



Facultad de Odontología  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA



ESCUELA DE GRADUADOS  
Facultad de Odontología : Universidad de la República

# **Estudio comparativo de Ki-67 y el complejo MCM4-6 en ameloblastoma y ameloblastoma uniuqúístico.**

Autor: Delmira Apellániz de los Campos

Maestría en Ciencias Odontológicas

Salida en Biología Oral

Facultad de Odontología Universidad de la Republica

Montevideo 2019

**Estudio comparativo de Ki-67 y el complejo MCM4-6 en  
ameloblastoma y ameloblastoma unicuístico.**

Autor: Delmira Apellániz de los Campos

Tesis presentada para la obtención del título de Magíster en Ciencias Odontológicas, Salida en  
Biología Oral.

Facultad de Odontología – Udelar, Uruguay.

Tutor: Prof. Dr. Ronell Bologna Molina, PhD

Montevideo 2019

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente a la Universidad de la República del Uruguay por haberme aceptado ser parte de ella, así como también a los diferentes docentes que me abrieron las puertas de sus cátedras y me hicieron sentir parte de ellas.

Mi agradecimiento también va dirigido a la Comisión Académica de Posgrado por haber confiado en mí y en mi proyecto brindándome su apoyo.

Agradezco también a mi tutor que desde el inicio me motivó a recorrer este camino y siempre estuvo a mi lado y a mis compañeros, aquellos que enfrentaron conmigo las pruebas permitiéndome superarlas.

Y para finalizar agradezco a mi familia, estas páginas no estarían escritas si no fuera por ellos, a mis amigos quienes siempre están para hacer todo más fácil y a la persona que me acompaña en el camino de la vida, mi amor, que está en todo momento.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1- Resumen.....                                | 5  |
| 2- Abstract.....                               | 6  |
| 3- Abreviaturas.....                           | 7  |
| 4- Introducción.....                           | 8  |
| a- Tumores odontogénicos.....                  | 8  |
| b- Ameloblastomas.....                         | 10 |
| c- Biomarcadores moleculares.....              | 13 |
| d- Biomarcadores de proliferación celular..... | 14 |
| e- Ki-67.....                                  | 17 |
| f- Proteínas MCM4, 5 y 6.....                  | 17 |
| g- Funciones de las proteínas MCM.....         | 19 |
| 5- Justificación.....                          | 20 |
| 6- Pregunta de investigación.....              | 21 |
| 7- Objetivos.....                              | 22 |
| a- Generales.....                              | 22 |
| b- Específicos.....                            | 22 |
| 8- Hipótesis.....                              | 23 |
| 9- Materiales y métodos.....                   | 23 |
| a- Tipo y diseño general del estudio.....      | 23 |
| b- Obtención de muestras.....                  | 23 |
| c- Criterios de inclusión.....                 | 25 |
| d- Criterios de exclusión.....                 | 25 |
| e- Técnica de inmunohistoquímica.....          | 26 |
| f- Visualización.....                          | 27 |
| g- Western-Blot.....                           | 29 |
| h- Análisis Estadístico.....                   | 30 |
| 10- Resultados.....                            | 31 |
| 11- Discusión.....                             | 41 |
| 12- Conclusiones.....                          | 46 |
| 13- Perspectivas.....                          | 46 |
| 14- Referencias.....                           | 47 |

# 1- Resumen

**Introducción:** El ameloblastoma sólido/convencional (AM) y el ameloblastoma unicístico (UAM) son los tumores odontogénicos epiteliales benignos más frecuentes de los maxilares y su tratamiento suelen ser amplias resecciones quirúrgicas. El estudio de nuevos biomarcadores moleculares es de relevancia para generar nueva información con la finalidad de comprender el comportamiento biológico de estos tumores. El objetivo de este estudio es describir y comparar la expresión de proteínas relacionadas con la proliferación celular: Ki-67 y el complejo MCM4-6 en estas neoplasias.

**Materiales y Métodos:** Se realizó la técnica inmunohistoquímica para los anticuerpos Ki-67, MCM4, MCM5 y MCM6 en 10 AM, y 10 UAM, cuyos resultados fueron cuantificados por la técnica de Label Index (Li), y posteriormente analizados estadísticamente.

**Resultados:** Los AM y UAM presentaron una mayor expresión de MCM6 seguido por MCM5, MCM4 y Ki-67 ( $p < 0.05$ ). La inmunoexpresión de Ki-67 y MCM5 fue exclusivamente nuclear, mientras que la expresión de MCM4 y MCM6 se presentó en núcleo y citoplasma.

**Conclusión:** Los resultados sugieren que MCM5 es un marcador de proliferación celular confiable, demostrando en algunos casos mayor sensibilidad que Ki-67, por lo que también podría ser de utilidad para predecir y entender mejor el comportamiento biológico de los ameloblastomas.

## **2- Abstract**

**INTRODUCTION:** Solid/conventional ameloblastoma (AM) and unicystic ameloblastoma (UAM) are the most frequent benign epithelial odontogenic tumors located in the maxillary region, and their treatment usually consists of extensive surgical resection. Therefore, it is relevant to study molecular markers to better understand the biological behavior of these tumors. The aim of this study was to describe and compare the expression of proteins related to cellular proliferation: Ki-67 and MCM4-6 complex.

**MATERIALS AND METHODS:** Immunohistochemistry technique was performed, with antibodies against Ki-67, MCM4, MCM5, and MCM6, in 10 AM and 10 UAM tumors. The results were quantified using label index and analyzed statistically.

**RESULTS:** AM and UAM had greater expression of MCM6, followed by MCM5, MCM4, and Ki-67 ( $P < .05$ ). Immunoexpression of Ki-67 and MCM5 was exclusively nuclear, whereas the expression of MCM4 and MCM6 was nuclear and cytoplasmic.

**CONCLUSION:** The results suggest that MCM5 is a trustable cell proliferation marker with higher sensitivity compared with Ki-67 and may be useful to predict the biological behavior of AM and UAM. Despite this, further studies are necessary, including a correlation with clinical parameters to confirm these findings.

### **3- Abreviaturas**

TOD: tumores odontogénicos

OMS: Organización Mundial de la Salud

AMEL: ameloblastoma

AM: ameloblastoma sólido/convencional

UAM: ameloblastoma uniuquístico

Li: label Index

ADN: ácido desoxirribonucleico

PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación

CA: carcinoma ameloblástico

MCM 2-7: complejo de Mantenimiento de Mini-Cromosomas

G1: GAP 1 (intervalo 1)

S: síntesis

G2: GAP 2 (intervalo 2)

ORC: complejo de reconocimiento de orígenes

Cdc6: cell división cycle 6

CDK: quinasa dependiente de ciclina

## 4- Introducción

### a- *Tumores odontogénicos*

Los tumores odontogénicos (TOD) son lesiones relativamente raras y poco frecuentes pero de gran importancia para el odontólogo, el cirujano maxilofacial, patólogo y sobre todo para el paciente que lo padece, dado que son lesiones que pueden llegar a tener un comportamiento agresivo, destructivo y mutilante que en ocasiones pueden llegar a comprometer la vida del paciente. Los TOD son lesiones que derivan de elementos epiteliales, mesenquimales y/o ectomesenquimales que son o fueron parte del proceso de odontogénesis o formación del diente (Philipsen y Reichart 2006). Estas lesiones se encuentran en los huesos maxilares (localización intraósea) o en la mucosa bucal (localización periférica). Entre ellos existen tumores con bajo potencial de crecimiento (posiblemente hamartomas), pasando por neoplasias benignas de comportamiento agresivo, hasta neoplasias malignas. Dada la gran variedad de TOD, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1971, presentó una primera clasificación la cual ha sido modificada por última vez en el 2017 (Soluk-Tekkeşin y Wright 2018, Barnes et al., 2005). El propósito del desarrollo de una clasificación unificada fue con el objetivo de adoptar una terminología común que amplíe y facilite la comunicación entre los médicos del área (odontólogos, cirujanos maxilofaciales, otorrinolaringólogos, anatomopatólogos y patólogos bucales). Y así, los profesionales de la salud utilizarían términos comunes para fines diagnósticos y terapéuticos, así como actualizar nueva información concerniente a dichas lesiones, producto de los conocimientos más recientemente adquiridos a través de la investigación científica.



| <b>CLASIFICACION DE TUMORES ODONTOGENICOS, OMS 2017.</b>  |
|---|
| <p><b>CARCINOMAS ODONTOGÉNICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Carcinoma primario intraoseo</li> <li>- Carcinoma odontogénico esclerosante</li> <li>- Carcinoma odontogénico de células claras</li> <li>- Carcinoma odontogénico de células fantasmas</li> </ul>   |
| <p><b>TUMORES ODONTOGÉNICOS BENIGNOS EPITELIALES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ameloblastoma convencional</li> <li>- Ameloblastoma Uniquístico</li> <li>- Ameloblastoma extra óseo periférico</li> <li>- Ameloblastoma metastásico</li> <li>- Tumor odontogénico escamoso</li> <li>- Tumor odontogénico epitelial calcificante</li> <li>- Tumor odontogénico adenomatoide</li> </ul> |
| <p><b>TUMORES ODONTOGÉNICOS BENIGNOS MIXTOS, EPITELIALES Y MESENQUIMÁTICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fibroma ameloblástico</li> <li>- Tumor odontogénico primordial</li> <li>- Odontoma compuesto</li> <li>- Odontoma complejo</li> <li>- Tumor dentinogénico de células fantasmas</li> </ul>  |
| <p><b>TUMORES ODONTOGÉNICOS BENIGNOS MESENQUIMÁTICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fibroma odontogénico</li> <li>- Mixoma odontogénico / mixofibroma</li> <li>- Cementoblastoma</li> <li>- Fibroma cemento osificante</li> </ul>   |

Tabla 1- Clasificación de tumores odontogénicos, OMS 2017.

## **b- Ameloblastomas**

Los TOD son entidades que representan hasta el 2.5% del total de las lesiones de cabeza y cuello, entre éstos el ameloblastoma (AMEL) es uno de los TOD más comunes y probablemente una de las neoplasias más controversiales de la región craneofacial, la cual es una neoplasia agresiva pero benigna (Johnson et al., 2014; Reichart et al., 1995). El AMEL presenta frecuencias que van del 11% del total de los tumores odontogénicos en Estados Unidos de Norteamérica, 13.5% en Canadá (Johnson et al., 2014), 36% en Turquía (Soluk Tekkesin et al., 2016) y hasta más del 60% en países de Asia y África (Luo y Li, 2009, Lawal et al., 2013). En el panorama latinoamericano existen informes de series realizadas en Brasil (Osterne et al., 2017) donde el AMEL tiene una prevalencia del 22%. En México se destacan los estudios realizados por Mosqueda y colaboradores (Mosqueda et al., 1997) quienes encontraron que el AMEL representaba el 23.3% de todos los casos de tumores odontogénicos diagnosticados en dos escuelas de odontología, un hospital de cáncer y un servicio de patología bucal privado, los cuales se encontraban situados en la Ciudad de México. Desafortunadamente los criterios para hacer la clasificación histológica de los tumores empleados en varios de estos trabajos no son uniformes, por lo que en muchos casos no es posible realizar comparaciones entre ellos.

La OMS en 2005 clasificó a los AMEL en sólidos / multiquísticos, extraóseos / periféricos, desmoplásicos y unikuísticos (Barnes et al., 2005). En el 2017 han reducido la clasificación en ameloblastoma convencional (AM) (Imagen 1), ameloblastoma unikuístico (UAM) (Imagen 2) y tipos extraóseos / periféricos. El término sólido / multiquístico se descartó porque la mayoría de los AMEL convencionales muestran degeneración quística. El tipo desmoplásico se dejó bajo el subtipo histopatológico en lugar de convertirse en una entidad separada. Los diferentes tipos histopatológicos

incluyen, células foliculares, plexiformes, acantomatosas, granulares, basaloides y desmoplásicas (Imagen 1). El patrón folicular es el patrón más común, se caracteriza por islas de células neoplásicas que en el centro se asemejan al retículo estrellado del germen dental en desarrollo y en la periferia las células son columnares, se encuentran en empalizada y muestran polaridad inversa nuclear (Imagen 1, a). El plexiforme se caracteriza por hebras de láminas delgadas, pero hay dos patrones distintos (Imagen 1, b). Uno donde las células son basaloides y a menudo están dispuestas en una fila doble de células basaloides sin empalizada periférica o polaridad nuclear inversa. En el segundo patrón de plexiforme, las cuerdas son más gruesas, las células centrales son más escamosas pero sin empalizada periférica o polaridad nuclear inversa. El patrón acantomatoso muestra una diferenciación escamosa en el centro (Imagen 1, c). Los tipos de células granulares y basaloides muestran cambio de células granulares o morfología basaloides respectivamente (Imagen 1, d). En la variante desmoplásica, las células tumorales pueden inducir desmoplasia estromal que a menudo comprime las células neoplásicas, dando como resultado la pérdida de empalizada periférica de diagnóstico con polaridad nuclear inversa. Mientras que los ameloblastomas pueden mostrar un subtipo histológico predominante, la mayoría muestra combinaciones de subtipos (Soluk-Tekkeşin y Wright , 2018).

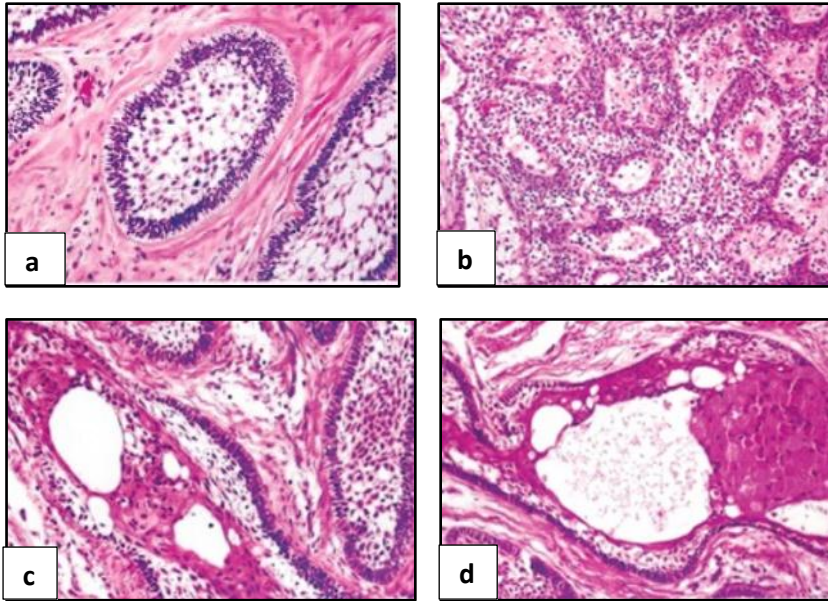


Imagen 1- Ameloblastoma (AM) a- Follicular. b- Plexiforme c- Tipo Acantomatoso. d- Tipo Granular. Imagen tomada de WHO Classification, Head and Neck Tumours.

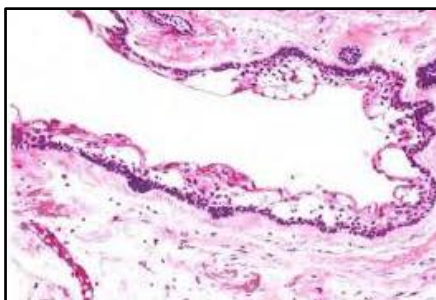


Imagen 2- Ameloblastoma unicístico (UAM). Imagen tomada de WHO Classification, Head and Neck Tumours.

Desde el punto de vista clínico, la localización más frecuente de todos los tipos de AMEL es la mandíbula, presentándose el 75% de las veces en área molar y rama ascendente. Las lesiones del maxilar superior se concentran en el área molar, desde donde suelen extenderse al seno maxilar y al suelo de las fosas nasales. La edad más

frecuente es entre los 20 - 40 años (no hay preferencia significativa por sexo), aunque el UAM se presenta con mayor frecuencia entre los 16 - 20 años e inclusive en pacientes más jóvenes (Philipsen y Reichart 2006). Puede producir deformidades extensas, incluso grotescas de los maxilares; tiende a expandir las corticales óseas debido a que su lento crecimiento deja tiempo al periostio para producir una fina concha de hueso por delante de la lesión en expansión. Esta cortical externa de hueso adelgazado se rompe fácilmente al ser palpada, signo diagnóstico denominado “crujido de cáscara de huevo” (Saap et al., 2000). Desde el punto de vista radiográfico, puede apreciarse como una lesión osteolítica, radiolúcida multilocular o unilocular, que puede causar desplazamiento y rizoclasia (Regezi y Sciubba, 2000). El tratamiento más común es la resección marginal o en bloque, teniendo recidiva de hasta el 30%, pero si se trata más conservadoramente con curetaje puede llegar a tener una recidiva relativamente alta (50 - 90%). El UAM suele tratarse menos agresivamente y con enucleación puede llegar a tener recidiva relativamente baja (10%) (Saap et al., 2000).

La tipificación de los AMEL es importante para el patólogo y cirujano maxilofacial, porque dicha tipificación se basa en el patrón de crecimiento y conducta biológica, lo cual es requisito para determinar tratamiento y pronóstico de cada variante individual del AMEL. Si esto es ignorado, puede llevar al paciente a una cirugía innecesaria, extensa y mutilante.

### ***c- Biomarcadores moleculares.***

Las denominadas biomoléculas son todas las moléculas de naturaleza orgánica con diferentes grados de complejidad, estructura y distribución. A modo de ejemplo, en una

célula existe gran heterogeneidad de biomoléculas, como los carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, cofactores y proteínas, las cuales juegan papeles importantes en los procesos celulares que involucran almacenamiento, movimiento, energía, transporte, catálisis, defensa, entre otros. Sin embargo, no todas las biomoléculas son utilizadas como biomarcadores moleculares, probablemente se deba a que aún no se ha alcanzado el nivel de conocimiento y tecnología que permita su manipulación en la investigación y diagnóstico. Todo lo cual nos lleva a definir a un biomarcador molecular como aquella 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 vivo (Zhang et al., 2012).

#### ***d- Biomarcadores de proliferación celular***

La proliferación celular es el incremento del número de células, resultado de la división celular, es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo, pero continúa durante toda la vida siendo necesaria para la homeostasis tisular (McInerney, 2016).

La división de una célula en dos células hijas requiere de la replicación previa del ADN y la síntesis de varias proteínas, así como la producción de estructuras y orgánulos para las nuevas células. Estos procesos ocurren en la interfase del ciclo, que a su vez se divide en fases: G1 (Gap 1), S (Síntesis) y G2 (Gap 2) (Imagen 3).

Cuando se cumplen todas las condiciones necesarias para la división, comienza la etapa M (mitosis), que da como resultado la separación de los cromosomas y luego la división del citoplasma, conocida como citocinesis. Algunas células pueden permanecer en un estado de metabolismo activo durante mucho tiempo sin replicar su ADN o dividirse.

Estas células están en fase G0 o en estado inactivo (Alberts, et al. 2007).

El control del ciclo celular es fundamental para la integridad del genoma, por lo que hay múltiples proteínas regulando este proceso. La pérdida de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación celular ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas (McInerny, 2016).

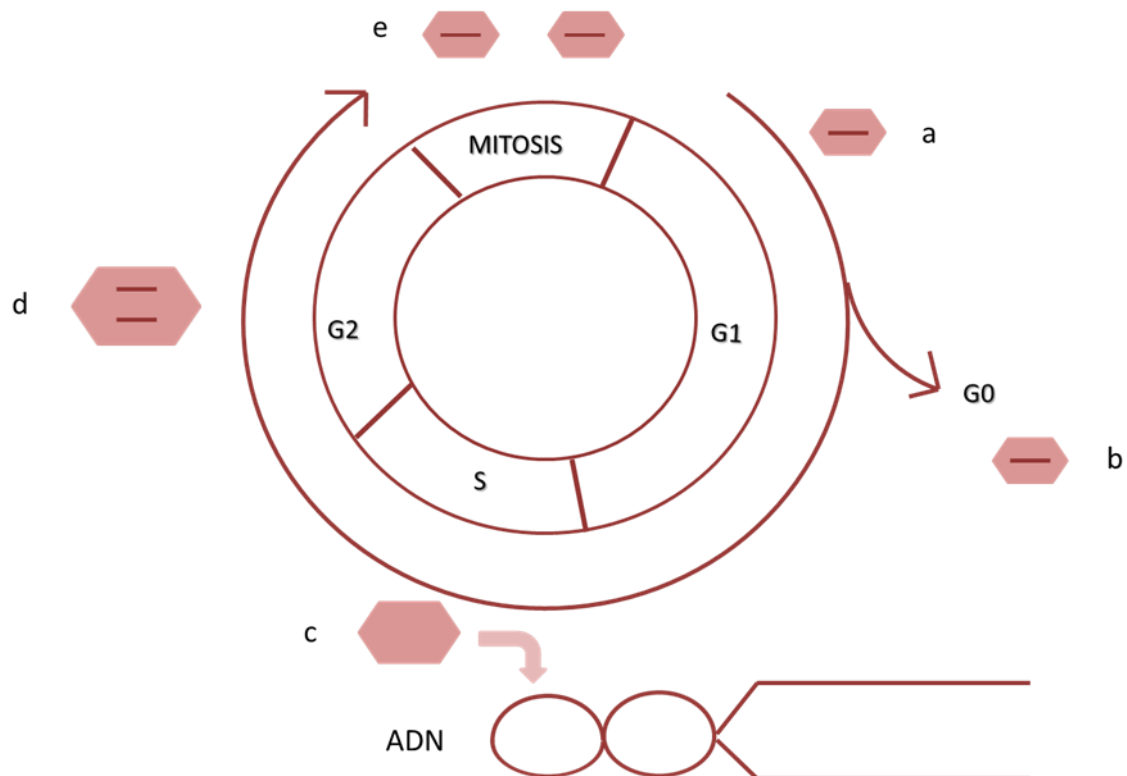


Imagen 3- Ciclo celular. a- Fase G1, la célula entra al ciclo celular. b- Fase G0, la célula está en estado de reposo. c- Fase S, la célula duplicando su ADN. d- Fase G2, la célula con el ADN duplicado. e- Mitosis, división de la célula en dos células hijas.

La identificación de las proteínas que intervienen en el ciclo celular nos permite utilizarlas como biomarcadores de proliferación celular los cuales son útiles para evaluar y predecir el comportamiento de los tumores, es decir, su capacidad de crecimiento, su probabilidad de recurrencia local, su potencial metastásico y por lo tanto

el pronóstico de nuestro paciente (Van Diest, et al. 1998). Hoy en día, el método más común para evaluar la actividad proliferativa es el uso de técnicas inmunohistoquímicas.

La tinción inmunohistoquímica se usa ampliamente en la identificación de células anormales, como las que se encuentran en tumores. Esta técnica también se utiliza ampliamente en la investigación básica para comprender la distribución y localización de biomarcadores y proteínas.

Los marcadores de proliferación son proteínas u otros factores específicos, en células en crecimiento y división, cuya presencia sirve como indicador de tales células (Bologna-Molina, et al. 2013a)

Se han postulado dos requisitos para este tipo de marcador: (1) el antígeno debe estar continuamente presente durante el ciclo celular de todos los tipos de células; y (2) la transición a un estado no proliferativo desde cualquier etapa del ciclo celular debe ser seguida por una rápida desaparición del antígeno (Van Dierendonck, et al. 1989).

Nuestro grupo realizó una revisión de todos los marcadores de proliferación celular que han sido utilizados en AMEL (Bologna-Molina, et al. 2013a). En un trabajo posterior (Bologna et al., 2013b), se seleccionaron los dos marcadores más comúnmente usados PCNA y Ki-67 con el objetivo de determinar cuál era de mayor utilidad en la determinación del comportamiento biológico tumoral y así servir como marcador pronóstico del avance tumoral en los AMEL. Sin embargo, en este proyecto proponemos el estudio de nuevos biomarcadores, las proteínas MCM 4, 5 y 6 que forman parte del complejo de Mantenimiento de Mini-Cromosomas (MCM 2-7).



#### **e- *Ki-67***

El anticuerpo monoclonal Ki-67 fue descrito por primera vez en 1983 por Gerdes et al (Gerdes, et al. 1983), quienes sugirieron que podría usarse como un marcador para células en proliferación.

El hecho de que la expresión de Ki-67 ocurre durante todas las fases del ciclo celular, excepto en la fase G0 y la fase G1 temprana y que esta proteína luego se degrada rápidamente después de la mitosis (Bologna-Molina, et al. 2013b) hace que sea un excelente marcador para la determinación de la fracción de crecimiento de una población celular dada (Scholzen y Gerdes, 2000).

El antígeno Ki-67 es un marcador clásico, considerado como el estándar de oro para medir la proliferación celular, se ha aplicado ampliamente en los campos de diagnóstico, investigación y descubrimiento fármacos. Este tiene valor pronóstico para muchos tipos de tumores malignos (Ihmann, et al. 2004).

Varios son los estudios que tienen como objetivo determinar la capacidad proliferativa de los ameloblastomas utilizando el marcador Ki-67 (Soluk Tekkesin et al 2012, Bologna-Molina et al.2013, Otero et al. 2013, Ahlem et al. 2015, Bologna-Molina et al. 2008, González-González et al. 2015, Sandra et al 2001, Meer et al. 2003).

#### **f- *Proteínas MCM4, 5 y 6.***

Las proteínas MCM4, 5 y 6, forman parte del complejo MCM2-7, este fue reconocido en el año 1980. Tiene una forma toroidal y está compuesto además por otras 3 proteínas (MCM2, MCM3 y MCM7) (Forsburg, 2004).

El complejo MCM2-7 forma parte del complejo pre-replicativo por lo que tienen un rol esencial en la replicación del ADN (Imagen 4) (Simon y Schwacha, 2014).

A finales de la mitosis e inicios de G1 se forma el complejo pre-replicative conformado por el complejo de reconocimiento de orígenes (ORC), cell division cycle 6 (Cdc6) y MCM2-7 (Imagen 4) (Nguyen et al 2000, Braun y Breeden, 2007). Este complejo marca el fragmento de ADN donde se dará inicio a la replicación, en la fase S del ciclo celular el complejo pre-replicative se activa dando lugar a la replicación del ADN (Imagen 4) (Arias y Walter, 2007, Alver et al. 2014). Una vez que la replicación ha sido culminada se produce la disolución del complejo y la destrucción de sus componentes (Nguyen et al 2000).

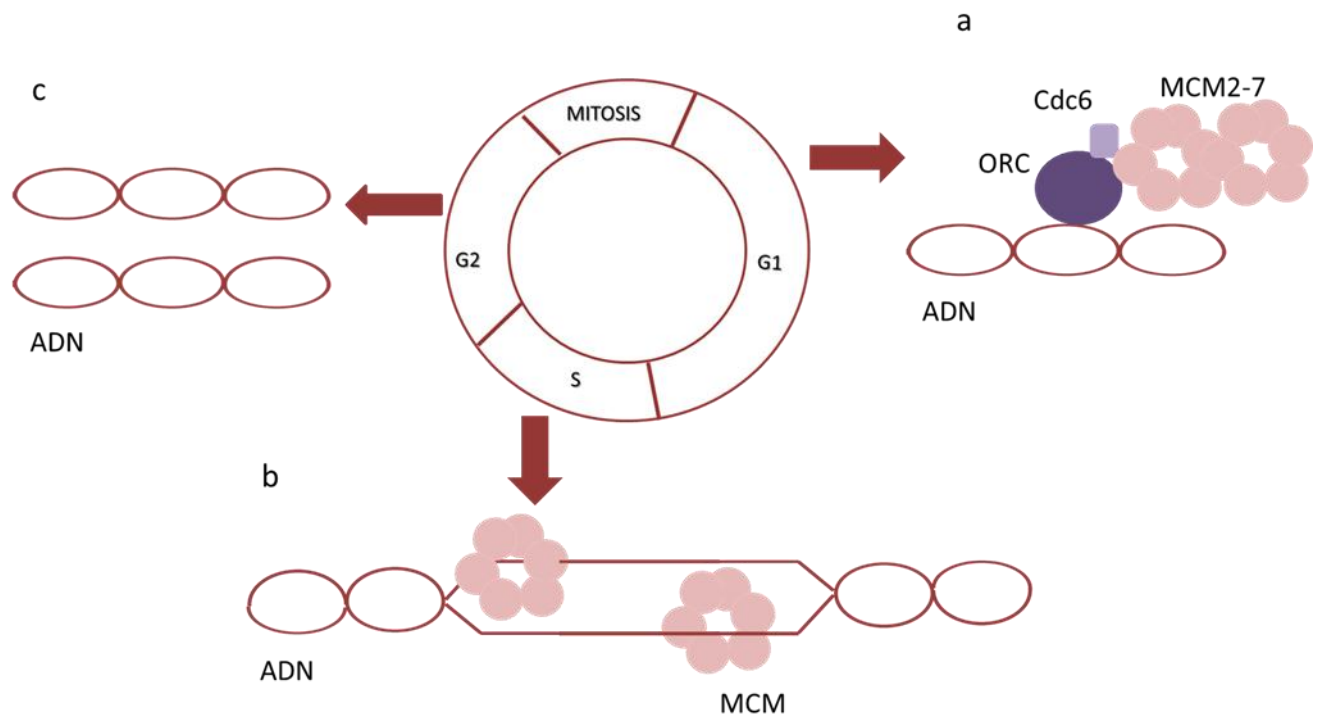


Imagen 4- a- Complejo pre-replicative formado. b- complejo activo, replicación del ADN. c- Dos hebras de ADN, disolución del complejo.

La actividad de las proteínas MCM está sumamente regulada por la actividad de una quinasa dependiente de ciclina (CDK), esta se encuentra en bajos niveles a finales de la mitosis y comienzos de G1 promoviendo la formación del complejo pre-replicative, y aumenta a finales de la fase S y M, lo que conduce a la fosforilación de los

componentes del complejo MCM2-7, haciendo que salgan al citoplasma y se degraden (Nguyen et al 2000, Braun y Breeden, 2007).

**g- Funciones de las proteínas MCM**

- 1- Inicia la replicación, permitiendo que esta se de en el momento oportuno para lo cual debe cambiar su estructura tridimensional. El complejo MCM2-7 cuando está inactivo presenta una discontinuidad reversible en su estructura toroidal, al unirse las proteínas MCM2 y MCM5 cierran esta discontinuidad permitiendo así activar el complejo MCM2-7 (Zegerman y Diffley, 2007, Tanaka et al, 2007) (Imagen5).

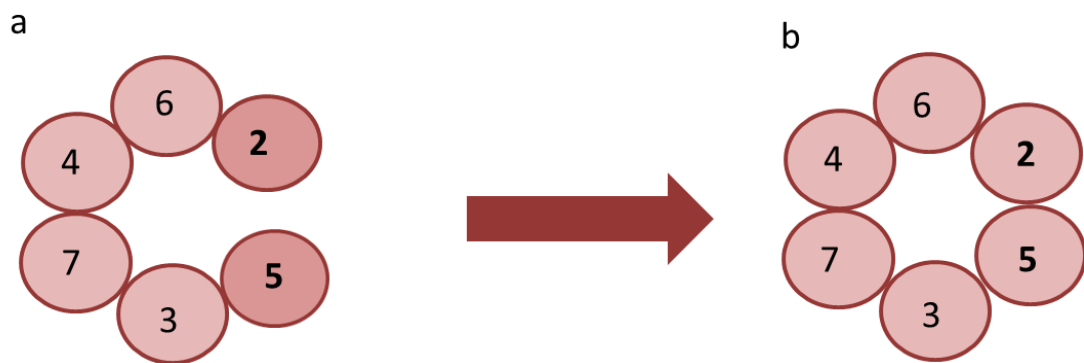


Imagen 5- a- Complejo inactivo b- complejo activo

- 2- Función helicasa: una vez que se cierra la discontinuidad MCM2-5, el complejo MCM2-7 comienza a desenrollar las dos hebras del ADN para que se pueda dar la replicación. La actividad helicasa se ha demostrado in vitro para el sub complejo MCM4, 6 y 7 (Xu et al. 2013).

- 3- Detiene la replicación: Si se detectan daños en el ADN, el complejo MCM2-7 detiene su actividad helicasa (Cortez et al. 2004).
- 4- Cuida que todo el ADN sea replicado: Debido al gran tamaño de los cromosomas se necesitan miles de sitios para dar origen a la replicación (Alver et al. 2014), pero de los múltiples sitios que presentan el complejo pre-replicativo, solo algunos se utilizan, los otros permanecen latentes y en caso de stress de replicación se activan, lo cual es importante para que la totalidad del ADN sea replicado (Blow et al. 2011).
- 5- Evita la replicación del ADN más de una vez (Tan et al. 2012). Ya que, una vez replicado el ADN, salen al citoplasma y degradan sus componentes (Nguyen et al. 2000).

Según Nguyen 2000, Todas las proteínas que forman el complejo MCM2-7 tienen el mismo patrón de localización en el ciclo celular y estas, una vez culminada la replicación, se transportan al citoplasma.

Pero, al contrario de este autor, investigaciones genéticas y bioquímicas más nuevas muestran funciones diferentes de las subunidades del complejo MCM2-7 (Bochman y Schwacha, 2007, Bochman et al. 2008, Ilves et al. 2010).

## **5- Justificación**

El interés por el estudio a nivel molecular de los AMEL radica en que es una lesión relativamente frecuente en los maxilares, con un comportamiento agresivo, invasivo, cuyo tratamiento es radical y en ocasiones puede ser mutilante y con altos índices de

recurrencia. Debido a la localización exclusiva de la región maxilofacial el odontólogo puede ser el primero en entrar en contacto con esta lesión.

El conocimiento de la inmunexpresión de las proteínas MCM4, 5 y 6, en las diferentes variantes de AMEL podría ayudar a comprender el comportamiento biológico de estos tumores. Asimismo, el conocimiento de los patrones de expresión de los biomarcadores estudiados será de utilidad en un futuro próximo en la determinación de los parámetros y nuevas estrategias terapéuticas en el manejo de cada variante tumoral (siendo radical u conservador dependiendo las características propias de cada neoplasia). Las proteínas MCM4, 5 y 6 podrían ser buenos marcadores de proliferación celular (Madine et al. 2000), posibles marcadores auxiliares en el diagnóstico y pronóstico (Das et al. 2013, Giaginis et al. 2010) y futuros blancos terapéuticos (Simon y Schwacha, 2014). Se ha demostrado que varios supresores tumorales pueden inhibir la actividad de MCM 2-7 (Simon y Schwacha, 2014).

## **6- Pregunta de investigación**

¿Pueden los biomarcadores moleculares MCM4, 5 y 6 constituir indicadores importantes en la progresión y el comportamiento tumoral, en las diferentes variantes de AMEL?, ¿La identificación de diversos marcadores de proliferación celular, podría tener implicaciones clínicas que ayuden a predecir el comportamiento biológico de las diferentes variantes de AMEL?, ¿Podrá relacionarse la inmunexpresión de estas proteínas como factores predictores en la biología del crecimiento y avance tumoral?

## 7- Objetivos

### *a- Objetivo general*

El objetivo de este estudio fue determinar los patrones de inmunexpresión de MCM 4, 5, 6 y correlacionarlos con la presencia de Ki-67 con la finalidad de evaluar su utilidad como posibles marcadores de proliferación celular en AM y UAM.

### *b- Objetivos específicos*

- 1- Determinar la inmunexpresión de MCM4 en AMEL.
- 2- Determinar la inmunexpresión de MCM5 en AMEL.
- 3- Determinar la inmunexpresión de MCM6 en AMEL.
- 4- Determinar la inmunexpresión de Ki-67 en AMEL.
- 5- Correlacionar la inmunexpresión de las proteínas MCM4, MCM5, MCM6 y Ki-67 con la variante histológica del tumor.
- 6- Correlacionar la inmunexpresión de MCM4, MCM5, MCM6 y Ki-67 entre sí.

## **8- Hipótesis**

Las proteínas MCM4, 5 y 6 podrían comportarse como buenos marcadores de proliferación celular, instrumento para diagnóstico y pronóstico, así como futuros blancos terapéuticos.

## **9- Materiales y métodos**

### ***a- Tipo y diseño general del estudio***

Se trata de un estudio observacional, transversal y retrospectivo.

### ***b- Obtención de muestras***

Se realizó un muestreo no probabilístico, por conveniencia. La muestra fue representada por todas las historias clínicas con diagnóstico histopatológico previo de AMEL en el período anterior (hasta el año 2014). Las muestras fueron obtenidas del laboratorio de Patología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República (UDELAR) (Uruguay). Se incluyeron un total de 20 especímenes de tejidos de la región maxilofacial producto de biopsia incisional o excisional cuyo diagnóstico previo fue de AM (10 casos) y UAM (10 casos) (tabla 2).

| AM       | UAM                 |
|----------|---------------------|
| 88-148   | 87-411              |
| 91-097   | 94-459              |
| 95-322   | 98-339              |
| 99-076   | 01-308-1            |
| 01- 364  | 02-205 <sup>a</sup> |
| 02-357   | 03-141 A            |
| 02-643   | 03-221              |
| 04-806   | 05-241              |
| 05-698 B | 05-472              |
| 06-534   | 05-537              |

Tabla 2 – Tabla de casos, 10 AM y 10 UAM

Se realizó por muestra un total de 5 cortes, un corte para tinción con Hematoxilina y Eosina, para ser reevaluadas y reclasificadas de acuerdo a la última clasificación de la OMS (Soluk-Tekkeşin y Wright 2018) y 4 cortes para cada caso (total 80) para la técnica inmunohistoquímica (uno para cada marcador, Ki-67, MCM 4, MCM5 y MCM6) y fueron montados en laminillas silanizadas previamente. Luego de realizada la técnica inmunohistoquímica de cada corte se eligieron las mismas 5 áreas para la visualización llegando a un total de 400 áreas (Imagen 6).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología- UDELAR, expediente 091900-000113-14.



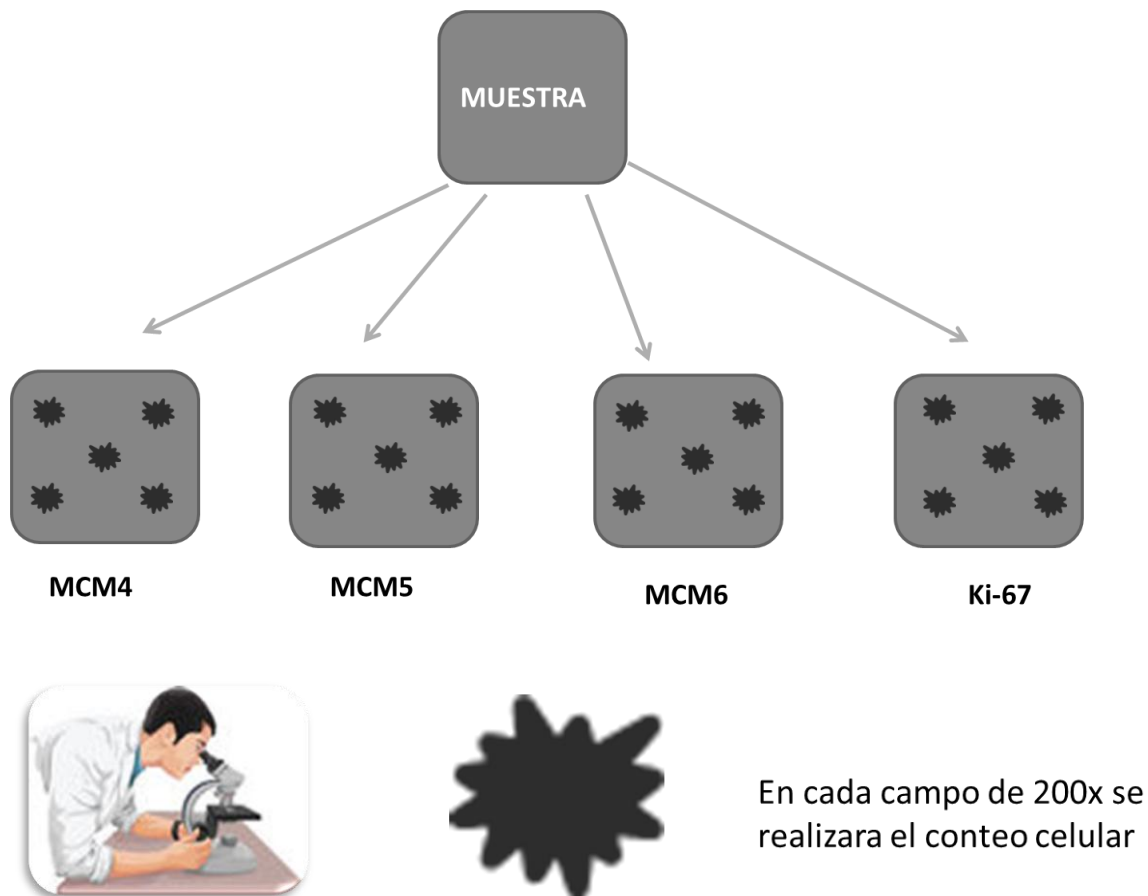


Imagen 6 - Permite apreciar como de la muestra se realizaron 4 cortes, uno para cada marcador (Ki-67, MCM 4, MCM5 y MCM6) y de cada corte se eligieron 5 campos a 200X para la visualización

***c- Criterios de inclusión:***

-Los especímenes que tengan diagnóstico previo de AMEL.

***d- Criterios de exclusión:***

-Aquellos especímenes que al ser revalorados y reclasificados acorde a la clasificación de los tumores odontogénicos de la OMS del 2017 no sean diagnosticados como AMEL en cualquiera de sus variantes.

-Aquellos especímenes que se encuentren en mal estado y cuya muestra no sea suficiente y representativa.

***e- Técnica de inmunohistoquímica:***

Se realizaron cortes de 2  $\mu\text{m}$  de espesor y fueron montados en laminillas tratadas con poly-L-lisina. Los cortes fueron desparafinados en la estufa a 45° C por 30 min. y posteriormente colocados en xilol por 5 minutos. Los cortes se hidrataron en un tren de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 90, 70 y 50%) y lavados con agua destilada. Para el desenmascaramiento de los epítopes se realizó recuperación antigénica con solución de citrato de sodio 10mM (pH 6.2) con olla a presión en microondas a potencia máxima (750 W) por 5 min., dejando enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se enjuago con agua destilada. Las peroxidasas endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno al 0.9%, seguidos por lavados con agua destilada y solución salina amortiguada con solución salina de fosfatos pH 7.4 (PBS). Se montaron las laminillas en placas de cubiertas y colocadas en bastidores para la realización de inmunohistoquímica por capilaridad. Se incubaron los anticuerpos primarios monoclonales contra MCM4 (clona G-7, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX), MCM5 (clona E-10, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc), MCM6 (clona H-8, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc) y Ki 67 (clona MIB-1, dilución 1:100, Dako Corp, Carpinteria, CA) (tabla 3), 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 + Labeledstreptavidin-biotin, Dako Corporation, Carpinteria CA, USA) por 30

minutos cada uno. Los productos de la reacción fueron visualizados con sustrato de 3,3'-diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dako Corporation, Carpintería, CA, USA). Las secciones fueron contra teñidas con hematoxilina de Mayer.

| Antígeno/Anticuerpo | Marca      | Clona | Concentración |
|---------------------|------------|-------|---------------|
| MCM4                | Santa Cruz | G-7   | 1:100         |
| MCM5                | Santa Cruz | E-10  | 1:100         |
| MCM6                | Santa Cruz | H-8   | 1:100         |
| KI-67               | Dako       | MIB-1 | 1:100         |

Tabla 3- Anticuerpos utilizados, marca, clona y concentración.

***f- Visualización:***

- Inmunomarcador: Complejo MCM4, 5, 6 y Ki-67
- Inmunopositividad: Nuclear
- Forma de evaluación: Manual

La evaluación de conteo celular nuclear fue realizada acorde al método descrito por Bologna y colaboradores (Bologna et al., 2011) a continuación se describe brevemente:

La evaluación de la expresión de cada anticuerpo fue realizada en áreas seleccionadas ricas en células epiteliales tumorales. Todas las células fueron cuantificadas mediante el uso de microfotografías tomadas a 200X en cada campo, en un microscopio de Luz



Imagen 7- La imagen izquierda esquematiza la secuencia y orden que se utilizó para 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. Imagen tomada de: Bologna et al (2011) *Histopathology*. 59(4):801-3

#### ***g- Western-Blot.***

Las muestras en bloques de parafina fueron cortadas en secciones de 3.0x100 mm<sup>2</sup>. Posteriormente, las extracciones de las proteínas fueron realizadas utilizando el Qproteome FFPE tissue kit (N° 37623, QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford utilizando el espectrofotómetro DeNovix DS-11. Se utilizaron de cada extracción concentraciones de 10 y 20µg de las proteínas totales y su separación se realizó en geles al 12% PAGE/SDS, 100 V durante 30 min. Luego de finalizada la separación, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF durante 2 hs. a temperatura ambiente (HoferBlot Module). En el bloqueo se utilizó el buffer TNE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2.5 mM EDTA, pH 8.0 y 50 Mm NaCl), 1% de Tween-20, a temperatura ambiente durante 1h. Se realizaron tres lavados cada 5 minutos con buffer TBST. Luego se realizó la incubación de la membrana con los anticuerpos primarios de ratón anti- Ki-67 (1:1000), MCM4 (1:1000), MCM5 (1:500), MCM6 (1:600) y  $\alpha$ -actina (1:500) a 4°C durante 2 horas bajo agitación suave. Al finalizar la incubación se realizaron tres lavados cada 5 minutos con el buffer TBST y luego se realizó la

incubación de la membrana de PVDF con el anticuerpo secundario (Goat-anti-Mouse-HRP conjugated secondary) a temperatura ambiente durante (1/5000) 1 hora bajo agitación suave. Luego se realizaron cuatro lavados cada 5 minutos con el buffer TBST. La detección se realizó utilizando el Opti-4CN substrate Kit (BIO-RAD, N° 970-3210) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Finalmente se secó la membrana y fotografió las bandas obtenidas.

#### ***h- Análisis Estadístico***

Para determinar si existieron diferencias en los índices de proliferación Li entre los marcadores estudiados, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la inmunoexpresión entre las proteínas y las variantes de ameloblastomas y U-Mann Whitney para la comparación de la inmunoexpresión entre las variantes de los ameloblastomas. El coeficiente de correlación entre Ki-67, MCM4, 5 y 6 fue determinado utilizando la prueba de Spearman en la que se establecieron rangos de correlación perfecta ( $r=1$ ) a nula ( $r=0$ ), o negativa ( $r=-0$ ) de acuerdo a los valores obtenidos. Los resultados fueron analizados usando SPSS Professional Statistics, Ver. 20.0 (SPSS Inc., IBM Corp, New York).

## 10- Resultados

### *Inmunohistoquímica*

|                    | Ki 67        | MCM4          | MCM5          | MCM6          |
|--------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>87-411</b>      |              |               |               |               |
| 1                  | 1%           | 9,69%         | 9,21%         | 70,31%        |
| 2                  | 1,90%        | 2,60%         | 5,60%         | 75,70%        |
| 3                  | 10,96%       | 35,66%        | 34,98%        | 68,06%        |
| 4                  | 0%           | 3,24%         | 7,19%         | 76,36%        |
| 5                  | 0,50%        | 5,72%         | 8,25%         | 41,50%        |
| <b>Promedio Li</b> | <b>2,87%</b> | <b>11,38%</b> | <b>13,05%</b> | <b>66,39%</b> |
| <b>88-148</b>      |              |               |               |               |
| 1                  | 1,35%        | 0,31%         | 4,56%         | 15,68%        |
| 2                  | 0,44%        | 0,33%         | 2,20%         | 4,52%         |
| 3                  | 0%           | 0,44%         | 2,93%         | 7,89%         |
| 4                  | 1,09%        | 0,41%         | 2,05%         | 9,67%         |
| 5                  | 0,14%        | 0,14%         | 1,79%         | 8,83%         |
| <b>Promedio Li</b> | <b>0,60%</b> | <b>0,33%</b>  | <b>2,71%</b>  | <b>9,32%</b>  |
| <b>91-097</b>      |              |               |               |               |
| 1                  | 9,02%        | 6,99%         | 18,22%        | 28,31%        |
| 2                  | 3,46%        | 6,73%         | 18,35%        | 19,02%        |
| 3                  | 4,20%        | 4,65%         | 13,05%        | 15,49%        |
| 4                  | 4,02%        | 2,75%         | 13,04%        | 19,61%        |
| 5                  | 3,50%        | 2,30%         | 6,80%         | 32%           |
| <b>Promedio Li</b> | <b>4,84%</b> | <b>4,68%</b>  | <b>13,89%</b> | <b>22,82%</b> |
| <b>94-459</b>      |              |               |               |               |
| 1                  | 8,04%        | 7,16%         | 29,82%        | 36,55%        |
| 2                  | 3,32%        | 9,96%         | 24,78%        | 31,64%        |
| 3                  | 0,50%        | 10,67%        | 20,59%        | 16,67%        |
| 4                  | 1,72%        | 9,74%         | 29,93%        | 39,26%        |
| 5                  | 1,00%        | 8,40%         | 29,14%        | 8,00%         |
| <b>Promedio Li</b> | <b>2,92%</b> | <b>9,19%</b>  | <b>26,85%</b> | <b>26,42%</b> |
| <b>95-322</b>      |              |               |               |               |
| 1                  | 9,02%        | 6,99%         | 18,22%        | 28,31%        |
| 2                  | 3,46%        | 6,73%         | 18,35%        | 19,02%        |
| 3                  | 4,20%        | 4,65%         | 13,05%        | 15,49%        |
| 4                  | 4,02%        | 2,75%         | 13,04%        | 19,61%        |
| 5                  | 3,50%        | 2,30%         | 6,80%         | 32%           |
| <b>Promedio Li</b> | <b>4,84%</b> | <b>4,68%</b>  | <b>13,89%</b> | <b>22,82%</b> |

|                    |              |               |               |               |  |
|--------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--|
| <b>98-339</b>      |              |               |               |               |  |
| 1                  | 2,61%        | 1,87%         | 10,07%        | 39,56%        |  |
| 2                  | 1,49%        | 4,48%         | 9,97%         | 44,78%        |  |
| 3                  | 0,68%        | 4,05%         | 2,97%         | 16,89%        |  |
| 4                  | 0,98%        | 3,27%         | 4,67%         | 15,03%        |  |
| 5                  | 1,12%        | 3,45%         | 7,92%         | 38,26%        |  |
| <b>Promedio Li</b> | <b>1,38%</b> | <b>3,42%</b>  | <b>7,12%</b>  | <b>30,90%</b> |  |
| <b>99-076</b>      |              |               |               |               |  |
| 1                  | 8,57%        | 4,69%         | 7,76%         | 33,33%        |  |
| 2                  | 0,36%        | 1,81%         | 4,16%         | 45,21%        |  |
| 3                  | 5,43%        | 11,14%        | 10,86%        | 28,58%        |  |
| 4                  | 3,07%        | 7,60%         | 14,01%        | 40,33%        |  |
| 5                  | 2,17%        | 6,33%         | 9,33%         | 38,89%        |  |
| <b>Promedio Li</b> | <b>3,92%</b> | <b>6,31%</b>  | <b>9,22%</b>  | <b>37,27%</b> |  |
| <b>01-308-1</b>    |              |               |               |               |  |
| 1                  | 0,75%        | 3,50%         | 1,88%         | 5,88%         |  |
| 2                  | 2,51%        | 3,76%         | 7,72%         | 8,35%         |  |
| 3                  | 1,58%        | 9,47%         | 5,26%         | 42,12%        |  |
| 4                  | 18,90%       | 21,65%        | 12,82%        | 27,56%        |  |
| 5                  | 1,50%        | 7,49%         | 11,99%        | 15,73%        |  |
| <b>Promedio Li</b> | <b>5,05%</b> | <b>9,17%</b>  | <b>7,93%</b>  | <b>19,93%</b> |  |
| <b>01- 364</b>     |              |               |               |               |  |
| 1                  | 8,02%        | 5,99%         | 17,22%        | 27,31%        |  |
| 2                  | 2,46%        | 5,73%         | 17,35%        | 18,02%        |  |
| 3                  | 3,20%        | 3,65%         | 12,05%        | 14,49%        |  |
| 4                  | 3,02%        | 1,75%         | 12,04%        | 18,61%        |  |
| 5                  | 2,50%        | 1,30%         | 5,80%         | 31%           |  |
| <b>Promedio Li</b> | <b>3,84%</b> | <b>3,68%</b>  | <b>12,89%</b> | <b>21,82%</b> |  |
| <b>02-205A</b>     |              |               |               |               |  |
| 1                  | 3,12%        | 3,90%         | 27,82%        | 97,27%        |  |
| 2                  | 0,42%        | 6,69%         | 11,18%        | 96,00%        |  |
| 3                  | 0,63%        | 5,06%         | 9,28%         | 91,56%        |  |
| 4                  | 0%           | 2,32%         | 4,63%         | 80,70%        |  |
| 5                  | 0%           | 3,47%         | 2,17%         | 87,64%        |  |
| <b>Promedio Li</b> | <b>0,83%</b> | <b>4,29%</b>  | <b>11,02%</b> | <b>90,63%</b> |  |
| <b>02-357</b>      |              |               |               |               |  |
| 1                  | 0,38%        | 1,88%         | 0,81%         | 23%           |  |
| 2                  | 0,90%        | 4,10%         | 3,59%         | 26,75%        |  |
| 3                  | 9,45%        | 79,34%        | 29,74%        | 71,88%        |  |
| 4                  | 0,26%        | 17,86%        | 1,56%         | 76,45%        |  |
| 5                  | 11,00%       | 12,36%        | 2,56%         | 19,38%        |  |
| <b>Promedio Li</b> | <b>4,40%</b> | <b>23,11%</b> | <b>7,65%</b>  | <b>43,43%</b> |  |
| <b>02-643</b>      |              |               |               |               |  |
| 1                  | 1,33%        | 18,48%        | 16,76%        | 63,15%        |  |
| 2                  | 0,78%        | 16,50%        | 14,47%        | 70,76%        |  |



|                    |               |               |               |               |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 3                  | 0,87%         | 10,13%        | 10,42%        | 59,56%        |
| 4                  | 1,34%         | 16,74%        | 14,51%        | 69,35%        |
| 5                  | 1,74%         | 17,37%        | 23,15%        | 83,76%        |
| <b>Promedio Li</b> | <b>1,21%</b>  | <b>15,84%</b> | <b>15,86%</b> | <b>69,32%</b> |
| <b>03-141 A</b>    |               |               |               |               |
| 1                  | 5,61%         | 9,76%         | 12,93%        | 29,27%        |
| 2                  | 0,72%         | 10,74%        | 5,73%         | 35,80%        |
| 3                  | 1,56%         | 4,44%         | 9,33%         | 33,89%        |
| 4                  | 3,33%         | 6,44%         | 8,89%         | 36,87%        |
| 5                  | 4,48%         | 23,45%        | 14,83%        | 44,76%        |
| <b>Promedio Li</b> | <b>3,14%</b>  | <b>10,97%</b> | <b>10,34%</b> | <b>36,12%</b> |
| <b>03-221</b>      |               |               |               |               |
| 1                  | 0,62%         | 9,62%         | 5,92%         | 20,96%        |
| 2                  | 1,01%         | 6,97%         | 10,00%        | 31,60%        |
| 3                  | 0,65%         | 9,13%         | 9,24%         | 29,67%        |
| 4                  | 0,51%         | 4,81%         | 5,82%         | 19,76%        |
| 5                  | 0,58%         | 7,56%         | 5,90%         | 20,11%        |
| <b>Promedio Li</b> | <b>0,67%</b>  | <b>7,62%</b>  | <b>7,38%</b>  | <b>24,42%</b> |
| <b>04-806</b>      |               |               |               |               |
| 1                  | 10,02%        | 7,99%         | 19,22%        | 29,31%        |
| 2                  | 4,46%         | 7,73%         | 19,35%        | 20,02%        |
| 3                  | 5,20%         | 5,65%         | 14,05%        | 16,49%        |
| 4                  | 5,02%         | 3,75%         | 14,04%        | 20,61%        |
| 5                  | 4,50%         | 3,30%         | 7,80%         | 32,67%        |
| <b>Promedio Li</b> | <b>5,84%</b>  | <b>5,68%</b>  | <b>14,89%</b> | <b>23,82%</b> |
| <b>05-241</b>      |               |               |               |               |
| 1                  | 16,30%        | 36,11%        | 39,11%        | 39,76%        |
| 2                  | 14,85%        | 45,54%        | 43,07%        | 49,50%        |
| 3                  | 9,15%         | 21,87%        | 24,58%        | 29,83%        |
| 4                  | 6,41%         | 27,95%        | 33,08%        | 38,98%        |
| 5                  | 11,57%        | 47,06%        | 32,55%        | 47,87%        |
| <b>Promedio Li</b> | <b>11,66%</b> | <b>35,71%</b> | <b>34,48%</b> | <b>41,19%</b> |
| <b>05-472</b>      |               |               |               |               |
| 1                  | 14,09%        | 19,93%        | 18,89%        | 30,59%        |
| 2                  | 10,10%        | 30,30%        | 21,21%        | 40,40%        |
| 3                  | 3,55%         | 21,33%        | 9,78%         | 25,78%        |
| 4                  | 6,15%         | 21,54%        | 13,57%        | 27,31%        |
| 5                  | 8,65%         | 24,68%        | 27,23%        | 55,98%        |
| <b>Promedio Li</b> | <b>8,51%</b>  | <b>23,56%</b> | <b>18,14%</b> | <b>36,01%</b> |
| <b>05-537</b>      |               |               |               |               |
| 1                  | 8,54%         | 7,66%         | 30,32%        | 37,05%        |
| 2                  | 3,82%         | 10,46%        | 25,38%        | 32,14%        |
| 3                  | 1,00%         | 11,17%        | 21,09%        | 17,27%        |
| 4                  | 2,22%         | 10,24%        | 20,43%        | 39,76%        |
| 5                  | 1,50%         | 8,90%         | 29,64%        | 8,50%         |

| <b>Promedio Li</b> |              |              |              |               |  |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--|
| <b>05-698 B</b>    |              |              |              |               |  |
| <b>1</b>           | 0,00%        | 1,93%        | 4,60%        | 16,06%        |  |
| <b>2</b>           | 0,00%        | 1,69%        | 3,62%        | 11,45%        |  |
| <b>3</b>           | 0,00%        | 0,13%        | 0,00%        | 0,50%         |  |
| <b>4</b>           | 0,00%        | 8,83%        | 7,98%        | 18,33%        |  |
| <b>5</b>           | 0,00%        | 6,64%        | 12,45%       | 27,28%        |  |
| <b>Promedio Li</b> | <b>0,00%</b> | <b>3,84%</b> | <b>5,73%</b> | <b>14,72%</b> |  |
| <b>06-534</b>      |              |              |              |               |  |
| <b>1</b>           | 1,37%        | 14,50%       | 12,33%       | 43,56%        |  |
| <b>2</b>           | 2,32%        | 6,34%        | 4,56%        | 42,64%        |  |
| <b>3</b>           | 0,38%        | 6,08%        | 3,23%        | 26,32%        |  |
| <b>4</b>           | 0,26%        | 2,35%        | 1,89%        | 12,74%        |  |
| <b>5</b>           | 0,36%        | 3,46%        | 4,76%        | 34,12%        |  |
| <b>Promedio Li</b> | <b>0,94%</b> | <b>6,55%</b> | <b>5,35%</b> | <b>31,88%</b> |  |

Tabla 4 – Tabla de resultados luego del conteo celular. Li para cada caso.

Se obtuvo una concordancia de Kappa >0.75 en ambas variantes de AMEL para la determinación del Li de Ki-67, MCM4, 5 y 6 entre los dos patólogos que realizaron el conteo celular. La inmunexpresión de Ki-67 y MCM5 tanto en los UAM como en los AM fue exclusivamente nuclear, observándose principalmente en las células tumorales basales (Imagen 7, 9 y 10), mientras que la inmunexpresión de MCM4 y 6 se presentó en núcleo y citoplasma, tanto en las células basales/columnares como en las células angulares internas que se asemejan al retículo estrellado (Imagen 8, 9 y 10).

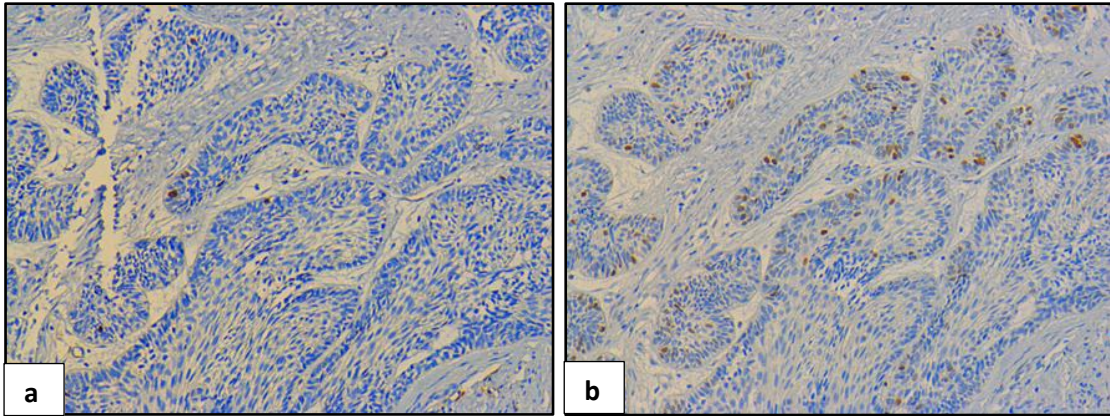


Imagen 7- Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 y MCM5 en AM a)

Immunoexpresión nuclear de Ki-67 con predominio en células tumorales basales. b)

Immunoexpresión nuclear de MCM5 con predominio en células tumorales basales.

(Inmunoperoxidasa, 200X).

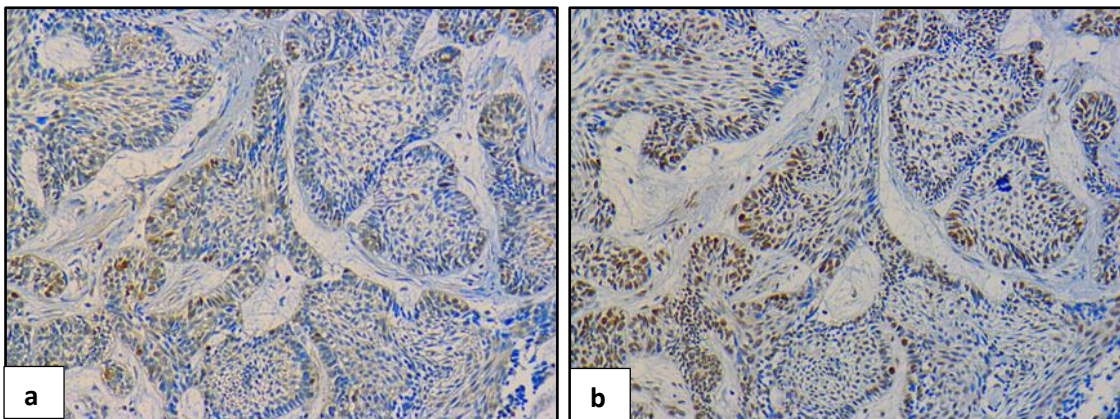


Imagen 8- Expresión inmunohistoquímica de MCM4 y MCM6 en AM. a)

Immunoexpresión nuclear y citoplasmática de MCM4 predomina en las células

tumorales basales b) Immunoexpresión nuclear/citoplasmática de MCM6, con

distribución en células basales, suprabasales y estroma tumoral. . (Inmunoperoxidasa,

200X).



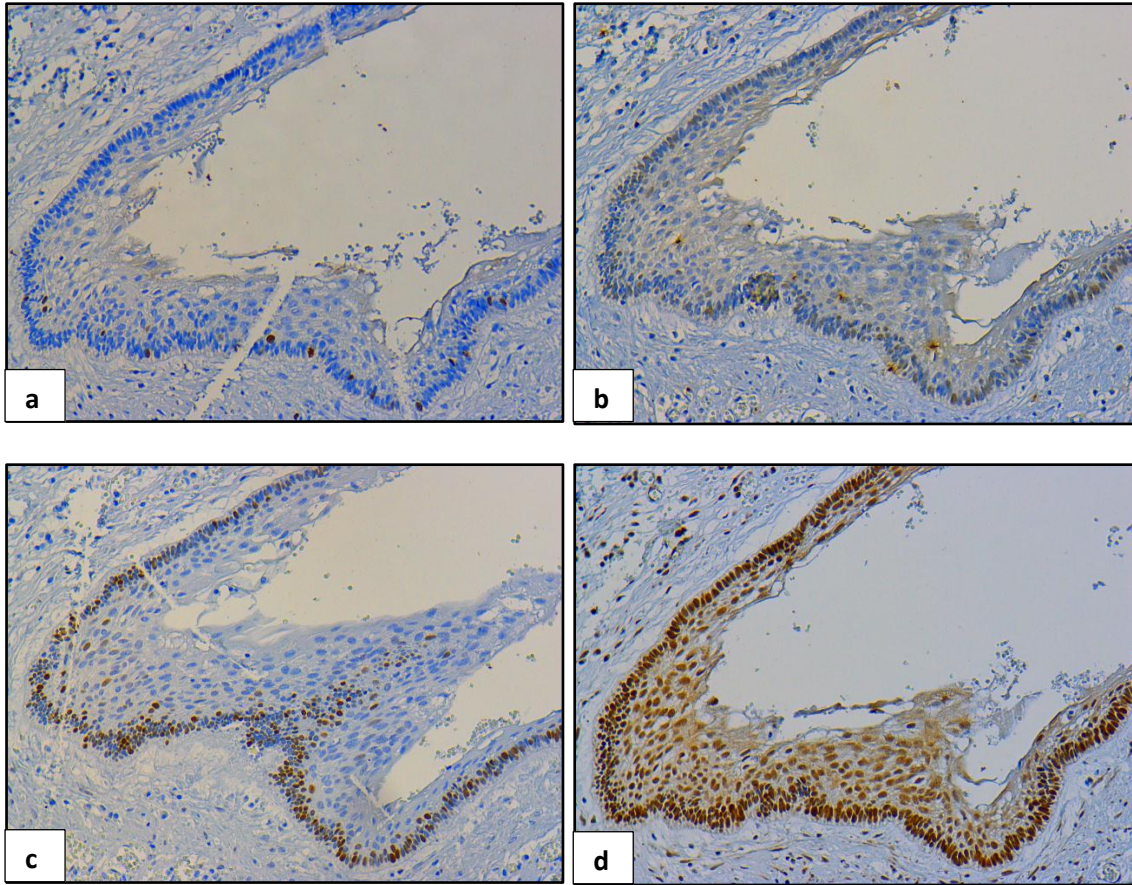


Imagen 9. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67, MCM4, MCM5 y MCM6 en ameloblastoma uniuquístico con crecimiento intraluminal. a) Inmunoeexpresión nuclear de Ki-67 con predominio en células tumorales basales, b) Inmunoeexpresión nuclear y citoplasmática de MCM4 predomina en las células tumorales basales, c) Inmunoeexpresión nuclear de MCM5 con predominio en células tumorales basales, d) Inmunoeexpresión nuclear/citoplasmática de MCM6, con distribución en células basales, suprabasales y estroma tumoral. . (Inmunoperoxidasa, 200X).

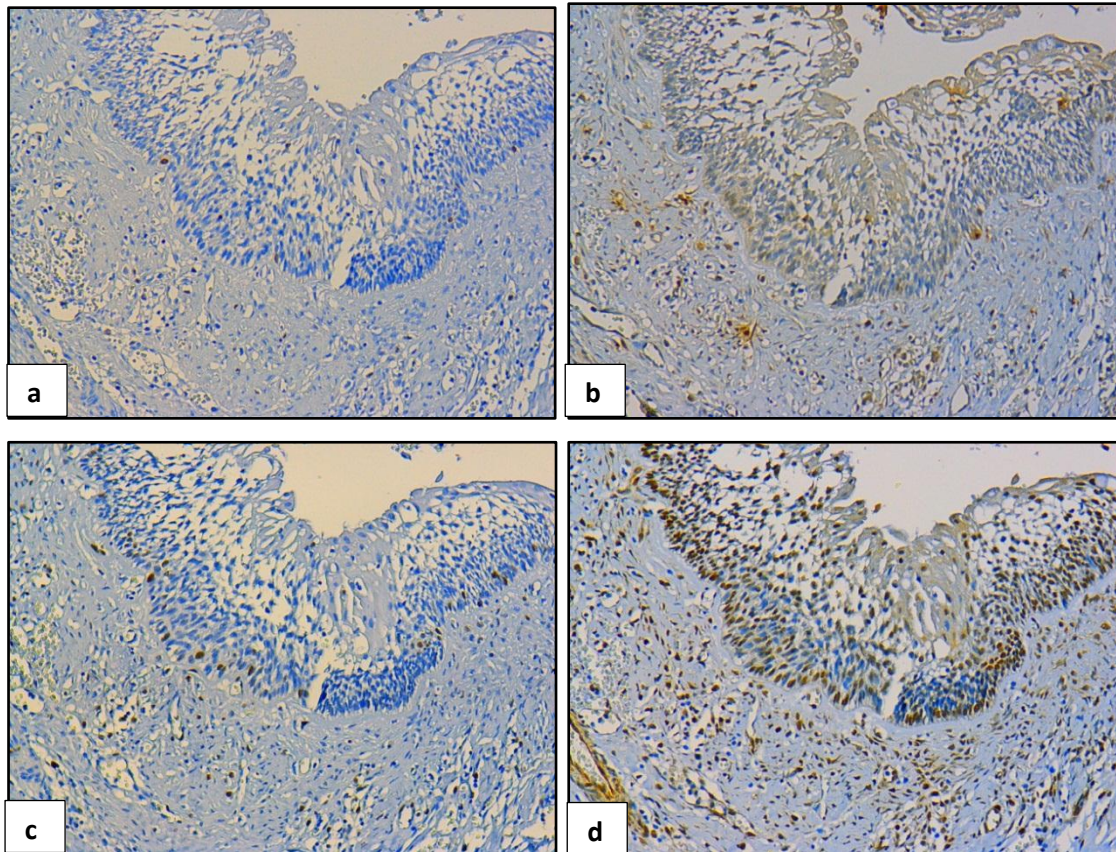


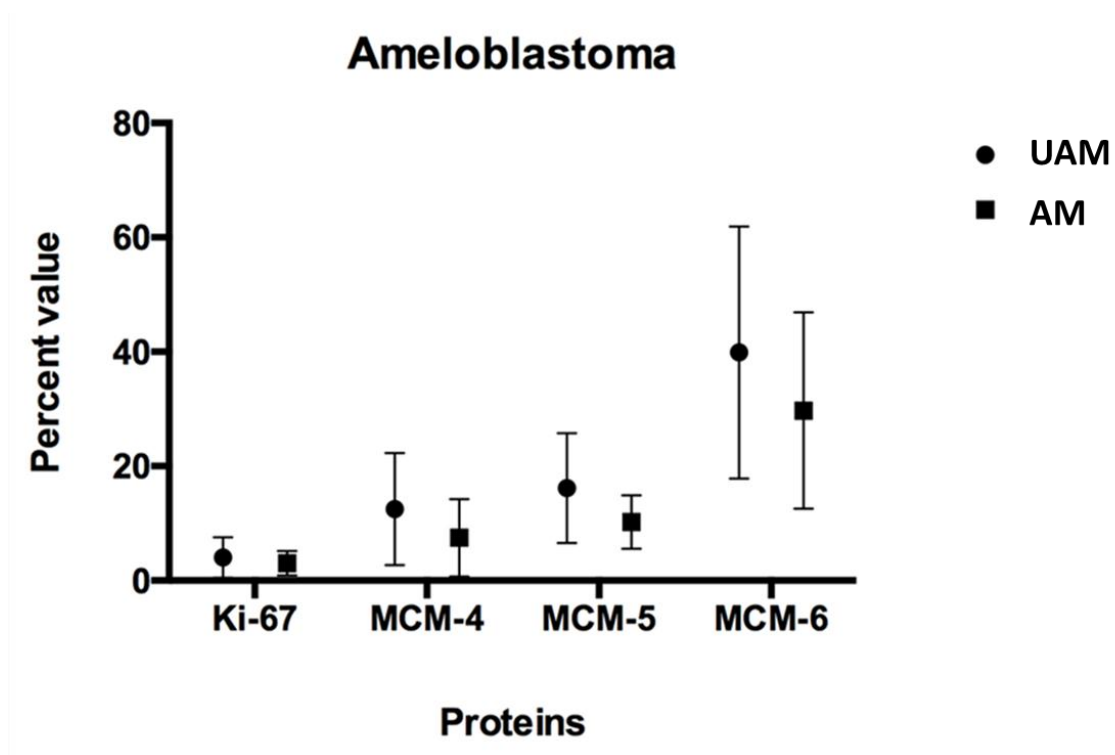
Imagen 10- Expresión inmunohistoquímica de Ki-67, MCM4, MCM5 y MCM6 en ameloblastoma uniuquístico con crecimiento intraluminal. a) Inmunoeexpresión nuclear de Ki-67 con predominio en células tumorales basales, b) Inmunoeexpresión nuclear y citoplasmática de MCM4 predomina en las células tumorales basales, c) Inmunoeexpresión nuclear de MCM5 con predominio en células tumorales basales, d) Inmunoeexpresión nuclear/citoplasmática de MCM6, con distribución en células basales, suprabasales y estroma tumoral. . (Inmunoperoxidasa, 200X).

En general Ki-67, MCM4, 5 y 6 presentaron un porcentaje mayor de inmunoeexpresión en los UAM en comparación con los AM (Tabla 5), sin embargo, no se observó significancia estadística ( $p>0.05$ ) (Gráfica 1). La proteína MCM6 mostró un mayor porcentaje de inmunoeexpresión en los UAM y AM en comparación con el resto de las proteínas ( $p=0.000$ ) (Gráfica 1).

| AM  | Ki67 $\pm$ SD    | MCM4 $\pm$ SD    | MCM5 $\pm$ SD    | MCM6 $\pm$ SD     |
|-----|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| UAM | 4.04 $\pm$ 3.52  | 12.49 $\pm$ 9.81 | 16.16 $\pm$ 9.63 | 39.88 $\pm$ 22.04 |
| AM  | 3.04 $\pm$ 21.12 | 7.47 $\pm$ 6.78  | 10.20 $\pm$ 4.66 | 29.7 $\pm$ 17.16  |

**Tabla 5.** Conteo celular para determinar el LI en Ki-67, MCM4, MCM5, MCM6 en UA y AM.

Promedio de porcentajes de acuerdo al LI de Ki-67, MCM4, MCM5 y MCM6 en las variantes de ameloblastoma. Test de Wilcoxon  $p < 0.05$  en todos los casos.



Gráfica 1. Promedio de los porcentajes de expresión inmunohistoquímica de Ki-67, MCM4, 5 y 6, en AMEL. U Mann-Whitney,  $p > 0.05$  Ki-67, MCM4, 5 y 6 (UAM vs AM).Kruskal-Wallis,  $p = 0.000$ , UAM y AM (MCM6, vs Ki-67, MCM4 y 5).



En los UAM se observó que la inmunexpresión de Ki-67, MCM4 y MCM5 presentaron una correlación positiva de moderada a fuerte, mientras que en los AM la inmunexpresión de Ki-67, MCM5 y MCM6 fue similar a los UAM con una correlación moderada a fuerte. MCM4 presentó una fuerte correlación cuando se comparó con MCM6. La correlación de la inmunexpresión entre las diferentes proteínas y las variantes de ameloblastomas, fue débil a negativa (Tabla 6).

| Tumor/Protein | U/Ki-67      | U/MCM4       | U/MCM5       | U/MCM6 | S/Ki-67      | S/MCM4       | S/MCM5       | S/MCM6       |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| U/Ki-67, vs   | N/A          | <b>0.745</b> | <b>0.588</b> | -0.03  | 0.091        | 0.116        | -0.261       | -0.018       |
| U/MCM4, vs    | <b>0.745</b> | N/A          | <b>0.709</b> | 0.321  | -0.164       | -0.43        | -0.371       | -0.201       |
| U/MCM5, vs    | 0.588        | <b>0.709</b> | N/A          | 0.273  | 0.055        | -0.213       | -0.614       | -0.322       |
| U/MCM6, vs    | -0.03        | 0.321        | 0.273        | N/A    | -0.067       | -0.541       | -0.274       | -0.59        |
| S/Ki-67, vs   | 0.091        | -0.164       | 0.055        | -0.067 | N/A          | 0.256        | <b>0.659</b> | 0.305        |
| S/MCM4, vs    | 0.116        | -0.043       | -0.213       | -0.541 | 0.256        | N/A          | 0.268        | <b>0.963</b> |
| S/MCM5, vs    | -0.261       | -0.371       | -0.164       | -0.274 | <b>0.659</b> | 0.268        | N/A          | <b>0.515</b> |
| S/MCM6, vs    | -0.018       | -0.201       | -0.322       | -0.590 | 0.305        | <b>0.963</b> | <b>0.515</b> | N/A          |

Tabla 6- Correlación de Spearman de acuerdo a la inmunexpresión de cada variante de ameloblastoma. Coeficiente de correlación de Spearman's rho, comparando Ki-67, MCM4, 5 y 6 en cada variante de ameloblastoma. En negritas representa un coeficiente rho con una correlación positiva (rho, >0.50), las cursivas representan significancia estadística p<0.05. U=Unicystic ameloblastoma, S=Solid/multicystic ameloblastoma.

### **Western-Blot.**

Los biomarcadores Ki-67, MCM4, 5 y 6 mostraron positividad por Western blot en las muestras de AM y UAM (Imagen 11).

En la detección de Ki-67 no se observan diferencias entre los bandeos de los AM a concentraciones de 10 µg y 20 µg. Sin embargo, sí hay diferencia en la detección de los UA, para dicho biomarcador en ambas concentraciones.

En el caso de la expresión de MCM4 en los AM y UAM en concentraciones de 10  $\mu\text{g}$  como de 20  $\mu\text{g}$  presentan los mismos patrones de bandeos. Mientras que en el caso de MCM5, si bien el bandeos es homogéneo en casi todos los casos, la muestra de UA con 10  $\mu\text{g}$  es la que presenta menor intensidad de banda. En el caso de la detección de MCM6 el bandeos es homogéneo en todos los casos, excepto en el UAM de baja concentración (10  $\mu\text{g}$ ) donde se visualiza una menor detección del biomarcador. Estos resultados validan los obtenidos en la técnica de inmunohistoquímica y además permitieron detectar cambios en los niveles de expresión de la subunidad MCM5 y MCM6 (Imagen 11).

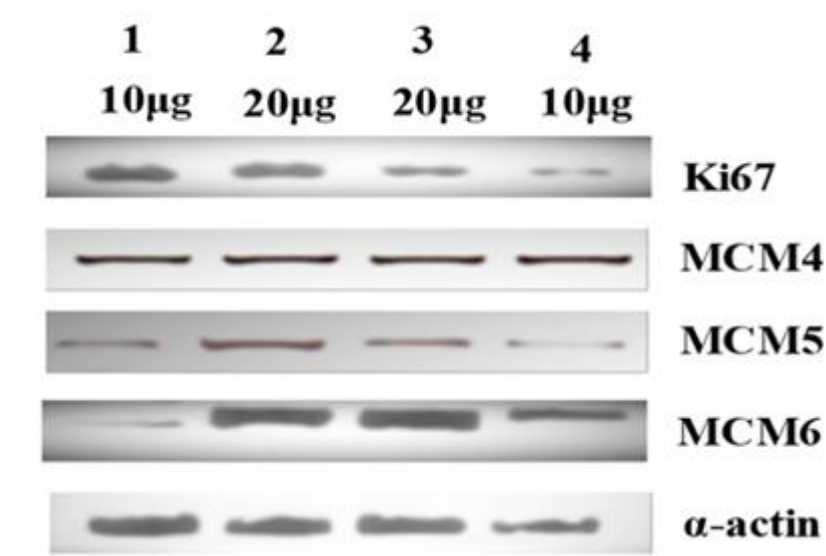


Imagen 11- Detección por Western blot de las proteínas MCM4 (96.56 kD), MCM5 (82.29 kD), MCM6 (92.89 kD) y Ki-67 (359 kD) en muestras de AM y UAM (AM 1, 2; UAM 3, 4). Control positivo de la técnica la proteína  $\alpha$ -actina (42.05 kD).

## 11- Discusión

El estudio inmunohistoquímico de proteínas asociadas al ciclo celular facilita el entendimiento del comportamiento biológico de ciertas neoplasias (Bologna-Molina, et al



2013b). El crecimiento y progresión tumoral de los ameloblastomas se relaciona con diversos procesos moleculares, en los cuales participan proteínas involucradas en la adhesión celular (González-González et al. 2014), invasión del frente tumoral (Iakovou et al 2015), factores de crecimiento (Nakao et al 2013), apoptosis (González-González et al 2015), proliferación celular (Carreón-Burciaga et al 2015), entre otros.

Ki-67 es un biomarcador ampliamente utilizado en la determinación del índice de proliferación celular en ameloblastomas (Soluk Tekkesin et al 2012, Bologna-Molina et al.2013, Otero et al. 2013, Ahlem et al. 2015, Bologna-Molina et al. 2008, González-González et al. 2015, Sandra et al 2001, Meer et al. 2003) y es considerado una herramienta importante que provee información acerca del comportamiento de este y otros tumores odontogénicos (Bologna-Molina et al.2013).

Este es un buen marcador de proliferación celular ya que cumple con los dos requisitos que se han postulado para esto: (1) está presente durante todas las fases del ciclo celular excepto en la fase G0 y la fase G1 temprana y (2) después de la mitosis se degrada rápidamente (Bologna-Molina, et al. 2013b).

En varios tipos de neoplasias, la expresión de las proteínas MCM2-7 se ha relacionado a un evento temprano en el desarrollo tumoral, mostrando utilidad para estudiar el comportamiento tumoral (Carreón-Burciaga et al. 2015, Ishimi et al. 2003, Das et al. 2013, Heidebrecht et al. 2001, Schrader et al. 2005, Yu et al. 2014, Giaginis et al 2011, Korkolopoulou et al. 2005, Gakiopoulou et al, 2011, Ladstein et al. 2010, Choy et al. 2016). La sobreexpresión de las proteínas MCM se ha demostrado en una variedad de neoplasias. La expresión de MCM2 se ve aumentada en carcinoma de vejiga (Korkolopoulou et al. 2005), adenocarcinoma de ovario (Gakiopoulou et al, 2011), Leucoplasia verrugosa proliferativa (Gouvêa et al 2010), oligodendrogliomas (Wharton et al. 2001), carcinoma renal (Rodins et al. 2002) y cáncer de mama (González et al. 2003). Por su parte, MCM3 en carcinoma papilar de tiroides (Lee et al. 2010), MCM4 en cáncer de pulmón de células pequeñas (Kikuchi et al 2011) y melanoma cutáneo (Ladstein et al. 2010),

MCM5 en adenocarcinoma gástrico (Giaginis et al 2011), carcinoma de vejiga (Korkolopoulou et al. 2005), adenocarcinoma de ovario (Gakiopoulou et al, 2011), carcinoma de células escamosas de piel (Liu et al. 2007), carcinoma de cuello uterino (Murphy et al 2005), carcinoma escamocelular de mucosa (Yu et al. 2014) y Leucoplasia verrugosa proliferativa (Gouvêa et al 2010), MCM6 en Carcinoma hepatocelular (Zheng et al. 2014) y MCM7 en cáncer de próstata (Ren et al 2006), cáncer de colon (Nishihara et al 2008) y adenocarcinoma pulmonar (Fujioka et al. 2009).

Estos son algunos de los tantos estudios que han demostrado la sobreexpresión de las diferentes proteínas del complejo MCM en diversas neoplasias, permitiéndoles concluir que dichas proteínas podrían ser buenos marcadores de proliferación celular.

Se ha demostrado que la desregulación de las proteínas MCM es un evento temprano en el desarrollo de los tumores, por lo tanto se sugiere que estos biomarcadores pueden ser muy útiles en el diagnóstico primario y la vigilancia tumoral (González et al. 2003, Williams et al. 1998, Stoeber et al. 2002).

Según Williams, MCM5 tiene alta sensibilidad y especificidad para detectar, en frotis de cuello uterino, las células precursoras malignas mediante el uso de inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia. Propone este método diagnóstico como estudio complementario al PAP para disminuir los falsos negativos (Williams et al. 1998). Por otra parte Williams y Strober, entienden que los niveles elevados de MCM5 en orina son altamente predictivos cáncer de vejiga (Williams et al. 1998, Stoeber et al. 2002).

Varios son los autores que concluyen que estas proteínas son superiores a los marcadores convencionales como Ki-67, ya que tienen una mayor expresión y por lo tanto presentan una mayor sensibilidad diagnóstica (Gouvêa et al 2010, Stoeber et al. 2001, Hanna-Morris et al. 2009).

El presente estudio es el primero que describe la expresión de las proteínas MCM4, 5 y 6 en ameloblastomas, valorando su utilidad como marcadores de proliferación celular.

De manera general, la positividad fue mayor para las tres proteínas MCM4, 5 y 6 en comparación con Ki-67.

Esta diferencia podría explicarse por dos motivos:

1) el exceso de MCM2-7 es resultado de una mayor cantidad de complejos Pre-RC de los que se utilizan para dar comienzo a la replicación, estos permanecen latentes para activarse en caso de que existan problemas en algunas de las horquillas de replicación (Stoeber et al. 2001).

2) Ki-67 se expresa desde la fase G1 tardía (Scholzen y Gerdes, 2000), mientras que MCM2-7 se expresa desde la fase G1 temprana (Kodani et al. 2003).

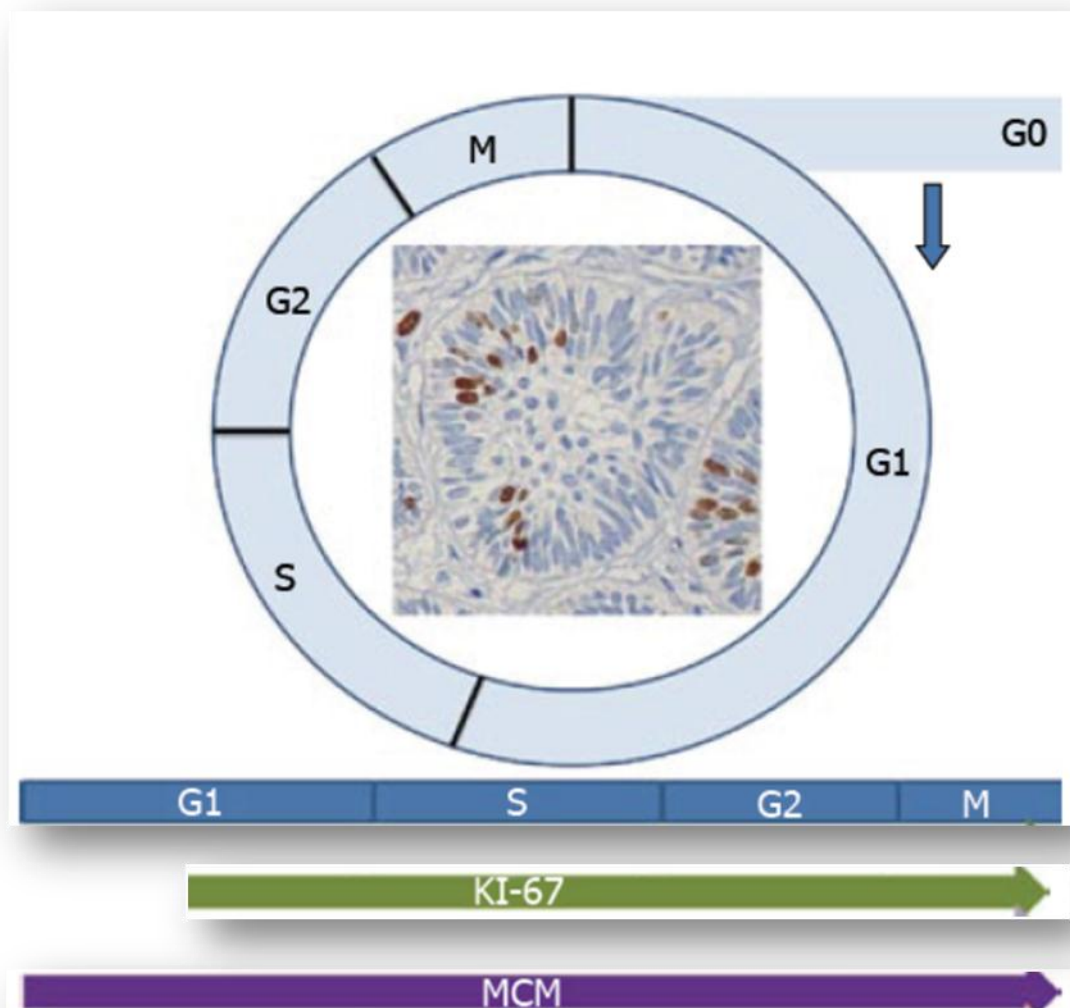


Imagen 12- Presencia de Ki 67 y MCM durante las fases del ciclo celular.

Nuestros resultados indican que la inmunexpresión nuclear de MCM6 fue la que presentó un mayor porcentaje en comparación con el resto de las proteínas (Gráfica 1). Schrader, en un estudio realizado en linfomas indican que existe un subconjunto de células tumorales que se detienen en fase G1 temprana y son positivas a MCM6, y no necesariamente representan el real potencial proliferativo de esta neoplasia, por lo cual, MCM6 no sería un indicador de proliferación confiable en algunos tumores (Schrader et al. 2005). Esto podría justificar la mayor expresión de MCM6 en nuestro estudio.

La inmunexpresión de MCM4 fue menor que MCM5 y MCM6, (Gráfica 1). Estudios realizados con MCM4 en carcinomas esofágicos sugieren que esta proteína puede ser un marcador más sensible que Ki-67, y que una alta de inmunexpresión de MCM4 se relaciona significativamente con un mal pronóstico (Choy et al. 2016). En nuestro estudio, MCM4 fue el marcador que presentó el Li nuclear más similar a Ki-67, sin embargo, a diferencia de los demás marcadores, en varios casos mostró inmunopositividad citoplasmática, la cual pudiera estar asociada a que luego de la replicación del ADN las proteínas del complejo MCM2-7 son exportadas del núcleo al citoplasma para su degradación (Nguyen et al. 2000). Por lo cual suponemos que la presencia citoplasmática de MCM4 no debe de ser considerado un marcador directo de actividad proliferativa y dicha positividad no fue considerada como indicador de proliferación celular.

La inmunexpresión de MCM5 en los ameloblastomas presentó un porcentaje menor en comparación con la inmunexpresión de MCM6 (Gráfica 1), y se correlacionó positivamente con Ki-67 (Tabla 5). Yu observo elevada inmunexpresión de MCM5 en carcinomas orales de células escamosas, correlacionándose con progresión agresiva y de pobre pronóstico, mientras que la baja inmunexpresión fue observada en mucosa oral normal y en displasia epitelial leve, por lo que se sugiere que MCM5 juega un papel crítico en la carcinogénesis de mucosa oral y esofágica; y posiblemente el incremento de la de esta proteína comienza en los estadios precancerosos de la mucosa oral (Yu et al. 2014). En nuestro estudio MCM5 mostró un patrón de expresión semejante a Ki-67, exclusivamente nuclear y predominantemente en las células basales, donde según algunos autores el tumor suele ser más proliferante (Bologna-Molina et al. 2008), sin embargo MCM5 presentó un mayor Li que Ki-67.

Creemos que MCM5 al estar presente desde inicios de la fase G1 podría llegar a ser un mejor marcador que Ki-67 ya que cumple mejor con el requisito de estar presente

durante todas las fases del ciclo celular. Por otra parte los marcadores MCM4 y MCM6 si bien también cumplen con este requisito no cumplen con el segundo ya que no se degradan rápidamente luego de la mitosis.

Al comparar la inmunexpresión de las proteínas MCM4, 5 y 6 en AM y UAM, no encontramos diferencias significativas, aunque el Li fue ligeramente mayor en UA, esto se podría justificar por la propia morfología y arquitectura de este tumor, ya que el UA, contiene menos células suprabasales (semejantes al retículo estrellado) comparado con AM y de consecuencia la mayoría de las células contadas corresponden a estratos basales, las cuales son más propensas a ser positivas (Bologna-Molina et al. 2008).

## **12- Conclusiones**

En el presente estudio, por primera vez se describió la expresión de las proteínas MCM4, 5 y 6 y se comparó con Ki-67 en AMEL. Los resultados sugieren que la proteína MCM5 es marcador de proliferación celular confiable, que posee una óptima sensibilidad para detectar células en fase G<sub>1</sub> temprana, por lo que también podría ser de utilidad para predecir y entender mejor el comportamiento biológico de los ameloblastomas.

## **13- Perspectivas**

Son necesarios futuros estudios que incluyan las características clínicas de los tumores y seguimiento para evaluar posible valor pronóstico

## 14- Referencias

- Ahlem B, Wided A, Amani L, Nadia Z, Amira A, Faten F. Study of Ki67 and CD10 expression as predictive factors of recurrence of ameloblastoma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2015; 132(5):275-9.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition. New York: Garland Science; 2007; 122-134.
- Alver RC, Chadha GS, Blow JJ. The contribution of dormant origins to genome stability: from cell biology to human genetics. *DNA Repair (Amst)*. 2014; 19: 182-9.
- Arias EE y Walter JC. Strength in numbers: preventing re replication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev*. 2007; 21(5): 497-518.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World health organization classification of tumors. *Pathology and genetics head and neck tumors*. 3rd edition, 2005, volumen 9.
- Blow JJ, Ge XQ, Jackson DA. How dormant origins promote complete genome replication. *Trends Biochem Sci*. 2011; 36 (8):405-14.
- Bochman ML y Schwacha A. Differences in the single-stranded DNA binding activities of MCM2-7 and MCM467: MCM2 and MCM5 define a slow ATP-dependent step. *J Biol Chem*. 2007; 282(46):33795-804
- Bochman ML, Bell SP, Schwacha A. Sub unit organization of MCM2-7 and the unequal role of active sites in ATP hydrolysis and viability. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(19): 5865-73.
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013a; 18:e174-e179.
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013b; 18(2): 174-179.
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Garcia-Vazquez F, Farfan-Morales JE, Irigoyen-Camacho ME, Damian-Matsumura P. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral oncology*. 2008; 44(8): 805-811.

- 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.
- Braun KA y Breeden LL. Nascent transcription of MCM2-7 is important for nuclear localization of the minichromosome maintenance complex in G1. *Mol BiolCell*. 2007; 18(4): 1447-56.
- Carreón-Burciaga RG, González-González R, Molina-Frechero N, Bologna-Molina R. Immunoexpression of Ki-67, MCM2, and MCM3 in Ameloblastoma and Ameloblastic Carcinoma and Their Correlations with Clinical and Histopathological Patterns. *Dis Markers*. 2015; 2015:683087
- Choy B, LaLonde A, Que J, Wu T, Zhou Z. MCM4 and MCM7, potential novel proliferation markers, significantly correlated with Ki-67, BMi1 and cyclin E expression in esophageal adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and precancerous lesions. *Hum Pathol*. 2016; 57: 126-135
- Cortez D, Glick G, Elledge SJ. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(27): 10078-83.
- Das M, Prasad SB, Yadav SS, Govardhan HB, Pandey LK, Singh S, Pradhan S, Narayan G. Over expression of minichromosome maintenance genes is clinically correlated to cervical carcinogenesis. *PLoS One*. 2013; 8 (7): e69607.
- Forsburg SL. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68(1): 109-31.
- Fujioka S, Shomori K, Nishihara K, Yamaga K, Nosaka K, Araki K, Haruki T, Taniguchi Y, Nakamura H, Ito H. Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinomas (pT1): Prognostic implication. *Lung Cancer*. 2009; 65(2):223-9.
- Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, et al. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. *Br J Cancer*. 2007; 97: 1124–34.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983; 31: 13-20.
- Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocharis S. MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol*. 2010; 25(3): 351-70.



- Giaginis C, Giagini A, Tsourouflis G, et al. MCM-2 and MCM-5 expression in gastric adenocarcinoma: clinical significance and comparison with Ki-67 proliferative marker. *Dig Dis Sci.* 2011; 56: 777–85.
- González-González R, Molina-Frechero N, Damian-Matsumura P, Salazar-Rodriguez S, Bologna-Molina R. Immunohistochemical expression of survivin and its relationship with cell apoptosis and proliferation in ameloblastomas. *Dis Markers.* 2015; 301781:1-7.
- González MA, Pinder SE, Callagy G, Vowler SL, Morris LS, Pájaro K, Campana JA, Laskey RA, Coleman N. Minichromosome maintenance protein 2 is a Strong independent prognostic marker in breastcancer. *J ClinOncol.* 2003; 21(23): 4306-13.
- Gouvêa AF, Vargas PA, Coletta RD, Jorge J, Lopes MA. Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39(6): 447-52.
- Hanna-Morris A, Badvie S, Cohen P, McCullough T, Andreyev HJ, Allen-Mersh TG. Minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) is a stronger discriminator of increased proliferation in mucosa adjacent to colorectal cancer than Ki-67. *J ClinPathol.* 2009; 62(4): 325-30
- Heidebrecht HJ, Buck F, Endl E, Kruse ML, Adam-Klages S, Andersen K, Frahm SO, Schulte C, Wacker HH, Parwaresch R. Ki-Mcm6, a new monoclonal antibody specific to Mcm6: comparison of the distribution profile of Mcm6 and the Ki-67 antigen. *Lab Invest.* 2001; 81: 1163-1165.
- Iakovou M, Chrysomali E, Piperietal E. A comparative study of bone remodeling molecules expression in different types of jaw ameloblastoma. *J Oral Pathol Med* 2015; 44(7): 543–551.
- Ihmann T, Liu J, Schwabe W, Häusler P, Behnke D, Bruch HP, Broll R, Windhövel U, Duchrow M. High-level mRNA quantification of proliferation marker pKi-67 is correlated with favorable prognosis in colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004; 130: 749-756.
- Ilves I, Petojevic T, Pesavento JJ, Botchan MR. Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell.* 2010; 37(2): 247-58.
- 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.
- Johnson NR, Gannon OM, Savage NW, Batstone MD. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *Journal of investigative and clinical dentistry.* 2014; 5(1): 9-14.

- Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, Kikuchi E, Takeda K, Aburatani H, Oizumi S, Konishi J, Kaga K, Matsuno Y, Birrer MJ, Nishimura M, Dosaka-Akita H. Minichromosome maintenance (MCM) protein4 as a marker for proliferation and its clinical and clinicopathological significance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011; 72(2): 229-37.
- Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoike 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.
- Korkolopoulou P, Givalos N, Saetta A, Goudopoulou A, Gakiopoulou H, Thymara I, Thomas-Tsagli E, Patsouris E. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 expression in muscle-invasive urothelial cancer: a multivariate survival study including proliferation markers and cell cycle regulators. *Hum Pathol*. 2005; 36: 899–907.
- Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Ki67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3 MCM4, and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer*. 2010; 10(140): 1-15.
- Lawal AO, Adisa AO, Olusanya AA. Odontogenic tumours: A review of 266 cases. *J Clin Exp Dent*. 2013; 5(1): e13-7.
- Lee YS, Ha SA, Kim HJ, Shin SM, Kim HK, Kim S, Kang CS, Lee KY, Hong OK, Lee SH, Kwon HS, Cha BY, Kim JW. Minichromosome maintenance protein 3 is a candidate proliferation marker in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2010; 88(1): 138-42.
- Liu H, Takeuchi S, Moroi Y, Lin N, Urabe K, Kokuba H, Imafuku S, Dainichi T, Uchi H, Furue M, Tu Y. Expression of minichromosome maintenance 5 protein in proliferative and malignant skin diseases. *Int J Dermatol*. 2007; 46 (11): 1171-6.
- Luo HY y Li TJ. Odontogenic tumors: a study of 1309 cases in a Chinese population. *Oral Oncol*. 2009; 45: 706–11
- Madine MA, Swietlik M, Pelizon C, Romanowski P, Mills AD, Laskey RA. The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol*. 2000; 129(2-3): 198-210.
- McInerney CJ. Cellcycle regulated transcription: from yeast to cancer. *F1000Res*. 2016; 12: 1-5.
- Meer S, Galpin JS, Altini M, Coleman H, Ali H. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon*. 2003; 95(2): 213-221.
- Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruíz-Godoy Rivera LM, Meneses-García A. Odontogenic tumors in

Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1997; 84(6): 672-675

- Murphy N, Ring M, Heffron CC, Martin CM, McGuinness E, Sheils O, O'Leary JJ. Quantitation of CDC6 and MCM5 mRNA in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Mod Pathol*. 2005; 18 (6): 844-9.
- Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours , 4th Edition, 2017, Volume 9.
- Nakao Y, Mitsuyasu T, Kawano S, Nakamura N, Kanda S, Nakamura S. Fibroblast growth factors 7 and 10 are involved in ameloblastoma proliferation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol*. 2013; 43(5): 1377-84.
- Nguyen VQ, Co C, Irie K, Li JJ. Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr Biol*. 2000; 10(4): 195-205.
- Nishihara K, Shomori K, Fujioka S, Tokuyasu N, Inaba A, Osaki M, Ogawa T, Ito H. Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance. *Int J Oncol*. 2008; 33(2): 245-51.
- Lima-Verde-Osterne R, Turatti E, Cordeiro-Teixeira R, Barroso-Cavalcante R. The relative frequency of odontogenic tumors: A study of 376 cases in a Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017; 22(2): e193-e200.
- González-González R, Molina-Frechero N, Damian-Matsumura P, Bologna-Molina R. Molecular markers of cell adhesion in ameloblastomas. An update. *Med Oral, Patol Oral Cir Bucal*. 2014; 19(1): e8-e14.
- González-González R, Molina-Frechero N, Damian-Matsumura P, Salazar-Rodriguez S, Bologna-Molina R. Immunohistochemical expression of survivin and its relationship with cell apoptosis and proliferation in ameloblastomas. *Dis Markers*. 2015; 301781: 1-7.
- Otero D, Lourenco SQC, Ruiz-Ávila I, Bravo M, Sousa T, de Faria PAS, González-Moles MA. Expression of proliferative markers in ameloblastomas and malignant odontogenic tumors. *Oral Diseases*. 2013; 19: 360-65.
- Philipsen HP y Reichart PA. Classification of odontogenic tumours. A historical review. *J Oral Pathol Med*. 2006; 35(9): 525-9.
- Regezi J y Sciubba J. *Patología Bucal. Correlaciones clinicopatológicas*. 4ta ed. 1999. Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos. McGraw- Hill Interamericana.
- Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995; 31B(2): 86-99.

- Ren B, Yu G, Tseng GC, Cieply K, Gavel T, Nelson J, Michalopoulos G, Yu YP, Luo JH. MCM7 amplification and over expression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene*. 2006; 25(7): 1090-8.
- Rodins K, Cheale M, Coleman N, Fox SB. Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(4): 1075-81.
- Sandra F, Mitsuyasu T, Nakamura N, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. *Oral Oncol*. 2001; 37(2): 193-198
- Sapp JR, Eversole LR, Wysocki GP. *Patología oral y máxilofacial contemporánea*. 2º ed. 2005. Madrid, España. Elsevier.
- Scholzen T y Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182(3): 311-22
- Schrader C, Janssen D, Klapper W, Siebmann JU, Meusers P, Brittinger G, Kneba M, Tiemann M, Parwaresch R. Minichromosome maintenance protein 6, a proliferation marker superior to Ki-67 and independent predictor of survival in patients with mantle cell lymphoma. *Br J Cancer*. 2005; 93(8): 939-45.
- Simon NE y Schwacha A. The Mcm2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 549719.
- Soluk Tekkesin M, Mutlu S, Olgac V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg*. 2012; 28: 49-55.
- Soluk Tekkesin M, Tuna EB, Olgac V, Aksakalli N, Alatlı C. Odontogenic lesions in a pediatric population: Review of the literature and presentation of 745 cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016; 86: 196-9.
- Soluk-Tekkeşin M y Wright JM. The World Health Organization Classification of Odontogenic Lesions: A Summary of the Changes of the 2017 (4th) Edition. *Turk Patoloji Derg*. 2018; 34 (1).
- Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, Williams ED, Williams GH. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J CellSci*. 2001; 114 (Pt 11): 2027-41.
- Stoeber K, Swinn R, Prevost AT, de Clive-Lowe P, Halsall I, Dilworth SM, Marr J, Turner WH, Bullock N, Doble A, Hales CN, Williams GH. Diagnosis of genitourinary tract cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments. *J Natl cancer Inst*. 2002; 94 (14): 1071-9.

- Tan Z, Wortman M, Dillehay KL, Seibel WL, Evelyn CR, Smith SJ, Malkas LH, Zheng Y, Lu S, Dong Z. Small-molecule targeting of proliferating cell nuclear antigen chromatin association inhibits tumor cell growth. *Mol Pharmacol*. 2012; 81(6): 811-9
- 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): 328-32
- Van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1989; 49: 2999-3006.
- Van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol*. 1998; 51: 716-724.
- Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2001; (4): 305-13.
- Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, Marr J, Laskey RA, Coleman N. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(25): 14932-7.
- Xu M, Chang YP, Chen XS. Expression, purification and biochemical characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm4, 6 and 7. *BMC Biochem*. 2013; 14:5.
- Yu SY, Wang YP, Chang JY, Shen WR, Chen HM, Chiang CP. Increased expression of MCM5 is significantly associated with aggressive progression and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2014; 43(5): 344-9.
- Zegerman P y Diffley JF. Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature*. 2007; 445(7125): 281-5.
- Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2012; 48(1): 1-9
- Zheng T, Chen M, Han S, Zhang L, Bai Y, Fang X, Ding SZ, Yang Y. Plasma minichromosome maintenance complex component 6 is a novel biomarker for hepatocellular carcinoma patients. *Hepatol Res*. 2014; 44(13): 1347-56.

# MCM2-7 complex: a review

Delmira Apellániz<sup>1</sup>, Vanesa Pereira-Prado<sup>2</sup>, Gabriel Tapia-Repetto<sup>3</sup>, Ronell Bologna-Molina<sup>4</sup>

DOI: 10.22592/ode2018n32a2

## Abstract

New cells are formed from preexisting cells through an ordered series of events called cell cycle. As the control of this cycle is fundamental for genome integrity, multiple proteins regulate this process. We currently know that the MCM2-7 complex has a major role in DNA replication in the cell cycle, in particular regarding proliferation. The immunohistochemical identification of the proteins in this complex on tissues may be useful, as they could be used as biomarkers and would help us understand one of the biological mechanisms affected in cancer processes. Our aim is to collect the existing evidence regarding the members of the MCM2-7 complex, since these proteins could be effective biological cell proliferation markers, which would help practitioners make accurate diagnosis, prognosis and future therapeutic targets of lesions that are mainly neoplastic, especially in the oral mucosa.

**Keywords:** MCM2-7 complex, cell proliferation, tumors.

1 Molecular Pathology in Stomatology, School of Dentistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ORCID: 0000-0003-3490-043

2 Molecular Pathology in Stomatology, School of Dentistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ORCID: 0000-0001-7747-671

3 Histology Department, School of Dentistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ORCID: 0000-0003-4563-9142

4 Histology Department, School of Dentistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ORCID: 0000-0001-9755-4779

## Introduction

New cells are formed from preexisting cells through an ordered series of events called *cell cycle*. The cycle is divided into four phases: G1, S, G2 and M (Fig.1). Although the cycle can be addressed conceptually from any phase, it is usually analyzed from the G1 phase. This is the phase immediately after mitosis (M): the cell grows because of different events that include synthesis of RNA, proteins and other cell elements. The following stage is called S phase, where the cell replicates the entire chromosomal DNA, leading to duplication. The centrioles and the centrosome also duplicate, which will be essential for the M phase (mitosis) to occur in this cycle.

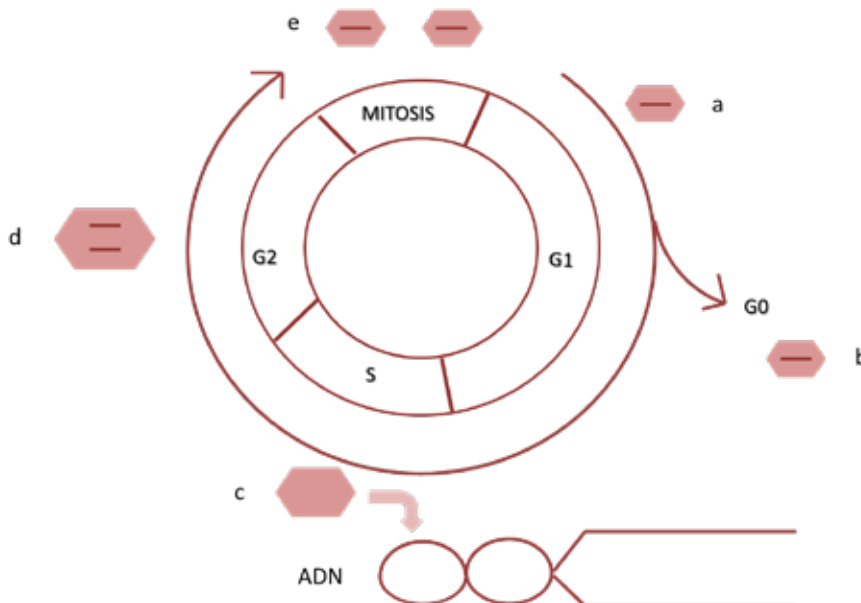
The next phase is called G2 and separates the S phase from mitosis. Here, there is rapid cell growth and DNA security molecular mechanisms are activated. They are used to search for errors in the DNA sequence. If such errors are detected but not corrected, mechanisms that prevent the cycle from developing are triggered. When the absence of errors is verified and G2 is

complete, the M phase begins, which is where the process of mitosis occurs. This is divided into four stages (prophase, metaphase, anaphase and telophase), where the mother diploid cell produces two diploid daughter cells <sup>(1)</sup>.

Some cells may remain in a state of basal metabolism without dividing or replicating their DNA. These cells are in G0 phase or in a quiescent state (Fig. 1), which can be a transitory state, where the cell is stimulated and re-enters the cell cycle, or a permanent state, where the cell never divides again <sup>(1)</sup>.

Cell proliferation is an increase in the number of cells, a result of cell division. It is more active during embryogenesis and the development of an organism, but continues throughout life, as it is necessary for tissue homeostasis <sup>(1)</sup>.

As the control of this cycle is fundamental for genome integrity, multiple proteins regulate this process. If this regulation is lost, diseases such as cancer may appear, where a cell makes up a cell line with unlimited and uncontrolled cell proliferation capacity due to genetic mutations <sup>(1)</sup>.



**Fig. 1: Cell cycle. a- G1 phase: the cell enters the cell cycle. b- G0 phase: the cell is in a quiescent state. c- S phase: the cell duplicates its DNA. d- G2 phase: the cell with duplicated DNA. e- Mitosis: cell division into two daughter cells.**

Identifying the proteins involved in the cell cycle allows us to use them as biomarkers of cell proliferation (through immunohistochemistry, essential technique in the pathological diagnosis of cancer), which are useful for the diagnosis, prognosis and treatment plan of different neoplasms, as several experimental research studies suggest.

Our aim is to collect evidence of the MCM2-7 complex (biological proteins involved in the cell cycle and its control) and to identify and mark defective mitosis, particularly in pre-malignant or potentially cancerous oral pathologies such as leukoplakia (in its different forms) actinic cheilitis, lupus erythematosus and lichen planus, all of which tend to become cancerous lesions.

## Methods

We conducted a literature review in the electronic database PubMed throughout 2017. The review included articles published in the previous 15 years and reference texts on the subject reviewed, using the following terms in English: “complex MCM2-7, cellular proliferation, cancer”. We included 45 articles in English to guide this literature review.

## Development

### MCM2-7 complex (minichromosome maintenance)

The MCM2-7 complex was recognized in 1980. It has a toroidal structure and includes six different proteins (MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7) <sup>(2)</sup>.

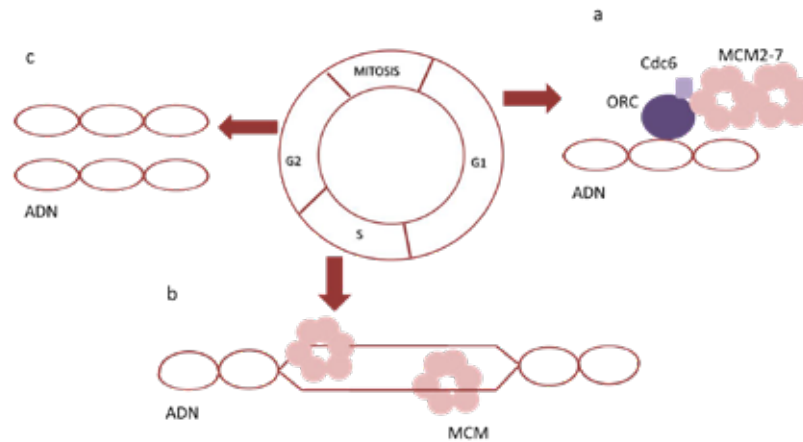
The MCM2-7 complex is part of the pre-replicative complex, so it plays an essential role in DNA replication <sup>(3)</sup> (Fig. 2). Therefore, it would be useful to know how it participates in the cell cycle to understand one of the biological mechanisms affected in cancer processes.

### Pre-replication complex

The MCM7 protein, along with [MCM2](#), [MCM4](#) and [MCM6](#), have [DNA-helicase](#) activity, so they could act as [enzymes](#) that unwind DNA.

The pre-replicative complex is formed near the end of mitosis and in early G1 phase. It includes the origin recognition complex (ORC), cell division cycle 6 (Cdc6) and MCM2-7 <sup>(4-5)</sup> (Fig. 2). This complex marks the DNA fragment where replication will start. In the S phase of the cell cycle, the pre-replicative complex is activated, giving rise to DNA replication <sup>(6-7)</sup> (Fig. 2). Once replication is complete, the complex dissolves and its components are destroyed <sup>(4)</sup>.





**Fig. 2:** a- Pre-replicative complex formed. b- Active complex, DNA replication. c- Two DNA strands, complex dissolves.

The activity of MCM proteins is highly regulated by a cyclin-dependent kinase (CDK), which has low levels at the end of mitosis and during early G1. Therefore, it promotes the formation of the pre-replicative complex and increases at the end of phases S and M. This leads to the phosphorylation of the MCM2-7 complex components, making them exit the cytoplasm and degrade<sup>(4-5)</sup>.

### MCM functions

As mentioned above, the complex has an essential role in DNA replication<sup>(8-9)</sup>.

1. It starts the replication process at the right time, for which it must change its three-dimensional structure. When inactive, the MCM2-7 complex has a reversible discontinuity in its toroidal structure. As MCM2 and MCM5 bind, they close this discontinuity, which allows the MCM2-7 complex to activate<sup>(10-11)</sup> (Fig. 3).



**Fig. 3:** a- Active complex b- Inactive complex

2. Helicase function: after the MCM2-5 discontinuity is closed, the MCM2-7 complex begins to unwind the two DNA strands for replication to occur. Helicase activity has been demonstrated in vitro for the MCM4, 6 and 7 subcomplex <sup>(12)</sup>
3. It stops replication: if damage is detected in the DNA, the MCM2-7 complex stops helicase activity <sup>(13)</sup>.
4. It ensures the entire DNA is replicated: due to the large size of the chromosomes, thousands of sites are necessary for replication to begin <sup>(7)</sup>. However, only some of the multiple sites that have the pre-replicative complex are used. The others remain dormant, and if there is replicative stress, they are activated, which is why all the DNA must be replicated <sup>(14)</sup>
5. It prevents repeated DNA replication <sup>(15)</sup>. Once the DNA is replicated, they are exported to the cytoplasm and degrade their components <sup>(4)</sup>.

According to Nguyen 2000, all the proteins that form the MCM2-7 complex have the same localization pattern in the cell cycle, and once replication is complete, they are exported to the cytoplasm.

However, contrary to this author, more recent genetic and biochemical studies show that the MCM2-7 complex subunits have different functions <sup>(16-18)</sup>.

As mentioned above, helicase activity has been demonstrated in vitro for the MCM4, 6 and 7 subcomplex <sup>(12)</sup>, while MCM2, 3 and 5 are responsible for activating and deactivating the complex <sup>(10-11)</sup>.

Given the high activity of the MCM2-7 present in the cells during the cell cycle, and the fact that these proteins are absent in quiescent cells, the different proteins in the MCM2-7 complex could be good markers of cell proliferation <sup>(19)</sup>, possible biological markers for diagnosis and prognosis <sup>(20-21)</sup> and future therapeutic targets <sup>(22)</sup>. It has been shown that several tumor suppressors can inhibit MCM 2-7 activity <sup>(22)</sup>.

## Role in carcinogenesis

Overexpression of MCM proteins has been demonstrated in a variety of neoplasms. MCM2 expression is increased in bladder carcinoma <sup>(23)</sup>, ovarian adenocarcinoma <sup>(24)</sup>, **proliferative verrucous leukoplakia** <sup>(25)</sup>, oligodendrogliomas <sup>(26)</sup>, renal cell carcinoma <sup>(27)</sup> and breast cancer <sup>(28)</sup>. Also, MCM3 in papillary thyroid carcinoma <sup>(29)</sup>, MCM4 in small cell lung cancer <sup>(30)</sup> and cutaneous melanoma <sup>(31)</sup>, MCM5 in gastric adenocarcinoma <sup>(32)</sup>, bladder carcinoma <sup>(23)</sup>, ovarian adenocarcinoma <sup>(24)</sup>, squamous cell carcinoma of the skin <sup>(33)</sup>, cervical cancer <sup>(34)</sup>, **squamous cell carcinoma of the buccal mucosa** <sup>(35)</sup> and **proliferative verrucous leukoplakia** <sup>(25)</sup>, MCM6 in hepatocellular carcinoma <sup>(36)</sup> and MCM7 in prostate cancer <sup>(37)</sup>, colon cancer <sup>(38)</sup> and pulmonary adenocarcinoma <sup>(39)</sup>.

These are just some of the many studies that have shown the overexpression of the different proteins of the MCM complex in various neoplasms. Therefore, they conclude that these proteins could be good cell proliferation markers.

It has been shown that the deregulation of MCM proteins is an early event in tumor development. It is therefore suggested that these biomarkers can be very useful in the primary diagnosis and monitoring of the tumor <sup>(28, 40-41)</sup>. According to Williams, 1998, MCM5 has high sensitivity and specificity to detect malignant precursor cells by using immunoperoxidase or immunofluorescence in Pap smears. Williams proposes this diagnostic method as an additional test besides Pap smear to decrease false-negative rates <sup>(40)</sup>. Furthermore, Williams, 1998 and Strober 2002 understand that high levels of MCM5 in urine are highly predictive of bladder cancer <sup>(40-41)</sup>.

There are several authors who conclude that these proteins are superior to conventional markers such as Ki-67, since they have higher expression and therefore better diagnostic sensitivity <sup>(25, 42-43)</sup>.

Higher expression of this complex, compared to Ki67 expression can be explained in two ways: As mentioned above, we find more pre-replicative complexes than the ones used to initiate replication. The others remain dormant to be activated if there are problems in some of the replication forks. This number of pre-replicative complexes, and therefore of the MCM2-7 complex, is what is referred to as “excess MCM”<sup>(42)</sup>. Ki-67 is expressed in the middle of the G1 phase<sup>(44)</sup>, while as mentioned above, the pre-replicative complex and therefore MCM2-7 is expressed at the beginning of the G1 phase<sup>(45)</sup>.

## Conclusions

As shown, MCM complex proteins and, more specifically MCM 2 and 5, could act as good biological markers of cell proliferation, as is clear from the results of the research conducted. Altered or defective tissue immunexpression would be an effective complementary diagnosis and prognosis tool, as well as future therapeutic targets. Therefore, we must improve our knowledge in the area, both from a functional perspective and regarding its participation in various biological processes. This would help practitioners detect neoplastic lesions early, including oral cancer, in their clinical practice, and therefore select the right therapy.

## References

1. McInerney CJ. Cell cycle regulated transcription: from yeast to cancer. *F1000Res*. 2016; 12:1-5. doi:10.12688/f1000research.8111.1.
2. Forsburg SL. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68 (1): 109-31.
3. Simon NE, Schwacha A. The Mcm2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 549719. doi: 10.1155/2014/549719.
4. Nguyen V Q, Co C, Irie K, Lij J. Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the repli-

- cation initiator proteins Mcm2-7. *Curr. Biol*. 2000; 10 (4): 195-205.
5. Braun KA, Breeden LL. Nascent transcription of MCM2-7 is important for nuclear localization of the minichromosome maintenance complex in G1. *Mol Biol Cell*. 2007; 18 (4): 1447-56.
6. Arias EE, Walter JC. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev*. 2007; 21 (5): 497-518.
7. Alver RC, Chadha GS, Blow JJ. The contribution of dormant origins to genome stability: from cell biology to human genetics. *DNA Repair (Amst)*. 2014; 19: 182-9.
8. 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): 1119-32.
9. Simon NE, Schwacha A. The Mcm2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 549719. doi: 10.1155/2014/549719.
10. Zegerman P, Diffley JF. Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature*. 2007; 445 (7125): 281-5.
11. 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): 328-32.
12. Xu M, Chang YP, Chen XS. Expression, purification and biochemical characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm4, 6 and 7. *BMC Biochem*. 2013; 14:5.
13. Cortez D, Glick G, Elledge SJ. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101 (27): 10078-83.
14. Blow JJ, Ge XQ, Jackson DA. How dormant origins promote complete genome replication. *Trends Biochem Sci*. 2011; 36 (8): 405-14.
15. Tan Z, Wortman M, Dillehay KL, Seibel WL, Evelyn CR, Smith SJ, Malkas LH, Zheng Y, Lu S, Dong Z. Small-molecule targeting of proliferating cell nuclear antigen chromatin association inhibits tumor cell growth. *Mol Pharmacol*. 2012; 81 (6): 811-9

16. Bochman ML, Schwacha A. Differences in the single-stranded DNA binding activities of MCM2-7 and MCM467: MCM2 and MCM5 define a slow ATP-dependent step. *J Biol Chem.* 2007; 282 (46): 33795-804
17. Bochman ML, Bell SP, Schwacha A. Subunit organization of Mcm2-7 and the unequal role of active sites in ATP hydrolysis and viability. *Mol Cell Biol.* 2008; 28 (19): 5865-73.
18. Ilves I, Petojevic T, Pesavento JJ, Botchan MR. Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell.* 2010; 37 (2): 247-58.
19. Madine MA, Swietlik M, Pelizon C, Romanowski P, Mills AD, Laskey RA. The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol.* 2000; 129 (2-3): 198-210.
20. Das M, Prasad SB, Yadav SS, Govardhan HB, Pandey LK, Singh S, Pradhan S, Narayan G. Over expression of minichromosome maintenance genes is clinically correlated to cervical carcinogenesis. *PLoS One.* 2013; 8 (7): e69607.
21. Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocharis S. MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol.* 2010; 25 (3): 351-70.
22. Simon NE, Schwacha A. The Mcm2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 549719. doi: 10.1155/2014/549719.
23. Korkolopoulou P, Givalos N, Saetta A, Goudopoulou A, Gakiopoulou H, Thymara I, Thomas-Tsagli E, Patsouris E. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 expression in muscle-invasive urothelial cancer: a multivariate survival study including proliferation markers and cell cycle regulators. *Hum Pathol.* 2005; 36 (8): 899-907.
24. 24- Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, Thymara I, Saetta A, Piperi C, Givalos N, Vassilopoulos I, Ventouri K, Tsenga A, Bamias A, Dimopoulos MA, Agapitos E, Patsouris E. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. *Br J Cancer.* 2007; 97 (8): 1124-34.
25. 25- Gouvêa AF, Vargas PA, Coletta RD, Jorge J, Lopes MA. Clinicopathological features and immune histochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39 (6): 447-52.
26. 26- Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001; (4): 305-13.
27. 27- Rodins K, Cheale M, Coleman N, Fox SB. Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clin Cancer Res.* 2002; 8 (4): 1075-81.
28. 28- González MA, Pinder SE, Callagy G, Vowler SL, Morris LS, Pájaro K, Campana JA, Laskey RA, Coleman N. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21 (23): 4306-13.
29. 29- Lee YS, Ha SA, Kim HJ, Shin SM, Kim HK, Kim S, Kang CS, Lee KY, Hong OK, Lee SH, Kwon HS, Cha BY, Kim JW. Minichromosome maintenance protein 3 is a candidate proliferation marker in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2010; 88 (1): 138-42.
30. 30- Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, Kikuchi E, Takeda K, Aburatani H, Oizumi S, Konishi J, Kaga K, Matsuno Y, Birrer MJ, Nishimura M, Dosaka-Akita H. Minichromosome maintenance (MCM) protein 4 as a marker for proliferation and its clinical and clinicopathological significance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2011; 72 (2): 229-37.
31. 31- Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Biochem.* 2013; 10:5. 140.
32. 32- Giaginis C, Giagini A, Tsourouflis G, Gatzidou E, Agapitos E, Kouraklis G, Theocharis S. MCM-2 and MCM-5 expression in gastric adenocarcinoma: clinical significance



- and comparison with Ki-67 proliferative marker. *Dig Dis Sci*. 2011; 56 (3): 777-85.
33. 33- Liu H, Takeuchi S, Moroi Y, Lin N, Urabe K, Kokuba H, Imafuku S, Dainichi T, Uchi H, Furue M, Tu Y. Expression of mini chromosome maintenance 5 protein in proliferative and malignant skin diseases. *Int J Dermatol*. 2007; 46 (11): 1171-6.
  34. 34- Murphy N, Ring M, Heffron CC, Martin CM, McGuinness E, Sheils O, O'Leary JJ. Quantitation of CDC6 and MCM5 mRNA in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Mod Pathol*. 2005; 18 (6): 844-9.
  35. 35- Yu SY, Wang YP, Chang JY, Shen WR, Chen HM, Chiang CP. Increased expression of MCM5 is significantly associated with aggressive progression and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2014; 43 (5): 344-9.
  36. 36- Zheng T, Chen M, Han S, Zhang L, Bai Y, Fang X, Ding SZ, Yang Y. Plasma minichromosome maintenance complex component is a novel biomarker for hepatocellular carcinoma patients. *Hepatol Res*. 2014; 44 (13): 1347-56.
  37. 37- Ren B, Yu G, Tseng GC, Cieply K, Gavel T, Nelson J, Michalopoulos G, Yu YP, Luo JH. MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene*. 2006; 25 (7): 1090-8.
  38. 38- Nishihara K, Shomori K, Fujioka S, Tokuyasu N, Inaba A, Osaki M, Ogawa T, Ito H. Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance. *Int J Oncol*. 2008; 33 (2): 245-51.
  39. 39- Fujioka S, Shomori K, Nishihara K, Yamaga K, Nosaka K, Araki K, Haruki T, Taniguchi Y, Nakamura H, Ito H. Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinomas (pT1): Prognostic implication. *Lung Cancer*. 2009; 65 (2): 223-9.
  40. 40- Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, Marr J, Laskey RA, Coleman N. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 (25): 14932-7.
  41. Stoeber K, Swinn R, Prevost AT, de Clive-Lowe P, Halsall I, Dilworth SM, Marr J, Turner WH, Bullock N, Doble A, Hales CN, Williams GH. Diagnosis of genito-urinary tract cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94 (14): 1071-9.
  42. Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, Williams ED, Williams GH. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci*. 2001; 114 (Pt 11): 2027-41.
  43. Hanna-Morris A, Badvie S, Cohen P, McCullough T, Andreyev HJ, Allen-Mersh TG. Minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) is a stronger discriminator of increased proliferation in mucosa adjacent to colorectal cancer than Ki-67. *J Clin Pathol*. 2009; 62 (4): 325-30
  44. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182: 311-22.
  45. 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.

Delmira Apellaniz: [Catalica037@hotmail.com](mailto:Catalica037@hotmail.com)

Received on: 14 Mar 18 – Accepted on: 21 Aug 18

# Comparative Study of the Minichromosome Maintenance Proteins Complex (MCM 4/5/6) in Ameloblastoma and Unicystic Ameloblastoma

International Journal of Surgical Pathology  
1–7  
© The Author(s) 2018  
Reprints and permissions:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/1066896918778341  
journals.sagepub.com/home/ijsp  


Delmira Apellániz, DDS<sup>1</sup> , Vanesa Pereira-Prado, DDS<sup>1</sup> ,  
Estefania Sicco, MSc<sup>1</sup> , Gabriela Vigil-Bastitta, DDS<sup>1</sup> ,  
Rogelio González-González, DDS, PhD<sup>2</sup> ,  
Adalberto Mosqueda-Taylor, DDS, MSc<sup>3</sup>, Nelly Molina-Frechero, DDS, PhD<sup>3</sup> ,  
Marcela Hernandez, DDS, PhD<sup>4</sup> , Celeste Sánchez-Romero, DDS, MSc<sup>5</sup> ,  
and Ronell Bologna-Molina, DDS, PhD<sup>1</sup> 

## Abstract

**Introduction.** Solid/conventional ameloblastoma (AM) and unicystic ameloblastoma (UAM) are the most frequent benign epithelial odontogenic tumors located in the maxillary region, and their treatment usually consists of extensive surgical resection. Therefore, it is relevant to study molecular markers to better understand the biological behavior of these tumors. The aim of this study was to describe and compare the expression of proteins related to cellular proliferation: Ki-67 and MCM4-6 complex. **Materials and Methods.** An immunohistochemistry technique was performed, with antibodies against Ki-67, MCM4, MCM5, and MCM6, in 10 AM and 10 UAM tumors. The results were quantified using label index and analyzed statistically. **Results.** AM and UAM had greater expression of MCM6, followed by MCM5, MCM4, and Ki-67 ( $P < .05$ ). Immunoexpression of Ki-67 and MCM5 was exclusively nuclear, whereas the expression of MCM4 and MCM6 was nuclear and cytoplasmic. **Conclusion.** The results suggest that MCM5 is a trustable cell proliferation marker with higher sensitivity compared with Ki-67 and may be useful to predict the biological behavior of AM and UAM. Despite this, further studies are necessary, including a correlation with clinical parameters to confirm these findings.

## Keywords

MCM4, MCM5, MCM6, proliferation, ameloblastoma, unicystic ameloblastoma

## Introduction

Solid ameloblastoma (AM) and unicystic ameloblastoma (UAM) are the most frequent benign epithelial odontogenic tumors and their behavior depends on clinical and histopathological characteristics.<sup>1,2</sup> The World Health Organization classified ameloblastomas into AM, UAM, peripheral ameloblastoma, and metastatic ameloblastoma.<sup>3</sup> AM and occasionally UAM can present maxillary bone destruction before showing clinical manifestations, such as facial asymmetry and deformity; these symptoms may be due to a slow-growing tumor present over a long period of time and may be related to proliferative capacity and diverse adaptive mechanisms, allowing intraosseous growth.<sup>4</sup> Cell proliferation control is deregulated in diverse neoplasms; for this reason, evaluation through immunohistochemistry techniques has become an important tool to

identify prognosis markers.<sup>5</sup> Ki-67 is considered to be gold standard to determine cell proliferation grade in diverse tumors, including AM and UAM; in general, Ki-67 has been an important marker for tumor behavior, recurrence, and invasion, despite diverse reported results.<sup>6-11</sup>

<sup>1</sup>Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, México

<sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Universidad de Chile, Santiago, Chile

<sup>5</sup>University of Campinas, Piracicaba, Brazil

### Corresponding Author:

Prof. Ronell Bologna-Molina, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Molecular Pathology Area, Las Heras 1925, Montevideo 14600, Uruguay.

Email: ronellbologna@odon.edu.uy

Minichromosome maintenance proteins (MCM) have an essential role in DNA replication and consist of a family that includes 6 different proteins (MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, and MCM7) that are part of the pre-replicative complex (pre-RC).<sup>12</sup>

At the end of mitosis and the beginning of the G1 phase, a pre-RC complex is formed, which consists of the origin recognition complex, cell division cycle 6 (Cdc6), and MCM2-7.<sup>13,14</sup> This complex marks the fragment of DNA where replication begins in phase S of the cell cycle, when the pre-RC complex is activated, thus starting DNA replication.<sup>15-17</sup> Once replication is complete, the dissolution of the complex starts.<sup>13</sup>

MCM is highly regulated by the activity of a cyclin dependent kinase, which is found in low levels at the end of mitosis and the beginning of G1, inducing the formation of the pre-RC complex; MCM levels become higher at the end of S phase, which leads to the phosphorylation of the components of the MCM2-7 complex, allowing it to pass into the cytoplasm and degrade.<sup>13,14</sup>

Diverse studies have correlated the immunoexpression of MCM2-7 proteins with tumor behavior and prognostic factors in several malignant neoplasms.<sup>18-21</sup> In AM and UAM, there exists only one study that relates immunoexpression of MCM2 and MCM3 proteins with tumor behavior<sup>19</sup>; even so, the expression of the rest of the complex proteins has still not been studied in ameloblastic tumors.

The aim of the present study was to determine the immunoexpression patterns of MCM4, 5, and 6, and assess their relation with the presence of Ki-67, with the objective of evaluating their utility as possible cell proliferation markers in AM and UAM.

## Materials and Methods

In this study, 20 cases diagnosed as AM (10 cases) and UAM (10 cases) were included. The samples were obtained from the Molecular Pathology area, School of Dentistry, Universidad de la República (Uruguay). The slides were counterstained with hematoxylin-eosin to be re-evaluated and reclassified according to the *World Health Organization 2017 Classification of Head and Neck Tumours*.<sup>3</sup> The Ethics Committee of the School of Dentistry, Universidad de la República, Uruguay, approved the study, file 091900-000113-14.

### Immunohistochemistry Technique

Immunohistochemistry was performed according to a previously described method<sup>5,6,9</sup> with the following antibodies: anti-Ki-67 (clone MIB-1, dilution 1:100, Dako Corp, Carpinteria, CA), anti-MCM4 (clone G-7, dilution 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX), anti-MCM5

(clone E-10, dilution 1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc), and anti-MCM6 (clone H-8, dilution 1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc), using LSAB (labeled streptavidin-biotin, Dako Corporation) for visualization.

The quantification of the nuclear markers was performed according to the method described by Bologna-Molina et al.<sup>22</sup> The label index (LI) was performed, and the percentage of positive cells was calculated for each field. Examiners' calibrations were conducted, obtaining a  $\kappa = 0.75$ .

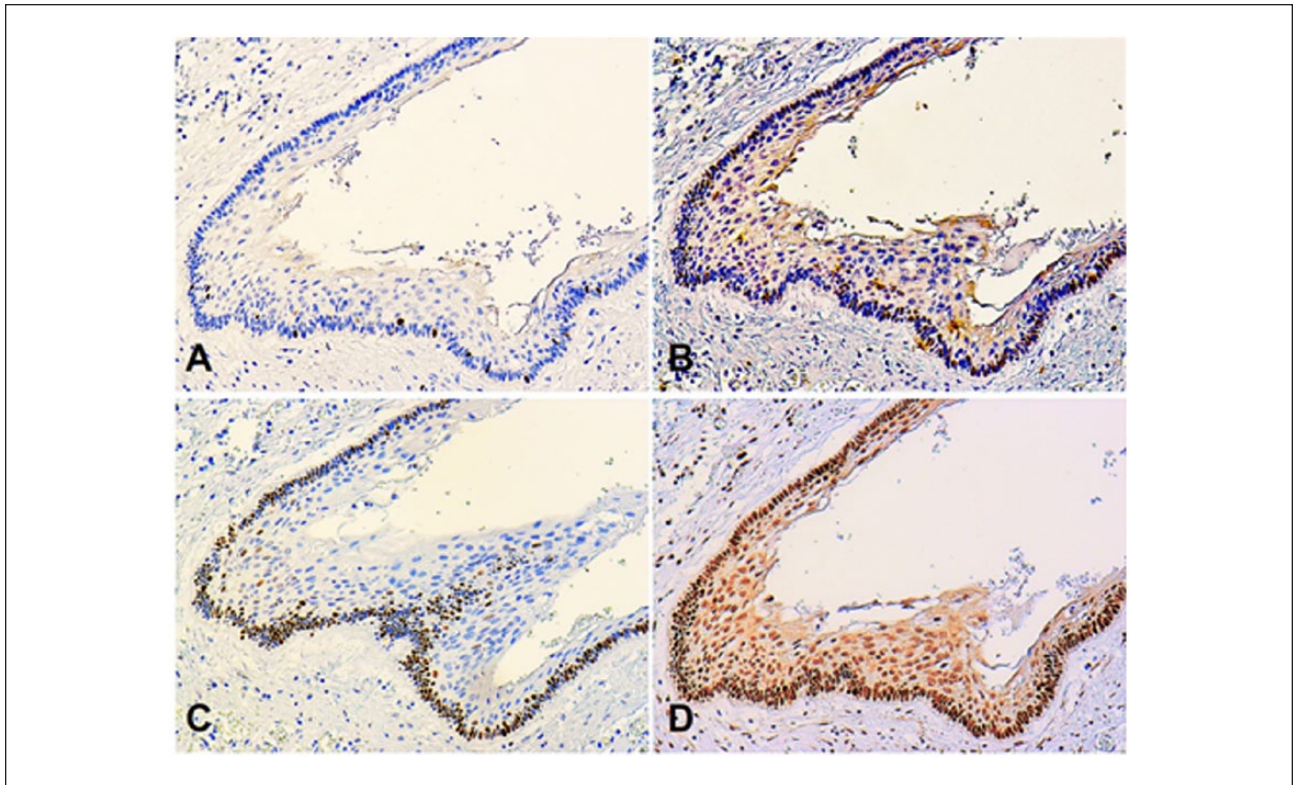
### Western Blot

Protein extraction was performed using a Qproteome FFPE tissue kit (Catalog Number 37623, QIAGEN), following the manufacturer's recommendations. The protein concentration was determined using the Bradford method with a spectrophotometer DeNovix DS-11. From each extraction, only 10 to 20  $\mu\text{g}$  of protein was used, and it was separated on 12% PAGE/SDS (polyacrylamide gel electrophoresis/sodium dodecyl sulfate), 100 V for 30 minutes. Electrotransference to polyvinylidene difluoride membranes over 2 hours at ambient temperature was performed (Hoefer Blot Module). Blockage was performed using buffer TNE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2.5 mM EDTA, pH 8.0, and 50 mM NaCl), 1% Tween-20, and ambient temperature for 1 hour. Three washings were performed for 5 minutes each with TBST buffer. Incubation of the primary antibodies mouse anti-Ki-67 (1:1000), anti-MCM4 (1:1000), anti-MCM5 (1:500), anti-MCM6 (1:600), and anti- $\alpha$ -actin (1:500) with the membrane was performed at 4°C for 2 hours under soft stirring. Then, the secondary antibody (goat-anti-mouse-HRP conjugated secondary antibody) was added at ambient temperature (diluted 1/5000) for 1 hour under soft stirring. Detection was performed using an Opti-4CN substrate kit (BIO-RAD, Catalog Number 970-3210).

### Statistical Analysis

To determine if significant differences were present in the proliferation index and LI between the markers studied, a Kruskal-Wallis test was performed to evaluate immunoexpression between proteins and ameloblastoma variants, and a Mann-Whitney *U* test was used to compare immunoexpression between the ameloblastoma variants. The correlation coefficients among Ki-67, MCM4, MCM5, and MCM6 were determined using the Spearman test in which the rates were established in perfect correlation ( $r = 1$ ) to the null ( $r = 0$ ) or negative ( $r = -1$ ) according to the values obtained. The results were analyzed using SPSS Professional Statistics, Version 20.0 (SPSS Inc, IBM Corp, Armonk, NY).





**Figure 1.** Immunohistochemical expression of Ki-67, MCM4, MCM5, and MCM6 in unicystic ameloblastoma with intraluminal growth. (A) Nuclear immunopositivity of Ki-67 predominantly in basal tumor cells. (B) Nuclear and cytoplasmic immunopositivity of MCM4 predominantly in basal tumor cells. (C) Nuclear immunopositivity of MCM5 predominantly in basal tumor cells. (D) Nuclear and cytoplasmic immunopositivity of MCM6, distributed in basal, suprabasal, and stromal tumor cells (200 $\times$ ).

## Results

### Immunohistochemistry

There was a concordance with  $\kappa > 0.81$  in both variants for establishing the LI of Ki-67 and MCM4, 5, and 6 between both pathologists who performed the cell counting. The immunopositivity of Ki-67 and MCM5 in both UAM and AM was exclusively nuclear, principally in basal tumoral cells, whereas the immunopositivity of MCM4 and MCM6 was nuclear and cytoplasmic in the basal/columnar cells, and the angular internal cells similar to the stellate reticulum (Figures 1A-D and 2A-D).

In general, Ki-67 and MCM4, 5, and 6 had a greater immunopositivity percentage in UAM compared with AM (Table 1), even though there was no statistical significance ( $P > .05$ ; Figure 3). Protein MCM6 showed a higher immunopositivity percentage in UAM and AM in comparison with the rest of the proteins ( $P = .000$ ; Figure 3).

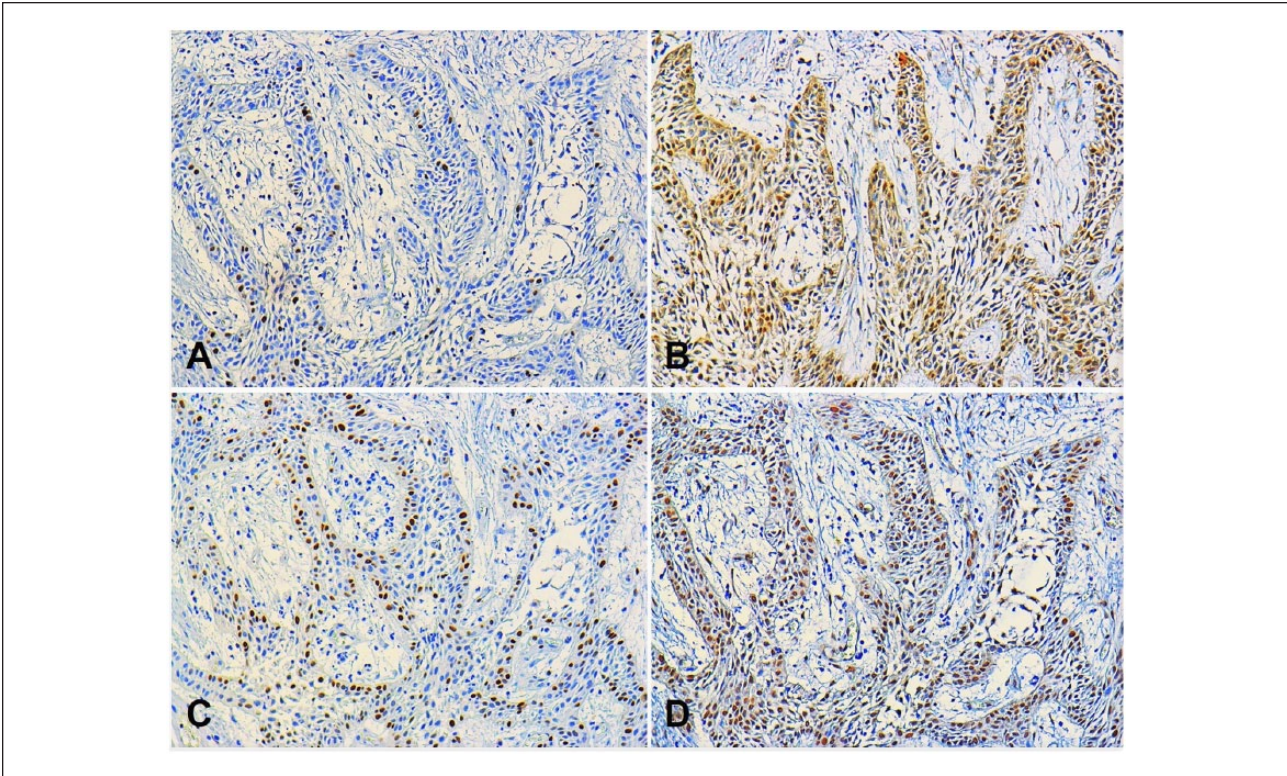
In UAM, the immunopositivity of Ki-67, MCM4, and MCM5 showed a positive correlation from moderate to strong, whereas in AM, the immunopositivity of Ki-67,

MCM5 and MCM6 was similar to UAM with a moderate-strong correlation. MCM4 showed a strong correlation when it was compared with MCM6. The correlation of the immunopositivity between the proteins and ameloblastoma variants was weak-negative (Table 2).

### Western Blot

Ki-67 and MCM4, 5, and 6 showed positivity in the Western blot analysis in both UAM and AM (Figure 4). Ki-67 did not show differences in the bands of AM at concentrations of 10 to 20  $\mu\text{g}$ , although there were differences in UAM for the same marker and concentrations. In the case of MCM4, both concentrations and ameloblastoma variants showed the same band patterns. MCM5 and MCM6 were homogeneous in every case, although in UAM at a 10  $\mu\text{g}$  concentration, there was a lower intensity of the band. These results reinforce the ones obtained in the immunohistochemistry technique and allowed for the detection of changes in the expression levels of MCM5 and MCM6 (Figure 3).





**Figure 2.** Immunohistochemical expression of Ki-67, MCM4, MCM5, and MCM6 in a solid ameloblastoma with a plexiform pattern. (A) Nuclear immunoreactivity of Ki-67 in central and basal tumor cells. (B) Nuclear and cytoplasmic immunoreactivity of MCM4 in central and basal tumor cells. (C) Nuclear immunoreactivity of MCM5 predominantly in basal tumor cells. (D) Nuclear and cytoplasmic immunoreactivity of MCM6 in central, basal, and stromal tumor cells (200x).

**Table 1.** Cell Counting to Determine LI in Ki-67, MCM4, MCM5, and MCM6 in UAM and AM<sup>a</sup>.

| AM  | Ki67 ± SD    | MCM4 ± SD    | MCM5 ± SD    | MCM6 ± SD     |
|-----|--------------|--------------|--------------|---------------|
| UAM | 4.04 ± 3.52  | 12.49 ± 9.81 | 16.16 ± 9.63 | 39.88 ± 22.04 |
| AM  | 3.04 ± 21.12 | 7.47 ± 6.78  | 10.20 ± 4.66 | 29.7 ± 17.16  |

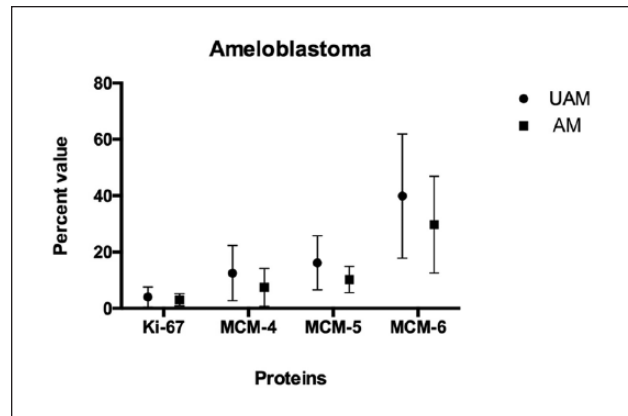
Abbreviations: LI, label index; UAM, unicystic ameloblastoma; AM, ameloblastoma; SD, standard deviation.

<sup>a</sup>Average percentage according to LI of Ki-67, MCM4, MCM5, and MCM6 in AM and UAM. Wilcoxon's test  $P < .05$  in every case.

**Discussion**

The immunohistochemical study of proteins associated with the cell cycle helps in the understanding of the biological behavior of certain neoplasms.<sup>5</sup> Growth and tumoral progression of ameloblastomas are related to diverse molecular processes, such as adhesion,<sup>23</sup> invasion,<sup>24</sup> growth factors,<sup>25</sup> apoptosis,<sup>26</sup> and cell proliferation,<sup>19</sup> among others.

Ki-67 is a biomarker highly used for determining the cell proliferation index in ameloblastomas<sup>2,5-11</sup> and is considered an important tool that supplies information about the behavior of the studied tumors and other odontogenic tumors.<sup>5</sup>



**Figure 3.** Average percentage of immunohistochemical expression of Ki-67 and MCM4, 5, and 6 in ameloblastomas. Mann-Whitney  $U$  test,  $P > .05$ , Ki-67, MCM4, 5, and 6 (UAM vs AM). Kruskal-Wallis test,  $P = .000$ , UAM and AM (MCM6 vs Ki-67, MCM4, and MCM5).

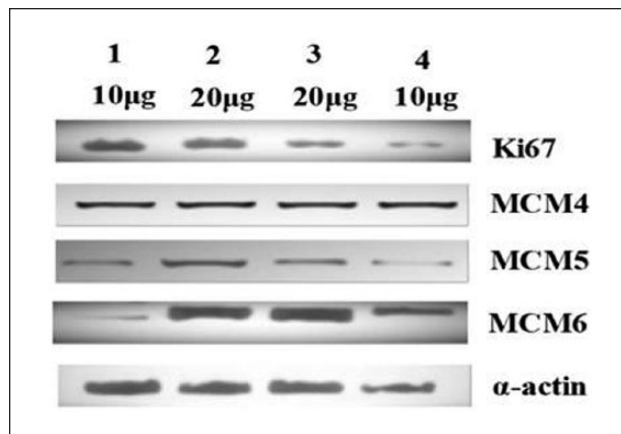
In several types of neoplasms, the expression of proteins MCM2-7 is related to an early event in tumor progression, showing its usefulness in studying tumor behavior.<sup>18-20,26-33</sup> The present study is the first to describe

**Table 2.** Spearman's Correlation According to Immunoeexpression in Both Ameloblastoma Variants. Spearman's  $\rho$  Correlation Coefficient, Comparing Ki-67 and MCM4, 5, and 6 in UAM and AM<sup>a</sup>.

| Tumor/Protein | U/Ki-67      | U/MCM4       | U/MCM5       | U/MCM6 | S/Ki-67      | S/MCM4       | S/MCM5       | S/MCM6       |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| U/Ki-67 vs    | N/A          | <b>0.745</b> | <b>0.588</b> | -0.03  | 0.091        | 0.116        | -0.261       | -0.018       |
| U/MCM4 vs     | <b>0.745</b> | N/A          | <b>0.709</b> | 0.321  | -0.164       | -0.43        | -0.371       | -0.201       |
| U/MCM5 vs     | 0.588        | <b>0.709</b> | N/A          | 0.273  | 0.055        | -0.213       | -0.614       | -0.322       |
| U/MCM6 vs     | -0.03        | 0.321        | 0.273        | N/A    | -0.067       | -0.541       | -0.274       | -0.59        |
| S/Ki-67 vs    | 0.091        | -0.164       | 0.055        | -0.067 | N/A          | 0.256        | <b>0.659</b> | 0.305        |
| S/MCM4 vs     | 0.116        | -0.43        | -0.213       | -0.541 | 0.256        | N/A          | 0.268        | <b>0.963</b> |
| S/MCM5 vs     | -0.261       | -0.371       | -0.164       | -0.274 | <b>0.659</b> | 0.268        | N/A          | <b>0.415</b> |
| S/MCM6 vs     | -0.018       | -0.201       | -0.322       | -0.590 | 0.305        | <b>0.963</b> | <b>0.415</b> | N/A          |

Abbreviations: UAM, unicystic ameloblastoma; AM, ameloblastoma; U, unicystic; S, solid.

<sup>a</sup>In bold is shown the  $\rho$  coefficient with a positive correlation ( $\rho > 0.50$ ). In italics is shown the statistical significance,  $P < .05$ .



**Figure 4.** Western blot detection of MCM4 (96.56 kD), MCM5 (82.29 kD), MCM6 (92.89 kD), and Ki-67 (359 kD) in samples of AM and UAM (AM 1, 2; UAM 3, 4). Positive control is  $\alpha$ -actin (42.05 kD).

the expression of MCM4, 5, and 6 in ameloblastomas, considering their utility as proliferation markers. In general terms, our results showed that positivity was greater for MCM4, 5, and 6 in comparison with Ki-67. This difference can be explained by 2 reasons: (1) the excess of MCM2-7 is a result of a greater amount of pre-RC complexes, which are used for the beginning of replication and are latent to activate in case problems arise in the replication fork<sup>34</sup> and (2) Ki-67 is expressed in late G1 phase,<sup>35</sup> whereas the MCM2-7 complex is expressed during the early G1 phase.<sup>14</sup>

Our results show that nuclear immunoeexpression of MCM6 presented a greater percentage in comparison with the rest of the proteins (Figure 3). Schrader et al,<sup>18</sup> in a study performed on lymphomas, indicated that a subgroup of tumoral cells stopped their progression through the cell cycle in early G1 phase and were positive for MCM6 and did not necessarily represent the real proliferative potential of the neoplasm. For this reason, MCM6 would not be a

trustworthy proliferation marker in some tumors. This could justify the major expression of MCM6 in our study.

The immunodetection of MCM4 was lower than MCM5 and MCM6 (Figure 3). Studies performed in esophageal carcinoma suggested that MCM4 could be a more sensible marker in comparison with Ki-67 and that high expression of MCM4 was related to an unfavorable prognosis.<sup>33</sup> In our study, MCM4 was the marker with a LI similar to Ki-67; however, different from the other markers in several cases, MCM4 showed cytoplasmic positivity, which is associated with degradation of the complex after DNA replication.<sup>13</sup> For this reason, cytoplasmic expression of MCM4 should not be considered a direct marker of proliferative activity.

The immunoeexpression of MCM5 in ameloblastomas showed a minor percentage in comparison with MCM6 (Figure 3) and correlated positively with Ki-67 (Table 2). Yu Sy et al<sup>20</sup> observed a high immunoeexpression of MCM5 in squamous cell carcinoma, associated with an aggressive progression and poor prognosis, whereas low immunoeexpression was observed in normal oral mucosa and mild epithelial dysplasia, suggesting that MCM5 plays a critical role in oral and esophageal carcinogenesis and possibly an increase in this protein in precancerous states of oral mucosa.<sup>20</sup> In our study, MCM5 showed a pattern of expression similar to Ki-67, namely, exclusively nuclear and predominantly in basal cells, whereas some authors have determined that the tumor is more proliferative,<sup>8</sup> even though MCM5 showed a greater LI compared with Ki-67, the expression was very similar.

When comparing the immunoeexpression of MCM4, 5, and 6 in both AM and UAM, there were no significant differences, although the LI was slightly higher in UAM, which could be justified by the morphology and architecture of the tumor due to the presence of fewer suprabasal cells in UAM (similar to the stellar reticulum) compared with AM; consequently, the major cells were counted from the basal layers, which are more likely to be positive.<sup>8</sup>

## Conclusion

The present study described for the first time the expression of MCM4, 5, and 6 and compared them with Ki-67 in ameloblastomas. The results suggest that MCM5 is a trustworthy proliferation marker that possesses an optimal sensibility to detect cells in the early G1 phase (Ki-67 is expressed in late G1 phase), and this could be suggested as one advantage to predict and better understand the biological behavior of ameloblastomas. Future studies with the inclusion of clinical characteristics of the tumors and a follow-up are necessary to fully evaluate the prognostic value of these markers.

## Acknowledgments

We thank Dr S. Soria for the collaboration in the Western blot technique.

## Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This research received a grant from I+D projects CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica), University of the Republic, Uruguay.

## Ethical Approval

The Ethics Committee of the School of Dentistry, Universidad de la República, Uruguay, approved the study, File 091900-000113-14.

## Informed Consent

Not applicable, because this article does not contain any studies with human or animal subjects.

## Trial Registration

Not applicable, because this article does not contain any clinical trials.

## ORCID iDs

Delmira Apellániz  <https://orcid.org/0000-0003-3490-043X>  
 Vanesa Pereira-Prado  <https://orcid.org/0000-0001-7747-6718>  
 Estefania Sicco  <https://orcid.org/0000-0003-1137-6866>  
 Gabriela Vigil-Bastitta  <https://orcid.org/0000-0002-0617-1279>  
 Rogelio González-González  <https://orcid.org/0000-0003-4457-704X>  
 Nelly Molina-Frechero  <https://orcid.org/0000-0002-0435-053X>  
 Marcela Hernandez  <https://orcid.org/0000-0001-8289-7314>  
 Celeste Sánchez-Romero  <https://orcid.org/0000-0001-5365-2692>  
 Ronell Bologna-Molina  <https://orcid.org/0000-0001-9755-4779>

## References

1. Sekerci AE, Nazlim S, Etoz M, Deniz K, Yasa Y. Odontogenic tumors: a collaborative study of 218 cases diagnosed over 12 years and comprehensive review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20:e34-e44.
2. Soluk Tekkesin M, Mutlu S, Olğac V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (keratocystic odontogenic tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg*. 2012;28:49-55.
3. Vered M, Muller S, Heikinheimo K. Bening epithelial odontogenic tumors. In: El Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, eds. *WHO Classification of Head and Neck Tumors*. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2017: 215-218.
4. Black CC, Addante RR, Mohila CA. Intraosseous ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110:585-592.
5. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18:e174-e179.
6. Otero D, Lourenco SQC, Ruiz-Ávila I, et al. Expression of proliferative markers in ameloblastomas and malignant odontogenic tumors. *Oral Dis*. 2013;19:360-365.
7. Ahlem B, Wided A, Amani L, Nadia Z, Amira A, Faten F. Study of Ki67 and CD10 expression as predictive factors of recurrence of ameloblastoma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2015;132:275-279.
8. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol*. 2008;44:805-811.
9. González-González R, Molina-Frechero N, Damian-Matsumura P, Salazar-Rodriguez S, Bologna-Molina R. Immunohistochemical expression of survivin and its relationship with cell apoptosis and proliferation in ameloblastomas. *Dis Markers*. 2015;2015:301781.
10. Sandra F, Mitsuyasu T, Nakamura N, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. *Oral Oncol*. 2001;37:193-198.
11. Meer S, Galpin JS, Altini M, Coleman H, Ali H. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95:213-221.
12. Simon NE, Schwacha A. The Mcm2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *Biomed Res Int*. 2014;2014:549719.
13. Nguyen VQ, Co C, Irie K, Li JJ. Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr Biol*. 2000;10:195-205.
14. Braun KA, Breeden LL. Nascent transcription of MCM2-7 is important for nuclear localization of the minichromosome maintenance complex in G1. *Mol Biol Cell*. 2007;18:1447-1456.
15. Arias EE, Walter JC. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev*. 2007;21:497-518.



16. Alver RC, Chadha GS, Blow JJ. The contribution of dormant origins to genome stability: from cell biology to human genetics. *DNA Repair (Amst)*. 2014;19:182-189.
17. Blow JJ, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:476-486.
18. Schrader C, Janssen D, Klapper W, et al. Minichromosome maintenance protein 6, a proliferation marker superior to Ki-67 and independent predictor of survival in patients with mantle cell lymphoma. *Br J Cancer*. 2005;93:939-945.
19. Carreón-Burciaga RG, González-González R, Molina-Frechero N, Bologna-Molina R. Immunoexpression of Ki-67, MCM2, and MCM3 in ameloblastoma and ameloblastic carcinoma and their correlations with clinical and histopathological patterns. *Dis Markers*. 2015;2015:683087.
20. Yu SY, Wang YP, Chang JY, Shen WR, Chen HM, Chiang CP. Increased expression of MCM5 is significantly associated with aggressive progression and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2014;43:344-349.
21. Huang XP, Rong TH, Wu QL, et al. MCM4 expression in esophageal cancer from Southern China and its clinical significance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131:677-682.
22. 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;59:801-803.
23. González-González R, Molina-Frechero N, Damian-Matsumura P, Bologna-Molina R. Molecular markers of cell adhesion in ameloblastomas. An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19:e8-e14.
24. Iakovou M, Chrysomali E, Piperi E, et al. A comparative study of bone remodeling molecules expression in different types of jaw ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2015;44:543-551.
25. Nakao Y, Mitsuyasu T, Kawano S, Nakamura N, Kanda S, Nakamura S. Fibroblast growth factors 7 and 10 are involved in ameloblastoma proliferation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol*. 2013;43:1377-1384.
26. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, et al. Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem*. 2003;270:1089-1101.
27. Das M, Prasad SB, Yadav SS, et al. Over expression of minichromosome maintenance genes is clinically correlated to cervical carcinogenesis. *PLoS One*. 2013;8:e69607.
28. Heidebrecht HJ, Buck F, Endl E, et al. Ki-Mcm6, a new monoclonal antibody specific to Mcm6: comparison of the distribution profile of Mcm6 and the Ki-67 antigen. *Lab Invest*. 2001;81:1163-1165.
29. Giaginis C, Giagini A, Tsourouflis G, et al. MCM-2 and MCM-5 expression in gastric adenocarcinoma: clinical significance and comparison with Ki-67 proliferative marker. *Dig Dis Sci*. 2011;56:777-785.
30. Korkolopoulou P, Givalos N, Saetta A, et al. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 expression in muscle-invasive urothelial cancer: a multivariate survival study including proliferation markers and cell cycle regulators. *Hum Pathol*. 2005;36:899-907.
31. Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, et al. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. *Br J Cancer*. 2007;97:1124-1134.
32. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Ki67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3 MCM4, and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer*. 2010;10:1-15.
33. Choy B, LaLonde A, Que J, Wu T, Zhou Z. MCM4 and MCM7, potential novel proliferation markers, significantly correlated with Ki-67, BMi1, and cyclin E expression in esophageal adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and precancerous lesions. *Hum Pathol*. 2016;57:126-135.
34. Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci*. 2001;114(pt 11):2027-2041.
35. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311-322.