminillas fueron colocadas en rejillas de plástico y llevadas al tren para su deshidratación, esta vez a la inversa del proceso de hidratación sin sumergirlas en los contenedores con xilol; se dejaron secar a temperatura ambiente.

Finalmente, fueron montadas con resina líquida (Entellan) colocándoles el cubreobjetos y se dejaron secar durante 24 horas.

Conteo celular.

La cuantificación citoplasmática y/o membranosa se realizó visualmente utilizando un microscopio óptico (Eclipse CI-L, Nikon, Japón) amplificado a 40x, tomando en cuenta la siguiente escala semi cuantitativa: 0 “esencialmente sin tinción” establecido para preparados negativos o positivos menos del <5% de las células; + “débil a moderado” para tinciones del 5-50% de las células; ++ “positivo intenso” para >50% de las células (Figura 1).

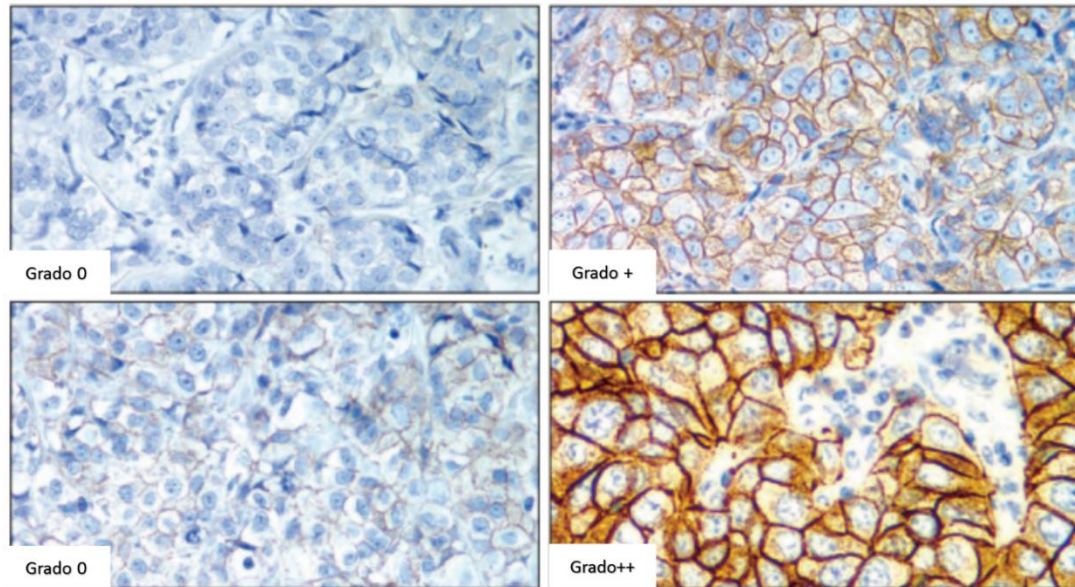


Figura 1. Esquematización de la gradación citoplasmática-membrana en base al conteo previamente descrito por HercepTest® (DAKO, Carpinteria, CA, USA) para cáncer de mama (134, 135).

La evaluación de conteo celular nuclear fue realizada acorde al método descrito por Bologna y colaboradores (135) a continuación se describe brevemente:

La evaluación de la expresión de cada anticuerpo se realizó en áreas seleccionadas ricas en células epiteliales tumorales. Todas las células se cuantificaron mediante el uso de microfotografías tomadas a 40x en cada campo, en un microscopio de luz marca Olympus® (se tomaron cinco campos por caso). La imagen se transfirió a una gradilla. Las microfotografías se convirtieron en archivos JPEG. Cada archivo se abrió con el uso del programa de Microsoft Power Point y con el uso de la función tabla, se conformó una tabla de 6x6 y se superpuso en la imagen de la microfotografía. La tabla se agrandó y adaptó al tamaño de la microfotografía. En cada imagen el inicio del conteo celular se realizó desde el marco superior izquierdo y culminó en el marco superior derecho, siguiendo un mismo orden. El número de células positivas y negativas se contaron manualmente en cada recuadro de la gradilla. Para el cálculo adicional de

los datos resultantes (por ejemplo, el número de núcleos de células positivas y negativas y el número total de células) se calculó de la forma siguiente: % de las células positivas= núcleos celulares positivos/total de núcleos celulares x100. El índice obtenido se expresó en porcentaje positivo de células por milímetro cuadrado del tejido analizado. El índice de inmunotinción (número de células positivas/número total de células expresado en porcentaje) se calculó para cada caso (Figura 2). Se realizó la calibración de los examinadores hasta obtener la Kappa =0.75.

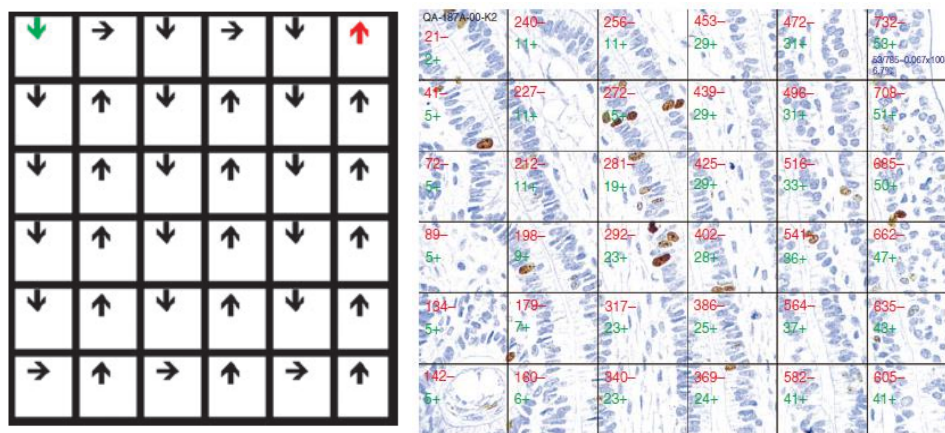


Figura 2. Esquema de la secuencia y orden que llevará el conteo celular. A la izquierda se esquematiza la secuencia y orden que llevó el conteo celular. La imagen de la derecha ejemplifica la técnica de conteo. En cada recuadro se hizo una sumatoria en color rojo de las células negativas y en color verde las células positivas hasta llegar al último cuadro (superior derecho). En el último cuadro se aplicó la fórmula: Células positivas (valor en verde) / Total de células (sumatoria de valor verde y rojo) X 100 (135).

El conteo celular se realizó tanto a nivel del componente mesenquimático tumoral como del tejido epitelial, dependiente de la expresión nuclear-citoplasmática-membranal de cada anticuerpo (Cuadro 6).

El desarrollo de este proyecto se realizó en el laboratorio ubicado en el Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, UdelaR, Uruguay.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio ha recibido la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de la República, Facultad de Odontología, Uruguay (17/17).

RESULTADOS

En total fueron cuantificadas 24 proteínas en 7 casos de tumor odontogénico primordial y 7 casos de germen dental.

Los hallazgos inmunohistoquímicos mostraron que el componente mesenquimal del tumor fue positivo en las células fusocelulares para PITX2, Vimentina, Syndecan-1, Bax, Bcl2, Survivina y p53. La positividad de Syndecan-1 también fue observada en la matriz extracelular. CD34 y CD105 fueron positivamente variables en los vasos sanguíneos, mientras que PTEN, DSPP y CD90 mostraron una positividad débil-moderada (Cuadro 7). Las células epiteliales que rodean la periferia del tumor fueron positivas para DSPP, CK14 y en la mayoría de las áreas tumorales también para CK19, Amelogenina, Glut-1, MOC-31 y Caveolina-1. La expresión fue variable para el caso de Galectina-3, p53, Bax, Bcl2, Survivina y PTEN. Por otra parte, la expresión de BRAF V600E y Calretinina se mostró negativa en todos los casos, tanto para el epitelio como la mesénquima (Fig. 3, 4, 5; Cuadro 7). Los marcadores relacionados con la proliferación celular Ki-67, MCM-7 y Ciclina D1 mostraron un índice de proliferación celular bajo.

Cuadro 7. Cuantificación de las proteínas cuya inmunexpresión se presenta en el citoplasma, membrana y núcleo en TOP.

Anticuerpo	Células epiteliales	Células Mesenquimaticas
Amelogenina	+	Neg
CK19	++	Neg
CK14	++	Neg
Vimentina	+	++
Calretinina	Neg	Neg
Syndecan-1	+	++
Glut-1	++	Neg
Galectina-3	+	Neg
Ki-67	<2%	<5%
MCM-7	<1%	<1%
Ciclina D1	<5 %.	<5 %.
p53	+	+

Caveolina-1	+	Neg
BRAFV600E	Neg	Neg
MOC-31	+	Neg
CD34	Neg	++ (vasos)
CD105	Neg	+(vasos)
Bcl2	+	+
Bax	+	+
Survivina	+	+
CD90	Neg	+
PTEN	+	+
PITX2	+	+
DSPP	+	+

Neg: negativo, +: débil a moderado, ++: positivo intenso.

A nivel de germenes dentarios los hallazgos inmunohistoquímicos mostraron que el componente mesenquimal fue positivo para Vimentina, Bax, Bcl2, Survivina, PITX2 y p53. La positividad de Amelogenina fue observada en la matriz extracelular. CD34 y CD105 fueron positivamente variables en los vasos sanguíneos, mientras que

PTEN se mostró negativo para el componente mesenquimal (Cuadro 8). Las células del epitelio interno del órgano del esmalte fueron positivas para CK14 y de manera focal para CK19, DSPP, Amelogenina, Vimentina, Glut-1, MOC-31 y Caveolina-1. La expresión fue variable para el caso de Syndecan-1, p53, Bax, PITX2 y PTEN. Por otra parte, la expresión de BRAF V600E, Galectina-3, CD90 y Calretinina se mostró negativa en todos los casos, tanto para el epitelio como el mesénquima (Figuras 6 y 7; Cuadro 8). Los marcadores de proliferación celular Ki-67, MCM-7 y Ciclina D1 mostraron una mayor expresión a nivel epitelial, siendo una expresión débil en el mesénquima.

Cuadro 8. Cuantificación de las proteínas cuya inmunoexpresión se presenta en el citoplasma, membrana y núcleo en germen dental.

Anticuerpo	Células epiteliales	Células Mesenquimáticas
Amelogenina	++	++
CK19	++	Neg
CK14	++	Neg
Vimentina	+	++
Calretinina	Neg	Neg
Syndecan-1	++	Neg
Glut-1	++	Neg

Galectina-3	Neg	Neg
Ki-67	++	+
MCM-7	++	+
Ciclina D1	++	+
p53	++	++
Caveolina-1	++	+
BRAFV600E	Neg	Neg
MOC-31	++	Neg
CD34	Neg	+ (vasos)
CD105	Neg	+ (vasos)
Bcl2	Neg	+
Bax	++	+
Survivina	Neg	+
CD90	Neg	Neg

PTEN	+	Neg
PITX2	+	++
DSPP	++	Neg

Neg: negativo, +: débil a moderado, ++: positivo intenso.

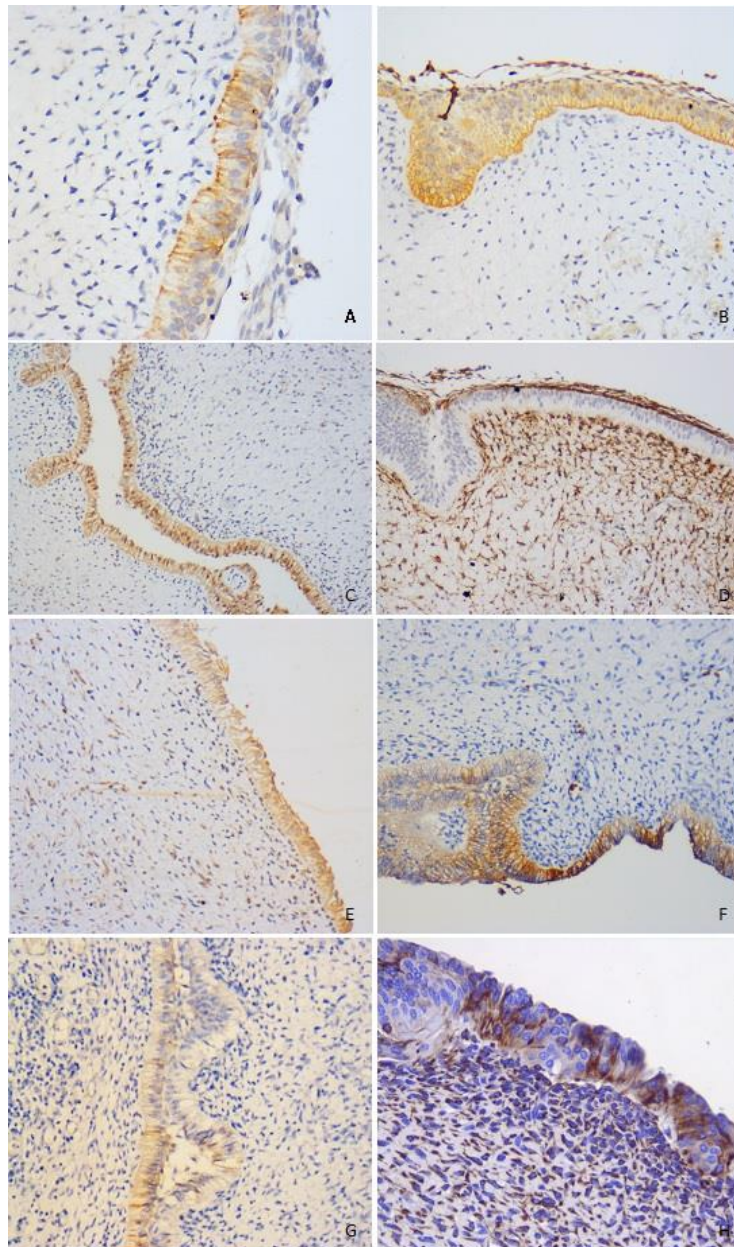


Figura 3. Tumor odontogénico primordial. (A) El epitelio muestra expresión variable de CK19, 400x. (B) Expresión epitelial constante de CK14, 200x. (C) Expresión de Amelogenina en células cubicas y columnares, 200x. (D) Syndecan-1 se expresa intensamente en el mesénquima pero no en todo el epitelio de recubrimiento, 200x. (E) Expresión variable de PITX2 en epitelio y mesénquima, x400. (F) Expresión de Glut-1 en el epitelio odontogénico, 200x. (G) MOC-31 expresado únicamente en áreas localizadas del epitelio, 200x. (H) Algunas células epiteliales muestran positividad para Vimentina, 400x.

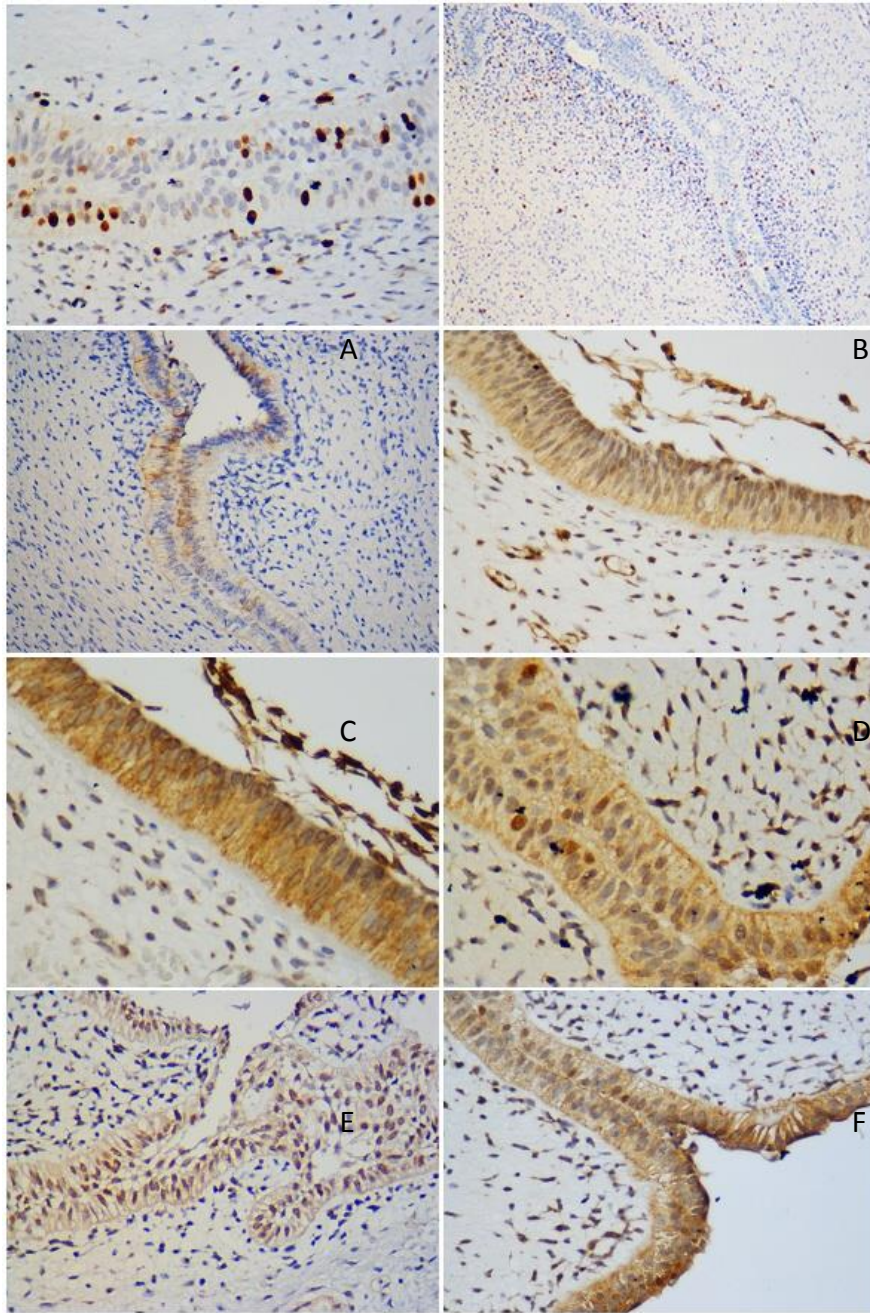


Figura 4. Tumor odontogénico primordial. (A) Expresión de Ki-67 en células epiteliales, 400x. (B) Índice de proliferación celular significativamente alto entre las células subepiteliales de la condensación mesenquimal comparada con la encontrada en otras áreas mesenquimales tumorales, 200x. (C) Expresión de Galectina-3 en células epiteliales, 100x. (D, E, F) Expresión de Bax, Bcl-2 y Survivina, 400x. (G) p53 fue encontrado en el componente mesenquimal y el epitelio circundante, 400x. (H) Expresión de Ciclina D1, 400x.

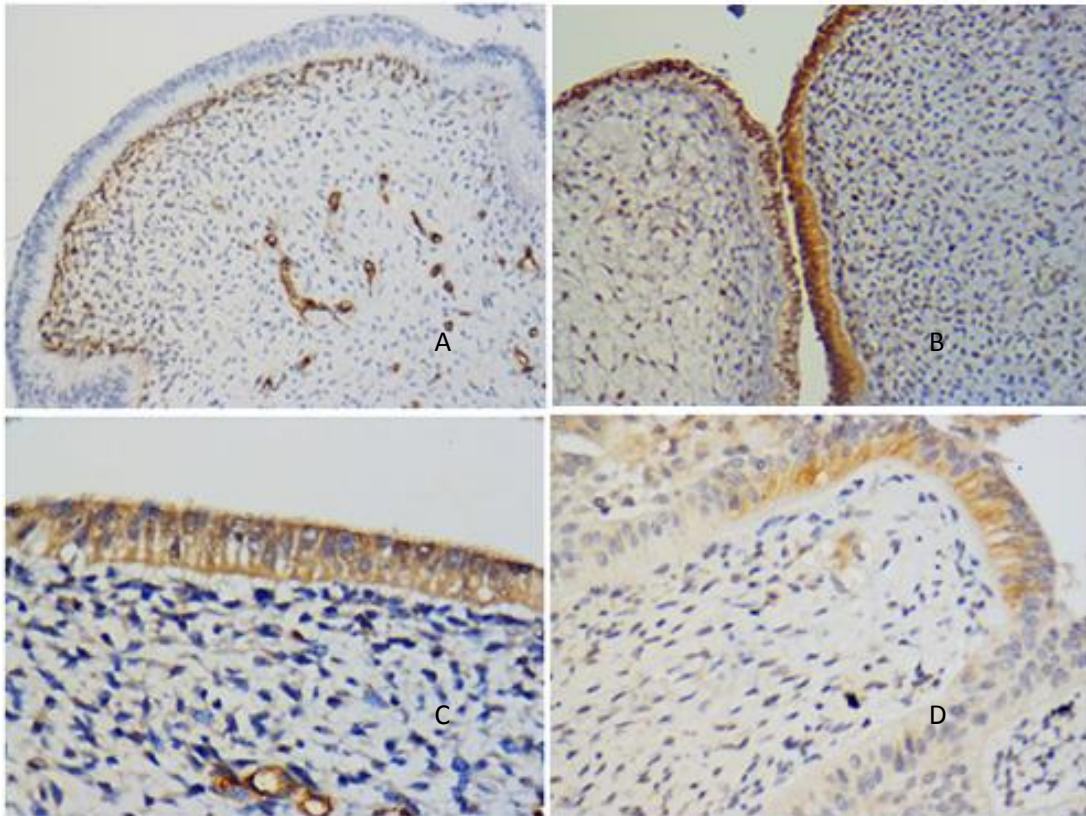


Figura 5. Tumor odontogénico primordial. (A) Fuerte positividad para CD34 en las células mesenquimales localizadas en contacto o próximas al epitelio odontogénico y en vasos sanguíneos, 200x. (B) Expresión de DSPP en el epitelio odontogénico tumoral, 200x. (C) Expresión de Caveolina-1 en el epitelio odontogénico, 400x. (D) Leve expresión de PTEN en áreas focales epiteliales, 400x.

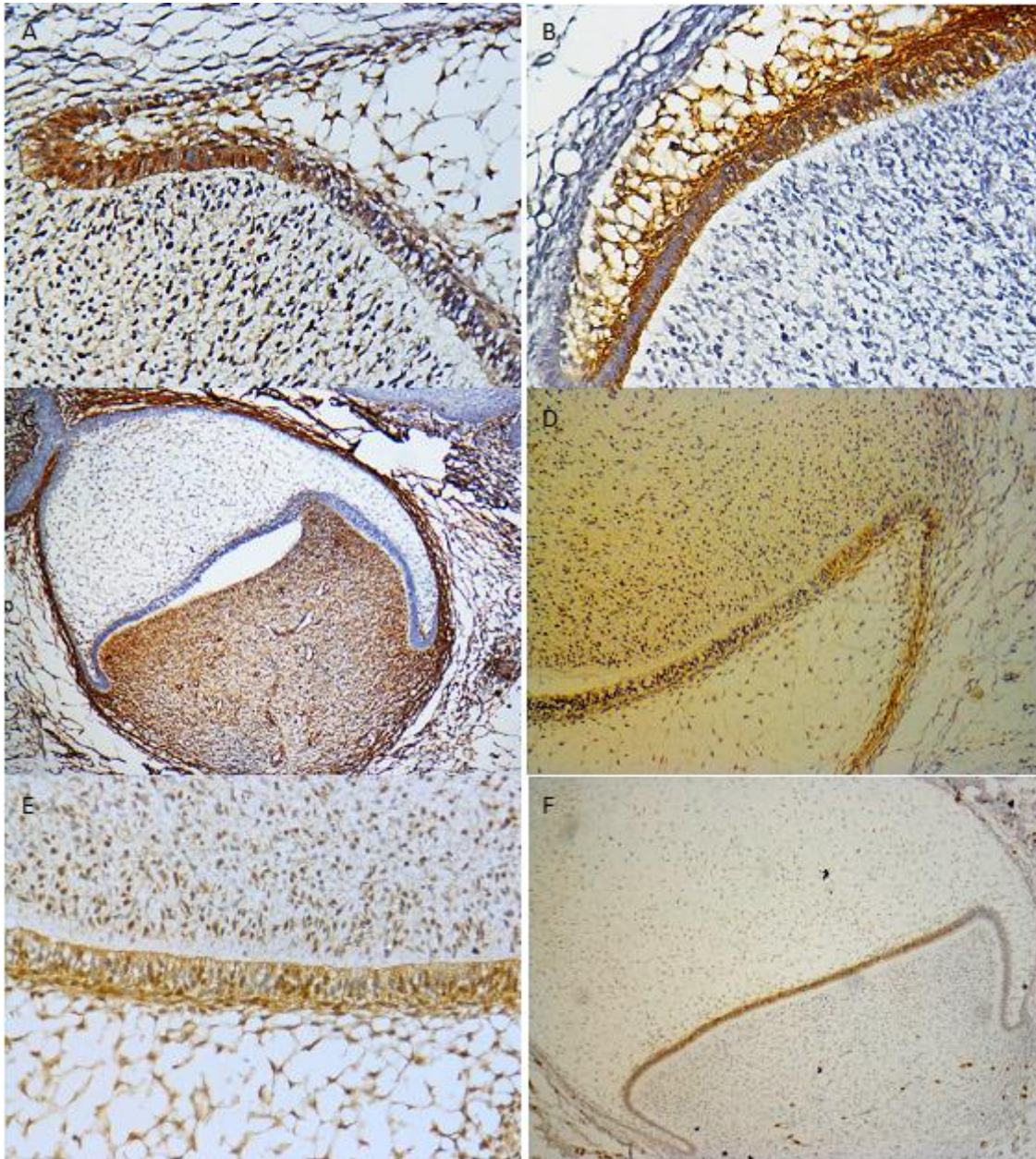


Figura 6. Germen dentario. (A) Intensa expresión de amelogenina en el epitelio interno del órgano del esmalte en el tercio cervical, 400x. (B) Expresión intensa de MOC-31, 400x. (C) Vimentina se observa expresada de manera intensa en el mesénquima, 100x. (D) Syndecan-1 se expresa de manera débil a moderada en zonas focales epiteliales y mesenquimáticas, 200x. (E) Expresión débil-moderada de PITX2 en el epitelio odontogénico y mesénquima, 100x. (F) Expresión focal de GLUT-1 en el epitelio odontogénico, 100x.

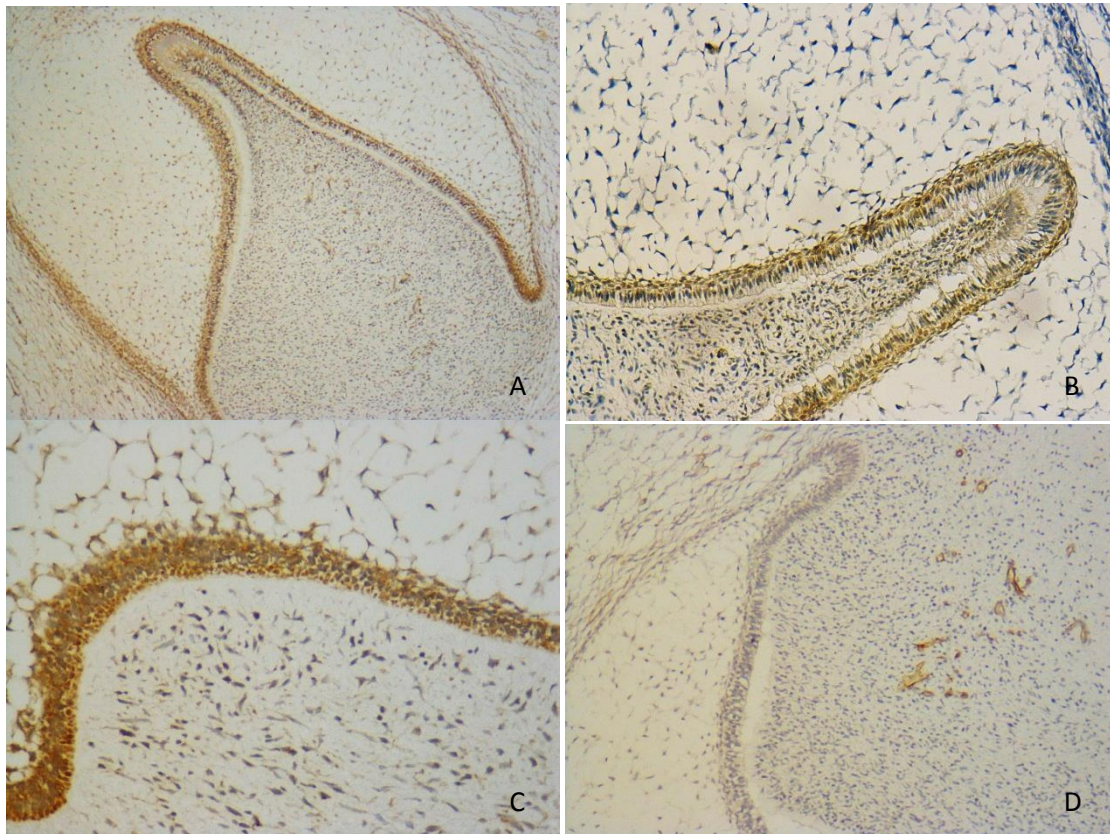


Figura 7. Germen dentario. (A) Expresión de Ciclina D1 en el epitelio, vasos sanguíneos y mesénquima, 100x. (B) Expresión intensa de MCM-7 en el epitelio odontogénico y mesénquima subepitelial condensado, 200x. (C) Expresión focal de BAX en el epitelio interno del órgano del esmalte y de menor intensidad en el mesénquima circundante, 400x. (D) Expresión de CD34 en vasos sanguíneos, 200x.

Al correlacionar las características clínicas y radiográficas así como socio-demográficas de cada caso de TOP con los resultados inmunohistoquímicos observamos que no hay diferencias significativas entre los mismos, sin poder establecer una correlación directa.

DISCUSIÓN

Este estudio describe ampliamente el perfil inmunohistoquímico de TOP, logrando por primera vez una completa caracterización inmunohistoquímica de este tumor. Los marcadores seleccionados proveen información nueva y valiosa para un mejor entendimiento sobre la histogénesis y el comportamiento biológico de esta entidad novel.

Estudios previos han demostrado que el patrón inmunohistoquímico de las citoqueratinas varía durante la odontogénesis con respecto a los tipos celulares específicos, así como las etapas de desarrollo y el grado de diferenciación epitelial (136). Aunque varias citoqueratinas son expresadas en las células epiteliales de los gérmenes dentarios (31), nuestros hallazgos demuestran que CK14 es aquella que se presenta constante en todas las etapas del desarrollo dental estudiadas, mientras que CK19 tiene un aumento en su expresión una vez que el epitelio interno del órgano del esmalte comienza su diferenciación, expresándose de manera variable en etapas previas.

En el caso de la inmunoexpresión de Amelogenina ésta se presenta desde su síntesis por parte de los ameloblastos jóvenes, para ser secretada a la matriz del esmalte y degradada durante la maduración del esmalte (31), coincidiendo con nuestros resultados, encontramos su expresión variable a nivel del germen dental dentro del epitelio del órgano del esmalte dependiendo del grado de diferenciación celular, así como también su presencia extracelular en el proceso de secreción- degradación de la misma.

La expresión de DSPP se mostró variable a nivel del epitelio odontogénico, mostrando zonas focales de mayor intensidad y otras completamente negativas. A su vez, se observó expresión proteica en el mesénquima, principalmente en el área de

condensación subepitelial. DSPP se expresó de manera constante e intensidad moderada en gérmenes dentarios, considerando que en ninguno de los preparados contenía tejido mineralizado. La inhibición de la formación de dentina puede ser debido a un disturbio en la transición de DSPP a DSP, DGP y DPP, lo cual previene la diferenciación normal de los odontoblastos, sugiriendo esta afectación en este tumor.

Al correlacionar la inmunexpresión de CK19, CK14, DSPP y Amelogenina entre los resultados obtenidos del epitelio de gérmenes dentarios y TOP, determinamos que esta evidencia apoya el origen odontogénico de este tumor. Observamos que tanto Amelogenina como CK19 no se presentaron de manera uniforme en las células epiteliales tumorales, predominando en aquellas columnares con polarización inversa (pre ameloblastos), lo que sugiere que este tumor exhibe diversos grados de maduración, dicha maduración se encuentra en etapas previas a la secreción de proteínas asociadas a la formación de tejidos mineralizados dentales, pudiendo asociarse a un origen primitivo (primordial) de los componentes celulares del órgano del esmalte.

Estas observaciones a su vez son apoyadas por el hecho de que algunas áreas del epitelio tumoral mostraron positividad focal para Vimentina, así como sucede con el germen dental, siendo de expresión más intensa en el área mesenquimal.

En este estudio encontramos una tinción débil para PITX2 en las células mesenquimáticas fusiformes de todos los casos de TOP, mientras que las células endoteliales presentaron de débil a moderada positividad en áreas focales. De acuerdo con Mucchielli et al. (42), la expresión de PITX2 se da en el área presunta de la lámina dental, manteniéndose como un marcador para el epitelio dental a través de las etapas de la morfogénesis hasta la diferenciación ameloblastica. La presencia de este factor de

transcripción, al menos focalmente, en el epitelio tumoral también respalda la hipótesis de que este tumor deriva de las etapas tempranas de la morfogénesis dental y que los componentes epiteliales expresan diferentes etapas del desarrollo dental.

Para el caso de MOC-31 éste fue encontrado en áreas localizadas del epitelio, sugiriendo, como sucede con CK19, Vimentina, PITX2 y Amelogenina, que hay un grado variable de diferenciación y maduración celular de las células que comprenden el comportamiento epitelial tumoral. A nivel de gérmenes dentarios la expresión de MOC-31 es mayor a nivel epitelial en estados más tempranos (casquete tardío) en comparación con estadios tardíos (campana temprana).

En todos los casos de TOP incluidos en este estudio, se encontraron diferentes grados en la expresión de Syndecan-1 en el epitelio tumoral, variando desde zonas enteramente negativas, a áreas focalmente positivas, similar a lo que sucede en el germen dental. Esto sugiere que hay grupos de células epiteliales con diferentes grados de maduración en este tumor, siendo un factor coincidente con lo analizado de CK19, Amelogenina y MOC-31. A su vez, esta proteína también se expresó de manera intensa a nivel estromal en TOP, mayoritariamente en áreas de condensación mesenquimal (tejido similar a la papila) próximo al epitelio odontogénico tumoral. Estos hallazgos no son coincidentes con nuestros resultados en germen dental, donde observamos que el mesénquima odontogénico es negativo para Syndecan-1. Un estudio realizado por Vaino et al. (73) reportó el acumulo del ARN de Syndecan-1 en las células mesenquimales condensadas rodeando el nudo epitelial dental durante el desarrollo temprano, la cual es más intensa a medida que avanza la morfogénesis hacia la etapa de casquete, perdiéndose durante la etapa de campana y a su vez se produce una interacción epitelio – mesenquimal para su propio desarrollo.

Al igual que en el estudio realizado por Alaeddini et al. sobre fibroma ameloblastico, tanto los casos de TOP como de germen dental se mostraron negativos para Calretinina, pudiendo suponer que esta proteína se expresa en etapas más tardías de la maduración, encontrándonos con procesos poco diferenciados que derivan de etapas tempranas de la odontogénesis (83).

En el presente estudio la inmunexpresión de Glut-1 en el epitelio odontogénico de TOP se mostró tanto a nivel citoplasmático como membranal, lo cual se correlaciona con una expresión intensa en el citoplasma a una membranal difusa durante la maduración del órgano del esmalte en la etapa temprana de campana del germen dental. Esta intensa expresión en TOP indica la existencia de requerimientos de muchos transportadores de glucosa, sugiriendo a su vez la coexistencia de diferentes etapas de maduración en este epitelio por la variación citoplasma-membrana comparando con a la maduración del germen dental.

Para cuantificar la actividad proliferativa de este tumor se usaron marcadores asociados a la proliferación celular y factores relacionados con el ciclo celular, como ser Ki-67, MCM-7 y Ciclina D1, los cuales mostraron un bajo grado de proliferación tumoral (<5%) tanto a nivel epitelial como mesenquimal. Sin embargo, la condensación mesenquimal subepitelial mostro un índice significativamente mayor de proliferación en relación con otras áreas tumorales, lo cual puede implicar que el tumor muestra un crecimiento activo en esta área y puede relacionarse con la habilidad inductiva del mesénquima para modificar el epitelio subyacente. Por su parte, la expresión de Ki-67 en el germen dental muestra un aumento progresivo a nivel de las células del epitelio interno del órgano del esmalte, desde la etapa de casquete tardía hasta la etapa de campana temprana, siendo escaso a nulo cuando estas células se diferencian en

ameloblastos maduros, así como en el estrato intermedio. A su vez, MCM-7 y Ciclina D1 presentaron mayor intensidad epitelial en comparación con el mesénquima.

La expresión de Galectina-3 en TOP fue exclusivamente epitelial, sugiriendo un posible rol en la proliferación celular y en la hipoxia, determinando a su vez que ciertas áreas se presentaron intensamente positivas mientras que otras fueron enteramente negativas, sugiriendo también diferentes áreas de oxigenación en el tumor. Por su parte, a nivel de germen dental, la expresión de Galectina-3 fue negativa tanto en el componente epitelial como mesenquimal. Nakahara et al. (137) sugirieron que la sobreexpresión de Galectina-3 a nivel intracelular favorece la transformación neoplásica, la progresión del ciclo celular, la inhibición de la apoptosis, aumentando en estados de hipoxia celular, pero el significado exacto de nuestros hallazgos permanece para ser elucidados.

En cuanto a la relación de las proteínas asociadas a la apoptosis, Bcl2, Bax y Survivina mostraron una intensa positividad tanto mesenquimal como epitelial en las células de TOP. La expresión de estas tres proteínas fue similar, con una presentación ligeramente mayor de las proteínas anti apoptóticas. Sin embargo, los resultados de este estudio no nos permiten concluir su rol como un mecanismo de crecimiento tumoral. La expresión nuclear de Survivina fue detectada en algunas áreas del epitelio, lo cual, según Stasikowska-Kanicka et al. (138) conduce a la proliferación celular, mientras que su expresión citoplasmática involucra a mecanismos de regulación de la apoptosis.

En cuanto a su expresión a nivel de germen dental, observamos que Survivina se encuentra exclusivamente en el citoplasma de las células mesenquimales, al igual que Bcl2, siendo Bax la que se expresa en ambos estratos, con mayor intensidad en el epitelio estimulando la apoptosis y el recambio celular. Por otra parte, tanto Bcl2 como

Bax actúan como factores de transcripción de p53, esta última proteína se expresó de manera débil a moderada tanto en el mesénquima como en el epitelio de los casos de TOP, mientras que en germen dental su expresión fue más intensa, determinando así el grado de regulación del ciclo celular en estos dos procesos.

Los vasos sanguíneos fueron identificados tanto en TOP como en gérmenes dentarios con la utilización de CD34 y CD105, demostrando una intensa positividad para CD34 en todas las células endoteliales mientras que para CD105 se marcó un menor número de vasos. Esto puede ser explicado por el hecho de que CD105 se expresa de manera característica para los vasos recién formados y no de aquellos vasos sanguíneos o linfáticos previamente existentes, a diferencia de CD34. CD105 en TOP fue encontrado mayoritariamente en áreas de mayor condensación mesenquimal, particularmente en la región subepitelial, marcando la actividad neoangiogenica de esta área tumoral, la cual coincide con las sugerencias previas de que este tumor tiene un mayor crecimiento en esta zona. Por su parte, CD34 mostró inmunopositividad no solo en los vasos sanguíneos mesenquimales pero también en las células mesenquimáticas localizadas en contacto o próximas al epitelio odontogénico, pudiendo indicar la presencia de fibroblastos embrionarios.

Un estudio realizado por Muica Nagy-Bota et al. (139) en el cual se examinó la expresión de CD34 en germen dental humano determino su positividad en células endoteliales de los vasos presentes en la papila dental durante las etapas de brote y casquete temprana, al igual que se observa en nuestro estudio.

La expresión estromal de CD90 en los casos de TOP (ya que en germen se expresó de manera negativa en ambos estratos) fue encontrada en vasos sanguíneos y células mesenquimáticas, en particular aquellas próximas al epitelio odontogénico,

sugiriendo que la expresión de CD90 puede jugar un rol importante en la adhesión celular y migración, como regulador de las interacciones célula-matriz extracelular.

Caveolina-1 en gérmenes dentarios se expresó, como ha reportado Schwab et al (140), tanto en las células epiteliales como mesenquimáticas, particularmente en el epitelio interno del órgano del esmalte y las células ameloblásticas en diferenciación. A nivel de TOP la variabilidad de su expresión encontrada a nivel epitelial puede sugerir diferentes etapas de la diferenciación celular, implicando que las células positivas a Caveolina-1 se encuentran en transformación dentro de este tipo de tumor.

La expresión de PTEN en TOP se mostró débil y en áreas focales del epitelio, apoyando la hipótesis de la diferenciación celular en las diferentes etapas del desarrollo dentro del compartimento epitelial. Estos resultados son semejantes a los encontrados en gérmenes dentarios, en donde se observa una intensidad moderada en áreas focales del epitelio en los brotes cervicales de las etapas de campana temprana.

El presente trabajo constituye uno de los estudios más completos realizados hasta ahora sobre el tumor odontogénico primordial, puesto que comprende el análisis de proteínas involucradas en los distintos mecanismos de desarrollo y progresión tumoral. Sin embargo, dentro de las limitantes encontradas podemos mencionar la escasez de muestras de germen dentario, las cuales servirían como un grupo control, así como también los pocos casos de TOP debido a que hay menos de 14 casos reportados en el mundo, como para poder establecer un análisis estadístico. A su vez, contar únicamente con gérmenes en estadios de casquete tardío y campana temprana cuenta con una limitante por no obtener una visión más amplia de todo el proceso de odontogénesis como comparativa con TOP. El análisis a futuro de los genes y su expresión, las proteínas utilizadas durante este estudio mediante la aplicación de otras

técnicas de biología molecular, resultaría bastante significativo para una mayor comprensión del comportamiento biológico del tumor odontogénico primordial así como de su patogénesis.

EXPRESIÓN COMPARATIVA INMUNOHISTOQUÍMICA DE TOP Y OTROS TUMORES ODONTOGÉNICOS

El diagnóstico diferencial con TOP se realiza considerando principalmente al fibroma ameloblastico y al mixoma odontogénico (1).

El fibroma ameloblástico es un tumor mixto benigno, poco frecuente, compuesto por mesénquima odontogénico rico en células que simular la papila dental, y por epitelio odontogénico que simular el epitelio del órgano del esmalte, sin presencia de tejido duro dental, con posible cápsula colagenosa (1).

Investigaciones iniciales sobre mutaciones de BRAF V600E en el fibroma ameloblástico demostraron que dos casos exhibían esta mutación, considerando a su vez la pérdida de alelos en genes supresores tumorales (141), lo cual no se observa en TOP.

Tomando como referencia el trabajo realizado por Bologna et al. (142) sobre el perfil inmunohistoquímico del fibroma ameloblastico, los autores determinaron que la expresión de Amelogenina era débil-moderadamente positiva en la capa periférica de células epiteliales columnares, confirmando el componente ameloblástico de este tumor, y la intensa expresión de CK19 en el epitelio, confirmando su naturaleza odontogénica; por lo cual son resultados similares a los de TOP. Para los resultados de Syndecan-1 en fibroma ameloblástico (142) la positividad se mostró intensa a nivel de las islas de epitelio y las áreas centrales que representan el retículo estrellado, sugiriendo la conservación de la arquitectura y cohesión epitelial, similar a lo que sucede a nivel de TOP, aunque en este caso la expresión llega a ser focal y no uniforme. La débil

expresión de Ki-67, indicando el bajo índice de proliferación celular, en el fibroma ameloblastico se correlaciona con el comportamiento tumoral de TOP, mostrando que el potencial de crecimiento de estos dos tumores mixtos no se debe a la capacidad proliferativa del tumor, sino que es mediante otros mecanismos de desarrollo tumoral (142).

Similar es el caso del mixoma odontogénico, el cual es considerado un tumor benigno localmente invasivo compuesto por células estelares y espinosas dispersas en una extensa matriz extracelular mixoide, caracterizado por presentar un índice de proliferación celular bajo (>1%), estudiado mediante inmunohistoquímica con Ki-67 (143). Considerando el potencial angiogénico del tumor a través de la utilización del marcador CD34, el mixoma odontogénico, al igual que TOP, posee una vascularización moderada, resultando un posible factor que impulse el crecimiento tumoral (143). En cuanto al rol de la apoptosis en el mixoma odontogénico, se observa un aumento de las proteínas anti apoptóticas (Bcl-1) y una expresión nula en las proteínas pro apoptóticas (Bax), similar a lo que sucede a nivel de TOP (140). Por lo cual se sugiere considerar a la apoptosis como un mecanismo de crecimiento tisular para estos tumores.

A pesar de encontrar hallazgos similares en la inmunoexpresión de varios marcadores para TOP y para el fibroma ameloblástico y el mixoma odontogénico, se debe tener en cuenta que histopatológicamente son entidades separadas.

El fibroma ameloblástico se encuentra compuesto por una proliferación celular espinosa y estelar con un estroma tipo colágeno y mixoide similar a la papilla dental como sucede en TOP, y se presenta principalmente en las primeras dos décadas de vida siendo la zona posterior de la mandíbula el área con más frecuencia (70%) relacionándose con una pieza dental sin erupcionar en un 75% de los casos; sin

embargo, también posee un componente ameloblastomoso con presencia de islas epiteliales que exhiben polarización nuclear invertida de las células basales y expresa mutación para BRAF V600E (144).

Por su parte, el mixoma odontogénico posee menor componente celular y no exhibe componente epitelial en la periferia, aunque en el 5% de los casos descritos hasta el momento pueda presentar islas epiteliales hacia el centro; a su vez el promedio de edad de ocurrencia de esta lesión comprende los 25-30 años y puede presentarse en cualquier porción de la mandíbula sin predilección mostrando márgenes irregulares radiográficamente, siendo que TOP se ha diagnosticado principalmente en pacientes en su primera década de vida y a nivel del sector posterior mandibular con mayor predilección (145, 146).

CONCLUSIONES

Gracias a los procedimientos realizados, fue posible obtener datos importantes que nos ayudan a comprender mejor algunos de los mecanismos moleculares relacionados al comportamiento biológico de TOP, cumpliendo de esta manera con el objetivo principal de este estudio.

De acuerdo con las expresiones variables de las diversas proteínas probadas en este estudio, podríamos concluir que TOP posee un índice de proliferación bajo, definiéndolo como una lesión de crecimiento lento con producción variable de tejido fibroso en donde la proliferación celular no pareciera ser el único mecanismo implicado en el crecimiento y expansión tumoral. TOP es un tumor moderadamente vascularizado en donde hay una mayor densidad vascular y neoformación vascular en el mesénquima localizado próximo al epitelio circundante. Esta área a su vez muestra una mayor expresión de Syndecan 1, CD34, Ki-67 y Glut-1, indicando que esta área tiene una actividad proliferativa mayor y corresponde al área de desarrollo tumoral. A su vez, hay evidencia sobre un incremento de la actividad anti apoptótica la cual pueda participar en el crecimiento de esta entidad. La expresión de CK19, vimentina, amelogenina, Syndecan-1, Caveolina-1, DSPP, Glut-1, MOC-31, en el epitelio circundante puede ser interpretada como que hay grupos de células en diferentes estados de desarrollo, con una estructura epitelial única aparente desde el punto de vista histológico. Esta situación conlleva a especular que el compartimento epitelial de TOP no es uniforme o estático, pero que expresa la transición entre las etapas tempranas del desarrollo dental y aquellas en donde la maduración ameloblástica se encuentra presente pero previamente a tener el potencial de inducción de diferenciación odontoblástica o de producción de material mineralizado. De esta forma podemos apoyar la denominación de “primordial” para esta entidad única. La ausencia de una proteína mutante identificable para BRAF V600E

sugiere que la mutación del gen BRAF no se encuentra implicado en la patogénesis de TOP y puede confirmar que este tumor no pertenece a la categoría de aquellos tumores ameloblásticos con BRAF mutante.

Considerando todos los hallazgos inmunohistoquímicos, interpretamos que la lesión estudiada es un tumor odontogénico benigno que posiblemente se origina del tejido mesenquimal de un germen dental en aborto que falla para producir el órgano dental.

A la fecha, este es el primer estudio de TOP con el uso de múltiples marcadores tumorales. En este estudio, fue cuantificada la inmunoexpresión de un total de 24 proteínas que intervienen en los mecanismos de desarrollo y progresión tumoral más importantes; es por ello que este trabajo constituye un aporte significativo y novedoso sobre el uso y utilidad de ciertos marcadores tumorales y el rol que desempeñan estas proteínas en TOP.

CRONOGRAMA

	Descripción de la actividad	Trimestre 1	Trimestre 2	Trimestre 3	Trimestre 4	Trimestre 5	Trimestre 6	Resultados esperables
1	Inclusión de muestras almacenadas en parafina, tanto de TOP (n=7) como de gérmenes dentarios (n=7).							Reclasificar todas las muestras existentes unificando criterios clasificatorios obteniendo.
2	Realización de los ensayos inmunohistoquímicos en muestras de parafina.							Determinar la presencia “ <i>in situ</i> ” de las proteínas asociadas al comportamiento biológico tumoral.
3	Análisis global de los resultados.							Integrar la creciente información inmunohistoquímica. Identificar de los mejores biomarcadores que permitan identificar las diferentes características del tumor y comparar con los resultados obtenidos en gérmenes dentarios.
4	Escritura de artículos científicos							Generar varios artículos científicos JCR.
5	Escritura de la tesis							Finalizar el proyecto planteado.

REFERENCIAS

1. El-Naggar, A.K., Chan, J.K.C, Grandis, J.R., Takata, T. & Slootweg, P.J. (2017). WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th edition. IARC: Lyon.
2. Mosqueda-Taylor, A., Pires, F. R., Aguirre-Urizar, J. M., Carlos-Bregni, R., Piedra-Garza, J. M., Martínez-Conde, R. & Almeida, O. P. (2014). Primordial odontogenic tumour: clinicopathological analysis of six cases of a previously undescribed entity. *Histopathol*, 65(5), 606-612.
3. Nanci, A. (2017). *Ten Cate's Oral Histology-E-Book: Development, Structure, and Function*. 8th edition. Elsevier Health Sciences.
4. Thesleff, I., Keranen, S. & Jernvall, J. (2001). Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Ad dental res*, 15(1), 14-18.
5. Maas, R. & Bei, M. (1997). The genetic control of early tooth development. *Critic Rev Oral Biol Med*, 8(1), 4-39.
6. Lesot, H. & Brook, A. H. (2009). Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch oral biol*, 54(1), 25-33.
7. Puthiyaveetil, J. S. V., Kota, K., Chakkarayan, R., Chakkarayan, J. & Thodiyil, A. K. P. (2016). Epithelial–mesenchymal interactions in tooth development and the significant role of growth factors and genes with emphasis on mesenchyme—a review. *J clinic diagn res*, 10(9), 05-09.
8. Thesleff, I., Vaahtokari, A. & Partanen, A.M. (1995). Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol*, 39(4), 35-50.
9. Balic, A. & Thesleff, I. (2015). Tissue interactions regulating tooth development and renewal. *Current topics in develop biol*, 115(3), 157-186.

10. Liyanage, S. (2013). *Essentials of oral histology and embryology: a clinical approach*. 4th edition. Elsevier.
11. Simmer, J. P., Papagerakis, P., Smith, C. E., Fisher, D. C., Rountrey, A. N., Zheng, L., & Hu, J. C. (2010). Regulation of dental enamel shape and hardness. *J dental res*, 89 (10), 1024-1038.
12. Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., & Sidransky D. (2005). *World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors*. 3rd edition. Lyon: IARC Press.
13. Mosqueda-Taylor, A., Ledesma-Montes, C., Caballero-Sandoval, S., Portilla-Robertson, J., Rivera, L. M. R. G. & Meneses-García, A. (1997). Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endo*, 84(6), 672-675.
14. Katabi, N. & Lewis, J. S. (2017). Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: what is new in the 2017 WHO blue book for tumors and tumor-like lesions of the neck and lymph nodes. *Head neck pathol*, 11(1), 48-54.
15. Bilodeau, E. & Collins, B. (2017). Odontogenic cyst and neoplasm. *Surg Pathol*. 10(3); 177–222.
16. Jordan, R. C. & Speight, P. M. (2009). Current concepts of odontogenic tumours. *Diagnostic Histopathol*, 15(6), 303-310.
17. Johnson, N. R., Gannon, O. M., Savage, N. W. & Batstone, M. D. (2014). Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *J invest clinic dent*, 5(1), 9-14.

18. Ando, T., Shrestha, M., Nakamoto, T., Uchisako, K., Yamasaki, S., Koizumi, K. & Takata, T. (2017). A case of primordial odontogenic tumor: A new entity in the latest WHO classification. *Pathol internat*, 67(7), 365-369.
19. Slater, L.J., Eftimie, L.F. & Herford, A.S. (2016). Primordial Odontogenic Tumor: Report of a Case. *J Oral Maxillofac Surg*, 74(10):547–51.
20. Mikami, T., Ohashi, Y., Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Fujiwara, N., Tsunoda, N. & Takeda, Y. (2017). Primordial Odontogenic Tumor: A case report with histopathological analyses. *Pathol internat*, 67(12), 638-643.
21. Pardhe, N. & Bajpai, M. (2018). Primordial odontogenic tumor of mandible; a case with proposed diagnostic criteria. *Iran J Med Sci.*, 43(1):97-99.
22. Amer, H., Hafed, L. & Ibrahim, S. (2018). Case Report: A Primordial odontogenic tumor. *F1000Res*. 7(1), 562.
23. Almazayad, A., Li, C. C., Tapia, R. O. C., Robertson, J. P., Collette, D. & Woo, S. B. (2018). Primordial odontogenic tumour: report of two cases. *Histopathol*, 72 (7) 1221-1227.
24. Bomfim, B.B., Prado, R.& Sampaio, R.K. (2018). Primordial Odontogenic Tumor: report of a new case and literature review. *Head and Neck Pathol*, 49(13),1-6.
25. Taylor, C. R. (2014). Predictive Biomarkers and Companion Diagnostics. The Future of Immunohistochemistry—‘in situ proteomics’, or just a ‘stain’?. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology*. *Soc App Immunoh*, 22(8), 555.
26. Paredes, A., Vega, J., de León, A., Kanacri, A., Castro, P. & Baeza, R. (2013). Utilidad de los biomarcadores en insuficiencia cardiaca en la práctica clínica. *Rev méd Chile*, 141(12), 1560-1569.

27. Florescu, A., Simionescu, C., Ciurea, R. & Pitru, A. (2012). P53, Bcl-2 and Ki67 immunoexpression in follicular solid ameloblastomas. *Rom J Morphol Embryol*, 53(1), 105-109.
28. Kaneko, A., Sekydo, Y. & Tsukinoki, K. (2012). Peripheral ameloblastoma of the lower molar gingiva: a case report and immunohistochemical study. *Tokai J Exp Clin Med*, 37(2), 30-34.
29. Fukumashi, K., Enokiya, Y. & Inoue, T. (2002). Cytokeratins expression of constituting cells in ameloblastoma. *Bulletin Tokyo Dental Coll*, 43(1), 13-21.
30. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11-24.
31. Mori, M., Yamada, K., Kasai, T., Yamada, T., Shimokawa, H. & Sasaki, S. (1991). Immunohistochemical expression of amelogenins in odontogenic epithelial tumours and cysts. *Virchows Archiv A*, 418(4), 319-325.
32. Bansal, A. K., Shetty, D. C., Bindal, R. & Pathak, A. (2012). Amelogenin: A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. *J oral max pathol*, 16(3), 395.
33. Yamamichi, K., Fukuda, T., Sanui, T., Toyoda, K., Tanaka, U., Nakao, Y. & Nishimura, F. (2017). Amelogenin induces M2 macrophage polarisation via PGE2/cAMP signalling pathway. *Arch oral biol*, 83, 241-251.
34. Kumamoto, H., Yoshida, M. & Ooya, K. (2001). Immunohistochemical detection of amelogenin and cytokeratin 19 in epithelial odontogenic tumors. *Oral dis*, 7(3), 171-176.

35. Tsujigiwa, H., Nagatsuka, H., Han, P. P., Gunduz, M., Siar, C. H., Oida, S. & Nagai, N. (2005). Analysis of amelogenin gene (AMGX, AMGY) expression in ameloblastoma. *Oral oncol*, 41(8), 843-850.
36. Ogbureke, K. U., Koli, K. & Saxena, G. (2016). Matrix metalloproteinase 20 co-expression with dentin sialophosphoprotein in human and monkey kidneys. *J Histochem Cytochem*, 64(10), 623-636.
37. Wan, C., Yuan, G., Luo, D., Zhang, L., Lin, H., Liu, H. & Chen, Z. (2016). The dentin sialoprotein (DSP) domain regulates dental mesenchymal cell differentiation through a novel surface receptor. *Scien rep*, 6, electronic code 29666.
38. Karadag, A., Ogbureke, K. U., Fedarko, N. S. & Fisher, L. W. (2004). Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and $\alpha\beta 3$ integrin in osteotropic cancer cell invasion. *J Nat Cancer Instit*, 96(12), 956-965.
39. Chaplet, M., Waltregny, D., Detry, C., Fisher, L. W., Castronovo, V. & Bellahcène, A. (2006). Expression of dentin sialophosphoprotein in human prostate cancer and its correlation with tumor aggressiveness. *Internat j cancer*, 118(4), 850-856.
40. Chen, Y., Zhang, Y., Ramachandran, A. & George, A. (2016). DSPP is essential for normal development of the dental-craniofacial complex. *J dental res*, 95(3), 302-310.
41. Hjalt, T. A., Semina, E. V., Amendt, B. A. & Murray, J. C. (2000). The Pitx2 protein in mouse development. *Develop Dynam*, 218(1), 195-200.
42. Mucchielli, M. L., Mitsiadis, T. A., Raffo, S., Brunet, J. F., Proust, J. P. & Goridis, C. (1997). Mouse Otlx2/RIEG Expression in the odontogenic epithelium

- precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signals for its maintenance. *Develop Biol*, 189(2), 275-284.
43. Lin, C. R., Kioussi, C., O'Connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F. & Rosenfeld, M. G. (1999). *Pitx2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature*, 401(6750), 279.
44. Heikinheimo, K., Kurppa, K. J., Laiho, A., Peltonen, S., Berdal, A., Bouattour, A. & Morgan, P. R. (2015). Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. *J dental res*, 94(1), 101-111.
45. Tümer, Z. & Bach-Holm, D. (2009). Axenfeld–Rieger syndrome and spectrum of *PITX2* and *FOXC1* mutations. *Europ J of Human Gen*, 17(12), 1527.
46. Huang, Y., Guigon, C. J., Fan, J., Cheng, S. Y. & Zhu, G. Z. (2010). Pituitary homeobox 2 (*PITX2*) promotes thyroid carcinogenesis by activation of cyclin D2. *Cell cyc*, 9(7), 1333-1341.
47. Hirose, H., Ishii, H., Mimori, K., Tanaka, F., Takemasa, I., Mizushima, T. & Mori, M. (2011). The significance of *PITX2* overexpression in human colorectal cancer. *Annals surgic oncol*, 18(10), 3005-3012.
48. García-Muñoz, A., Rodríguez, M. A., Licéaga-Escalera, C., Licéaga-Reyes, R., Carreón-Burciaga, R. G., González-González, R. & Bologna-Molina, R. (2015). Expression of the transcription factor *PITX2* in ameloblastic carcinoma. *Arch oral biol*, 60(6), 799-803.
49. Díaz-Alvarez, L. & Ortega, E. (2017). The many roles of galectin-3, a multifaceted molecule, in innate immune responses against pathogens. *Med inflammat*, Article ID 9247574, 10 p.

50. Wang, L. & Guo, X. L. (2016). Molecular regulation of galectin-3 expression and therapeutic implication in cancer progression. *Biomed Pharmacol*, 78 (3), 165-171.
51. Liu, F. T. & Rabinovich, G. A. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Rev Cancer*, 5(1), 29.
52. Cardoso, A. C. F., Andrade, L. N. D. S., Bustos, S. O. & Chammas, R. (2016). Galectin-3 determines tumor cell adaptive strategies in stressed tumor microenvironments. *Front oncol* 6 (3), 127.
53. Baldus, S. E., Zirbes, T. K., Weingarten, M., Fromm, S., Glossmann, J., Hanisch, F. G. & Hölscher, A. H. (2000). Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation. *Tumor biol*, 21(5), 258-266.
54. Song, S., Ji, B., Ramachandran, V., Wang, H., Hafley, M., Logsdon, C. & Bresalier, R. S. (2012). Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. *PLoS one*, 7(8), e42699.
55. Wu, K. L., Huang, E. Y., Jhu, E. W., Huang, Y. H., Su, W. H., Chuang, P. C. & Yang, K. D. (2013). Overexpression of galectin-3 enhances migration of colon cancer cells related to activation of the K-Ras–Raf–Erk1/2 pathway. *J gastro*, 48(3), 350-359.
56. Hsu, D. K., Dowling, C. A., Jeng, K. C. G., Chen, J. T., Yang, R. Y. & Liu, F. T. (1999). Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Internat j cancer*, 81(4), 519-526.

57. Honjo, Y., Inohara, H., Akahani, S., Yoshii, T., Takenaka, Y., Yoshida, J. I. & Kubo, T. (2000). Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res*, 6(12), 4635-4640.
58. Orlandi, F., Saggiorato, E., Pivano, G., Puligheddu, B., Termine, A., Cappia, S. & Angeli, A. (1998). Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 58(14), 3015-3020.
59. Van Den Brûle, F. A., Buicu, C., Berchuck, A., Bast, R. C., Deprez, M., Liu, F. T. & Castronovo, V. (1996). Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Hum pathol*, 27(11), 1185-1191.
60. Califice, S., Castronovo, V., Bracke, M. & van den Brûle, F. (2004). Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene*, 23(45), 7527.
61. Castronovo, V., Van den Brûle, F. A., Jackers, P., Clausse, N., LIU, F. T., Gillet, C. & Sobel, M. E. (1996). Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J pathol*, 179(1), 43-48.
62. Pacis, R. A., Pilat, M. J. P., Pienta, K. J., Wojno, K. J., Raz, A., Hogan, V. & Cooper, C. R. (2000). Decreased galectin-3 expression in prostate cancer. *Prost*, 44(2), 118-23
63. Litvinov, S. V., Balzar, M., Winter, M. J., Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., Prins, F. & Warnaar, S. O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J cell biol*, 139(5), 1337-1348.

64. Yu, S., Li, A., Liu, Q., Yuan, X., Xu, H., Jiao, D. & Wu, K. (2017). Recent advances of bispecific antibodies in solid tumors. *J hematol oncol*, 10(1), 155.
65. Dai, M., Yuan, F., Fu, C., Shen, G., Hu, S. & Shen, G. (2017). Relationship between epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression and gastric cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 12(4), e0175357.
66. Satelli, A. & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell mol life sci*, 68(18), 3033-3046.
67. Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M. & Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J mammary gland biol neop*, 15(2), 117-134.
68. Niknami, Z., Eslamifar, A., Emamirazavi, A., Ebrahimi, A. & Shirkoohi, R. (2017). The association of vimentin and fibronectin gene expression with epithelial-mesenchymal transition and tumor malignancy in colorectal carcinoma. *EXCLI J*, 16 (1), 1009.
69. Lin, J., Lu, J., Wang, C. & Xue, X. (2017). The prognostic values of the expression of Vimentin, TP53, and Podoplanin in patients with cervical cancer. *Cancer cell internat*, 17(1), 80.
70. Sanghvi-Shah, R. & Weber, G. F. (2017). Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front cell develop biol*, 5 (2), 81.
71. Teng, Y. H. F., Aquino, R. S., & Park, P. W. (2012). Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix biol*, 31(1), 3-16.

72. Nadalin, M. R., Fregnani, E. R., Silva-Sousa, Y. T. C., & Perez, D. E. D. C. (2011). Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in odontogenic cystic lesions. *Brazilian dental j*, 22(3), 223-229.
73. Vainio, S., Jalkanen, M., Vaahtokari, A., Sahlberg, C., Mali, M., Bernfield, M. & Thesleff, I. (1991). Expression of syndecan gene is induced early, is transient, and correlates with changes in mesenchymal cell proliferation during tooth organogenesis. *Develop Biol*, 147(2), 322-333.
74. Saalbach, A., Wetzig, T., Haustein, U. F. & Anderegg, U. (1999). Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. *Cell tissue res*, 298(2), 307-315.
75. Craig, W., Kay, R., Cutler, R. L. & Lansdorp, P. M. (1993). Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med*, 177(5), 1331-1342.
76. Vidal, M., Morris, R., Grosveld, F. & Spanopoulou, E. (1990). Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO j*, 9(3), 833-840.
77. Yang, Z. F., Ho, D. W., Ng, M. N., Lau, C. K., Yu, W. C., Ngai, P. & Fan, S. T. (2008). Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer cell*, 13(2), 153-166.
78. Tang, K. H., Dai, Y. D., Tong, M., Chan, Y. P., Kwan, P. S., Fu, L. & Tong, D. K. (2013). A CD90+ tumor-initiating cell population with an aggressive signature and metastatic capacity in esophageal cancer. *Cancer res*, 73(7), 2322-2332.
79. He, J., Liu, Y., Zhu, T., Zhu, J., DiMeco, F., Vescovi, A. L. & Lubman, D. M. (2012). CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol Cell Prot*, 11(6), M111-010744.

80. Zhu, J., Thakolwiboon, S., Liu, X., Zhang, M. & Lubman, D. M. (2014). Overexpression of CD90 (Thy-1) in pancreatic adenocarcinoma present in the tumor microenvironment. *PloS one*, 9(12), e115507.
81. Wen, H. C., Kao, C., Hsu, R. C., Huo, Y. N., Ting, P. C., Chen, L. C. & Lee, W. S. (2013). Thy-1-induced migration inhibition in vascular endothelial cells through reducing the RhoA activity. *PloS one*, 8(4), e61506.
82. Moraes, D. A., Sibov, T. T., Pavon, L. F., Alvim, P. Q., Bonadio, R. S., Da Silva, J. R. & Oliveira, D. M. (2016). A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem cell res therapy*, 7(1), 97.
83. Alaeddini, M., Etemad-Moghadam, S. & Baghahi, F. (2008). Comparative expression of calretinin in selected odontogenic tumours: a possible relationship to histogenesis. *Histopathol*, 52(3), 299-304.
84. He, D. N., Zhu, H. S., Zhang, K. H., Jin, W. J., Zhu, W. M., Li, N. & Li, J. S. (2004). E-cadherin and calretinin as immunocytochemical markers to differentiate malignant from benign serous effusions. *W J Gastro*, 10(16), 2406.
85. Taliano, R. J., Lu, S., Singh, K., Mangray, S., Tavares, R., Noble, L. & Yakirevich, E. (2013). Calretinin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast is associated with basal-like subtype and unfavorable prognosis. *Hum pathol*, 44(12), 2743-2750.
86. Alexandrescu, S., Rosenberg, H. & Tatevian, N. (2013). Role of calretinin immunohistochemical stain in evaluation of Hirschsprung disease: an institutional experience. *Internat j clinical exp pathol*, 6(12), 2955.

87. Altini, M., Coleman, H., Doglioni, C., Favia, G. & Maiorano, E. (2000). Calretinin expression in ameloblastomas. *Histopathol*, 37(1), 27-32.
88. Oliver, R. J., Woodward, R. T. M., Sloan, P., Thakker, N. S., Stratford, I. J. & Airley, R. E. (2004). Prognostic value of facilitative glucose transporter Glut-1 in oral squamous cell carcinomas treated by surgical resection: results of EORTC Translational Research Fund studies. *Europ J Cancer*, 40(4), 503-507.
89. Baer, S. C., Casaubon, L. & Younes, M. (1997). Expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in cutaneous neoplasia. *J American Academy Dermatol*, 37(4), 575-577.
90. Ayala, F. R. R., Rocha, R. M., Carvalho, K. C., Carvalho, A. L., Da Cunha, I. W., Lourenço, S. V. & Soares, F. A. (2010). GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. *Molec*, 15(4), 2374-2387.
91. Hauptmann, S., Grünewald, V., Molls, d., Schmitt, W. D., Köbel, M., Kriese, K. & Schürmann, A. (2005). Glucose transporter GLUT1 in colorectal adenocarcinoma cell lines is inversely correlated with tumour cell proliferation. *Anticancer res*, 25(5), 3431-3436.
92. Götte, M., Kersting, C., Radke, I., Kiesel, L. & Wülfing, P. (2007). An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res*, 9(1), 8.
93. Bologna-Molina, R., Bedoya-Borella, A. M., Soria-Moreira, L. & Soría-Suárez, S. (2013). Molecular biomarkers of cell proliferation in ameloblastomas. *W J Stomatol*, 2(4), 79-85.
94. Scholzen, T. & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J cell physiol*, 182(3), 311-322.

95. Coșarcă, A. S., Mocan, S. L., Păcurar, M., Fülöp, E. & Ormenișan, A. (2016). The evaluation of Ki67, p53, MCM3 and PCNA immunoexpressions at the level of the dental follicle of impacted teeth, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Romanian j morphol embryol*, 57(2), 407-412.
96. Zhai, Y. & Tye, B. K. (2017). Structure of the MCM2-7 Double Hexamer and Its Implications for the Mechanistic Functions of the Mcm2-7 Complex. *Adv Exp Med Biol*, 1042 (0), 189-205.
97. Malumbres, M. & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature rev cancer*, 9(3), 153.
98. Motokura, T., Bloom, T., Kim, H. G., Jüppner, H., Ruderman, J. V., Kronenberg, H. M. & Arnold, A. (1991). A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*, 350 (6318), 512.
99. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
100. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes develop*, 18(22), 2699-2711.
101. Mishra, R., Nagini, S. & Rana, A. (2015). Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Molec cancer*, 14(1), 20.
102. Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. (2007). Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature Rev Cancer*, 7(10), 750.

103. Thomas, G. R., Nadiminti, H. & Regalado, J. (2005). Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Internat j exp pathol*, 86(6), 347-363.
104. Van Diest, P. J., Michalides, R. J., Jannink, L., Van der Valk, P., Peterse, H. L., De Jong, J. S. & Baak, J. P. (1997). Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *American j pathol*, 150 (2), 705.
105. Shan, Y. S., Hsu, H. P., Lai, M. D., Hung, Y. H., Wang, C. Y., Yen, M. C. & Chen, Y. L. (2017). Cyclin D1 overexpression correlates with poor tumor differentiation and prognosis in gastric cancer. *Oncol letters*, 14(4), 4517-4526.
106. Seifi, S., Shafaie, S. & Ghadiri, S. (2011). Microvessel density in follicular cysts, keratocystic odontogenic tumours and ameloblastomas. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(2), 351-6.
107. Simonetti, O., Lucarini, G., Rubini, C., Goteri, G., Zizzi, A., Staibano, S. & Offidani, A. (2013). Microvessel density and VEGF, HIF-1 α expression in primary oral melanoma: correlation with prognosis. *Oral dis*, 19(6), 620-627.
108. Nielsen, J. S. & McNagny, K. M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *J cell sci*, 121(22), 3683-3692.
109. Tamayo, J. G., Hernández, C. & Novapath, L. D. P. M. (2002). Aplicación del anticuerpo CD34 en el diagnóstico diferencial de los tumores fusocelulares. *Vitae: Academia Bioméd Dig*, 7 (11), 2-32.
110. Lin, C. S., Ning, H., Lin, G. & Lue, T. F. (2012). Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells?. *Cytotherapy*, 14(10), 1159-1163.
111. del Carmen González-Galván, M., Aguirre-Urizar, J. M., Bologna-Molina, R., Farfán-Morales, J. E., Gainza-Cirauqui, M. L., Marichalar-Mendía, X. & Mosqueda-Taylor, A. (2016). Assessment of CD-105 as an Angiogenic

- Modulator in Odontogenic Myxomas and Dental Follicles. *Internat j surgical pathol*, 24(4), 315-319.
112. Baik, J., Borges, L., Magli, A., Thatava, T. & Perlingeiro, R. C. (2012). Effect of endoglin overexpression during embryoid body development. *Exp hematol*, 40(10), 837-846.
113. Dourado, K. M., Baik, J., Oliveira, V. K., Beltrame, M., Yamamoto, A., Theuer, C. P. & Perlingeiro, R. C. (2017). Endoglin: a novel target for therapeutic intervention in acute leukemias revealed in xenograft mouse models. *Blood*, 129(18), 2526-2536.
114. Regezi, J. A. & Sciubba, J. J. (2000). *Patología bucal: correlaciones clinicopatológicas*. 3ra edición, McGraw-Hill / Interamericana de México.
115. Tekkesin, M. S., Mutlu, S. & Olgac, V. (2012). Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turkish J Pathol*, 28(1), 49-55.
116. Naz, I., Mahmood, M. K. & Nagi, A. H. (2015). Expression of Bcl-2 in Primary and Recurrent Odontogenic Keratocysts in Comparison with Other Odontogenic Lesions. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 16(15), 6289-6292.
117. Basu, A. & Haldar, S. (1998). The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol hum repro*, 4(12), 1099-1109.
118. Fukuda, S. & Pelus, L. M. (2006). Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol cancer therap*, 5(5), 1087-1098.

119. Peery, R. C., Liu, J. Y. & Zhang, J. T. (2017). Targeting survivin for therapeutic discovery: past, present, and future promises. *Drug discov today*, 22(10), 1466-1477.
120. Khan, Z., Khan, A. A., Yadav, H., Prasad, G. B. & Bisen, P. S. (2017). Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma. *Cell mol biol letters*, 22(1), 8.
121. Neville BW. (2016) *Oral and Maxillofacial Pathology*. 4a Edición, Elsevier.
122. Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: an overview. *Internat j biochem cell biol*, 29(12), 1305-1312.
123. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. & Aster, J. C. (2014). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition*. 8th edition. Elsevier health sciences.
124. Alarcon-Vargas, D. & Ronai, Z. E. (2002). p53–Mdm2—the affair that never ends. *Carcinogen*, 23(4), 541-547.
125. Bermúdez Brito, M., Goulielmaki, E. & Papakonstanti, E. A. (2015). Focus on PTEN regulation. *Front oncol*, 5 (2), 166.
126. Vivanco, I., Palaskas, N., Tran, C., Finn, S. P., Getz, G., Kennedy, N. J. & Golub, T. (2007). Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN. *Cancer cell*, 11(6), 555-569.
127. Han, F., Zhang, L., Zhou, Y. & Yi, X. (2015). Caveolin-1 regulates cell apoptosis and invasion ability in paclitaxel-induced multidrug-resistant A549 lung cancer cells. *Internat j clinical experiment pathol*, 8(8), 8937.
128. Vered, M., Lehtonen, M., Hotakainen, L., Pirilä, E., Teppo, S., Nyberg, P. & Dayan, D. (2015). Caveolin-1 accumulation in the tongue cancer tumor

- microenvironment is significantly associated with poor prognosis: an in-vivo and in-vitro study. *BMC cancer*, 15(1), 25.
129. Zhao, R., Liu, K., Huang, Z., Wang, J., Pan, Y., Huang, Y. & Hua, L. (2015). Genetic variants in Caveolin-1 and RhoA/ROCK1 are associated with clear cell renal cell carcinoma risk in a Chinese population. *PloS one*, 10(6), e0128771.
130. Brown, N. A., Rolland, D., McHugh, J. B., Weigelin, H. C., Zhao, L., Lim, M. S. & Betz, B. L. (2014). Activating FGFR2–RAS–BRAF mutations in ameloblastoma. *Clinical Cancer Res*, 20(21), 5517-5526.
131. Sweeney, R. T., McClary, A. C., Myers, B. R., Biscocho, J., Neahring, L., Kwei, K. A. & Varma, S. (2014). Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nature gen*, 46(7), 722.
132. Fregnani, E. R., Perez, D. E., Paes de Almeida, O., Fonseca, F. P., Soares, F. A., Castro-Junior, G. & Alves, F. A. (2017). BRAF-V600E expression correlates with ameloblastoma aggressiveness. *Histopathol*, 70(3), 473-484.
133. Arafah, M., Kfoury, H. K. & Zaidi, S. N. (2010). HER2/neu immunostaining in invasive breast cancer: analysis of false positive factors. *Oman med j*, 25(4), 261.
134. López-Verdín, S., Soto-Avila, J. J., Zamora-Perez, A. L., Lalalde-Ramos, B. P., de la Luz Martínez-Fierro, M., González-González, R. & Bologna-Molina, R. (2017). Patients with advanced oral squamous cell carcinoma have high levels of soluble E-cadherin in the saliva. *Med oral, patol oral y cirugia bucal*, 22(6), e694.
135. Bologna, M.R., Damián, M.P. & Molina, F.N. (2011). An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathol*, 59(4), 801-3.

136. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11-24.
137. Pelissier, A., Ouhayoun, J. P., Sawaf, M. H. & Forest, N. (1990). Evolution of cytokeratin expression in developing human tooth germ. *J biol buccale*, 18(2), 99-108.
138. Nakahara, S. & Raz, A. (2007). Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Met Rev*, 26(3-4), 605.
139. Stasikowska-Kanicka, O., Wagrowska-Danilewicz, M. & Danilewicz, M. (2013). Immunohistochemical study on survivin in sinonasal tumors and its relationship with the immunoexpression of Ki67 and Bcl-2. *Folia histochem cytobiol*, 51(3), 225-231.
140. Nagy-Bota, M., Pap, Z., Denes, L., Ghizdavlat, A., Brinzaniuc, K. & Lup Cosarca, A. S. (2014). Immunohistochemical study of Ki67, CD34 and p53 expression in human tooth buds. *Rom J Morphol Embryol*, 55(1), 43-8.
141. Brown, N.A., Rolland, D., McHugh, J.B., Weigelin, H.C., Zhao, L. & Lim, M.S. (2014). Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res*, 20 (2), 5517-26.
142. Bologna-Molina, R., Salazar-Rodríguez, S., Bedoya-Borella, A. M., Carreón-Burciaga, R. G., Tapia-Repetto, G. & Molina-Frechero, N. (2013). A histopathological and immunohistochemical analysis of ameloblastic fibro-dentinoma. *Case rep pathol*, 2013; 2013: 604560.

143. Bast, B. T., Pogrel, M. A. & Regezi, J. A. (2003). The expression of apoptotic proteins and matrix metalloproteinases in odontogenic myxomas1. *J oral maxillo surgery*, 61(12), 1463-1466.
144. Chen, Y., Wang, J.M. & Li, T.J. (2007). Ameloblastic fibroma: a review of published studies with special reference to its nature and biological behavior. *Oral Oncol*, 43(3), 960-9.
145. Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Dominguez-Malagon, H., Salazar-Rodríguez, S., Tapia, G., González-González, R. & Molina-Frechero, N. (2015). Immunolocalization of VEGF-A and orosomucoid-1 in odontogenic myxoma. *Romanian journal of morphology and embryology. Rev roumaine morphol embryol*, 56(2), 465-473.
146. Martinez-Mata, G., Mosqueda-Taylor, A. & Carlos-Bregni, R. (2008). Odontogenic myxoma: clinico-pathological, immunohistochemical and ultrastructural findings of a multicentric series. *Oral Oncol*, 44(2), 601-7.

ANEXOS

- Aprobación del comité de ética.



- 1er Artículo publicado: Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile. Bologna-Molina R1, Mikami T, **Pereira-Prado V**, Pires FR, Carlos-Bregni R, Mosqueda-Taylor A. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017; 1;22(3):e314-e323.

Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2017 May 1;22 (3):e314-23.

Primordial odontogenic tumor

Journal section: *Oral Medicine and Pathology*
 Publication Types: *Research*

doi:10.4317/medoral.21859
<http://dx.doi.org/doi:10.4317/medoral.21859>

Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile

Ronell Bologna-Molina ¹, Toshinari Mikami ², Vanesa Pereira-Prado ¹, Fabio-Ramoa Pires ³, Roman Carlos-Bregni ⁴, Adalberto Mosqueda-Taylor ⁵

¹ Molecular Pathology Area, Faculty of Dentistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

² Associate Professor, Division of Anatomical and Cellular Pathology, Department of Pathology, Iwate Medical University, Iwate, Japan

³ School of Dentistry, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Pathology Section, Head and Neck Clinical Center/Hospital Herrera-Llerandi, Guatemala City, Guatemala

⁵ Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico

- 2do Artículo publicado: Primordial odontogenic tumor: Subepithelial expression of Syndecan-1 and Ki-67 suggests origin during early odontogenesis. Bologna-Molina R, Mikami T, **Pereira-Prado V**, Tapia-Repetto G, Pires FR, Carlos R, Mosqueda-Taylor A. *Oral Dis*. 2018 Mar;24(1-2):72-77.



Received: 24 July 2017 | Revised: 8 August 2017 | Accepted: 9 August 2017

DOI: 10.1111/odi.12733

PROF SCULLY MEMORIAL ISSUE

WILEY **ORAL DISEASES** 

Primordial odontogenic tumor: Subepithelial expression of Syndecan-1 and Ki-67 suggests origin during early odontogenesis

R Bologna-Molina¹  | T Mikami² | V Pereira-Prado¹  | G Tapia-Repetto³ | FR Pires⁴ | R Carlos⁵ | A Mosqueda-Taylor⁶

- 3er Artículo publicado: Pathogenesis of primordial odontogenic tumour based on tumourigenesis and odontogenesis. Mikami T, Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Ogawa I, **Pereira-Prado V**, Fujiwara N, Pires FR, Carlos R, Takata T, Takeda Y. Oral Dis. 2018 Oct;24(7):1226-1234.



Received: 3 May 2018 | Revised: 8 June 2018 | Accepted: 11 June 2018

DOI: 10.1111/odi.12914

ORIGINAL ARTICLE

WILEY **ORAL DISEASES** 

Pathogenesis of primordial odontogenic tumour based on tumourigenesis and odontogenesis

Toshinari Mikami¹  | Ronell Bologna-Molina²  | Adalberto Mosqueda-Taylor³ | Ikuko Ogawa⁴ | Vanesa Pereira-Prado² | Naoki Fujiwara⁵ | Fabio Ramoa Pires⁶ | Roman Carlos⁷ | Takashi Takata⁸ | Yasunori Takeda⁹

- 4to Artículo publicado: Pereira-Prado, V., Vigil-Bastitta, G., Sicco, E., Bologna-Molina, R., & Tapia-Repetto, G. (2018). Estudio de la proliferación celular en gérmenes dentarios humanos. Odontoestomatología, 20(32).

Estudio de la proliferación celular en gérmenes dentarios humanos

Cell proliferation study in human tooth germs

Vanesa Pereira-Prado¹, Gabriela Vigil-Bastitta², Estefania Sicco³, Ronell Bologna-Molina⁴, Gabriel Tapia-Repetto⁵

DOI: 10.22592/ode2018n32a10

“If you are not willing to learn, no one can help you.

If you are determined to learn, no one can stop you”

Journal section: *Oral Medicine and Pathology*
 Publication Types: *Research*

doi:10.4317/medoral.21859
<http://dx.doi.org/doi:10.4317/medoral.21859>

Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile

Ronell Bologna-Molina ¹, Toshinari Mikami ², Vanesa Pereira-Prado ¹, Fabio-Ramoa Pires ³, Roman Carlos-Bregni ⁴, Adalberto Mosqueda-Taylor ⁵

¹ Molecular Pathology Area, Faculty of Dentistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

² Associate Professor, Division of Anatomical and Cellular Pathology, Department of Pathology, Iwate Medical University, Iwate, Japan

³ School of Dentistry, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Pathology Section, Head and Neck Clinical Center/Hospital Herrera-Llerandi, Guatemala City, Guatemala

⁵ Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico

Correspondence:

Health Care Department
 Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco
 Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud
 Mexico City 04960
mosqueda@correo.xoc.uam.mx

Bologna-Molina R, Mikami T, Pereira-Prado V, Pires FR, Carlos-Bregni R, Mosqueda-Taylor A. **Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile.** *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017 May 1;22 (3):e314-23.
<http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v22i3/medoralv22i3p314.pdf>

Received: 13/02/2017
 Accepted: 15/03/2017

Article Number: 21859 <http://www.medicinaoral.com/>
 © Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - pISSN 1698-4447 - eISSN: 1698-6946
 eMail: medicina@medicinaoral.com
Indexed in:
 Science Citation Index Expanded
 Journal Citation Reports
 Index Medicus, MEDLINE, PubMed
 Scopus, Embase and Emcare
 Indice Médico Español

Abstract

Background: Primordial Odontogenic Tumor (POT) is a recently described odontogenic tumor characterized by a variably cellular loose fibrous tissue with areas similar to the dental papilla, covered by cuboidal to columnar epithelium that resembles the internal epithelium of the enamel organ, surrounded at least partly by a delicate fibrous capsule. The purpose of this study was to investigate the possible histogenesis and biological behavior of this rare tumor by means of a wide immunohistochemical analysis of its epithelial and mesenchymal components.

Material and Methods: The immunoeexpression of twenty-three different antibodies were evaluated in four cases of POT.

Results: The epithelial cells that cover the periphery of the tumor showed immunopositivity for Cytokeratins 14 and 19, while Amelogenin, Glut-1, MOC-31, Caveolin-1, Galectin-3, PITX2, p53, Bax, Bcl-2, Survivin and PTEN were variably expressed in focal areas. The mesenchymal component of the tumor was positive for Vimentin, Syndecan-1, PITX2, Endoglin (CD105), CD 34, Cyclin D1, Bax, Bcl-2, Survivin and p53. PTEN and CD 90 showed a moderate positivity. BRAF V600E and Calretinin were negative in all samples. Cell proliferation markers (Ki-67, MCM-7) were expressed in <5% of the tumor cells.

Conclusions: According to these immunohistochemical findings, we may conclude that POT is a benign odontogenic tumor in which there is both epithelial and mesenchymal activity during its histogenesis, as there is expression of certain components in particular zones in both tissues that suggests this tumor develops during the immature (primordial) stage of tooth development, leading to its inclusion within the group of benign mixed epithelial and mesenchymal odontogenic tumours in the current World Health Organization classification of these lesions.

Key words: *Immunohistochemistry, jaw tumors, odontogenic, primordial.*

Introduction

Odontogenic tumors derive from the tooth-producing tissues or its remnants, which are entrapped either within the jawbones or in the adjacent soft tissues. Biologically, some of these lesions are hamartomas that show varying degrees of differentiation, while the others comprise both benign and malignant neoplasms exhibiting variable aggressiveness and potential for metastasis (1). In 2014, our group reported for the first time an odontogenic tumor characterized by a variably cellular loose fibrous tissue with areas similar to the dental papilla, entirely surrounded by cuboidal to columnar epithelium that resembles the internal epithelium of the enamel organ and covered at least partly by a delicate fibrous capsule. The fact that the epithelium is located peripherally recalls the relationship between the immature inner enamel epithelium and the primitive dental papilla at a time when no inductive ecto-mesenchymal effects have occurred, and then it mimics the primordial stages of tooth development, apparently lacking the ability to follow a normal inductive evolution to produce the subsequent stages histo and morpho-differentiation of the dental tissues. This is the reason why we proposed the name “Primordial Odontogenic Tumor” (POT) as a descriptive term for this entity (2).

To date, seven cases of POT have been reported in the literature, all of which were found as well-defined radiolucent lesions adjacent to the crown of an unerupted tooth, producing varying degrees of bone expansion, root resorption and displacement of adjacent teeth, and macroscopically appeared as whitish solid tumors that tended to be encapsulated or at least well-defined from the surrounding structures (2,3).

The aim of this study was to better characterize POT both histopathologically and immunohistochemically, through the use of a large panel of antibodies. A further objective was to discuss the possible implications or functions held by each of the analyzed proteins in order to elucidate the possible histogenesis and biological behavior of this rare tumor.

Material and Methods

Four cases of POT retrieved from three different Centers of Oral Pathology in Latin America (Two from Mexico, one from Brazil and one from Guatemala) were included in the present study. All of them belong to the series of six cases originally published by our group in 2014 (2). New immunohistochemical studies were performed with a panel of 23 different antibodies.

Paraffin blocks were cut and three- μ m sections were set on glass slides previously treated with poly-lysine; we then proceeded to deparaffinize and rehydrate the slides and to perform antigen retrieval through treatment with 0.1 M sodium citrate (pH 6.2) and Tween 20 in microwave to unmask the epitopes. Endogenous

peroxidases were blocked with 0.9% hydrogen peroxide. Primary antibodies for Amelogenin, CK19, CK 14, Vimentin, Calretinin, Syndecan-1, Glut-1, Galectin-3, Ki-67, MCM-7, Cyclin D1, PTEN, p-53, PITX2, Caveolin-1, BRAFV600E, Epithelial Related Antigen (MOC-31), CD-34, Endoglin (CD105), CD-90, Bax, Bcl-2 and Survivin were incubated for 45 min (Table 1). Afterwards the slides were incubated with a biotinylated anti-mouse/anti-rabbit antibody and the streptavidin/ peroxidase complex for 30 minutes each (LSAB β -labeled streptavidin-biotin, Dako). To visualize the reaction a 3,3'-diaminobenzidine-H₂O (Dako) substrate was used. Finally, the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin solution. For the negative controls, the primary antibody was replaced with PBS.

For the cytoplasmic and/or membranous positivity the quantification was performed visually using an optical microscope (Eclipse Ci-L, Nikon, Japan) within 10 high-power fields/slide at the 40X objective amplification according to the following semi-quantitative scale. A score of 0 (“essentially no staining”) was established for negative or positive immunohistochemical staining of < 5% of the cells; + (“weak-moderate”) for staining of 5 to 50% of cells, and ++ (“strong positive”) for >50% positive staining. When the positivity was in the nucleus, the cell counts were performed as previously described by Bologna-Molina R, *et al.* (4). The labeling index (number of positive tumor cells/total number of tumor cells expressed as a percentage) was calculated in every case. The cell count was performed both in the mesenchymal component of the tumor and on the epithelial component surrounding each lesion. Two different oral pathologists assessed the immunohistochemical expression individually before reaching a consensus. The standardization of the examiners showed a kappa index of 0.90.

Results

The clinical data of the four cases, including sex, age, location, clinical and radiographic findings, treatment and follow-up were described in our previous work (2) and are summarized in table 2.

The immunohistochemical findings show that the mesenchymal component of the tumor was positive in the fusocellular cells for Vimentin, Syndecan-1, PITX2, Bax, Bcl-2, Survivin and p53. Syndecan-1 positivity was also observed in the extracellular matrix. CD-34 and CD-105 (Endoglin) were variably positive in blood vessels, while PTEN and CD 90 showed weak-moderate positivity (see Table 1 and Figs. 1-3). The epithelial cells that surround the periphery of the tumor were positive for CK 14 and in most areas also for CK19, Amelogenin, Glut-1, Epithelial Related Antigen (MOC-31) and Caveolin-1. Galectin-3, PITX2, p53, Bax, Bcl-2, Survivin and PTEN were variably expressed. On the other hand,

Table 1: Immunoeexpression of the 23 studied antigens in the epithelial and mesenchymal cells of POT samples.

Antibody	Source/clone	Dilution	Epithelial cells	Mesenchymal cells
Amelogenin	Santa Cruz/F-11	1 : 100	+	Neg
CK19	Genetex/polyclonal	1 : 100	++	Neg
CK 14	Biocare/LL002	1:100	++	Neg
Vimentin	DAKO/V 9	1:100	+	++
Calretinin	DAKO/DAK-CALERET 1	1 : 100	Neg	Neg
Syndecan-1 (CD138)	DAKO/MI15	1 : 100	Neg	++
Glut-1	GeneTex/E107	1 : 100	++	Neg
Galectin-3	Bio SB/9C4	1:50	+	Neg
Ki-67	DAKO/MIB1	1 : 100	<2%	<5%
MCM-7	Leica/ DCS-141.1	1:100	<1%	<1%
Cyclin D1	DAKO/DCS-6	1:50	<5 %.	<5 %.
p-53	Bio SB/D07	1:200	+	+
PITX2	Abcam/ab32832	1:50	+	+
Caveolin-1	Santa Cruz/polyclonal	1:100	+	Neg
BRAFV600E	Bio SB/RM8	1:100	Neg	Neg
Epithelial Related Antigen (MOC-31)	DAKO/MOC-31	1:50	+	Neg
CD-34	Biocare/QBEnd10	1:100	Neg	++ (Vessels)
Endoglin (CD105)	DAKO/SN6h	1:100	Neg	+(Vessels)
Bcl-2	Biocare/100/D5	1:100	+	+
Bax	GeneTex/polyclonal	1:200	+	+
Survivin	GeneTex/polyclonal	1:200	+	+
CD90	STEMCELL/5E10	1:100	Neg	+
PTEN	Santa Cruz	1:100	+	Neg

Neg: negative, +: weak-moderate, ++: strong positive.

BRAF V600E and Calretinin were negative in both the mesenchyme and the epithelium.

Discussion

This study widely describes the immunohistochemical profile of POT. The selected markers provide new and valuable information for a better understanding of the possible histogenesis and biological behavior of this entity. Previous studies have demonstrated that im-

munoeexpression patterns of CKs during odontogenesis vary with respect to specific cell types, as well as to the diverse developmental stages and the degree of differentiation of the epithelium (5). Although several CKs are expressed in the epithelial cells of the tooth germ (6), CK 14 is the one that seems to be present constantly in all stages of tooth development and in most neoplastic epithelial cells in odontogenic tumors (7-9), in contrast to CK 19, which increases its expression once the inner

epithelial cells become potential ameloblasts (8). On the other hand, immunostaining of amelogenin in young or immature enamel matrix areas occurs in around 95% of the enamel protein. This protein, which is synthesized in young ameloblasts, is secreted into enamel matrix (10) and is gradually almost entirely removed by degradation by extracellular enzymes during enamel maturation

(11). The presence of CK 19 and CK14 as well as the observed immunopositivity for Amelogenin in the epithelium of our cases of POT is a supporting evidence of an odontogenic origin of this tumor (Figs. 1a-c). It is interesting to note that both Amelogenin and CK 19 did not exhibit a uniform expression in all epithelial cells, as these predominated in the cubic and columnar cells

Table 2: Clinico-pathological and radiographic features of 4 cases of Primordial Odontogenic Tumour

Case	Age (y)/ Gender	Location	Clinical findings	Radiographic findings	Treatment	Follow-up
1	18/M	Left posterior mandible	Asymptomatic buccal swelling 6 mo. evolution	RL, UL, well defined, enclosing the crown of third molar. Root resorption of second molar	Enucleation together with embedded third molar	20 yr.
2	13/F	Left posterior mandible	Asymptomatic buccal swelling. 4 mo. evolution	RL, biloculated well defined, enclosing the third molar. Root resorption of second molar	Enucleation with third molar and extraction of first and second molars	3 yr. NED
3	3/F	Left posterior mandible from first deciduous molar up to the entire ascending ramus.	Asymptomatic buccal and lingual bony expansion. 22 mo. evolution	RL, biloculated well defined 9 x 7 cm, enclosing the crowns of second deciduous and first permanent molars. Root resorption of first deciduous molar	Enucleation together with first and second deciduous molars and tooth 19	9 yr. NED
4	3 y 6mo/F	Left posterior maxilla from first deciduous molar up to the floor of maxillary sinus and tuberosity	Asymptomatic buccal and palatal bony swelling. 3 mo. evolution	RL, UL, well defined 3.5 x 3 cm, displacing second deciduous and first permanent molars	Enucleation together with second deciduous and first permanent molars	6 mo.

RL: Radiolucent; UL: Umbilical; LFU: Lost to follow-up; NED: No evidence of disease.

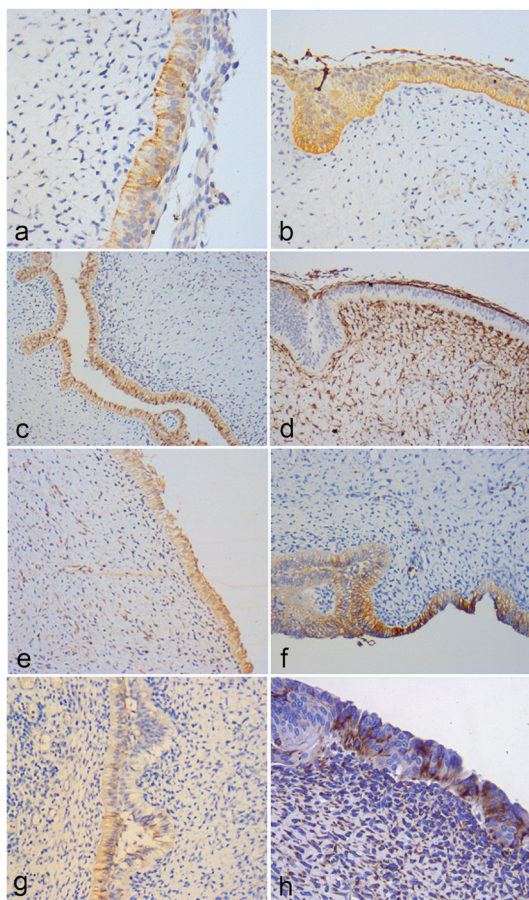


Fig. 1: (a) The epithelium shows variable expression of CK19, 400X. (b) Expression of CK 14 was constant throughout the epithelium, 200X. (c) Expression of Amelogenin in the cubic and columnar cells, 200X. (d) Syndecan-1 is intensely expressed in the mesenchyme, but not in all the epithelial lining, 200X. (e) PITX2 positivity in focal areas, 400X. (f) Expression of GLUT-1 in the odontogenic epithelium, 200X. (g) MOC-31 was only found expressed in localized areas within the epithelium, 200X. (h) Some epithelial cells showed positivity for vimentin, 400X.

showing inverse polarization (pre-ameloblasts), which suggests that this epithelial lining express diverse degrees of maturation, supporting an origin from primitive (primordial) cellular components of the enamel organ (Figs. 1a-c). This observation is also reinforced by the fact that some areas of the tumor epithelium showed focal positivity to vimentin (Fig. 1h).

MOC-31 is an epithelial-related antigen expressed in most normal epithelia but also in tumors originating from epithelial tissues. This is a cell adhesion molecule that allows tight junction formation between epithelial cells, which can negatively affect cadherin/catenin complex formation (12). MOC-31 has been proved to be an advantageous marker at signaling epithelial cell differentiation. Reduced expression of MOC-31 has been correlated with poor survival in cancerous conditions. It could be related to differentiation, tumor proliferation

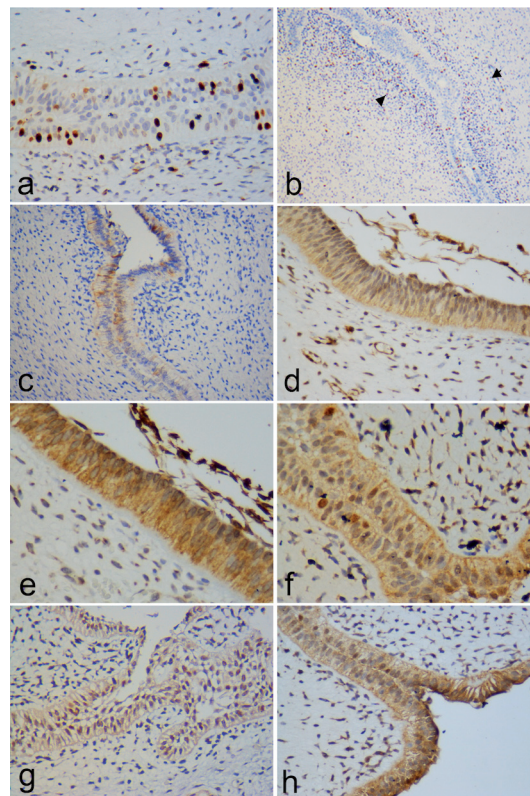


Fig. 2: (a) Expression of Ki-67 in epithelial cells; 400x, (b) significantly higher proliferative index within the cells in the subepithelial mesenchymal condensation (arrow) as compared to that found in other mesenchymal areas of the tumor; 200X. (c) Expression of Galectin-3 in epithelial cells; 100X. (d,e,f) Bax, Bcl-2 and Survivin expression; 400X. (g) p53 was found both in the mesenchymal component and in the surrounding epithelium; 400X. (h) Cyclin D1 expression; 400X.

and invasion (13,14). This molecule was found only expressed in localized areas within the epithelium of the studied POT cases (Fig. 1g), suggesting, as seen for CK 19, Vimentin and Amelogenin, that there is a variable degree of differentiation and maturation of the cells that comprises the epithelial compartment.

As a member of the family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans, Syndecan-1 (CD138) is involved in cell to cell adhesion and in the interaction of cells with the extracellular matrix, and also participates in promoting cell proliferation and regulates cellular growth by interacting with families of growth factors in association with heparin (15). Syndecan-1 plays a role in epithelial maturation, and it has been consistently observed that the degree of epithelial differentiation is directly associated with its expression (16). In addition, it has been reported that the pattern of Syndecan-1 expression varies according to the stage of maturation of the epithelial tissues (17). In this respect, it is relevant to highlight the fact that in all cases of POT included in this study, there were different degrees of Syndecan-1

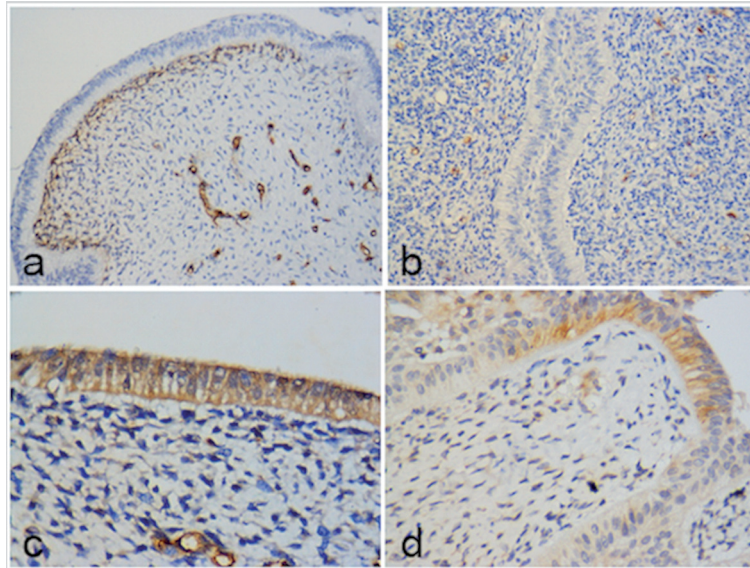


Fig. 3: (a) Strong CD34 positivity in mesenchymal cells located in contact or closer to the odontogenic epithelium and in blood vessels; 200X. (b) CD 105 mainly expressed in blood vessels located in the areas of greater condensation of mesenchymal cells, particularly in the subepithelial region, thus signaling neoangiogenesis activity in this tumoral area; 200X. (c) Expression of CAV-1 in odontogenic epithelium; 400X (d) Slight expression of PTEN in focal areas of the epithelium; 400X.

expression in the tumoral epithelium, ranging from entirely negative areas to focally positive zones (Fig. 1d). This suggests that there are groups of epithelial cells with different degrees of maturation within the epithelial compartment of this tumor, which coincides with the differences in expression observed with MOC-31, CK19 and amelogenin. On the other hand, it was also noted a strong stromal expression of Syndecan-1 in areas of mesenchymal condensation (papilla-like tissue), particularly in the subepithelial regions (Fig. 1d). Vaino *et al.* reported that Syndecan RNA accumulates in the condensing mesenchymal cells around the invaginating epithelial tooth bud during early development, and this accumulation is more intense when morphogenesis advances towards the cap stage, and also that Syndecan expression is lost during the bell stage (18). The same group found that Syndecan-1 was intensely expressed in the mesenchyme, but not in the epithelium, by proliferating cells during the process of odontogenesis, suggesting a possible interaction of these tissues with growth factors (Fig. 1d) (19). These facts led us to consider that this lesion mimics the early (primordial) stages of tooth development.

PITX2 is selectively expressed in the early stages of morphogenesis in oral ectoderm and epithelial cells. Fine-tuned molecular signaling between the oral epithelium and the ectomesenchyme is involved in tooth development and it is considered a marker for the initiation of dental development (20,21). In vitro studies in human and mouse cells have shown that a mesenchymal signal

is required to maintain PITX2 expression in the epithelium throughout tooth development (22). In the present study we found weak immunostaining for PITX2 in the fusiform mesenchymal cells in the four cases of POT, whereas the endothelial cells presented weak to moderate positivity (Fig. 1e). On the other hand, epithelial cells showed moderate positivity in focal areas (Figure 1e). According to Mucchielli *et al.* (22), PITX2 expression occurs in the area of the presumptive dental lamina, remaining as a marker for dental epithelium throughout morphogenesis until it is downregulated in differentiated ameloblasts. The presence of this transcription factor, at least focally in the tumoral epithelium, also lend support to the hypothesis that this tumor derives from the early stages of dental morphogenesis and that the epithelial components express different stages of tooth development.

In mammalian cells, glucose is fundamental for metabolism. A family of transporters, called glucose transporters or Gluts, mediates its passage across cell membranes. Glucose Transporter Glut-1 is found in normal cells, such as erythrocytes and endothelium at the blood-brain barrier in perineural cells, and in the basal layer of oral epithelium and epidermis. Conditions in which the metabolic rate must be adjusted can induce increased glucose transport via Glut-1. Examples of such conditions are cell division, differentiation, nutrient starvation and hypoxia, which are frequently found in embryological tissues and in those with malignant transformation (23). Glut-1 is also expressed in odontogenic tumors, and it

has been observed increased in ameloblastomas and ameloblastic carcinomas as compared to tooth germs, which suggests its overexpression may play an important role in the aggressive behavior of these neoplasms (24). In the present study we found a strong expression of this glucose transporter in odontogenic epithelium, showing both cytoplasmic and membranous localization (Figure 1f), which correlates well with the fact that the pattern of Glut-1 expression changes from strong cytoplasmic expression to membranous expression during maturation of the enamel organ in the late bell stage (24). The strong expression of this protein in the epithelium of POT indicates the existence of high glucose transport requirements in this pathological condition. On the other hand, the cytoplasmic and membranous expression also suggests the co-existence of different stages of maturation in this epithelium.

In order to quantify the proliferative activity of the tumor we used markers associated to cell proliferation and factors related to cell cycles, such as Ki-67, MCM7 and Cyclin D1, which revealed that the tumor presents a low rate of proliferation (< 5%) in both epithelial and mesenchymal cells (Fig. 2a,b), similar to that reported for other benign odontogenic tumors, such as the odontogenic myxoma (25). Additionally, it is important to highlight the fact that there was a significantly higher proliferative index among the cells located within the subepithelial mesenchymal condensation as compared to that found in other mesenchymal areas of the tumor (Fig. 2b). This may imply that the tumor shows more active growth in this specific area, and perhaps it may be related to the inductive ability of that part of the mesenchyme to modify the overlying epithelium.

Galectin-3, a lectin involved in diverse biological events including embryogenesis, cell adhesion, proliferation, apoptosis, mRNA splicing and regulation of the immune system (26), is widely present in human tissues. Changes in Galectin-3 expression and its subcellular and intercellular localization are commonly observed in cancer and precancerous conditions (27). While a general shift of galectin-3 localization from nucleus to cytoplasm occurs in cancer development from adenoma to carcinoma and also this protein plays an important pivotal role within the nucleus in the regulation of cancer-related gene expression (27), including Cyclin D1, its expression in POT in this study was exclusively found in the epithelial component, mainly in the cytoplasm (yet some cells showed immunopositivity in the nucleus) (Figs. 2c,h), suggesting a possible role in cell proliferation. As occurred with other immunomarkers, there were areas in the epithelium that were completely negative and some which showed clear expression (Fig. 2c). Nakahara *et al.* (28) have suggested that overexpression of intracellular galectin-3 favors neoplastic transformation, cell cycle progression and inhibition of

apoptosis, but the exact significance of our findings remains to be elucidated.

The range of survival or cellular death is determined by the relationship between Bcl-2 (an apoptosis inhibitor) and Bax (an apoptosis promoter). In addition, Survivin is an antiapoptotic protein that leads to negative regulation of apoptosis by inhibiting caspase activation (29). When Bax predominates over Bcl-2, the activity of Bcl-2 is repressed and the apoptotic pathway of Bax is activated (30). In this study Bcl-2, Survivin and Bax manifested strong positivity in both mesenchymal and epithelial cells of POT (Figs. 2d,e,f). The expression of Bax, Survivin and Bcl-2 was similar, with slightly greater presence of the antiapoptotic proteins; however, the results of this study does not allow us to conclude that the overexpression of antiapoptotic proteins play an important role as growth mechanism of POT, as it has been suggested for other odontogenic neoplasms (31). It is interesting to note that nuclear immunopositivity of Survivin was detected in some areas of the epithelium (Fig. 2f), which according to Stasikowska-Kanicka *et al.* (32), fosters cell proliferation, while its cytoplasmic immunopositivity is involved in the mechanisms of apoptosis regulation. On the other hand, both Bcl-2 and Bax participate as transcriptional targets for p53, a tumor suppressor protein, which brings about cell cycle arrest or apoptosis in response to DNA damage. The coordinate activity of these molecules is vital in order to control life and death of a cell (33). A weak to moderate expression of p53 was found both in the mesenchymal component and in the surrounding epithelium in our cases (Fig. 2g), which is evidence that this protein participates as part of the regulation of this tissue.

Blood supply is required for tumor growth, to provide the oxygen, metabolites and growth factors necessary for cell proliferation. Blood vessels feeding the tumor were identified by means of CD34 and Endoglin (CD-105) expression, demonstrating strong positivity for CD34 in all the endothelial cells, whereas CD 105 marked a smaller number of blood vessels (Figs. 3a,b). This situation may be explained by the fact that CD-105 expression, contrary to CD34, is a characteristic property of newly formed blood vessels and not of previously-existing blood and lymphatic vessels (34). CD 105 in POT was found mainly in blood vessels located in the areas of greater condensation of mesenchymal cells, particularly in the subepithelial region, thus signaling neoangiogenesis activity in this tumoral area (Fig. 3b), which agrees with our previous suggestion that the tumor has a greater growth rate in this area. In this recently recognized tumoral entity we found that CD34 showed immunopositive areas not only in the mesenchymal vessels, but also in the mesenchymal cells located in contact or closer to the odontogenic epithelium (Fig. 3a). CD34 is known to be a marker for hematopoietic stem

cells, and hematopoietic progenitor cells (35), but also it is regarded as a marker of several other nonhematopoietic cell types, including vascular endothelial progenitors and embryonic fibroblasts (36,37), and therefore we consider that its positivity in this area could indicate the presence of embryonic fibroblasts (38,39).

CD90 has been established as a marker for a wide variety of human cell-stem types, and particularly mesenchymal stem cells. It is considered to be a vital regulator, critical at cell-cell and cell-matrix interactions. It takes part in cellular migration and fibrosis, both of which are important events for tissue regeneration and oncogenesis (40). Its expression in tumor stroma, especially in endothelial and mesenchymal stem cells, including tumor-associated fibroblasts, appears to be an influential agent in disease progression (41). Stromal expression of CD90 in our POT cases was found in blood vessels and in some mesenchymal cells, particularly in those in close proximity to epithelial odontogenic cells, which led us to suggest that CD90 expression in POT could play an important role in cellular adhesion and migration, serving as an important regulator of cell-matrix interactions for determining the biological behavior of this tumor.

Expression of Caveolin-1 (Cav-1) was reported by Schwab *et al.* (42) in epithelial and mesenchymal cells of tooth germ in various stages of development, particularly in the inner enamel epithelium and ameloblastic cells in developing tooth germ (42), and it has also been established that Cav-1 participates in oncogenic transformation and differentiation in oral squamous cell carcinoma and prostate cancer (43,44). Regarding its tumor promoting function, higher expression of Cav-1 drives into tumorigenesis by inhibiting apoptosis (44). The variable expression that we found within the epithelial component of POT (Fig. 3c) could suggest different stages of cellular differentiation within the odontogenic epithelium covering the lesion, implying that positive cells are the transformed cells of this particular type of tumor.

PTEN gene, which in humans encodes the protein phosphatase and tensin homolog, (PTEN), was identified as a tumor suppressor gene that mutates with a high frequency in a large number of cancerous condition. Reduced expression of PTEN has also been reported in some oral cancers, in studies that suggest PTEN plays an important role at signaling pathways in the carcinogenesis of head and neck squamous cell carcinoma (45). In our study, we observed only a slight expression of PTEN in focal areas of the epithelium (Fig. 3d), reinforcing the hypothesis of the existence of cells with different stages of development within the epithelial compartment.

Recently, dysregulation of the MAPK pathway signaling have been proved as a critical step in the pathogenesis of ameloblastoma. The mutation most frequently identified is BRAF V600E. (46). To date, BRAF V600E

mutations have been identified also in ameloblastic fibromas (2/2) and fibrodentinomas (1/1), as well as in ameloblastic carcinomas (3/8) and clear cell odontogenic carcinomas (1/1), but not in other odontogenic tumors (47,48). In our POT cases, we did not find the presence of the mutant protein BRAFV600E, and the absence of this mutation positions POT in a different category with respect to the ameloblastic lesions.

According to the variable extent of expression of the diverse proteins tested in this study, we may conclude that POT has a low proliferative index, which defines it as a slowly growing lesion with variable production of loose fibrous tissue in which cell proliferation does not seem to be the only growth mechanism implicated in its expansion. POT is a moderately vascularized tumor, in which there is greater vascular density and vascular neof ormation in the mesenchyme located just below the epithelium, an area that also shows greater expression of Syndecan 1, CD 34, Ki-67 and Glut-1, indicating that this is the area with the greatest proliferative activity and in which the necessary elements for the development of the tumor converge. In addition, there is some evidence of an increase of antiapoptotic activity that may participate in the growth of this tumoral entity. The uneven expression of CK19, Vimentin, Amelogenin, Syndecan-1, CAV 1, Glut-1 1, MOC-31 and PITX2 in the surrounding epithelium could be interpreted as that there are groups of cells in different stages of development within an apparently unique epithelial structure. This situation leads us to speculate that the epithelial compartment of POT is not a uniform or static structure in odontogenesis, but that it expresses the transition between the earliest stages of tooth development and those in which ameloblastic maturation is present, but before having the potential for induction of odontoblastic differentiation or the production of mineralized tissues, supporting the denomination of "primordial" for this unique entity. The absence of identifiable BRAF V600E mutant protein suggest that mutation of BRAF gene is not implicated in the pathogenesis of POT, and may confirm that this tumor does not belong to the category of those BRAF-mutant positive ameloblastic tumors.

Considering and putting together all these immunohistochemical findings, we interpret that the lesion studied is an odontogenic tumor of benign behavior that possibly originates from the mesenchyme of an abortive tooth germ that fails to produce a dental organ. Given the rarity of this tumor and the small number of cases reported to date, it is necessary to collect new cases in order to obtain a larger sample, towards a better understanding of the histogenesis and tumoral behavior of this condition.

References

1. Mosqueda-Taylor A. New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13:555-8.



2. Mosqueda-Taylor A, Pires FR, Aguirre-Urizar JM, Carlos-Bregni R, de la Piedra-Garza JM, Martínez-Conde R, et al. Primordial odontogenic tumour: clinicopathological analysis of six cases of a previously undescribed entity. *Histopathology*. 2014;65:606-12.
3. Slater LJ, Eftimie LF, Herford AS. Primordial Odontogenic Tumor: Report of a Case. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016;74:547-51.
4. Bologna-Molina R, Damián-Matsumura P, Molina-Frechero N. An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology*. 2011;59:801-3.
5. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982;31:11-24.
6. Pelissier A, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Evolution of cytokeratin expression in developing human tooth germ. *J Biolog Buccale*. 1990;18:99-108.
7. Heikinheimo K, Hormia M, Stenman G, Virtanen I, Happonen RP. Patterns of expression of intermediate filaments in ameloblastoma and human fetal tooth germ. *J Oral Pathol Med*. 1989;18:264-73.
8. Crivelini MM, de Araújo VC, de Sousa SOM, de Araújo NS. Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms. *Oral Dis*. 2003;9:1-6.
9. Kumamoto H, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of amelogenin and cytokeratin 19 in epithelial odontogenic tumors. *Oral Dis*. 2001;7:171-6.
10. Mori M, Yamada K, Kasai T, Yamada T, Shimokawa H, Sasaki S. Immunohistochemical expression of amelogenins in odontogenic epithelial tumours and cysts. *Virchows Arch*. 1991;418:319-25.
11. Zalzal SF, Smith CE, Nanci A. Ameloblastin and amelogenin share a common secretory pathway and are co-secreted during enamel formation. *Matrix Biol*. 2008;27:352-9.
12. Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, et al. Epithelial cell adhesion molecule (ep-cam) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol*. 1997;139:1337-48.
13. Ordóñez NG. Value of the MOC-31 monoclonal antibody in differentiating epithelial pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 1998;29:166-9.
14. Wang A, Ramjeesingh R, Chen CH, Hurlbut D, Hammad N, Mulligan LM, et al. Reduction in membranous immunohistochemical staining for the intracellular domain of epithelial cell adhesion molecule correlates with poor patient outcome in primary colorectal adenocarcinoma. *Curr Oncol*. 2016;23:171-8.
15. Bologna-Molina R, González-González R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Damián-Matsumura P, Domínguez-Malagón H. Expression of Syndecan-1 in Papillary Carcinoma of the Thyroid with Extracapsular Invasion. *Arch Med Res*. 2010;401:33-7.
16. Trautman MS, Kimelman J, Bernfield M. Developmental expression of syndecan, an integral membrane proteoglycan, correlates with cell differentiation. *Develop*. 1991;111:213-20.
17. Hayashi K, Hayashi M, Jalkanen M, Firestone JH, Trelstad RL, Bernfield M. Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues. A light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem*. 1987;35:1079-88.
18. Vainio S, Jalkanen M, Vaahtokari A, Sahlberg C, Mali M, Bernfield M, et al. Expression of syndecan gene is induced early, is transient, and correlates with changes in mesenchymal cell proliferation during tooth organogenesis. *Dev Biol*. 1991;147:322-33.
19. Elenius K, Salmivirta M, Inki P, Mali M, Jalkanen M. Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins. *J Biol Chem*. 1990;265:17837-43.
20. Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, et al. Identification of a Wnt/Dvl/beta-catenin PITX2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*. 2002;111:673-85.
21. Wang Y, Li L, Zheng Y, Yuan G, Yang G, He F, et al. BMP activity is required for tooth development from the lamina to bud stage. *J Dent Res*. 2012;91:690-5.
22. Mucchielli ML, Mitsiadis TA, Raffo S, Brunet JF, Proust JP, Goridis C. Mouse Otlx2/RIEG expression in the odontogenic epithelium precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signals for its maintenance. *Dev Biol*. 1997;189:275-84.
23. Gordon N, Newton RW. Glucose transporter type1 (GLUT-1) deficiency. *Brain Dev*. 2003;25:477-80.
24. Sánchez-Romero C, Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Almeida OP. Immunohistochemical Expression of GLUT-1 and HIF-1 α in Tooth Germ, Ameloblastoma, and Ameloblastic Carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2016;24:410-8.
25. Martínez-Mata G, Mosqueda-Taylor A, Carlos-Bregni R, de Almeida OP, Contreras-Vidaurre E, Vargas PA, et al. Odontogenic myxoma: clinico-pathological, immunohistochemical and ultrastructural findings of a multicentric series. *Oral Oncol*. 2008;44:601-7.
26. Newlaczyl AU, Yu LG. Galectin-3—a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett*. 2011;313:123-8.
27. Tuğçe C. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: a review of the literature. *Türk Patoloji Dergisi*. 2012;28:1-10.
28. Nakahara S, Raz A. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Met Rev*. 2007;26:605-10.
29. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:1087-98.
30. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:2941-53.
31. Bast BT, Pogrel MA, Regezi JA. The expression of apoptotic proteins and matrix metalloproteinases in odontogenic myxomas. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61:1463-6.
32. Stasikowska-Kanicka O, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Immunohistochemical study on survivin in sinonasal tumors and its relationship with the immunoeexpression of Ki67 and Bcl-2. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013;51:225-31.
33. Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl-2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod*. 1998;4:1099-109.
34. Del Carmen González-Galván M, Aguirre-Urizar JM, Bologna-Molina R, Farfán-Morales JE, Gainza-Cirauqui ML, Marichalar-Mendia X, et al. Assessment of CD-105 as an Angiogenic Modulator in Odontogenic Myxomas and Dental Follicles. *Int J Surg Pathol*. 2016;24:315-9.
35. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 1990;75:2417-26.
36. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014;32:1380-9.
37. Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*. 1991;3:175-84.
38. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci*. 2008;121:3683-92.
39. Lin CS, Ning H, Lin G. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*. 2012;14:1159-63.
40. Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*. 2006;20:1045-54.
41. Silva FP, Dias A, Coelho CA, Guerra EN, Marques AE, Decurcio DA, et al. Expression of CD90 and P75NTR stem cell markers in ameloblastomas: a possible role in their biological behavior. *Braz Oral Res*. 2016;30:109.
42. Schwab W, Harada H, Goetz W, Nowicki M, Witt M, Kasper M, et al. Immunocytochemical and biochemical detection of EMMPRIN in the rat tooth germ: Differentiation-dependent co-expression with MMPs and co-localization with caveolin-1 in membrane rafts of dental epithelial cells. *Histochem Cell Biol*. 2007;128:195-203.
43. Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer and metastasis. *Am J Physiol*. 2005;288:494-506.
44. Yang SF, Yang JY, Huang CH, Wang SN, Lu CP, Tsai CJ, et al. Increased caveolin-1 expression associated with prolonged overall survival rate in hepatocellular carcinoma. *Pathol*. 2010;42:438-45.

45. Bian Y, Hall B, Sun ZJ, Molinolo A, Chen W, Gutkind JS, et al. Loss of TGF- β signaling and PTEN promotes head and neck squamous cell carcinoma through cellular senescence evasion and cancer-related inflammation. *Oncogene* 2012;31:3322-32.
46. Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho J, Neahring L, Kwei KA. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat Genet.* 2014;46:722-5.
47. Brown NA, Rolland D, McHugh JB, Weigelin HC, Zhao L, Lim MS, et al. Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20:5517-26.
48. Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BV, Castro WH, Lacerda JC, Cardoso SV, et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol.* 2015;36:5649-53.

Conflict of Interest

The authors have declared that no conflict of interest exist.

Primordial odontogenic tumor: Subepithelial expression of Syndecan-1 and Ki-67 suggests origin during early odontogenesis

R Bologna-Molina¹  | T Mikami² | V Pereira-Prado¹  | G Tapia-Repetto³ | FR Pires⁴ | R Carlos⁵ | A Mosqueda-Taylor⁶

¹Molecular Pathology Area, Faculty of Dentistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Division of Anatomical and Cellular Pathology, Department of Pathology, Iwate Medical University, Iwate, Japan

³Histology Area, Faculty of Dentistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁴School of Dentistry, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Pathology Division, Centro Clínico de Cabeza y Cuello/Hospital Herrera-Llerandi, Guatemala City, Guatemala

⁶Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico City, Mexico

Correspondence

Ronell Bologna-Molina, Molecular Pathology Area, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
Email: ronellbologna@odon.edu.uy

Primordial odontogenic tumor (POT) is composed of variably cellular myxoid connective tissue, surrounded by cuboidal to columnar odontogenic epithelium resembling the inner epithelium of the enamel organ, which often invaginates into the underlying connective tissue. The tumor is delimited at least partially by a thin fibrous capsule. It derives from the early stages of tooth development. Syndecan-1 is a heparan sulfate proteoglycan that has a physiological role in several cellular functions, including maintenance of the epithelial architecture, cell-to-cell adhesion and interaction of cells with extracellular matrix, and with diverse growth factors, stimulating cell proliferation. Ki-67 is considered the gold standard as a cell proliferation marker. The aim of this study was to examine the expression of Syndecan-1 and Ki-67 proliferation index in POT and normal tooth germs to better understand the biological behavior of this tumor. Results showed that Syndecan-1 was more intensely expressed in subepithelial mesenchymal areas of POT, in a pattern that resembles the early stages of tooth development. The cell proliferation index (4.1%) suggests that POT is a slow growing tumor. Syndecan-1 expression in tooth germs in late cap and early bell stages was similar to POT, showing immunopositivity in subepithelial mesenchymal condensed areas. The immunohistochemical findings showed a pattern in which the population of subepithelial mesenchymal cells exhibited greater proliferative activity than the central portion of the dental papilla.

KEYWORDS

CD138, Ki-67, odontogenesis, primordial odontogenic tumor, Syndecan-1, tooth germ

1 | INTRODUCTION

Odontogenic tumors comprise a heterogeneous group of lesions ranging from hamartomas or non-neoplastic growths to benign and malignant neoplasms. These originate from epithelial, ectomesenchymal, and/or mesenchymal tissues derived from odontogenesis (Barnes, Eveson, Reichart, & Sidransky, 2005).

Primordial odontogenic tumor (POT) is a recently described entity (Mosqueda-Taylor et al., 2014), classified as a mixed epithelial mesenchymal benign neoplasm in the current WHO histological classification

of tumors (El-Naggar, Chan, Grandis, Takata, & Slookweg, 2017). It is composed of loosely arranged cellular fibrous connective tissue, resembling dental papilla, which is surrounded peripherally by cuboidal to columnar odontogenic epithelium closely resembling the inner epithelium of enamel organ, surrounded at least partially by a thin fibrous capsule. It occurs as a well-defined intra-osseous lesion, adjacent to the crown of an unerupted tooth, and may cause varying degrees of cortical bone expansion, root resorption, and tooth displacement (Slater, Eftimie, & Herford, 2016). To date, only eight cases of POT have been reported, with scant preliminary information regarding its

biological behavior (Ando et al., 2017; Bologna-Molina et al., 2017; Mosqueda-Taylor et al., 2014; Slater, Eftimie, & Herford, 2016).

Syndecan-1 (CD138) is a member of the family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans, involved in cell-to-cell adhesion, as well as in diverse interactions between cells and extracellular matrix (Ruoslahti, 1989). It is thought that Syndecan-1 functions as a matrix receptor and as a translator of information between extracellular matrix and cells (Sanderson, Hinkes, & Bernfield, 1992). This protein plays a role in cell proliferation promotion, regulating cell growth when interacting with growth factors, and collaborates in epithelial maturation, as diverse degrees of epithelial differentiation are directly associated with Syndecan-1 expression (Teng, Aquino, & Park, 2012). Syndecan-1 participates in different embryonic processes, having variable expression during odontogenesis (Thesleff, Jalkanen, Vainio, & Bernfield, 1988). On the other hand, evidence suggests that the loss of Syndecan-1 is an indicator of higher aggressiveness both in benign and in malignant epithelial neoplasms (Anttonen, Kajanti, Heikkilä, Jalkanen, & Joensuu, 1999; Inki et al., 1994; Joensuu, Anttonen, & Eriksson, 2002; Kurokawa et al., 2006; Shah et al., 2004; Zellweger, Nink, & Mirlacher, 2003).

Ki-67 is a nuclear protein expressed in most stages of cell cycle, except early G1 and the inactive stage G0. Contrary to many other proteins associated with the cell cycle, Ki-67 is absent in latent cells and in those under DNA repair processes. Thus, the presence or overexpression of this protein indicates cell proliferation, being considered a gold standard to determine tumor cell proliferation index (Pontes, Pontes, & Silva, 2010).

As only eight cases of POT have been reported to date, it seems important to perform studies in order to obtain new data that may help to clarify its origin and behavior, which may in turn help to better understand, determine, and justify its therapeutic approach. The aim of this study was to describe the immunohistochemical expression of Syndecan-1 and Ki-67 in five cases of POT and compare it to five tooth germs and discuss the possible relationship of these two biomarkers in the biological behavior of the tumor with regard to the normal process of odontogenesis.

2 | MATERIALS AND METHODS

A retrospective observational study was conducted in the Molecular Pathology area of the Faculty of Dentistry, Universidad de la República, Uruguay, with five cases of POT, contributed from Mexico (two cases), Brazil, Guatemala, and Japan (one case each). Five tooth germs (from Histology area, Faculty of Dentistry, Universidad de la República, Uruguay) in late cap and early bell stage were included to compare the expression of these two proteins. This work was submitted and approved by the institution's ethics committee (Faculty of Dentistry, Universidad de la República, Uruguay) according to the principles of the Helsinki convention. The specimens were collected from undecalcified tumor portions, fixed in 10% formalin and paraffin-embedded. Immunohistochemistry techniques were performed following the procedures described in previous articles (Bologna-Molina, Mosqueda-Taylor, & Lopez-Corella, 2009). Monoclonal antibodies against Syndecan-1 (CD138; clone MI15, Dako, Carpinteria, CA, USA; dilution 1:100) and Ki-67 (clone MIB-1; Dako; dilution 1:100)

were used. For the double immunohistochemistry technique, the nuclear marker Ki-67 was first labeled and visualized with 3,3'-diaminobenzidine (brown color) according to standard procedures, and subsequently, the surface antigen Syndecan-1 was labeled using alkaline phosphatase (red color). As a positive control, a normal oral mucosal fragment was used, and as a negative control, the primary antibody was replaced with PBS.

Syndecan-1 expression was considered positive when immunoreactivity was unequivocally observed in the cell membrane. A score of 0 ("essentially no staining") was established for negative or positive immunohistochemical staining of <5% of the cells; "1" ("weak-moderate") for staining of 5%–50% of cells, and "2" ("strong positive") for >50% positive staining.

The percentage of tumor cells positive for Syndecan-1 was calculated using a microscope with areas corresponding to 5.3 mm². For each POT case, five areas dominated by neoplastic cells were randomly selected and photographed using a digital camera (Olympus C-7070, Imaging, Melville, NY, USA). The percentage of positive tumor cells for Syndecan-1 was determined in each area. Results are expressed as percentages of total positive cells for Syndecan-1.

The staining of Ki-67 was determined based on the method previously described by our group (Bologna-Molina, Damián-Matsumura, & Molina-Frechero, 2011). The labeling index was calculated for each case.

3 | RESULTS

All cases were "strong positive" for Syndecan-1 in mesenchyme, and the average immunopositivity (label index) for Ki-67 was 4.1% (median value 4%) (Figure 1a–d).

All cases of POT included in this study showed variable Syndecan-1 expression in the epithelial tumor cells, ranging from negative to focally positive areas (Figure 2a–c). On the other hand, Syndecan-1 showed strong positivity in mesenchymal tissue, being more evident in the subepithelial area, which in some cases formed a subepithelial band (Figure 1a,c,d).

Ki-67 expression in POT showed a mean rate of proliferation of 4.1%, with the higher values found in the subepithelial cells located within the area of mesenchymal condensation (12.4%) (Figure 1b–d).

The tooth germs showed different expression of Syndecan-1 and Ki-67 in epithelial and mesenchymal cells, exhibiting greater expression of both proteins in the subepithelial region in the areas of mesenchymal condensation (Figures 2d and 3a,b). The tooth germs included in this study were in late cap and early bell stages as previously mentioned. The expression of Syndecan-1 was not homogeneous in the epithelial component, with only isolated areas of positivity. Syndecan-1 mesenchymal expression was predominantly evident in the papillary condensation band that is close to the internal epithelium of the enamel organ, similar to what was observed in POT.

All tooth germs had higher expression of Ki-67 as compared to POT (39% vs 4.1%), with more positive cells being found in the subepithelial region of the dental papilla and cervical loops (Figure 3a,b).

All the tumors showed a more active protein expression in the subepithelial area (Figure 3c).

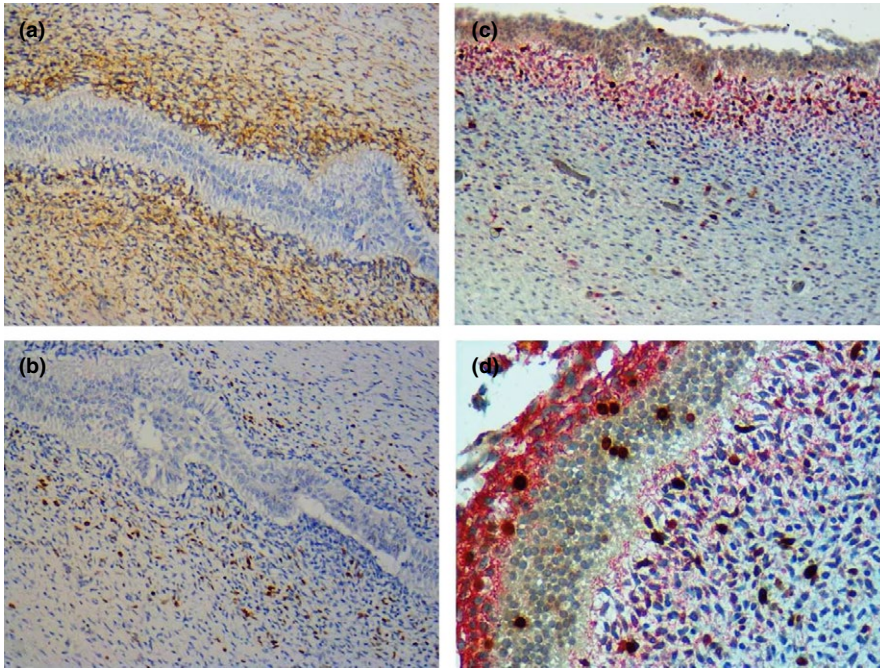


FIGURE 1 (a,b) Shows intense subepithelial expression of Syndecan-1 and Ki-67 in the areas of mesenchymal condensation, respectively, in a case of POT. Magnification 200 \times . (c,d) Shows double immunohistochemistry technique; Syndecan-1 is observed in the subepithelial area (red color), whereas Ki-67 is expressed in the nucleus of both epithelial and mesenchymal cells (brown color), in cases of POT, magnification 200 \times and 400 \times , respectively

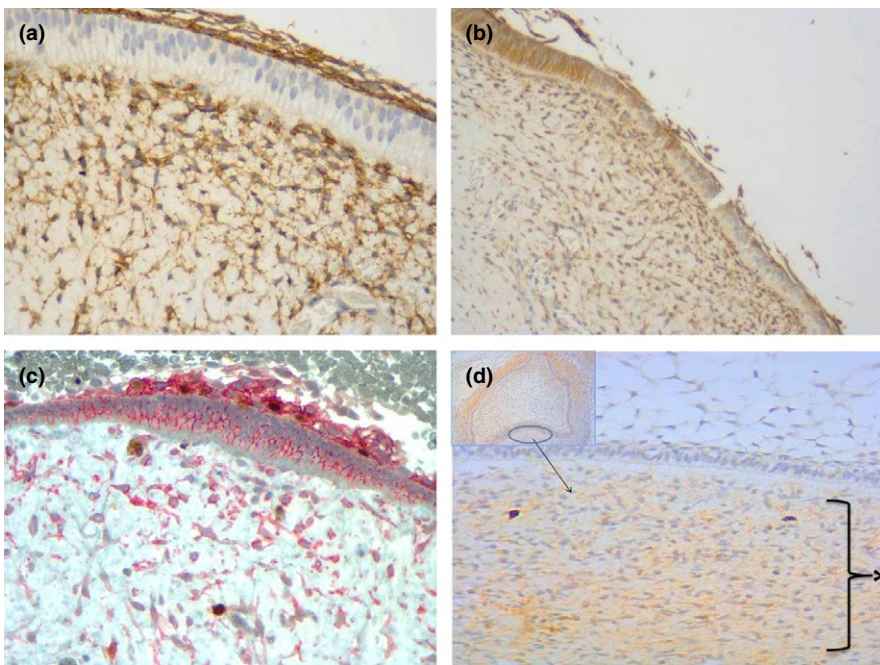


FIGURE 2 (a) Shows negativity for Syndecan-1 in odontogenic epithelium of POT, magnification 400 \times . (b) Shows different expression of Syndecan-1 in the epithelial surface of POT that ranges from strong-to-weak expression, magnification 200 \times . (c) Shows double immunohistochemistry technique with strong membrane expression of Syndecan-1 in the epithelial compartment in red color in a case of POT, magnification 200 \times . (d) Is a tooth germ in early bell stage, and the asterisk shows subepithelial expression of Syndecan-1 in light brown color, magnification 400 \times

4 | DISCUSSION

Expression of Syndecan-1 has been reported in diverse mesenchymal tissues, particularly in those exhibiting mesenchymal–epithelial interactions during embryological development (Thesleff et al., 1988). In tooth germs, it has been observed in the dental papilla and follicle, which interacts with epithelial tissue during mesenchymal cell proliferation (Iguchi-Ishiguro, Ouchi, Watanabe, & Numabe, 2012; Vainio, Jalkanen, & Thesleff, 1989). In the early bell stage, Syndecan-1 is found both at the epithelial and at the mesenchymal tissues, in a distribution that is very similar to the one found in all POT cases of the study. It has been considered that

the high expression of this protein in pre-odontoblasts may play a role in cell differentiation (Filatova, Pagella, & Mitsiadis, 2015). In addition, its possible role in the upregulation of mesenchymal cell condensation has been determined by linking growth factors and participating in cell proliferation, promoting the interaction between epithelial and mesenchymal tissues during all stages of odontogenesis (Thesleff, Vaahtokari, Vainio, & Jowett, 1996). In an experimental study with culture of tooth germ cells obtained from rat embryos, Vainio & Thesleff (1992) found that the expression of Syndecan-1 was constantly induced in the subepithelial mesenchyme, together with cell proliferation and condensation of mesenchymal cells. Recent studies have revealed that Syndecan-1 also

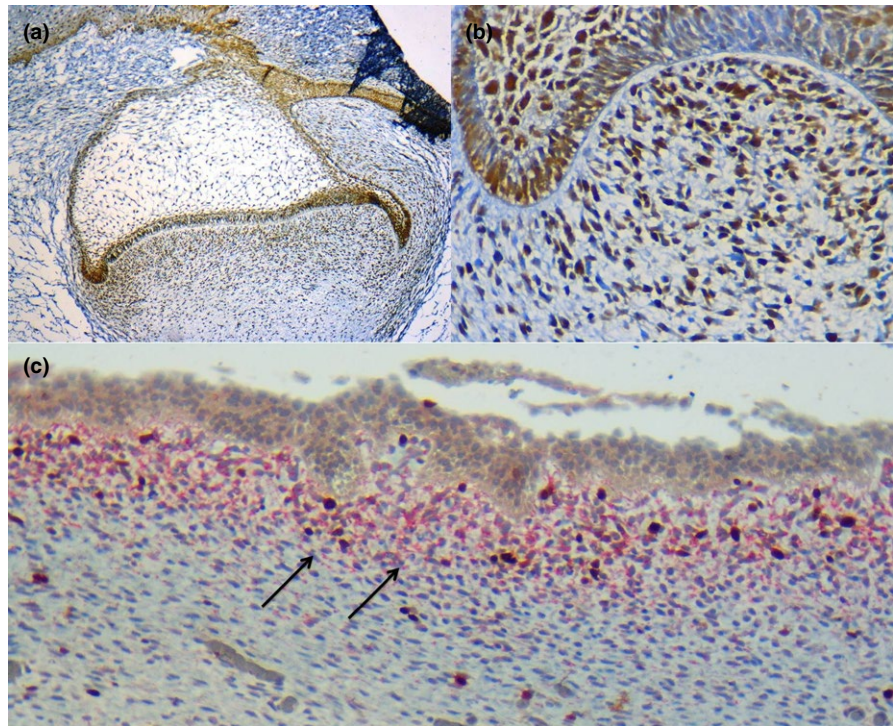


FIGURE 3 Tooth germ in late cap stage, showing higher positivity for Ki-67 in mesenchymal cells of subepithelial papilla and in cervical loops (a,b), magnification 100 \times and 600 \times , respectively. (c) Shows morphological area of POT where our findings are centered. Double immunohistochemistry technique, magnification 100 \times

stimulates cell proliferation and migration under pathological conditions (Iozzo & Sanderson, 2011), and some have linked the higher expression of this protein with the higher degree of epithelial differentiation (Ro, Muramatsu, & Shima, 2006; Tulumori, Thomas, & Fraser, 2004).

In our cases, Syndecan-1 expression in the epithelial component of the tumor varied from focally positive areas to negative ones (Figure 2a–c), suggesting that there are groups of cells with different degrees of maturation, which correlates with previous studies in which the immunorexpression of cytokeratin 19 was also variably expressed in the epithelium of POT, implying that there are cells with different degrees of differentiation (Bologna-Molina et al., 2017). In contrast, an intense expression of Syndecan-1 was observed in areas of mesenchymal condensation, particularly in subepithelial regions (Figure 1a,c).

The Finnish group of Vainio, Jalkanen, and Vaahtokari (1991) also demonstrated that Syndecan-1 has different expression in the subepithelial mesenchyme of the tooth germ during the various stages of odontogenesis; the expression in early stages was greater, particularly during the bud stage and even greater in cap stage, followed by a gradual decrease until being lost in the late bell stage. We found similar results in the five tooth germs included in this study. Taking into account all of the above-mentioned facts, as well as the histomorphologic and immunohistochemical findings found in POT, we suggest that POT possibly derives from an early stage of odontogenesis.

Our study also revealed that POT presented a variable proliferation index (mean 4.1%, median value 4%). The expression within the epithelial lining varied in different areas, ranging from <1% to more than 5%. On the other hand, a significantly higher rate of cell proliferation was observed in the condensed mesenchymal cells located in the subepithelial region as compared to mesenchymal cells located below this zone (12.4 vs 0.6%) (Figure 1b–d). This may imply that the tumor shows a more active growth in the subepithelial area (Figure 3c), which

may possibly be related with its inductive ability for odontoblastic differentiation and its capacity to modify the overlying epithelium.

During cap and bell stages, Syndecan-1 is gradually overexpressed in mesenchymal cells, followed by a downregulation in the epithelial component of the enamel organ (Kero et al., 2014). Initial expression of Syndecan-1 is followed by an increased proliferation activity in the papillary condensation front, predominantly in the subepithelial area (Kero et al., 2014); however, cell proliferation measured by Ki-67 varies according to normal development and tooth germ morphogenesis, showing a selective decrease at the beginning of cell differentiation. Our group found the same pattern of expression for Syndecan-1 and Ki-67 in the tooth germs included in this study, which also was very similar to that found in POT, reinforcing the hypothesis that POT has its origin during early stages of odontogenesis.

Although there are studies that have demonstrated that the expression of Syndecan-1 and Ki-67 correlate with the biological behavior of some tumors (Syndecan-1 expression diminished or was lost in malignant neoplasms, which is inversely related to the proliferation index of Ki-67) (Gomes da Silva, Ribeiro Bartholomeu, Grillo Cabral, Souza Azevedo, & Ramôa Pires, 2014), in this study we noted that the simultaneous expression of Syndecan-1 and Ki-67 was not homogeneous throughout the tumor, nor was there a direct or an inverse relationship in the tissues, suggesting an asynchronous proliferative activity of the tumor cells.

5 | CONCLUSION

Immunohistochemical findings of Syndecan-1 and Ki-67 in POT show a pattern that resembles the primary stages of tooth development, due to the greater accumulation of these two proteins in subepithelial mesenchymal areas, as it occurs in dental papilla. These findings

support the odontogenic origin of this tumor from early stages of odontogenesis.

CONFLICTS OF INTEREST

None to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Adalberto Mosqueda-Taylor, Fabio Ramos Pires, Toshinari Mikami and Román Carlos, were responsible to provide the cases of primordial odontogenic tumors for this research. Gabriel Tapia-Repetto was responsible to provide the cases of tooth germs for this research. The immunohistochemical reactions were made in the Molecular Pathology area of the Faculty of Dentistry, Universidad de la República, Uruguay, coordinated by Ronell Bologna-Molina and Vanesa Pereira-Prado. Ronell Bologna-Molina was responsible for the idea of using antibodies Syndecan-1 and Ki-67 in primordial odontogenic tumor. Adalberto Mosqueda-Taylor, Ronell Bologna-Molina and Vanesa Pereira-Prado were in charge of writing the article. All authors participated in the interpretation and redaction of the results. All authors have read the revised version of this manuscript and they agree with the suggestions made by the reviewers.

ORCID

R Bologna-Molina  <http://orcid.org/0000-0001-9755-4779>

V Pereira-Prado  <http://orcid.org/0000-0001-7747-6718>



REFERENCES

- Ando, T., Shrestha, M., Nakamoto, T., Uchisako, K., Yamasaki, S., Koizumi, K., ... Takata, T. (2017). A case of primordial odontogenic tumor: A new entity in the latest WHO classification (2017). *Pathology International*, 67(7), 365–369.
- Anttonen, A., Kajanti, M., Heikkilä, P., Jalkanen, M., & Joensuu, H. (1999). Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma. *British Journal of Cancer*, 79, 558–564.
- Barnes, L., Eveson, J. W., Reichart, P., & Sidransky, D. (2005). *World health organization classification of tumors. Pathology and genetics head and neck tumors*, Vol. 9, 3rd ed.. Lyon: IARC Press.
- Bologna-Molina, R., Damián-Matsumura, P., & Molina-Frechero, N. (2011). An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology*, 59(4), 801–803.
- Bologna-Molina, R., Mikami, T., Pereira-Prado, V., Pires, F. R., Carlos-Bregni, R., & Mosqueda-Taylor, A. (2017). Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 22(3), e314–e323.
- Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., & Lopez-Corella, E. (2009). Comparative expression of syndecan-1 and Ki-67 in peripheral and desmoplastic ameloblastomas and ameloblastic carcinoma. *Pathology International*, 59(4), 229–233.
- El-Naggar, A. K., Chan, J. K. C., Grandis, J. R., Takata, T., & Slootweg, P. J. (2017). *World health organization classification of head and neck tumours*, Vol. 9, 4th ed.. IARC, Lyon.
- Filatova, A., Pagella, P., & Mitsiadis, T. A. (2015). Distribution of syndecan-1 protein in developing mouse teeth. *Frontiers in Physiology*, 15(5), 518.
- Gomes da Silva, W., Ribeiro Bartholomeu, T. C., Grillo Cabral, M., Souza Azevedo, R., & Ramôa Pires, F. (2014). Clinicopathologic analysis and syndecan-1 and Ki-67 expression in calcifying cystic odontogenic tumors, dentinogenic ghost cell tumor, and ghost cell odontogenic carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 117, 626–633.
- Iguchi-Ishiguro, H., Ouchi, Y., Watanabe, S., & Numabe, Y. (2012). Analysis of syndecan-1 gene promoter during mouse tooth development. *Archives of Oral Biology*, 57(5), 531–538.
- Inki, P., Larjava, H., Haapasalmi, K., Miettinen, H. M., Grenman, R., & Jalkanen, M. (1994). Expression of syndecan-1 is induced by differentiation and suppressed by malignant transformation of human keratinocytes. *European Journal of Cell Biology*, 63, 43–51.
- Iozzo, R. V., & Sanderson, R. D. (2011). Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(5), 1013–1031.
- Joensuu, H., Anttonen, A., & Eriksson, M. (2002). Soluble syndecan-1 and serum basic fibroblast growth factor are new prognostic factors in lung cancer. *Cancer Research*, 62, 5210–5217.
- Kero, D., Kalibovic Govorko, D., Vukojevic, K., Cubela, M., Soljic, V., & Saraga-Babic, M. (2014). Expression of cytokeratin 8, vimentin, syndecan-1 and Ki-67 during human tooth development. *Journal of Molecular Histology*, 45, 627–640.
- Kurokawa, H., Zhang, M., Matsumoto, S., Yamashita, Y., Tanaka, T., & Takamori, K. (2006). Reduced syndecan-1 expression is correlated with the histological grade of malignancy at the deep invasive front in oral squamous carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 35, 301–306.
- Mosqueda-Taylor, A., Pires, F. R., Aguirre-Urizar, J. M., Carlos-Bregni, R., de la Piedra-Garza, J. M., Martínez-Conde, R., ... de Almeida, O. P. (2014). Primordial odontogenic tumour: Clinicopathological analysis of six cases of a previously undescribed entity. *Histopathology*, 65(5), 606–612.
- Pontes, H. A., Pontes, F. S., & Silva, B. S. (2010). Immunoeexpression of ki67, proliferative cell nuclear antigen, and Bcl-2 proteins in a case of ameloblastic fibrosarcoma. *Annals of Diagnostic Pathology*, 14(6), 447–452.
- Ro, Y., Muramatsu, T., & Shima, K. (2006). Correlation between reduction of syndecan-1 expression and clinico-pathological parameters in squamous cell carcinoma of tongue. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 35, 252–257.
- Ruoslahti, E. (1989). Proteoglycans in cell regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 13369–13372.
- Sanderson, R. D., Hinkes, M. T., & Bernfield, M. (1992). Syndecan-1, a cell surface proteoglycan, changes in size and abundance when keratinocytes stratify. *Journal of Investigative Dermatology*, 66, 314–323.
- Shah, L., Walter, K., Borczuk, A., Kawut, S., Sonett, J., & Gorenstein, L. (2004). Expression of syndecan-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer*, 101, 1632–1638.
- Slater, L. J., Eftimie, L. F., & Herford, A. S. (2016). Primordial odontogenic tumor: Report of a case. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 74(3), 547–551.
- Teng, Y. H., Aquino, R. S., & Park, P. W. (2012). Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biology*, 31, 3–16.
- Thesleff, I., Jalkanen, M., Vainio, S., & Bernfield, M. (1988). Cell surface proteoglycan expression correlates with epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. *Developmental Biology*, 129, 565–572.
- Thesleff, I., Vaahtokari, A., Vainio, S., & Jowett, A. (1996). Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. *Anatomical Record*, 245(2), 151–161.
- Tulumori, V., Thomas, G. A., & Fraser, I. S. (2004). The relationship of proliferating cell density at the invasive tumor front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 33, 204–208.
- Vainio, S., Jalkanen, M., & Thesleff, I. (1989). Syndecan and tenascin expression is induced by epithelial-mesenchymal interactions in embryonic tooth mesenchyme. *Journal of Cell Biology*, 108, 1945–1954.
- Vainio, S., Jalkanen, M., & Vaahtokari, A. (1991). Expression of syndecan gene is induced early, is transient, and correlates with changes

- in mesenchymal cell proliferation during tooth organogenesis. *Developmental Biology*, 147(2), 322–333.
- Vainio, S., & Thesleff, I. (1992). Coordinated induction of cell proliferation and syndecan expression in dental mesenchyme by epithelium: Evidence for diffusible signals. *Developmental Dynamics*, 194(2), 105–117.
- Zellweger, T., Nink, C., & Mirlacher, M. (2003). Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer. *Prostate*, 55, 20–29.

How to cite this article: Bologna-Molina R, Mikami T, Pereira-Prado V, et al. Primordial odontogenic tumor: Subepithelial expression of Syndecan-1 and Ki-67 suggests origin during early odontogenesis. *Oral Dis*. 2018;24:72–77. <https://doi.org/10.1111/odi.12733>

Pathogenesis of primordial odontogenic tumour based on tumourigenesis and odontogenesis

Toshinari Mikami¹  | Ronell Bologna-Molina²  | Adalberto Mosqueda-Taylor³ | Ikuko Ogawa⁴ | Vanesa Pereira-Prado² | Naoki Fujiwara⁵ | Fabio Ramoa Pires⁶ | Roman Carlos⁷ | Takashi Takata⁸ | Yasunori Takeda⁹

¹Division of Anatomical and Cellular Pathology, Department of Pathology, Iwate Medical University, Yahaba Shiwa-gun, Japan

²Molecular Pathology Area, Faculty of Dentistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico City, Mexico

⁴Center of Oral Clinical Examination, Hiroshima University Hospital, Hiroshima, Japan

⁵Division of Functional Morphology, Department of Anatomy, Iwate Medical University, Yahaba Shiwa-gun, Japan

⁶School of Dentistry, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁷Pathology Division, Centro Clínico de Cabeza y Cuello/Hospital Herrera-Llerandi, Guatemala City, Guatemala

⁸Department of Oral and Maxillofacial Pathobiology, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

⁹Division of Clinical Pathology, Department of Oral and Maxillofacial Reconstructive Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, Japan

Correspondence

Toshinari Mikami, Division of Anatomical and Cellular Pathology, Department of Pathology, Iwate Medical University, 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, Japan.
Email: toshi_m@sea.plala.or.jp

Funding information

Japan Society for the Promotion of Science, Grant/Award Number: 17K11917; Japanese Association for Dental Science, Grant/Award Number: 2016B-2

Abstract

Objective: Primordial odontogenic tumour (POT) is a rare benign mixed epithelial and mesenchymal odontogenic tumour. POT is composed of dental papilla-like tissue covered with cuboidal to columnar epithelium that resembles to inner and outer enamel epithelium of the enamel organ without dental hard tissue formation. The aim of this study was to examine pathogenesis of POT based on tumourigenesis and odontogenesis.

Subjects and methods: Six cases of POT were submitted for study. DNA analysis and transcriptome analysis were performed by next-generation sequencing. Expression of amelogenin, ameloblastin and dentin sialophosphoprotein (DSPP) was examined by immunohistochemistry.

Results: There were no gene mutations detected in any of analysed 151 cancer- and 42 odontogenesis-associated genes. Enamel protein-coding genes of *Amelx*, *Ambn* and *Enam*, and dentin protein-coding genes of *Col1a1*, *Dspp*, *Nes* and *Dmp1* were expressed, whereas expression of dentinogenesis-associated genes of *Bglap*, *Ibsp* and *Nfic* was negative or very weak suggesting inhibition of dentin formation in POT after odontoblast differentiation. Immunoreactivity of amelogenin, ameloblastin and DSPP was detected in POT.

Conclusions: Pathogenesis of POT is considered to be genetically different from other odontogenic tumours. It is suggested that inhibition of enamel and dentin formation in POT is due to defects in dentin formation process.

KEYWORDS

dentinogenesis, gene mutation, next-generation sequencing, odontogenesis, odontogenic tumour, primordial odontogenic tumour

1 | INTRODUCTION

The primordial odontogenic tumour (POT), classified as benign mixed epithelial and mesenchymal odontogenic tumour in the 4th edition of WHO Histological Classification of Head and Neck Tumours in 2017 (El-Naggar, Chan, Grandis, Takata, & Slootweg, 2017), was first reported by Mosqueda-Taylor et al. (2014). Clinically, the first and/or the second deciduous molar was involved in patients in deciduous dentition stage, while the third molar was involved in patients in permanent dentition stage, suggesting that the tooth developmental factors may be related to the pathogenesis of POT (Mikami et al., 2017). Histopathologically, POT is composed of variable cellular to loose fibrous tissue with areas similar to dental papilla, entirely surrounded by cuboidal to columnar epithelium resembling the inner enamel epithelium without morphological evidence of odontoblast differentiation or dentine formation (Mosqueda-Taylor et al., 2014). Enamel organ-like structures are rarely observed within epithelial layers, and it was suggested that the columnar epithelium correspond to the inner enamel epithelium, and cuboidal and squamous epithelium from the middle to outer epithelial layers could correspond to outer enamel epithelium and stratum intermedium (Mikami et al., 2017). Immunohistochemical analysis demonstrated that the expression of Ki-67 in the epithelium is lower than 2% while it increase up to 5% in mesenchymal components (average 3.1%) suggesting that POT is a slowly growing tumour (Bologna-Molina et al., 2017, 2018). To date, the largest size of the reported tumours was 90 × 70 mm in a 3-year-old child (Mosqueda-Taylor et al., 2014).

In most mixed epithelial and mesenchymal odontogenic tumours such as developing odontoma, ameloblastic fibro-dentinoma and fibro-odontoma (El-Naggar et al., 2017) and odonto ameloblastoma (Mosqueda-Taylor et al., 2002), as well as in calcifying odontogenic cyst (El-Naggar et al., 2017) dentin or both dentin and enamel formation results as a consequence of epithelial-mesenchymal interactions. It is interesting to note that neither enamel nor dentine formation has been observed to date in POT, and what inhibits dental hard tissue formation has not been clarified yet.

Recently, somatic mutations of cancer-associated genes such as *Braf* (Kurppa et al., 2014), *Smo* (Sweeney et al., 2014), *Kras* (Gomes et al., 2016), *Ptch1* (Qu et al., 2015) and *Ctnnb1* (Sekine et al., 2003; Yukimori et al., 2017) in some benign odontogenic tumours or cysts have been reported. These facts indicate that neoplastic proliferation of some odontogenic tumours may be triggered by genetic alterations affecting oncogenic signalling pathways (Diniz, Gomes, de Sousa, Xavier, & Gomez, 2017). As odontogenic tumours are derived from cells of the tooth forming apparatus and their remnants (El-Naggar et al., 2017), evaluation of odontogenesis-associated genes is also important to elucidate the pathogenesis of POT.

The aim of this study was to investigate the pathogenesis of POT and the possible reason for not forming enamel and dentin. In this study, we examined somatic mutations of 151 cancer- and 42 odontogenesis-associated genes, and mRNA expression level of odontogenesis-associated genes in POT by next-generation

sequencing (NGS). Expression of amelogenesis- and dentinogenesis-associated proteins was also examined by immunohistochemistry.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethics and subjects

This study was approved by the research ethics committee of the School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, Japan (approved in December 2014, #01229). This study was performed in adherence to guidelines of the Declaration of Helsinki as revised in 2000. Six POT samples of 6 patients from Mexico (2 patients), Brazil (1 patient), Guatemala (1 patient) and Japan (2 patients) were submitted to the study. Summary of the cases and a type of analysis are listed in Table 1.

2.2 | Library preparation and NGS

Five of six POT cases were submitted to extraction of DNA and RNA. POT5 was excluded from genetic analysis because the surgically excised tumour tissues were fragmented into small pieces and tissue selection for DNA/RNA extraction was macroscopically difficult. Five- μ m-thick sections were prepared from the nondecalcified paraffin-embedded tissues. The both epithelial and mesenchymal cells constituting tumour nests (and the stroma tissue if possible to separate it from parenchyma of the tumour) were macroscopically dissected with surgical knife, and genomic DNAs were extracted from the samples using an ALLPrep DNA/RNA FFPE Kit (80234, Qiagen, Valencia, CA) or PAXgene Tissue DNA Kit (767134, Qiagen). Quality of the extracted DNAs were evaluated by Agilent 2200 TapeStation system (Agilent Technologie, Santa Clara, CA), and sufficient DNA concentration and amount for sample preparation (>10 ng/ μ l, >0.5 μ g) with low DNA degradation was obtained from three samples (POT1, 4, and PAXgene-fixed POT6). Quality of the extracted RNAs was evaluated by Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologie). After RNA purification using Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter, Brea, CA), sufficient RNA DV200 (the percentage of fragments >200 nucleotides), concentration and amount (DV200 > 30%, >2.7 ng/ μ l, >65 ng) for sample preparation were obtained from three samples (POT1, 4 and formalin-fixed POT6).

The sequencing library was prepared using the dedicated preparation kit; ClearSeq Comprehensive Cancer (Agilent Technologie) for a cancer panel of 151 cancer-associated genes, SureSelect Human v6 (Agilent Technologie) for exome analysis, or TruSeq RNA Access Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA) for transcriptome analysis. Paired-end 100-bp sequencing was carried out on a HiSeq 2500 instrument (Illumina).

2.3 | Bioinformatics

After a successful sequencing reaction in three DNA samples and three RNA samples, the illumina FASTQ reads were analysed as

TABLE 1 Summary of the cases successful for analyses

Case	Fixation	References	Age (years)/Gender	Size (mm)	Immunohistochemistry	DNA analysis	Transcriptome analysis
POT 1 (surgery)	Formalin	Mosqueda-Taylor et al. (2014)	3/F	35 × 30	Amelogenin	ClearSeq Comprehensive Cancer (151 genes)	TruSeq RNA Access
POT 2 (surgery)	Formalin	Mosqueda-Taylor et al. (2014)	18/M	45 × 40	Amelogenin, ameloblastin, DSPP	-	-
POT 3 (surgery)	Formalin	Mosqueda-Taylor et al. (2014)	13/F	85 × 50	Amelogenin, ameloblastin, DSPP	-	-
POT 4 (surgery)	Formalin	Mosqueda-Taylor et al. (2014)	3/F	90 × 70	Amelogenin, ameloblastin, DSPP	ClearSeq Comprehensive Cancer (151 genes)	TruSeq RNA Access
POT 5 (surgery)	Formalin	Ando et al. (2017)	8/F	16 × 15	Amelogenin, ameloblastin, DSPP	-	-
POT 6 (biopsy)	Formalin	Mikami et al. (2017)	5/M	-	Amelogenin, ameloblastin, DSPP	-	TruSeq RNA Access
POT 6 (surgery)	PAXgene			8 × 9	-	SureSelect Human v6 (all exons)	-
Stroma				-	-	SureSelect Human v6 (all exons)	-

follows: To detect gene mutations, FASTQ reads were mapped to the human reference genome b37 using BWA (Li & Durbin, 2009), and somatic gene mutations were evaluated by GATK (McKenna et al., 2010). Analysed targeted genes were listed in Table 2. The candidate altered genes were visually validated with Integrated Graphic viewer (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/home>). Calculation of mRNA expression level was performed as described previously (Mikami, Kurose, Javed, & Takeda, 2015), and R (<https://www.r-project.org/>) and bioconductor (Huber et al., 2015) were used for visualization of the results creating a graph. All the gene analysis software was run using Diagno Linux OS (Iwate Medical University, Morioka, Iwate, Japan).

2.4 | Immunohistochemistry

Four- μ m-thick tissue sections were used for staining. After antigen retrieval through treatment with 0.1 M sodium citrate (pH 6.2) and Tween 20 in microwave to unmask the epitopes, endogenous peroxidase was blocked with 0.9% hydrogen peroxide. Primary antibodies for amelogenin (mouse-monoclonal, clone:F-11, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and DSPP (mouse-monoclonal antibody raised against amino acids 487–502 of DSPP, clone:LFBm-21, 1:100, Santa Cruz Biotechnology) were incubated for 45 min. Afterwards the slides were incubated with a biotinylated anti-mouse/anti-rabbit antibody and the streptavidin/peroxidase complex for 30 min each (LSAB β -labelled streptavidin-biotin, Dako, Santa Clara, CA, USA). To visualize the reaction a 3,30-diaminobenzidine-H₂O (Dako) substrate was used. Finally, the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin solution. Primary antibody for ameloblastin (rabbit polyclonal, clone:H300, 1:100, Santa Cruz) was used with fully automated system for immunohistochemistry and the dedicated reagents (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) under conditions optimized by the manufacturer.

3 | RESULTS

The sequencing library was successfully prepared in three DNA samples and in three RNA samples, and gene sequence data were obtained by NGS. In POT 4, as the amount of extracted total RNA was less than necessary for library preparation, it was amplified by PCR method.

As results of DNA analysis, somatic gene mutation was not detected in any of the analysed 151 cancer- and 42 odontogenesis-associated genes, comparing with reference gene sequences and SNP data base, or gene sequences of DNA from stromal tissue.

Expression levels of enamel protein-, dentin protein-, cytokeratin- and enamel organ marker protein- coding genes are shown in Figure 1. Enamel protein-coding genes of *Amelx* (coding amelogenin), *Ambn* (coding ameloblastin) and *Enam* (coding enamelin) were all detected by transcriptome analysis suggesting that ameloblast differentiation was normal, though expression of *Enam* in POT 6 was

<i>Abl1</i>	<i>Bracl1</i>	<i>Egfr</i>	<i>Jak2</i>	<i>Myc</i>	<i>Pik3ca</i>	<i>Runx1</i>
<i>Akt1</i>	<i>Bracl2</i>	<i>Esr1</i>	<i>Kras</i>	<i>Myd88</i>	<i>Ptch1</i>	<i>Smo</i>
<i>Alk</i>	<i>Cdkn2a</i>	<i>Fgfr2</i>	<i>Kit</i>	<i>Nf1</i>	<i>Pten</i>	<i>Stk11</i>
<i>Apc</i>	<i>Cebpa</i>	<i>Flt3</i>	<i>Map2k2</i>	<i>Notch1</i>	<i>Ptpn11</i>	<i>Tet2</i>
<i>Asxl1</i>	<i>Ctnnb1</i>	<i>Hras</i>	<i>Met</i>	<i>Npm1</i>	<i>Nras</i>	<i>Tp53</i>
<i>Atm</i>	<i>Dnmt3a</i>	<i>Idh1</i>	<i>Mll</i>	<i>Mtor</i>	<i>Rb1</i>	<i>Vhl</i>
<i>Braf</i>	<i>Erbbl2</i>	<i>Idh2</i>	<i>Mpl</i>	<i>Pdgfra</i>	<i>Ret</i>	<i>Wt1</i>
<i>Abcb1</i>	<i>Cyp19a1</i>	<i>Fbxw7</i>	<i>Il2rb</i>	<i>Mlh1</i>	<i>Ros1</i>	<i>Smarcb1</i>
<i>Abcc2</i>	<i>Cyp2a6</i>	<i>Fgfr1</i>	<i>Il2rg</i>	<i>Mst1r</i>	<i>Rps6 kb1</i>	<i>SNCAIP</i>
<i>Abl2</i>	<i>Cyp2b6</i>	<i>Fgfr3</i>	<i>Inpp4b</i>	<i>Nell2</i>	<i>Rxra</i>	<i>Sos1</i>
<i>Akt2</i>	<i>Cyp2c19</i>	<i>Fgfr4</i>	<i>Jak1</i>	<i>Pdgfrb</i>	<i>Rxrb</i>	<i>Spred1</i>
<i>Akt3</i>	<i>Cyp2c9</i>	<i>Flt1</i>	<i>Jak3</i>	<i>Phf6</i>	<i>Rxrg</i>	<i>Src</i>
<i>Atrx</i>	<i>Cyp2d6</i>	<i>Flt4</i>	<i>Kdm6a</i>	<i>Pik3r1</i>	<i>Shh</i>	<i>Sufu</i>
<i>Cbl</i>	<i>Ddr1</i>	<i>Fstl5</i>	<i>Kdr</i>	<i>Psbm1</i>	<i>Shoc2</i>	<i>Tas2r38</i>
<i>Cda</i>	<i>Ddr2</i>	<i>Gna11</i>	<i>Lama2</i>	<i>Psbm2</i>	<i>Slc22a1</i>	<i>Trrap</i>
<i>Cdh1</i>	<i>Ddx3x</i>	<i>Gnaq</i>	<i>Lck</i>	<i>Psbm5</i>	<i>Slc22a2</i>	<i>Tyk2</i>
<i>Cdkn2b</i>	<i>Dpyd</i>	<i>Gnas</i>	<i>Ltk</i>	<i>Psmc1</i>	<i>Slc31a1</i>	<i>Ugt1a1</i>
<i>Chd7</i>	<i>Erbbl3</i>	<i>Gstp1</i>	<i>Map2k1</i>	<i>Psmc2</i>	<i>Slc34a2</i>	<i>Yes1</i>
<i>Chic2</i>	<i>Erbbl4</i>	<i>H3f3a</i>	<i>Map2k4</i>	<i>Raf1</i>	<i>Slc45a3</i>	<i>Zmyrn3</i>
<i>Crebbp</i>	<i>Erg</i>	<i>Hnf1a</i>	<i>Map3k1</i>	<i>Rara</i>	<i>Slco1b1</i>	
<i>Crlf2</i>	<i>Esr2</i>	<i>Ikzf1</i>	<i>Mapk1</i>	<i>Rarb</i>	<i>Smad4</i>	
<i>Csf1r</i>	<i>Ezh2</i>	<i>Il2ra</i>	<i>Med13</i>	<i>Rarg</i>	<i>Smarca4</i>	
Tooth germ differentiation-associated genes						
<i>Fgf</i>	<i>Shh</i>	<i>Wnt</i>	<i>Tnf</i>	<i>Pitx2</i>	<i>Msx</i>	<i>Msx2</i>
<i>Dix1</i>	<i>Dix2</i>	<i>Pax9</i>	<i>Gli1</i>	<i>Gli2</i>	<i>Gli3</i>	<i>Barx1</i>
<i>Lhx6</i>	<i>Lhx7</i>	<i>Lef1</i>	<i>Runx2</i>			
Amelogenesis-associated genes						
<i>Enam</i>	<i>Amelx</i>	<i>Ambt</i>	<i>Msx2</i>	<i>Jag1</i>	<i>Sp3</i>	<i>Sp6</i>
<i>Fam83 h</i>	<i>Klk4</i>					
Dentinogenesis-associated genes						
<i>Dspp</i>	<i>Dmp1</i>	<i>Ibsp</i>	<i>Bglap</i>	<i>Alpl</i>	<i>Col1a1</i>	<i>Aol1a2</i>
<i>Sparc</i>	<i>Bmp2</i>	<i>Bmp4</i>	<i>Prss1</i>	<i>Prss2</i>	<i>Prss3</i>	<i>Dlx3</i>
<i>Nfic</i>						

TABLE 2 Cancer Panel (all coding exons, exon-intron boundaries and selected introns)

low (generally, when the FPKM value is 10 or less, protein expression would be expected to be very low). Regarding the expression of odontoblast differentiation marker coding-genes, *Col1a1* (coding collagen type I alpha 1) and *Dspp* (coding dentin sialophosphoprotein) were highly expressed, and *Nes* (coding nestin) was moderately expressed. Expression of *Nfic* (coding nuclear factor I-C), which is associated with root dentin formation, was low. Regarding the expression of dentin protein-coding genes other than *Col1a1* and *Dspp*, *Dmp1* (coding dentin matrix protein 1) was moderately expressed in both POT 1 and POT 4, whereas expression of *Bglap* (coding osteocalcin) and *Ibsp* (coding bone sialoprotein) was negative and low respectively in all the three cases. These results suggest that although some dentin protein-coding genes were expressed to some extent after odontoblast differentiation, dentin was not formed at all. Regarding cytokeratin-coding genes, expression of *Krt14*, *Krt18*

and *Krt19* were all highly expressed, and among them, expression of *krt14* (representative odontogenic epithelial marker) was the highest. Regarding enamel organ marker protein-coding genes, *Msx2*, *Jag1*, *Notch1*, *Sp3*, *Sp6* and *Alpl* were all detected in all the three samples.

Histopathologically, the entire periphery of the tumour was covered with columnar epithelium and nonkeratinized cuboidal or squamous epithelium in the outer layers (Figure 2a). The mesenchymal cells underlying the epithelial surface corresponded to odontoblasts, in spite of not forming the classical arrangement of a palisade or developing processes directed towards the epithelial interphase with higher cell density comparing with the central area of the tumour. Results of immunohistochemistry are summarized in Table 3 and are shown in Figure 2. Amelogenin (Figure 2b) was positive in some parts of the epithelium in all cases, and ameloblastin (Figure 2c) was positive in some parts of the epithelium in 4 out of 5 cases. DSPP

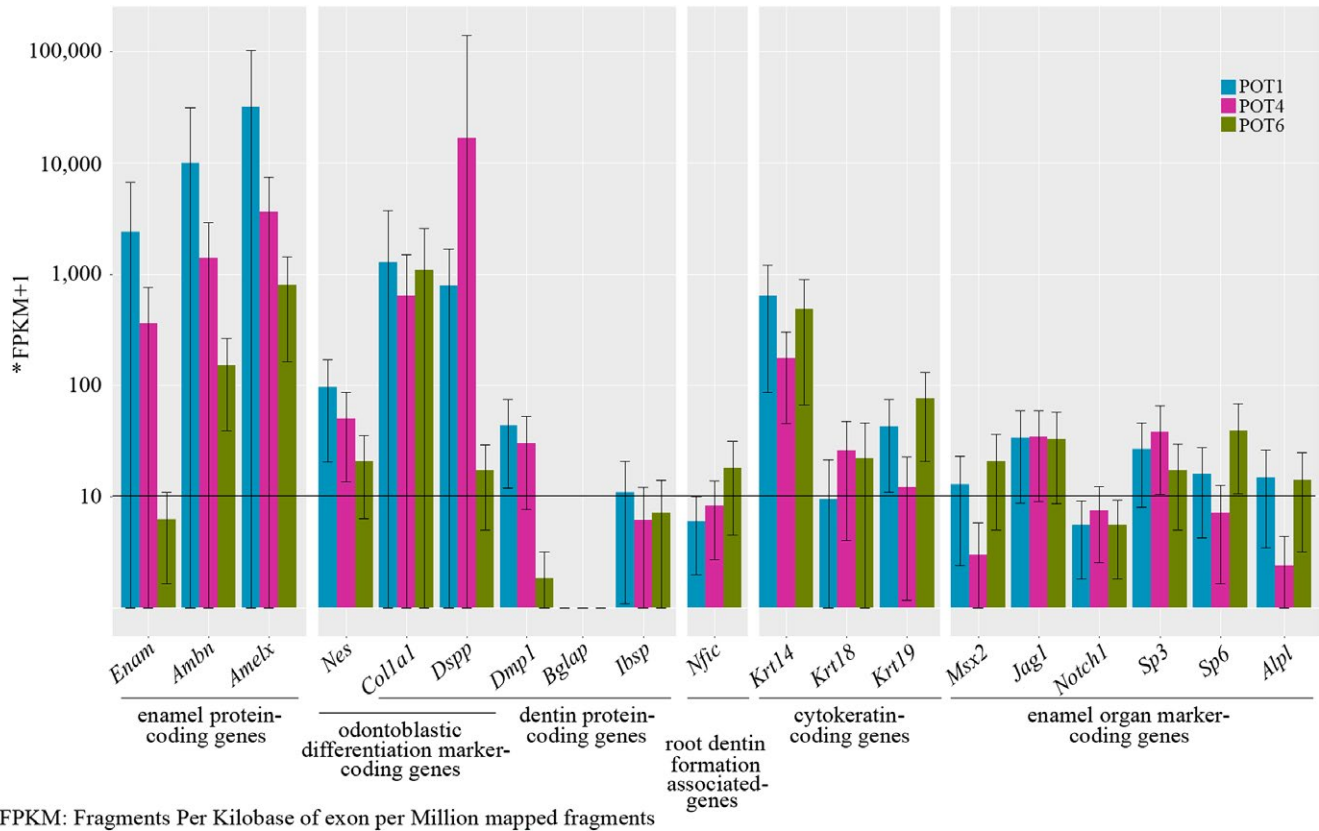


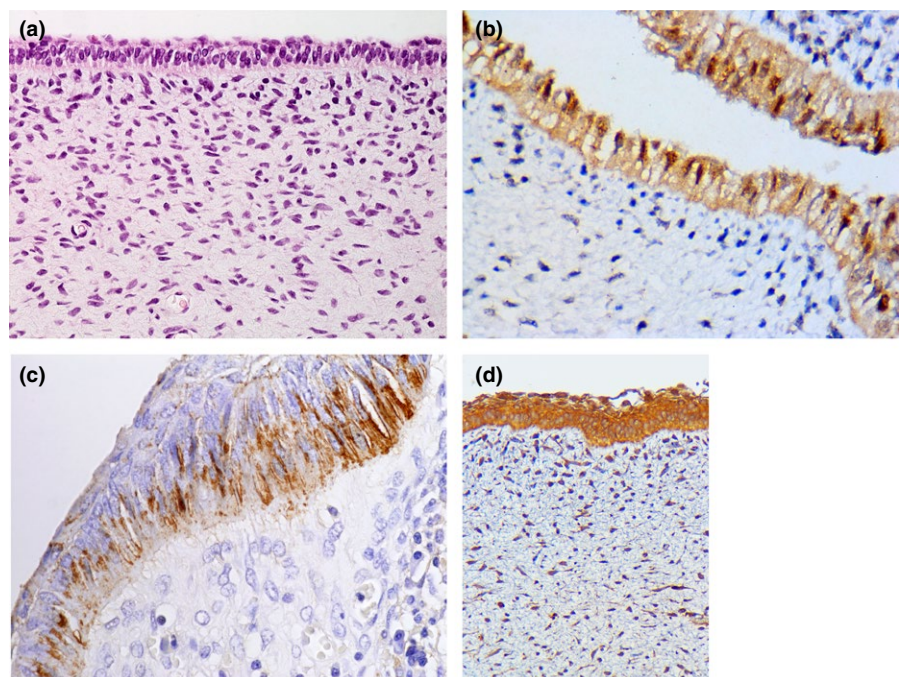
FIGURE 1 Expression levels of enamel protein-, dentin protein-, cytokerin- and enamel organ marker protein- coding genes. These results suggested differentiation into ameloblasts and odontoblasts, whereas dentin formation was denied because *bglap* was negative

(Figure 2d) was positive in both epithelial and mesenchymal components of the tumour in all cases. Expression patterns of proteins were not homogeneous, as both positive and negative areas were mixed.

4 | DISCUSSION

In the present study, somatic gene mutation of POT was examined to discuss its possible pathogenesis. With respect to genetic alterations

FIGURE 2 Results of histopathological findings. (a) The mesenchymal cells underlying the epithelial surface, which corresponded to odontoblasts, showed the irregular cell morphology and arrangement, magnification 400 \times . (b, c) Shows expression of amelogenin and ameloblastin in the peripheral epithelial components, respectively. Magnification 600 \times and 400 \times . (d) Shows strong-to-moderate expression of DSPP in both epithelial and mesenchymal components of the tumour, magnification 40 \times



	Amelogenin	Ameloblastin	DSPP	
			Epithelium	Mesenchyme
POT1	++	(not performed)		
POT2	++	+	+++	+
POT3	++	+	+++	+
POT4	++	+	+++	+
POT5	++	++	+++	+
POT6	++	-	+++	+++
Total (%)	100 (6/6)	80 (4/5)	100 (5/5)	100 (5/5)

TABLE 3 Immunorexpression of enamel and dentin protein in POT samples

related to pathogenesis of benign odontogenic tumours or cysts, *Braf* V600E (Kurppa et al., 2014), *Smo* L412F and W535L (Sweeney et al., 2014) have been reported in ameloblastoma, while *Ptch1* mutation has been reported in odontogenic keratocyst (Qu et al., 2015), *Kras* mutation in adenomatoid odontogenic tumours (Gomes et al., 2016), and *Ctnnb1* mutations in calcifying odontogenic cysts (Sekine et al., 2003; Yukimori et al., 2017). Genetic alterations of *Braf* and *Kras*, *Smo* and *Ctnnb1* affect to dysregulation of *Mapk*, *Shh* and *Wnt* signalling pathways, respectively, which play important roles in tooth germ development (Diniz et al., 2017). Thus, genetic alterations contribute to pathogenesis of some odontogenic tumours, though their impacts towards tumoural behaviour vary among tumours. Both *Kras* and *Braf* are components in a *Mapk* signalling pathway that culminate with activation of transcription factors important for cell proliferation. Ameloblastoma exhibits variable biological behaviour, ranging from simple cystic expansion to aggressive solid masses characterized by local invasiveness, a high risk of recurrence, and even malignant transformation, whereas adenomatoid odontogenic tumour have limited growth potential (El-Naggar et al., 2017) clinically suggesting an hamartomatous nature. In the present study, somatic gene mutation was not detected in any of the analysed 151 cancer-associated genes; therefore, the pathogenesis of POT is considered to be clearly different from other odontogenic tumours. With respect to odontogenic myxoma (OM), most OM cases were diagnosed within the second to fourth decades, and demonstrated pseudomalignant growth pattern with matrix secretion (El-Naggar et al., 2017). Although OM has quite different clinico-pathologic characteristics compared to POT, no somatic mutation was detected on 50 cancer-associated genes (Santos et al., 2017).

In this study, no somatic gene mutation was detected in any of amelogenesis (and amelogenesis imperfecta)-associated genes by DNA analysis (all exons in POT6). In transcriptome analysis, enamel protein-coding genes of *Amelx*, *Ambn* and *Enam* were all detected. Immunorexpression of amelogenin and ameloblastin proteins was demonstrated in the surface of the cuboidal to columnar epithelial components of POT suggesting their normal ameloblastic differentiation to some extent, though the expression pattern was not homogenous. From the above, there is a possibility that enamel formation is inhibited by the lack of dentin formation in POT, and there might be no defects in enamel forming ability. With respect to expression of cytokeratin-coding genes, expression of *Krt14* was higher than

those of *Krt18* and *Krt19* (Figure 1). These results are consistent with the observed immunoreactivity of cytokeratins in POT, that is, all epithelial layers expressed CK14, whereas CK18 and CK19 were only expressed in columnar epithelium (Mikami et al., 2017; Mosqueda-Taylor et al., 2014). With respect to enamel organ marker protein-coding genes of *Msx2*, *Jag1*, *Notch1*, *Sp3*, *Sp6*, *Alpl*, the expression levels of these genes were comparatively low (FPKM < 100) (Figure 1). *Msx2* expresses in the stellate reticulum (Satokata et al., 2000), *Jag1* expresses in enamel knot and inner enamel epithelium, *Notch1* and *Alpl* expresses in stratum intermedium (Harada et al., 2006), *Sp3* expresses in inner and outer enamel epithelium, stellate reticulum, stratum intermedium, and ameloblast cell-lineage (Golonzhka et al., 2009) and *sp6* expresses in enamel knot and inner enamel epithelium, but not in stratum intermedium (Nakamura et al., 2004). Presence of a stellate reticulum-like structure in the surface epithelial layers was described in the previously published POT cases (Mikami et al., 2017; Mosqueda-Taylor et al., 2014).

The approximate differentiation stage of POT was suggested to be that of a normal primary tooth germ around the 10th to 20th week (cap stage to late bell stage) based on immunorexpression pattern of vimentin and cytokeratin18 in enamel organ and of CD34 in subepithelial mesenchymal area on POT (POT6 in this study) (Mikami et al., 2017). Previous reports support this hypothesis demonstrating vimentin positivity (POT1-4 in this study, Bologna-Molina et al., 2017) and CD34 positivity (POT1-5 in this study, Bologna-Molina et al., 2017; Ando et al., 2017). Recently immunorexpression pattern of syndecan-1 in POTs (POT1-4 and 6 in this study) were compared with those in tooth germs in late cap and early bell stages, and similar immunopositivity in subepithelial mesenchymal areas were confirmed (Bologna-Molina et al., 2018).

In the time line of human tooth development, dentin formation begins at the bell stage of tooth development in the papillary tissue adjacent to the inner enamel epithelium (Antonio, 2013). In this context, POT should be accompanied by dentin formation, but the lack of production of this tissue (and the underlying cause) could be responsible for the lack of differentiation into normal odontoblasts and the continuous proliferation of the dental papilla-like tissue, particularly in the subepithelial region, inducing only partly the ameloblastic differentiation. Dentin extracellular matrix is composed of 90% of collagen type I and 10% of noncollagenous proteins, among which dentin phosphoprotein (DPP) and dentin glycoprotein (DGP)

are crucial in dentinogenesis (Antonio, 2013). DSPP, which is responsible for dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia (de La Dure-Molla, Philippe Fournier, & Berdal, 2015), is processed into N-terminal dentin sialoprotein (DSP), intermediate DGP and C-terminal DPP. DPP binds large amounts of calcium, and is able to initiate hydroxyapatite formation in vitro (Antonio, 2013). In this study, no somatic gene mutation was detected in any of dentinogenesis (and dentinogenesis imperfecta)-associated genes by DNA analysis. The results of transcriptome analysis with NGS include variability in the expression of analysed genes. The variability may reflect heterogeneity of the tumour caused by, for example, slight difference of differentiation degree among the cases. Additionally, the ratio of collected cell components (epithelial and mesenchymal components) is different among the cases. After considering them, enamel protein coding genes and some of odontoblastic differentiation marker-coding genes are highly expressed, whereas, *Bglap* was not expressed at all suggesting dentin formation is completely inhibited in any of the 3 cases.

In transcriptome analysis, mRNAs of *Col1a1* and *Dspp* were highly expressed and mRNA of *Nes* was moderately expressed in the genetically analysed three cases, and immunoreactivity of DSPP was positive in both epithelial and mesenchymal components of the tumour in all cases. In tooth germ development, DSPP is positive in preameloblast and preodontoblast (Bègue-Kirn, Krebsbach, Bartlett, & Butler, 1998). Expression of nestin protein in POT5 was confirmed in a previous report (Ando et al., 2017). These results suggested that some amount of mesenchymal tumour cells in dental papilla-like lesion differentiated into preodontoblasts. However, neither odontoblast differentiation nor induction of dentin formation was morphologically observed. Transcriptome analysis demonstrated that mRNA expression of *Dmp1*, *Ibsp* and *Bglap*, all of which are associated with calcification and induction of dentin formation, were moderate, very low and negative, respectively. The inhibition of dentin formation may be due to the disturbance of the process of translation from *Dspp* to DSP, DGP, DPP, which prevented normal odontoblast differentiation.

In term of dentinogenesis, root dentin formation should be taken into consideration, because the epithelial layers in POT might be consistent with the cervical loop of tooth germ (Mikami et al., 2017), then differentiation degree of some mesenchymal cells might be consistent with Hertwig's epithelial root sheath (HERS). Development of tooth crown and root are controlled by different mechanisms, and *Nfic* does not control crown but root dentin formation (Huang, Xu, Bringas, Hung & Chai, 2010; Wang & Feng, 2017). The loss of *Nfic* did not interfere with the formation of HERS, but it caused disrupted odontoblast differentiation (Park, Herr, Kim, Gronostajski, & Cho, 2007). *Nfic* regulates cell proliferation in the dental mesenchyme, and is required for root patterning and growth during root morphogenesis (Kim, Bae, Yang, Park, & Cho, 2015). In our results, the expression level of *Nfic* was very low suggesting that not only crown dentin but also root dentin were not formed at all.

In benign mixed epithelial and mesenchymal odontogenic tumours, ameloblastic fibroma (AF) does not form dental hard tissues, whereas odontoma forms them. Although reports of

comparative studies among mixed odontogenic tumours are limited because they are extremely rare except odontoma, a previous report demonstrated that amelogenin was positive for both AF ($n = 1$) and odontoma ($n = 1$), and ameloblastin was positive for only odontoma (Crivelini, Felipini, Miyahara, & de Sousa, 2012). In this study, both amelogenin and ameloblastin were positive in epithelial components in most of the POT cases (six and five of six cases respectively). Differentiation degree of epithelial components of the mixed odontogenic tumours seems to be different among tumours. With respect to mesenchymal components of mixed odontogenic tumours, nestin (odontogenic ectomesenchymal marker) was positive for both AF (2 of 2 cases) and odontoma (49 of 62 cases) (Fujita, Hideshima, & Ikeda, 2006). Interestingly, neuron-specific enolase (NSE) and glial fibrillary acidic protein (GFAP), which are neural tissue markers, were negative in AF (3 of 3 cases), whereas they were both positive in ameloblastic fibrodentinoma (AFD, 3 of 3 cases) (Takeda, Sato, Satoh, Nakamura, & Yamamoto, 2000). In this study, mRNA expression of *Eno2* (coding NSE) was almost negative (FPKM = 6.30 ± 1.93), and *Gfap* was not expressed at all (FPKM = 0) in all analysed 3 POTs. Additionally, there was no gene mutation in POT in both *Eno2* and *Gfap* (data not shown). Nestin is replaced with GFAP accompanied by developmental processing of nervous tissue (Lendahl et al., 1990), and with respect to tooth development, nestin is considered to be related to the differentiation toward odontoblasts and to the acquisition of the function to produce dentin (Fujita et al., 2006). In this context, differentiation degree of mesenchymal components of POT is closer to AF than that of AFD. These findings are not enough to clarify why POT does not form dentin, however, a comparative study of POT with other mixed odontogenic tumours may be potentially useful. As far as the authors investigated, there are no reports on the expression of dentin protein in odontogenic mixed tumour cases. In established mesenchymal cell lines derived from human odontoma, mRNA of *Dspp* and *Col1* were both positive (Hatano et al., 2012; Uzawa et al., 2016).

This is the first report on gene mutational analysis of POT. In conclusion, pathogenesis of POT is considered to be genetically different from other odontogenic tumours. In this term, POT is distinct, but not that it is necessarily different from all other types of odontogenic tumour. With the limitations of the present study, the mechanisms of the defects in dentine formation remain unclear. To elucidate the pathogenesis of POT, further accumulation of clinical, morphological and genetic data is necessary.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported in part by Grant-in-Aid for Project Research from Japanese Association for Dental Science (No. 2016B-2) and JSPS KAKENHI (No. 17K11917).

CONFLICTS OF INTEREST

None declared.



AUTHOR CONTRIBUTION

The study was designed by Toshinari Mikami and Ronell Bologna-Molina. Clinical and histopathologic information were collected and analyzed by Adalberto Mosqueda-Taylor, Ikuko Ogawa, Ramoa-Pires Fabio, Roman Carlos and Yasunori Takeda. Genetic analyses were performed by Toshinari Mikami. Immunohistochemistry was performed by Ronell Bologna-Molina, Ikuko Ogawa, Vanesa Pereira-Prado. All authors participated in the interpretation of the results. All authors have read the revised version of this manuscript and they agree with the suggestions made by the reviewers.

ORCID

Toshinari Mikami  <http://orcid.org/0000-0001-6224-0593>

Ronell Bologna-Molina  <http://orcid.org/0000-0001-9755-4779>

REFERENCES

- Ando, T., Shrestha, M., Nakamoto, T., Uchisako, K., Yamasaki, S., Koizumi, K., & Takata, T. (2017). A case of primordial odontogenic tumor: A new entity in the latest WHO classification. *Pathology International*, 67(7), 365–369. <https://doi.org/10.1111/pin.12543>
- Antonio, N. (2013). *Ten Cate's Oral Histology Development, Structure, and Function*, 8th ed. St. Louis: Mosby.
- Bègue-Kirn, C., Krebsbach, P. H., Bartlett, J. D., & Butler, W. T. (1998). Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: Tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *European Journal of Oral Sciences*, 106(5), 963–970. <https://doi.org/10.1046/j.0909-8836.1998.eos106510.x>
- Bologna-Molina, R., Mikami, T., Pereira-Prado, V., Pires, F. R., Carlos-Bregni, R., & Mosqueda-Taylor, A. (2017). Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 22(3), e314–e323.
- Bologna-Molina, R., Mikami, T., Pereira-Prado, V., Tapia-Repetto, G., Pires, F. R., Carlos, R., & Mosqueda-Taylor, A. (2018). Primordial odontogenic tumor: Subepithelial expression of Syndecan-1 and Ki-67 suggests origin during early odontogenesis. *Oral Diseases*, 24(1–2), 72–77. <https://doi.org/10.1111/odi.12733>
- Crivelini, M. M., Felipini, R. C., Miyahara, G. I., & de Sousa, S. C. (2012). Expression of odontogenic ameloblast-associated protein, amelotin, ameloblastin, and amelogenin in odontogenic tumors: Immunohistochemical analysis and pathogenetic considerations. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 41(3), 272–280. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2011.01079.x>
- Diniz, M. G., Gomes, C. C., de Sousa, S. F., Xavier, G. M., & Gomez, R. S. (2017). Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncology*, 72, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.07.021>
- El-Naggar, A. K., Chan, J. K. C., Grandis, J. R., Takata, T., & Slootweg, P. J. (2017). *World health organization classification of head and neck tumours*, Vol. 9, (4th ed.). Lyon, France: IARC.
- Fujita, S., Hideshima, K., & Ikeda, T. (2006). Nestin expression in odontoblasts and odontogenic ectomesenchymal tissue of odontogenic tumours. *Journal of Clinical Pathology*, 59(3), 240–245. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.025403>
- Golonzhka, O., Metzger, D., Bornert, J. M., Bay, B. K., Gross, M. K., Kioussi, C., & Leid, M. (2009). Ctip2/Bcl11b controls ameloblast formation during mammalian odontogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4278–4283. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900568106>
- Gomes, C. C., de Sousa, S. F., de Menezes, G. H., Duarte, A. P., Pereira Tdos, S., Moreira, R. G., ... Gomez, R. S. (2016). Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncology*, 56, e3–e5. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.03.001>
- Harada, H., Ichimori, Y., Yokohama-Tamaki, T., Ohshima, H., Kawano, S., Katsube, K., & Wakisaka, S. (2006). Stratum intermedium lineage diverges from ameloblast lineage via notch signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(2), 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.053>
- Hatano, H., Kudo, Y., Ogawa, I., Shimasue, H., Shigeishi, H., Ohta, K., ... Kamata, N. (2012). Establishment of mesenchymal cell line derived from human developing odontoma. *Oral Diseases*, 18(8), 756–762. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2012.01942.x>
- Huang, X., Xu, X., Bringas, P. Jr, Hung, Y. P., & Chai, Y. (2010). Smad4-Shh-Nfic signaling cascade-mediated epithelial-mesenchymal interaction is crucial in regulating tooth root development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(5), 1167–1178.
- Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., ... Morgan, M. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods*, 12(2), 115–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>
- Kim, T. H., Bae, C. H., Yang, S., Park, J. C., & Cho, E. S. (2015). Nfic regulates tooth root patterning and growth. *Anatomy & Cell Biology*, 48(3), 188–1894. <https://doi.org/10.5115/acb.2015.48.3.188>
- Kurppa, K. J., Catón, J., Morgan, P. R., Ristimäki, A., Ruhin, B., Kellokoski, J., ... Heikinheimo, K. (2014). High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *Journal of Pathology*, 232(5), 492–498. <https://doi.org/10.1002/path.4317>
- de La Dure-Molla, M., Philippe Fournier, B., & Berdal, A. (2015). Isolated dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia: Revision of the classification. *European Journal of Human Genetics*, 23(4), 445–451. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.159>
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B., & McKay, R. D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4), 585–595.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A., ... DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analysing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- Mikami, T., Kurose, A., Javed, F., & Takeda, Y. (2015). Detection of rare variant of SS18-SSX1 fusion gene and mutations of important cancer-related genes in synovial sarcoma of the lip: Gene analyses of a case and literature review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 73(8), 1505–1515. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2015.02.010>
- Mikami, T., Ohashi, Y., Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Fujiwara, N., Tsunoda, N., ... Takeda, Y. (2017). Primordial Odontogenic Tumor: A case report with histopathological analyses. *Pathology International*, 67(12), 638–643. <https://doi.org/10.1111/pin.12601>
- Mosqueda-Taylor, A., Carlos-Bregni, R., Ramírez-Amador, V., Palma-Guzmán, J. M., Esquivel-Bonilla, D., & Hernández-Rojase, L. A. (2002). Odontoameloblastoma. Clinico-pathologic study of three cases and critical review of the literature. *Oral Oncology*, 38(8), 800–805. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(02\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(02)00046-5)
- Mosqueda-Taylor, A., Pires, F. R., Aguirre-Urizar, J. M., Carlos-Bregni, R., de la Piedra-Garza, J. M., Martínez-Conde, R., ... de Almeida, O. P. (2014). Primordial odontogenic tumour: Clinicopathological analysis

- of six cases of a previously undescribed entity. *Histopathology*, 65(5), 606–612. <https://doi.org/10.1111/his.12451>
- Nakamura, T., Unda, F., de Vega, S., Vilaxa, A., Fukumoto, S., Yamada, K. M., & Yamada, Y. (2004). The Krüppel-like factor epiprofin is expressed by epithelium of developing teeth, hair follicles, and limb buds and promotes cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 626–634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307502200>
- Park, J. C., Herr, Y., Kim, H. J., Gronostajski, R. M., & Cho, M. I. (2007). Nfic gene disruption inhibits differentiation of odontoblasts responsible for root formation and results in formation of short and abnormal roots in mice. *Journal of Periodontology*, 78(9), 1795–1802. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060363>
- Qu, J., Yu, F., Hong, Y., Guo, Y., Sun, L., Li, X., ... Li, T. (2015). Underestimated PTCH1 mutation rate in sporadic keratocystic odontogenic tumors. *Oral Oncology*, 51(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.09.016>
- Santos, J. N., Sousa Neto, E. S., França, J. A., Diniz, M. G., Moreira, R. G., Castro, W. H., Gomes, C. C. (2017). Next-generation sequencing of oncogenes and tumor suppressor genes in odontogenic myxomas. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 46(10), 1036–1039.
- Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., ... Maas, R. (2000). Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nature Genetics*, 24(4), 391–395. <https://doi.org/10.1038/74231>
- Sekine, S., Sato, S., Takata, T., Fukuda, Y., Ishida, T., Kishino, M., ... Hirohashi, S. (2003). Beta-catenin mutations are frequent in calcifying odontogenic cysts, but rare in ameloblastomas. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 1707–1712. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63528-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63528-6)
- Sweeney, R. T., McClary, A. C., Myers, B. R., Biscocho, J., Neahring, L., Kwei, K. A., ... West, R. B. (2014). Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nature Genetics*, 46(7), 722–725. <https://doi.org/10.1038/ng.2986>
- Takeda, Y., Sato, H., Satoh, M., Nakamura, S. I., & Yamamoto, H. (2000). Immunohistochemical expression of neural tissue markers (neuron-specific enolase, glial fibrillary acidic protein, S100 protein) in ameloblastic fibrodentinoma: A comparative study with ameloblastic fibroma. *Pathology International*, 50(8), 610–615. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.2000.01087.x>
- Uzawa, K., Kasamatsu, A., Saito, T., Takahara, T., Minakawa, Y., Koike, K., ... Tanzawa, H. (2016). Long-term culture of human odontoma-derived cells with a Rho kinase inhibitor. *Experimental Cell Research*, 347(1), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.08.005>
- Wang, J., & Feng, J. Q. (2017). Signaling pathways critical for tooth root formation. *Journal of Dental Research*, 96(11), 1221–1228. <https://doi.org/10.1177/0022034517717478>
- Yukimori, A., Oikawa, Y., Morita, K. I., Nguyen, C. T. K., Harada, H., Yamaguchi, S., ... Sakamoto, K. (2017). Genetic basis of calcifying cystic odontogenic tumors. *PLoS ONE*, 12(6), e0180224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180224>

How to cite this article: Mikami T, Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, et al. Pathogenesis of primordial odontogenic tumour based on tumorigenesis and odontogenesis. *Oral Dis*. 2018;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/odi.12914>

Estudio de la proliferación celular en gérmenes dentarios humanos

Cell proliferation study in human tooth germs

Vanesa Pereira-Prado¹, Gabriela Vigil-Bastitta², Estefania Sicco³, Ronell Bologna-Molina⁴, Gabriel Tapia-Repetto⁵

DOI: 10.22592/ode2018n32a10

Resumen

El objetivo de este estudio fue conocer la expresión de MCM4-5-6 en gérmenes dentarios humanos en estado de campana. **Materiales y Métodos:** Se obtuvieron preparados histológicos de 4 maxilares fetales incluidos en parafina en el archivo de bloques de la cátedra de Histología de la Facultad de Odontología, UdelaR. Se procedió al corte de los mismos en secciones para técnica de rutina (HE) y de IHQ para MCM 4, 5 y 6. **Resultados:** Las diferentes regiones del órgano del esmalte mostraron 100 % de positividad en el estrato intermedio, una variación de 100 % a 0 % en el epitelio interno del órgano del esmalte, desde el sector cervical al sector incisal del mismo, y 0% tanto en el retículo estrellado como en el epitelio externo del órgano del esmalte. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos permitieron evidenciar y confirmar la acción proliferativa de las diferentes zonas del órgano del esmalte.

Abstract

The aim of this study was to determine the expression of MCM4-5-6 in human tooth germs in the bell stage. **Materials and Methods:** Histological samples were collected from four fetal maxillae placed in paraffin at the block archive of the Histology Department of the School of Dentistry, UdelaR. Sections were made for HE routine technique and for immunohistochemistry technique for MCM4-5-6. **Results:** Different regions of the enamel organ showed 100% positivity in the intermediate layer, a variation from 100% to 0% in the inner epithelium from the cervical loop to the incisal area, and 0% in the stellar reticulum as well as the outer epithelium. **Conclusions:** The results show and confirm the proliferative action of the different areas of the enamel organ.

Palabras clave: MCM4, MCM5, MCM6, germen dentario, proliferación celular.

Keywords: MCM4, MCM5, MCM6, tooth germ, cell proliferation.

- 1 Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0001-7747-671
- 2 Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0002-0617-1279
- 3 Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0003-1137-6866
- 4 Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0001-9755-4779
- 5 Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0003-4563-9142

Introducción

La organogénesis dental es un proceso que implica una amplia gama de funciones celulares en las cuales se involucran de manera alternada la participación de los elementos ectomesenquimáticos y epiteliales, representados por la papila dental y el órgano del esmalte respectivamente⁽¹⁾. Durante el transcurso del desarrollo dental existen diversas etapas en las cuales el germen pasa por diferentes estadios morfológicos, estas etapas incluyen el brote, el casquete y la campana temprana y avanzada¹. Desde el punto de vista estructural, el germen dentario presenta tres sectores, dos de ellos de origen ectomesenquimático (la papila y el folículo o saco dental), y uno epitelial (el órgano del esmalte)⁽²⁾. La papila dental es responsable de la formación de la pulpa y la dentina, tanto coronaria como radicular; por su parte el saco o folículo dental se encarga del desarrollo de los componentes del paradencio profundo y de los elementos conectivos del paradencio superficial; por último, el órgano del esmalte participa en la formación del esmalte, en especial a punto de partida del epitelio interno⁽³⁾. Todos estos procesos fisiológicos se dan, entre otras cosas, por la proliferación celular, producto del incremento del número de células, resultado de la división celular⁽⁴⁾.

Existen diversos marcadores de proliferación celular, dentro de los cuales encontramos al complejo MCM 2-7 (minichromosome maintenance)⁽⁵⁾. El complejo MCM2-7 está compuesto por 6 proteínas diferentes (MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7) y forma parte del complejo pre-replicativo del ciclo celular, por lo que tiene un rol esencial en la replicación del ADN^(6,7). Una de sus funciones consiste en dar inicio a la replicación, permitiendo que ésta se dé en el momento oportuno, para lo cual el complejo debe cambiar su estructura tridimensional. El complejo MCM2-7 en estado inactivo presenta una discontinuidad reversible de su estructura toroidal; al unirse las proteínas MCM2 y MCM5 éstas cierran dicha discontinuidad permitiendo la activación de

todo el complejo^(8,9). Entre otras de sus funciones encontramos su rol helicasa⁽¹⁰⁾, detiene la replicación⁽¹¹⁾, cuida que todo el ADN sea replicado⁽¹²⁾, y evita la replicación del ADN más de una vez en un mismo ciclo celular⁽¹³⁾. Las proteínas de este complejo se expresan durante todo el ciclo celular desde la fase G1 temprana en adelante, así como en células con potencial proliferativo, pero están ausentes en células quiescentes (G0)⁽¹⁴⁾.

Este trabajo tiene como objetivo conocer la actividad proliferativa de los gérmenes dentarios humanos en estadio de campana mediante la expresión de moléculas del complejo MCM 4-5-6 en el epitelio externo, retículo estrellado, estrato intermedio y epitelio interno del órgano del esmalte.

Materiales y métodos

Se estudiaron 8 gérmenes dentarios humanos clasificados en estadio campana, provenientes del archivo de la Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de la República (FO – UdelaR), Uruguay. Los mismos se obtuvieron de 4 maxilares fetales incluidos en bloques de parafina de entre 17 y 24 semanas de desarrollo, los cual figuran como procesados en el año 1970. Estos fueron cortados con micrótomos de precisión, en cortes de 4 micras y montados en láminas silanizadas. Se realizó un corte por muestra para ser coloreados con la técnica de Hematoxilina Eosina, así como 3 cortes para la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) para las proteínas MCM 4-5-6.

Para la técnica de inmunohistoquímica los cortes fueron desparafinados en estufa a 60°C por 60 min y posteriormente colocados en xilol durante 5 minutos. Luego se hidrataron en un tren de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 90, 80%, 70% y 50%) y dos lavados con agua destilada. Para el desmascaramiento de los epítopes se realizó la recuperación antigénica con solución de citrato de sodio 10mM (pH 6.2) en olla a presión en

microondas a potencia máxima (750 W) por 6 min., dejando enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se enjuago con agua destilada. Las peroxidasa endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno al 0.9% durante 5min., seguidos por lavados con agua destilada y solución salina amortiguada de fosfatos pH 7.4 (PBS). Se montaron las laminillas en placas de cubiertas y se colocaron en bastidores para la realización de inmunohistoquímica por capilaridad. Se incubaron los anticuerpos primarios monoclonales contra MCM 4, 5, 6 (Leica Biosystems, Newcastle, UK, dilución 1:100) por un período de 45 min. Posteriormente, los cortes fueron incubados con el segundo anticuerpo biotinilado anti-ratón/anti-conejo y con el complejo streptavidina/peroxidasa (LSA-B + Labeled streptavidin-biotin, Dako Corporation, Carpinteria CA, USA) por 30 min, cada uno. Los productos de la reacción fueron visualizados con sustrato de 3,3'-diaminobenzidina-H₂O₂ (Dako Corporation, Carpintería, CA, USA). Las secciones fueron contra teñidas con hematoxilina de Mayer. Se utilizó como testigos preparados de ameloblastomas.

Se realizó el conteo de células positivas en el epitelio externo, retículo estrellado y estrato intermedio, así como en los tercios cervical, medio y apical del epitelio interno del órgano del esmalte acorde al método descrito por Bologna y colaboradores⁽¹⁵⁾.

La evaluación de la expresión de cada anticuerpo fue realizada en áreas seleccionadas ricas en células epiteliales. Se tomaron 5 microfotografías por caso, a 40x en cada campo, con un microscopio de Luz marca Olympus®. La imagen fue convertida en archivo JPEG. Cada archivo fue abierto con el uso del programa de Microsoft Power Point y con el uso de la función tabla, se creó una tabla de 10x10 que fue superpuesta en la imagen de la microfotografía para facilitar el conteo. El número de células positivas y negativas fueron contadas manualmente. Se realizó una regla de tres (el total de células positivas

x100/el total de células). El porcentaje de células positivas fue calculado para cada campo.

Resultados

Una vez analizados los preparados se observó que la distribución de la positividad de las células en cada uno de los tercios del epitelio interno del órgano del esmalte es uniforme para todos los componentes del complejo MCM estudiados (Fig.1).

Sin embargo, la expresión de estos marcadores de proliferación celular está ausente en las células del epitelio externo del órgano del esmalte y del retículo estrellado, presentando un 100 % de positividad en las células del estrato intermedio.

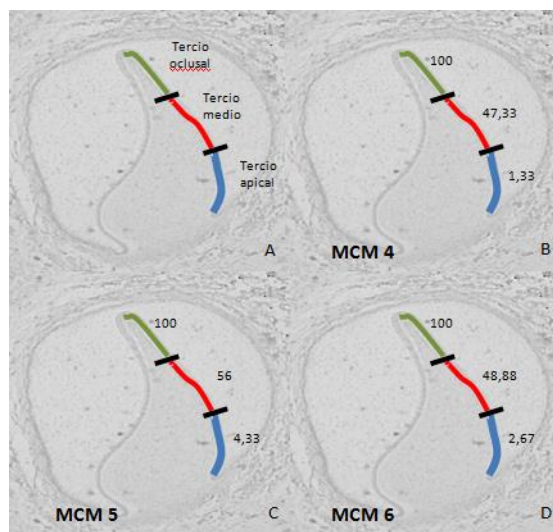


Fig. 1 – En la imagen se observa la forma en que fueron sistematizadas las áreas del epitelio interno (A). Porcentaje promedio de células marcadas positivamente en cada uno de los sectores del epitelio interno del órgano del esmalte de los gérmenes estudiados para MCM 4 (B), MCM 5 (C) y MCM 6 (D).

Aumento 10x.

La porción periférica de la papila dental presenta una distribución inversa para los tres marcadores, mostrando un gradiente de menor tasa de proliferación en la porción cervical de la pa-

pila, algo mayor en el tercio medio y una alta tasa de positividad celular en el tercio incisal u oclusal (Figs. 2 y 3).



Fig. 2. Panorámica del germen dentario en estado de campana. Se observa la inmunoexpresión de MCM4, positiva en la región interna del órgano del esmalte, y negativa en la región del epitelio externo. Aumento 10x.

Discusión

La inmunodetección de proteínas involucradas en el proceso de proliferación celular se realiza de forma rutinaria utilizando biomarcadores como Ki-67 que es considerado el Gold standard⁽¹⁶⁾. En este trabajo se propone por primera vez identificar 3 marcadores de proliferación celular no estudiados hasta ahora en gérmenes dentarios, MCM4, 5 y 6. Una de las diferencias de este complejo con la proteína Ki-67, entre otras, radica en que la proteína Ki-67 no se expresa en la etapa temprana de G1 sino que a partir de G1 tardía, y continúa durante todo el ciclo celular, exceptuando en células quiescentes (G0). Las moléculas del complejo MCM se expresan incluso en G1 temprana, siendo consideradas más sensibles en cuanto a su detección molecular⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

Estudios previos realizados por Muica et al. 2014 determinaron que la expresión de KI-67 decrece con el avance de las etapas del desarrollo dental en todos los tejidos y estratos que componen al germen dental⁽¹⁹⁾. Kero et al. apoyan estos resultados tras su estudio realizado en el mismo año, en donde determinan que el aumento de la proliferación celular permite el crecimiento del órgano del esmalte, mientras que su disminución selectiva en los diferentes componentes del germen conlleva a la desin-

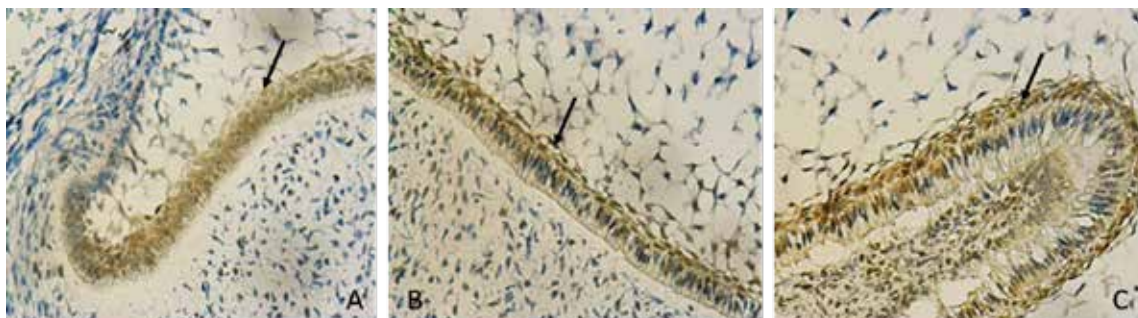


Fig. 3. Inmunoexpresión de MCM6 en la región interna del órgano del esmalte, donde podemos observar los gradientes de positividad en el epitelio interno a nivel cervical (A), medio (B) y cúspideo (C). En los tres sectores existe casi un 100% de positividad a nivel de las células del estrato intermedio (flecha). Aumento 40x.

tegración de determinadas estructuras dentales⁽²⁰⁾. La caída del índice de proliferación celular coincide con el inicio de la diferenciación de ameloblastos y odontoblastos⁽²⁰⁾. A su vez, se distingue que cada capa celular que compone el germen dental exhibe una actividad proliferativa específica. El índice de proliferación del epitelio interno del órgano del esmalte y la papila dental marcan su pico máximo en la semana 14, cayendo en la semana 21 durante el estado de campana tardía, coincidiendo con la aparición del esmalte maduro en la región coronal, o diferenciación ameloblastica-odontoblástica⁽²⁰⁾. Por otra parte, tanto el epitelio externo como el retículo estrellado mostraron una disminución constante en la actividad proliferativa a lo largo de esta fase. La distribución de las células proliferantes se mostró más uniformes a nivel de la papilla dental en todas las etapas estudiadas, comparado con el resto de las capas celulares⁽²⁰⁾. Comparando nuestros resultados con los estudios citados, observamos que en nuestro estudio hay una disminución gradual del porcentaje de MCM4, 5 y 6 en el epitelio interno del órgano del esmalte, lo cual podría estar marcando un descenso en la proliferación para favorecer la desintegración selectiva dentaria, permitiendo pasar a un estado más maduro del tejido, coincidiendo con la diferenciación de los ameloblastos y odontoblastos. Esto se acompaña de igual forma con la expresión negativa de los marcadores a nivel del epitelio externo y el retículo estrellado.

Tomando en cuenta que a pesar de que los marcadores MCM son más sensibles en determinados tejidos comparados con la acción de Ki-67^(17, 18) consideramos que estos estudios son comparables con nuestros resultados.

Estudios basados en los patrones de invaginación de la vaina radicular epitelial de Hertwig y la formación radicular mesial así como la formación de la bifurcación dental, determinan que estas regiones se correlacionan con la condensación de células mesenquimales altamente proliferativas, observando a nivel de molares

que el porcentaje de Ki-67 era el doble comparando las zonas de raíz mesial con la bifurcación, sugiriendo que la proliferación pulpar induce la migración epitelial en esta etapa⁽²¹⁻²²⁾. Por lo tanto, basándonos en nuestros resultados, en donde la positividad de expresión de estas tres proteínas del complejo MCM decrece, siendo 100% a nivel incisal, pasando por 47-56% a nivel medio y llegando a valores de 1,33-4,33% a nivel cervical en la etapa de campana, nos conlleva a pensar que a medida que avanzan las fases de la odontogénesis conjuntamente con la diferenciación celular, los diferentes estratos de formación dentaria expresan sus niveles de proliferación celular de manera diferencial, con una inducción epitelio-mesenquimal, para concluir con el desarrollo normal de las piezas dentales.

Conclusiones

De acuerdo con los datos obtenidos podemos considerar a las proteínas del complejo MCM 4, 5 y 6 como indicadoras de la actividad proliferativa en el proceso de Odontogénesis. Nuestros hallazgos permiten evidenciar un gradiente de concentraciones de estas moléculas con diferencias marcadas entre las regiones cervical, medio y cusplídea del epitelio interno del órgano del esmalte, lo cual se condice con la actividad celular descrita por diversos autores en la bibliografía. Dicha evidencia se constata a sí mismo en las células de la papila dental donde debemos continuar profundizando en el estudio de la misma.

Referencias

1. Mass R, Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1997; 8 (1): 4-39.
2. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology*. 8th. ed. London: Elsevier, 2013.
3. Thesleff I, Keränen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogene-

- sis and odontoblast differentiation. *Adv. Dent. Res.* 2001; 15: 14-18.
4. Alver RC, Chadha GS, Blow JJ. The contribution of dormant origins to genome stability: from cell biology to human genetics. *DNA Repair.* 2014; 19 (100): 182-9.
 5. Forsburg SL. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68 (1), 109-131.
 6. Laskey R. The Croonian Lecture 2001 hunting the antisocial cancer cell: MCM proteins and their exploitation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005; 360 (1458): 1119-1132.
 7. Simon NE, Schwacha A. The MCM2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *BioMed Research International.* 2014; 2014: 14.
 8. Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y, Araki H. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature.* 2007; 445 (7125): 328.
 9. Zegerman P, Diffley JF. DNA replication as a target of the DNA damage checkpoint. *DNA repair (Amst).* 2009; 8 (9): 1077-1088.
 10. Byun TS, Pacek M, Yee MC, Walter JC, Cimprich KA. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 2005; 19 (9): 1040-1052.
 11. Cortez D, Glick G, Elledge SJ. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101 (27): 10078-10083.
 12. Zhai Y, Li N, Jiang H, Huang X, Gao N, Tye BK. Unique Roles of the Non-identical MCM Subunits in DNA Replication Licensing. *Mol Cell.* 2017; 20;67(2): 168-179.
 13. Deegan TD, Diffley JF. MCM: one ring to rule them all. *Curr Opin Struct Biol.* 2016; 37: 145-51.
 14. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon HJ, Kimura H, Yamada K, Song SY. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem.* 2003; 270 (6): 1089-1101.
 15. Bologna-Molina R, Damián-Matsumura P, Molina-Frechero N. An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology.* 2011; 59 (4): 801-3.
 16. Pontes HA, Pontes FS, Silva BS, Cury SE, Fonseca FP, Salim RA, Pintor Júnior Ddos S. Immunoeexpression of ki67, proliferative cell nuclear antigen, and Bcl-2 proteins in a case of ameloblastic fibrosarcoma. *Ann Diagn Pathol.* 2010; 14 (6): 447-52.
 17. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182: 311-22.33.
 18. Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K, Ito H. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32 (8): 468-74. 34.
 19. Muica Nagy-Bota MC, Pap Z, Denes L, Ghizdavăț A, Brînzaniuc K, LupCoșarcă AS, Chibelea Cires-Mărginean M, Păcurar M, Pávai Z. Immunohistochemical study of Ki67, CD34 and p53 expression in human tooth buds. *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55 (1):43-8.
 20. Kero D, Govorko D K, Vukojevic K, Cubela M, Soljic V, Saraga-Babic M. Expression of cytokeratin 8, vimentin, syndecan-1 and Ki-67 during human tooth development. *Journal of molecular histology,* 2014; 45 (6): 627-640.
 21. Sohn WJ, Choi MA, Yamamoto H, Lee S, Lee Y, Jung JK, Jin MU, An CH, Jung HS, Suh JY, Shin HI, Kim JY. Contribution of Mesenchymal Proliferation in tooth root Morphogenesis. *J Dent Res.* 2014; 93 (1): 78-83.
 22. Iwamoto T, Nakamura T, Ishikawa M, Yoshizaki K, Sugimoto A, Ida-Yonemochi H, Masahiro Saito, Yoshihiko Yamada, Satoshi Fukumoto. Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177557>

Vanesa Pereira: vanesapereira91@hotmail.com

Fecha de recibido: 14.05.2018- Fecha de aceptado: 09.08.2018