



**INMUNOEXPRESIÓN DE EP-CAM (MOC-31) EN  
AMELOBLASTOMAS Y CARCINOMAS AMELOBLÁSTICOS.**

**DRA. NATHALIE DERDERIAN**

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

OPCIÓN BIOLOGÍA ORAL

ESCUELA DE GRADUADOS – FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY

AÑO 2021

*A Dios, por ser mi Padre amoroso y amigo incondicional, por dar su vida por mí y dar verdadero sentido a mi vida. El que me protege, nunca me abandona y renueva mis fuerzas cada día...*

*A mi esposo David, por ser la persona que más amo por la eternidad, mi gran amor, amigo, compañero, padre de mis hijos, la mejor persona que Dios puso para siempre en mi camino...*

*A mis hijos, mis mellis Jeremías y Emanuel, por ser los amores de toda mi vida, mis bendiciones más hermosas, las luces de mis ojos, mi principal motor por quienes vivir cada día...*

*A mis padres, Carlos y Ester, porque los amo con el alma entera, por ser los mejores padres, mi ejemplo a seguir en la vida, por haberme dado todo su amor y más, por mostrarme el camino por el que debo andar...*

*A mis hermanos, Adriné y Misak, porque no imagino mi vida sin ellos, porque nos une algo que es enorme y para siempre y porque los amo con todo mi ser... A mi hermanita Sol, por ser mi pequeña y dulce nueva hermanita...*

*A mis abuelos, Agassi, Yeran, Misak y Rosa, porque no tengo palabras que describan todo lo que significan para mí, por haberme dado su vida sin reservas, por ser los pilares más importantes de mi familia, ejemplos de amor, dulzura, valentía, lucha y entrega, por haberme regalado la infancia más feliz...*

*A mis tíos, Dikran y Krikor, por haber sido siempre mis segundos padres, por haber estado siempre para mis hermanos y para mí, sin dudar, sin vacilaciones, mis amados tíos...*

*A mis suegros y padres del corazón, Carlos y Zulma, por haberme adoptado como su hija, por todo el amor que me brindan desde el día que los conocí, porque estoy eternamente agradecida a Dios por los padres y la familia que me regaló...*

*A toda mi familia, porque a todos los amo...*

*A mis amigas, Mariela, Sonia, Claudia, Stella, Ana y Paola, por su hermosa amistad, por el amor de hermanas que nos une y sus incansables oraciones a mi favor... A mi iglesia y mis hermanos en la fe, todos ellos...*

*A mis amigas queridas, por haberme alentado a continuar hacia adelante...*

# **INMUNOEXPRESIÓN DE EP-CAM (MOC-31) EN AMELOBLASTOMAS Y CARCINOMAS AMELOBLÁSTICOS.**

Tesis de maestría en el marco de Maestría Académica en Ciencias  
Odontológicas- opción Biología Oral, Facultad de Odontología, Universidad de la  
República.

Requisito para la obtención del título de  
Magister en Ciencias Odontológicas – Opción Biología Oral.

Autora: Dra. Nathalie Derderian Santurian

Tutor: Dr. Ronell Bologna Molina

Co- tutora: Dra. Laura Cosetti

El trabajo fue realizado en el Área de Patología Molecular Estomatológica, en la  
Facultad de Odontología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Se realizó con fondos de Grupo CSIC I+D 881880 “Patología y Morfología Molecular”.

Contacto: Dra. Nathalie Derderian Santurian

Celular: 099 379 183

Correo electrónico: natushka\_ian@hotmail.com

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que han contribuido de alguna u otra forma en la realización de este trabajo.

Gracias a la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República, por la oportunidad de formación permanente.

Gracias al Grupo CSIC 881880 “Patología y Morfología Molecular”, por su gran aporte brindando todas las muestras tumorales para la realización de la técnica de inmunohistoquímica. **Este trabajo se realizó con fondos de Grupo CSIC I+D 881880 “Patología y Morfología Molecular”.**

Gracias a la cátedra de Histología de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República, por brindarnos las muestras de gérmenes dentarios para el estudio.

Gracias al equipo de trabajo del laboratorio de Patología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República, en especial a mis colegas Vanesa Pereira y Gabriela Vigil, por su apoyo durante la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

Gracias al equipo de estadística de Facultad de Odontología de la Universidad de la República, en especial al Lic. Fernando Massa, por su colaboración en el análisis estadístico.

Gracias a la cátedra de Patología y Semiología, y Clínica de Estomatología de la Universidad de la República, de la cual formo parte, por permitirme formarme en el área.

Gracias a mi querida profesora, Dra. Susana Vázquez, por los años compartidos, sus valiosas enseñanzas y consejos, en lo profesional y personal, que siempre tendré muy presentes.

Gracias a mi querida y actual profesora, Dra. Laura Cosetti, por confiar en mi y brindarme su apoyo constante durante mi desempeño en la cátedra y en la realización de este trabajo.

Miles de gracias a mi tutor, Dr. Ronell Bologna, por esta oportunidad de trabajo, por enseñarme con excelencia y abrirme camino a la formación en el área de la investigación.

Gracias a mi familia, en especial a mi esposo, padres y hermanos, porque sin su constante colaboración, este trabajo no hubiese sido posible.

## Resumen

Los tumores odontogénicos constituyen un grupo heterogéneo de lesiones de poco frecuentes, exclusivas de los huesos maxilares y mucosa bucal que los recubre, que surgen de los tejidos formadores de las piezas dentarias o sus remanentes. El ameloblastoma es una de las neoplasias odontogénicas más prevalentes, de características benigna agresiva, que se origina del epitelio odontogénico dentro de un estroma fibroso maduro desprovisto de ectomesénquima odontogénico. El carcinoma ameloblástico es la neoplasia odontogénica maligna más común, contraparte maligna del ameloblastoma.

Este trabajo busca determinar la inmunoexpresión de Ep-CAM (MOC-31) en ameloblastoma y carcinoma ameloblástico, y compararla con su expresión en germen dentario, con el objetivo de generar información que contribuya a comprender el rol de esta proteína en la biología tumoral de estas neoplasias.

La inmunoexpresión de MOC-31 fue evaluada en 60 muestras tumorales de ameloblastoma y nueve de carcinoma ameloblástico, y en 16 gérmenes dentarios. En ameloblastoma la expresión de MOC-31 resultó negativa en una amplia mayoría de los casos (83.3%). El carcinoma ameloblástico comparte similares resultados que la variante benigna (55.6% de negatividad). En contraste a estos hallazgos, los gérmenes dentarios mostraron moderada a intensa positividad al marcador en un elevado porcentaje de las muestras (81.3%). En ambos tumores la expresión de la proteína se observó de manera difusa a nivel de la membrana y el citoplasma epitelial tumoral, en tanto que en gérmenes dentarios se mostró de igual forma en el epitelio interno del órgano del esmalte y el retículo estrellado adyacente.

De acuerdo a los resultados, podemos concluir que la elevada expresión de Ep-CAM en germen dentario, sugiere un papel importante de esta proteína durante la odontogénesis. Su regulación a la baja en ameloblastoma podría estar relacionada con la pérdida de adhesión celular y organización epitelial que marcan el inicio de la transformación neoplásica, y podría conferir agresividad local a esta entidad. En cuanto a la relativa mayor expresión de Ep-CAM en el carcinoma ameloblástico respecto a su variante benigna, surge la interrogante acerca de un posible rol de esta molécula en la transformación maligna del epitelio, lo que podría ser objeto de estudio para próximas investigaciones basadas en una mayor casuística.

**PALABRAS CLAVE:** ameloblastoma, carcinoma ameloblástico, germen dental, Ep-CAM, inmunohistoquímica.

## Abstract

Odontogenic tumors constitute a heterogeneous group of infrequent lesions, exclusive to the maxillary bones and the buccal mucosa that covers them, which arise from the tissues that form the teeth or their remnants. Ameloblastoma is one of the most prevalent odontogenic neoplasms, with aggressive benign characteristics, originating from the odontogenic epithelium within a mature fibrous stroma devoid of odontogenic ectomesenchyme. Ameloblastic carcinoma is the most common malignant odontogenic neoplasm, a malignant counterpart of ameloblastoma.

The present study aims to determine the immunoexpression of Ep-CAM (MOC-31) in ameloblastoma and ameloblastic carcinoma, and compare it with its expression in dental germ, with the aim of generating information that contributes to understanding the role of this protein in the tumor biology of these neoplasms.

The immunoexpression of MOC-31 was evaluated in 60 tumor samples of ameloblastoma and nine of ameloblastic carcinoma, and in 16 dental germs. In ameloblastoma, MOC-31 expression was negative in a vast majority of cases (83.3%). Ameloblastic carcinoma shares similar results as the benign variant (55.6% negativity). In contrast to these findings, the dental germs showed moderate to intense positivity to the marker in a high percentage of the samples (81.3%). In both tumors the expression of the protein was observed diffusely at the level of the tumor membrane and epithelial cytoplasm, while in dental germs it was shown in the same way in the internal epithelium of the enamel organ and the adjacent stellate reticulum.

According to the results, we can conclude that the high expression of Ep-CAM in dental germ suggests an important role for this protein during odontogenesis. Its down-regulation in ameloblastoma could be related to the loss of cell adhesion and epithelial organization that mark the beginning of neoplastic transformation, and could confer local aggressiveness to this entity. Regarding the relative greater expression of Ep-CAM in ameloblastic carcinoma with respect to its benign variant, the question arises about a possible role of this molecule in the malignant transformation of the epithelium, which could be the object of study for future research based in a larger casuistry.

**KEY WORDS:** ameloblastoma, ameloblastic carcinoma, dental germ, Ep-CAM, immunohistochemistry.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1) INTRODUCCIÓN.....</b>	
<b>2) MARCO TEÓRICO.....</b>	
2.1. Odontogénesis y gérmenes dentarios.	
2.2. Tumores odontogénicos.	
2.3. Ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos.	
2.3.1. Cambios en la clasificación.	
2.3.2. Características clínicas, imagenológicas e histopatológicas.	
2.3.3. Avances en histopatogénesis.	
2.3.4. Tratamiento.	
2.4. Los biomarcadores moleculares como bioreporteros de los tumores odontogénicos.	
2.4.1. Ep-CAM (MOC-31).	
<b>3) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	
<b>4) JUSTIFICACIÓN.....</b>	
<b>5) OBJETIVOS.....</b>	
5.1. Objetivo general.	
5.2. Objetivos específicos.	
<b>6) METODOLOGÍA.....</b>	
6.1. Diseño de estudio.	
6.2. Fases del estudio.	
6.3. Características de las muestras.	
6.4. Criterios de inclusión y exclusión.	
6.5. Definición y operacionalización de variables.	

6.6. Procedimientos.

6.6.1. Obtención de las muestras. Cortes.

6.6.2. Técnica de inmunohistoquímica.

6.6.3. Conteo celular.

6.6.4. Equipos y materiales.

6.6.5. Análisis estadístico.

6.7. Consideraciones éticas.

7) **RESULTADOS**.....

8) **DISCUSIÓN**.....

9) **CONCLUSIONES**.....

10) **REFERENCIAS**.....

11) **CRONOGRAMA**.....

12) **ANEXOS**.....

## **LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS**

AMEL Ameloblastoma

BRAF Gen humano que codifica una proteína llamada B-Raf.

CA Carcinoma ameloblástico

CAM Molécula de adhesión celular

Ep-CAM Molécula de adhesión de células epiteliales

EpEX Dominio extracelular de Ep-CAM

EpICD Dominio intracelular de Ep-CAM

GD Germen dentario

IHC Inmunohistoquímica

MAPK Proteína quinasa activada por mitógenos

MEK- ERK Cascada de señalización: proteína quinasa activada por mitógenos/ quinasa regulada por señales extracelulares

MMP Metaloproteinasas de la matriz extracelular

MOC-31 Anticuerpo primario monoclonal anti Ep-CAM

OPG Osteoprotegerina

RANK Receptor activador del factor nuclear

RANKL Ligando de receptor activador para el factor nuclear k B

SHH Sonic hedgehog, proteína de la familia Hedgehog

SMO Smoothened gen, regulador de la vía de señalización Hedgehog (HH)

TOD Tumor odontogénico

## LISTA DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICOS

Cuadro 1. Cuadro comparativo de las clasificaciones de ameloblastoma y carcinoma ameloblástico de 2005 y 2017.

Cuadro 2. Funciones de Ep-CAM.

Cuadro 3. Operacionalización de las variables dependientes e independientes.

Cuadro 4. Positividad a MOC-31 en variantes tumorales y gérmenes dentarios.

Cuadro 5. Distribución de la expresión de MOC-31 según grupo de estudio.

Cuadro 6. Inmunoexpresión de MOC-31 en relación a variables género, edad, variante clínica y tipo histológico en grupo AMEL.

Cuadro 7. Inmunoexpresión de MOC-31 en relación a variables género y edad en grupo CA.

Cuadro 8. Inmunoexpresión de MOC-31 en relación a la etapa gestacional en grupo GD.

Cuadro 9. Cronograma de actividades realizadas.

Figura 1. Ameloblastoma convencional. (a) Deformación vestibular en el cuerpo y rama izquierda de la mandíbula. (b) OPT que muestra imagen multilocular en el cuerpo y rama izquierda de la mandíbula.

Figura 2. Ameloblastoma uniuquístico. (a) Ameloblastoma del cuerpo izquierdo de la mandíbula que causa deformidad facial. (b) Deformación vestibular izquierda a nivel de cuerpo y rama mandibular, exteriorización y solución de continuidad en mucosa de reborde alveolar. (c) OPT que muestra imagen unilocular asociada a corona de molar retenido desplazado, en cuerpo y rama mandibular izquierda. (d) Imagen oclusal que muestra expansión de tablas vestibular y lingual mandibular izquierda.

Figura 3. Carcinoma ameloblástico. (a) Tumoración que se exterioriza en sector anteroinferior de reborde mandibular, bordes indefinidos, sangrante, infiltrante hacia vestibular y lingual, que provoca desplazamiento dentario. (b) Imagen vestibular de la misma lesión.

Figura 4. Esquema de la escala de tinción citoplasmática- membrana, en base al conteo descrito por HercepTest® (DAKO, Carpinteria, CA, USA) para cáncer de mama.

Figura 5. Inmunoexpresión de MOC-31 en ameloblastoma. A- Intensa positividad en islotes epiteliales. B- Positividad moderada a nivel epitelial. 20x.

Figura 6. Inmunoexpresión de MOC-31 en carcinoma ameloblástico. A, B- Positividad intensa para MOC-31 en membrana y citoplasma de células epiteliales tumorales. 20x.

Figura 7. Inmunoexpresión de MOC-31 en germen dentario en etapa de casquete. A- En el asa cervical se observa una disminución de la inmunoexpresión. B- Intensa inmunoexpresión en epitelio y papila dental. C- Asa cervical con menor inmunoexpresión marcando etapa de desarrollo. 20x.

Figura 8. Gérmenes dentarios. Positividad intensa para MOC-31 en epitelio interno del órgano del esmalte y retículo estrellado. A- 10x. B- 40x.

Gráfico 1. Frecuencias relativas de la expresión de MOC-31 en variantes tumorales y gérmenes dentarios.

## 1) INTRODUCCIÓN

Los tumores odontogénicos (TODs) son lesiones exclusivas de la cavidad oral, cuya denominación hace referencia a su origen en el aparato odontogénico, es decir, formador de dientes (1) (2).

En la actualidad existe controversia acerca de la patogenia y categorización de los TODs, debido al variado comportamiento biológico de estas entidades (1) (2).

El ameloblastoma (AMEL), corresponde a una de las neoplasias odontogénicas más frecuentes, cuyo comportamiento localmente agresivo y su posible potencial de transformación maligna, lo convierten en motivo constante de investigación (3). El carcinoma ameloblástico (CA), contraparte maligna del AMEL, a pesar de constituir una neoplasia de rara aparición, desafortunadamente presenta un comportamiento invasivo, con alta tasa de recurrencia posterior a la cirugía, lo que causa destrucción ósea extensa, representando un desafío su diagnóstico y tratamiento (4).

La molécula de adhesión de células epiteliales (Ep-CAM), es una glicoproteína presente en la superficie de las células epiteliales, que se ha descrito para mediar en la adhesión célula-célula por interacción homofílica (5) (6). Estudios previos han revelado que la misma contribuye a varios procesos biológicos, incluida la adhesión, señalización, migración, proliferación y diferenciación celular, y la formación y mantenimiento de la morfología de órganos (7) (8). También se describe implicada en diversos mecanismos patológicos asociados a formación tumoral, lo que justifica su estudio en estas neoplasias (9).

Por su parte, MOC-31, es un anticuerpo primario monoclonal de ratón que se utiliza para reconocer a la mencionada proteína mediante estudios de inmunohistoquímica (10), razón por la cual su empleo resulta de utilidad en esta investigación.

El presente estudio pretende analizar la inmunoexpresión de Ep-CAM (MOC-31) en AMEL y CA, y compararlos con su expresión en gérmenes dentarios (GD), los que representan la contraparte normal de las neoplasias.

## 2) MARCO TEÓRICO

### 2.1. *Odontogénesis y gérmenes dentarios*

La odontogénesis se define como el proceso embrionario que da origen a la formación de los GDs. En este proceso intervienen fundamentalmente los tejidos embrionarios del mesodermo y ectodermo. Comienza en la sexta semana en el embrión humano (cuando se forma la lámina

dentaria). Como consecuencia de una actividad proliferativa continuada y localizada del ectodermo en el ectomesénquima subyacente, tendrá lugar la formación dentaria (11).

Durante el desarrollo dentario, los GDs transcurren por diferentes estadios morfológicos, denominados brote o yema, casquete, campana y folículo dentario (12).

Desde el punto de vista estructural, los GDs presentan tres sectores, dos de ellos de origen ectomesenquimático (la papila y el folículo o saco dental), y uno epitelial (el órgano del esmalte) (11).

## 2.2. *Tumores odontogénicos (TODs)*

Los TODs constituyen un grupo heterogéneo de lesiones de poco frecuentes, exclusivas de los huesos maxilares y mucosa bucal que los recubre, que surgen de los tejidos formadores de las piezas dentarias o sus remanentes. Pueden derivar de los elementos epiteliales, mesenquimales y/o ectomesenquimales involucrados en el proceso de odontogénesis (13) (2).

Poseen diversas características clínicas e histopatológicas, su comportamiento biológico es heterogéneo, incluyendo entidades que varían desde lesiones posiblemente hamartomatosas (o tumores con bajo potencial de crecimiento), neoplasias benignas no agresivas y agresivas, y neoplasias malignas con capacidad metastásica (13) (2).

Pueden hallarse dentro de los huesos maxilares (tipos centrales) o asociados a la mucosa oral (tipos periféricos) (13) (2).

Los TODs representan menos del 1% de todos los tumores de cabeza y cuello (2). La incidencia y prevalencia de estas neoplasias difiere según área geográfica estudiada. Representan entre 2% y 5% de todas las lesiones maxilofaciales, según hallazgos de investigaciones realizadas en América del Sur, América del Norte y Europa (14) (15) (16) . Sin embargo, estudios realizados en África y Asia mostraron una mayor frecuencia de estas lesiones, afectando hasta al 8.9% de todos los tumores diagnosticados (17) (18) (19).

A pesar de su escasa frecuencia, son lesiones que adquieren particular relevancia para el paciente; en especial las de comportamiento localmente agresivo, produciendo gran destrucción ósea y complicaciones asociadas; dado que requieren tratamientos mutilantes y pueden comprometer la vida (13) (2). Algunas entidades presentan alta propensión a la recurrencia local (13) (2), otras pueden desarrollar metástasis a pesar de expresar un aspecto microscópicamente benigno (20), mientras que

otras comprenden neoplasias malignas que muestran una agresividad variable y un potencial de metástasis (1).

El profesional odontólogo, cirujano maxilofacial y patólogo, debe conocer tales patologías y su comportamiento variable, para poder establecer un diagnóstico y tratamiento adecuado.

### 2.3. *Ameloblastoma (AMEL) y carcinoma ameloblástico (CA)*

El AMEL fue reconocido por primera vez por Cusack en 1827 (21). Fue designado como adamantinoma en 1885 por Malassez (22), y posteriormente denominado ameloblastoma en 1930 por Ivey y Churchil (23). El término ameloblastoma fue acuñado a partir de los vocablos “amel” y “blastos”, el primero proviene del inglés, esmalte, y el segundo del griego, germen. Etimológicamente hace referencia a la histogénesis dental, pues se forma a partir del epitelio que origina los dientes, como los restos de Serres y de Malassez, el epitelio reducido del órgano del esmalte o inclusive de la pared epitelial de quistes odontogénicos, como el quiste dentífero (24).

El AMEL es una neoplasia odontogénica benigna agresiva que se origina del epitelio odontogénico dentro de un estroma fibroso maduro desprovisto de ectomesénquima odontogénico (13) (2).

Es uno de los tumores odontogénicos más prevalentes, representa el 9-14% de todos los tumores odontogénicos y constituye aproximadamente el 1% de todas las neoplasias orales (24). Su incidencia global, incluyendo estudios desde 1995 hasta 2018 y comparados con la revisión previa de Reichart et al. (1995), es estimada en 0,92 casos por millón de habitantes por año (25).

Es la neoplasia odontogénica epitelial más frecuente en los países en desarrollo (26) (27), su prevalencia es muy elevada en África y China (18) (28). En el hemisferio occidental, es el segundo en frecuencia, luego del odontoma. La población afroamericana tiene cinco veces más probabilidades de desarrollar este tumor en comparación con la población caucásica (29). Recientes investigaciones realizadas en América del Sur, señalan al AMEL como el tumor odontogénico más frecuente en este continente, seguido del odontoma (30), en tanto que otras lo ubican en segundo lugar luego del queratoquiste odontogénico (31).

El pico de mayor incidencia de diagnóstico se encuentra entre la cuarta y quinta década de vida (29). La mayoría de los pacientes con esta entidad se encuentran entre las edades de 30 y 60 años, pero el promedio de edad de diagnóstico varía de un continente a otro (32) (33). Estudios recientes detallan la edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico en 34,3 años. Por otra parte, señalan la incidencia máxima en África y América del Sur en la tercera década, mientras que en Europa y América

del Norte en la quinta y sexta décadas (25). Sólo el 10-15% de los casos de AMEL se producen en la población pediátrica, pero este porcentaje puede ser tan alto como el 25% en África y Asia (34).

La distribución global por sexo destaca mayor frecuencia en sexo masculino, según estudios recientes, consistentes con la revisión de Reichart et al. (1995) (25).

El término carcinoma ameloblástico fue introducido por Shafer et al. (1974) para describir un tumor que surge de la transformación maligna de las células epiteliales de un AMEL (35).

El CA es una neoplasia odontogénica maligna de origen epitelial. Contraparte maligna del AMEL (2).

A pesar de la rareza del CA en comparación con el AMEL, es la neoplasia odontogénica maligna más común (36) (37). Su frecuencia relativa es inferior al 1% de todas las neoplasias malignas en la región de la cabeza y el cuello (38).

Hallazgos de la literatura demuestran que ocurre en un rango de edad promedio de 30-50 años (29), con una edad media de 36.8 años ( $\pm 15.5$ ) (39). Algunos autores sugieren una variación en la edad media de los pacientes diagnosticados con CA, observando una mayor edad media para lesiones maxilares, en comparación con las mandibulares (40).

Respecto a su distribución por sexo, el consenso general de la mayoría de los estudios relata mayor frecuencia de ocurrencia en varones (41) (36). Esta mayor predilección masculina sigue el patrón de distribución de su contraparte benigna (29).

### *2.3.1. Cambios en la clasificación 2005- 2017*

El principio de desarrollar un estándar internacional para la clasificación de los TODs fue acordado por la OMS en 1952, pero las primeras ediciones de la serie de Clasificación Histológica Internacional no se publicaron hasta después de 1967. El número cinco de las series, publicado en 1971, fue el primer intento de una clasificación estándar internacionalmente aceptada de tumores odontogénicos. Esta 1ra edición de 1972 se tituló “Tipos histológicos de tumores odontogénicos, quistes de los maxilares y lesiones afines”, y fue deliberadamente inclusiva, para asegurar que todas las neoplasias y quistes del aparato odontogénico se clasificaran en este contexto, de modo que los patólogos apreciaran y comprendieran las características comunes de estas lesiones, para poder alcanzar un diagnóstico. También incluía una cantidad de lesiones óseas que tienen características distintivas cuando surgen en los huesos maxilares, y que deben distinguirse de las neoplasias odontogénicas (42).

La 2ª edición fue publicada en 1992 y mantuvo esta amplia inclusión de lesiones (43).

La 3ª edición fue publicada en 2005, excluyó a los quistes odontogénicos, pero incluyó a las lesiones relacionadas con los huesos maxilares. Aunque los autores parecían reconocer que las lesiones óseas son importantes en el diagnóstico diferencial de las lesiones de los huesos maxilares, consideraron que no era necesaria la diferencia entre los quistes odontogénicos. También ignoraron el hecho de que todavía existía un descuido sobre la verdadera naturaleza de un número de lesiones, que se encuentran en la interface quiste- tumor. No incluir estas lesiones en la clasificación causó incertidumbre con respecto a la terminología (13).

La última y 4ta edición publicada en 2017, ha incluido nuevamente los quistes odontogénicos, siguiendo el criterio de las primeras ediciones. El enfoque aproximado de los editores y del grupo de consenso internacional, fue simplificar la clasificación y aclarar la terminología para que los nombres de las lesiones reflejaran adecuadamente su naturaleza y comportamiento biológico (2).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2005, el AMEL fue clasificado en entidades benignas y malignas basados en su comportamiento biológico (13).

Este tumor ha sufrido modificaciones en la terminología y la clasificación con la introducción de estudios genéticos actuales. El debate de AMEL benigno vs maligno fue discutido. Reconociendo su agresividad local y su propensión a recurrir, se mantuvo dentro de los tumores benignos, a pesar de la variante increíblemente rara conocida como AMEL metastásico (44).

En la OMS de 2005, los AMELs se clasificaron como sólidos / multiquísticos, extraóseos / periféricos, desmoplásicos y unikuísticos (13). Esta subclasificación se consideró demasiado compleja y carente de significado biológico. La nueva clasificación del 2017 ha dejado de utilizar la terminología sólido / multiquístico, ya que este patrón es bien conocido como típico del AMEL convencional, y el uso de “quístico” puede causar confusión con el tipo unikuístico. El AMEL desmoplásico también ha sido eliminado como un tipo específico y se describe como una variante histológica del AMEL convencional. Del mismo modo otras variantes, incluidas las foliculares, plexiformes y acantomatosas, son histológicamente distintivas y pueden describirse; pero como entidad diagnóstica, no hay ninguna evidencia de diferencia en el comportamiento. El AMEL periférico se comporta de manera diferente y se conserva como un subtipo específico. De manera similar, hay buena evidencia de que el AMEL unikuístico tiene características morfológicas distintas, y se conserva como un subtipo (45). El AMEL unikuístico se describe con tres variantes histológicas (2). Dos tipos no son controvertidos: el tipo luminal es un quiste simple revestido por un epitelio ameloblástico, y el tipo intraluminal es similar, pero con proliferaciones intra lumbales del epitelio ameloblástico. Se considera que estos dos tipos

tienen un buen pronóstico y rara vez recurren luego de la enucleación simple. Más controversialmente, el grupo de consenso retuvo el AMEL uniuquístico mural como uno de los tres subtipos. Este tipo muestra proliferación de epitelio ameloblástico en la pared del quiste, con crecimiento centrífugo y en ocasiones desprendimiento celular, lo que evidencia un comportamiento similar al AMEL convencional, con tasas de recurrencia similares (46). Las recomendaciones sugieren que la invasión mural debe ser vista como AMEL convencional debido a su tasa relativamente más alta de recurrencia respecto al tipo luminal (2). Sin embargo, a pesar de algunas pruebas de un comportamiento más agresivo, el grupo consideró que se necesitaban más investigaciones para definir claramente el comportamiento de esta lesión, antes de que se justificara una reclasificación (45).

Respecto a las lesiones malignas, el AMEL metastatizante (maligno) y el CA son dos variantes malignas distintas del AMEL. Mientras que CA surge de novo, de ex AMEL o de quiste odontogénico (47); el AMEL metastatizante es indistinguible del AMEL convencional, pero con capacidad de metastatizar a distancia (48).

El CA como neoplasia maligna odontogénica, combina las características histológicas del AMEL con atipia citológica, incluso en ausencia de metástasis (49) (50). Hallazgos en la literatura, señalan una mayor incidencia de CA en comparación con la de AMEL metastatizante en una proporción de 2:1 (18). La clasificación de 2005, divide a esta neoplasia en los subtipos primario y secundario. El subtipo primario, también conocido como de novo, presenta características de malignidad al inicio; mientras que el subtipo secundario demuestra una transformación maligna en un AMEL previamente existente, independiente de la presencia o ausencia de metástasis (51). Existe una división adicional del tipo secundario en dos subtipos, a saber, el tipo intraóseo que surge dentro de un AMEL intraóseo benigno preexistente, y el tipo periférico, que surge dentro de uno periférico benigno (13).

En la actual clasificación, se consideró que esta subdivisión era innecesariamente compleja e injustificada para dividir un tumor de tan rara aparición. Actualmente continúa simplemente como una entidad única; CA, aunque se reconocen las características histológicas variadas (44).

El AMEL metastatizante (maligno) se conoce como un tumor que conserva las características histológicas benignas del AMEL, independientemente del sitio de la metástasis (13) (41). Finalmente, en esta nueva edición, se ha eliminado de la sección de CA y se ha incluido como un tipo de AMEL benigno convencional. Se define como un AMEL histológicamente benigno que metastatiza en sitios distantes. Tanto la lesión primaria como la metástasis deben tener características histológicas del AMEL benigno (44) (52).

**Cuadro 1. Cuadro comparativo de las clasificaciones de ameloblastoma y carcinoma ameloblástico de 2005 y 2017 (44)**

2005	2017
<i>Entidades benignas</i>	
Ameloblastoma sólido / multiquístico	Ameloblastoma convencional (variantes histológicas)
Ameloblastoma unikuístico	Ameloblastoma unikuístico (variantes histológicas)
Ameloblastoma desmoplásico	Variante histológica de Ameloblastoma convencional
Ameloblastoma extraóseo / periférico	Ameloblastoma extraóseo / periférico
	Ameloblastoma metastatizante
<i>Entidades malignas</i>	
Carcinoma ameloblástico: tumores intraóseos primarios y secundarios y tumores periféricos secundarios	Carcinoma ameloblástico
Ameloblastoma metastatizante	

### 2.3.2. Características clínicas, imagenológicas e histopatológicas

#### *Ameloblastoma convencional*

El AMEL convencional es un tumor odontogénico epitelial benigno intraóseo, de crecimiento progresivo, localmente agresivo, caracterizado por causar deformación ósea y presentar tendencia a la recurrencia local ante una exéresis incompleta (2).

Representa aproximadamente el 91% de todas las variantes de AMEL (53).

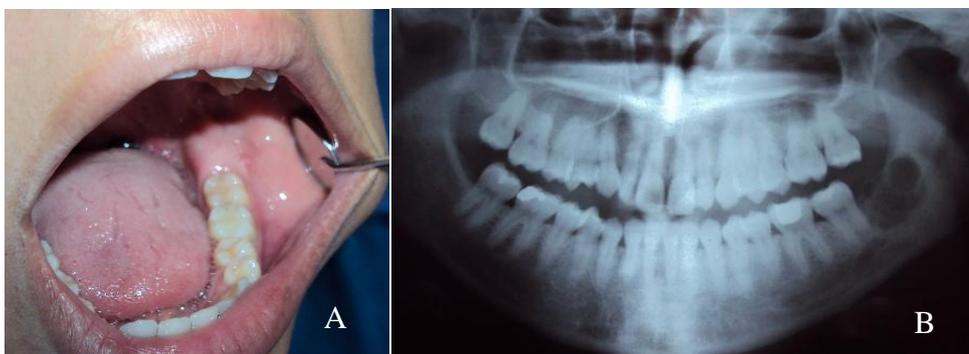
Entre el 80 y 85% ocurren en el sector posterior mandibular, en el área molar y de la rama ascendente, en tanto que los restantes 15 a 20% se presentan en el maxilar, usualmente en la región posterior (53). En su fase inicial, exhibe una expansión lenta, y posteriormente su crecimiento se acelera, en ocasiones adquiriendo grandes proporciones (54). El incremento en su tamaño suele acompañarse de complicaciones que incluyen movilidad y/o pérdida dentaria, maloclusión, dolor, parestesia, reabsorción de tablas óseas e invasión de tejidos blandos, deformación facial, limitación en la apertura bucal, dificultad en la masticación y obstrucción de la vía aérea (55) (56) (Figura 1.a).

Debido a sus características de crecimiento localmente agresivo e infiltrante, el AMEL puede convertirse rápidamente en un tumor masivo y expansivo que causa movilidad y desplazamiento de piezas dentarias, y una apariencia facial con gran asimetría si el paciente no recibe tratamiento (53). Aunque clasificado como benigno, el AMEL convencional, es el tumor odontogénico de origen epitelial más común con graves implicaciones clínicas (57). Debido al retraso en el acceso a la atención médica en algunos países en desarrollo de África y Asia, los pacientes a menudo presentan lesiones de gran tamaño, que pueden llevar a la muerte (53) (55) (56).

Radiográficamente, se presenta como una radiolucencia uni o multilocular, con apariencia similar a burbujas de jabón o panal de abejas. La apariencia unilocular es menos común. A menudo se observa expansión de corticales vestibular y lingual. Puede observarse también reabsorción radicular de las piezas involucradas y asociación con piezas no erupcionadas. En la variante de AMEL desmoplásico, puede observarse una apariencia radiográfica que combina radiolucencias con radiopacidades, que simulan lesiones fibroósas (55) (56) (Figura 1.b).

Los AMELs convencionales presentan diferentes tipos histopatológicos, incluidos foliculares, plexiformes, acantomatosos, de células granulares, basaloide y desmoplásico. El patrón folicular es el más común, caracterizado por islas neoplásicas, formadas por áreas centrales de células dispersas que se asemejan al retículo estrellado del germen dental en desarrollo, recubiertas de células periféricas columnares (empalizadas) que muestran polaridad nuclear inversa. El patrón plexiforme se caracteriza por láminas delgadas como hebras, dispuestas en dos patrones celulares distintos: uno de células basaloideas a menudo organizadas en doble fila, sin empalizada o polaridad nuclear inversa; y otro de hebras más gruesas, formados por células centrales más escamosas, pero sin empalizada periférica o polaridad nuclear inversa. El patrón acantomatoso presenta una disposición celular similar al folicular, pero con una diferenciación escamosa en el centro; el diagnóstico diferencial siempre incluye el carcinoma de células escamosas o el tumor odontogénico escamoso. Los tipos de células granulares y basaloideas muestran cambio de células granulares o morfología basaloide, respectivamente. Con la variedad de células granulares, algunas o todas las células pueden mostrar cambios, lo que a menudo dificulta el diagnóstico. El apiñamiento nuclear y la hiper celularidad de la variante de células basales siempre despiertan preocupación por presentar características similares a malignidad, pero esto en sí mismo no constituye diagnóstico de malignidad. En el tipo desmoplásico, las células tumorales pueden inducir desmoplasia estromal que a menudo comprime las células neoplásicas, dando como resultado la pérdida de empalizada periférica y la polaridad nuclear inversa (58). A pesar de que los AMELs convencionales pueden mostrar un subtipo histológico predominante, la mayoría muestra

combinaciones de subtipos, pero todos estos tipos histopatológicos no presentan variación en la significación clínica (59).



*Figura 1. Ameloblastoma convencional. (A) Deformación vestibular en el cuerpo y rama izquierda de la mandíbula. (B) Radiografía panorámica (OPT) que muestra imagen multilocular en el cuerpo y rama izquierda de la mandíbula. (Gentileza de la Prof<sup>a</sup>. Dra. Laura Cosetti).*

### *Ameloblastoma unikuístico*

El AMEL unikuístico, es descrito por primera vez por Robinson y Martínez en 1977, como una lesión cuyos signos clínicos, radiográficos y la descripción macroscópica son compatibles con un quiste; no obstante, el análisis histopatológico muestra el perfil tisular característico de un AMEL en la membrana quística (24) (60). Es una variante de AMEL intraóseo que se presenta como una cavidad quística, con o sin proliferación luminal (2).

Es el segundo tipo de AMEL más común y representa alrededor del 5-15% del total de estas lesiones (61).

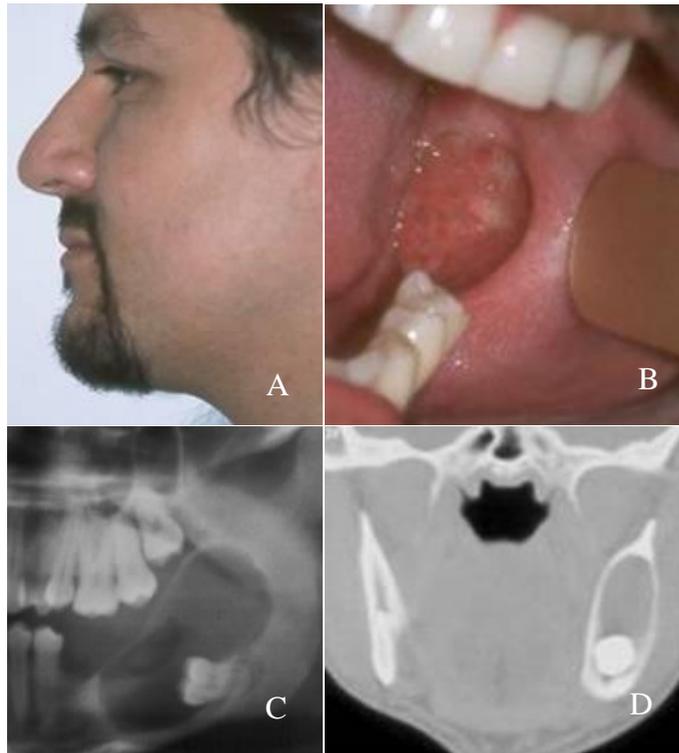
Se ve con mayor frecuencia en pacientes más jóvenes con una edad promedio de 26,1 años, y su principal ubicación es en sector posterior mandibular, donde a menudo se presenta como una deformación asintomática (34). Aproximadamente el 90% de estos tumores se presentan en el área del tercer molar mandibular y la rama ascendente (13), seguido por el cuerpo y la sínfisis mandibular (62) (Figura 2.a.b).

Radiográficamente se presenta como una radiolucencia unilocular bien definida, a menudo asociada con un diente no erupcionado, con mayor frecuencia el tercer molar mandibular (63) (64), lo que le confiere características radiográficas similares a los quistes dentígeros (53). Los casos no relacionados con piezas dentarias retenidas pueden presentar un contorno festoneado (63) (64). A pesar de que tiende a presentarse como una lesión unilocular bien definida, también se reporta un aspecto

multilocular de esta variante tumoral (65). La reabsorción radicular puede observarse, y la perforación cortical está presente en casos avanzados (64).

El AMEL uniuístico es descrito con tres variantes histológicas (2). Ackerman y col. (1988) sugieren el reconocimiento de los siguientes grupos histológicos: I luminal, II intraluminal, y III mural. El tipo I corresponde a un quiste simple revestido por un epitelio ameloblástico, en el que solo se afecta el revestimiento del quiste, el tipo II es similar, pero con proliferaciones sólidas lumbales del epitelio ameloblástico (a menudo plexiforme) (66) (46). El tipo III, como se mencionó anteriormente, se retuvo por el grupo de consenso como uno de los tres subtipos, a pesar de las controversias acerca de su comportamiento. Este subtipo se presenta con proliferación de epitelio ameloblástico en la pared del quiste, lo que podría explicar las características clínicas similares al AMEL convencional (46) (67).

En el AMEL uniuístico, solo el revestimiento epitelial del quiste muestra un cambio ameloblástico (68). Vickers y Gorlin (1970), establecen algunas características histológicas presentes en el revestimiento epitelial para sugerir la interpretación de AMEL temprano, que mantienen vigencia en el diagnóstico histopatológico de estas lesiones: hiperromatismo nuclear, polarización invertida y disposición en empalizada de los núcleos basales, vacuolización del citoplasma celular basal, células suprabasales con pérdida de la cohesión (asemeja a retículo estrellado) e hialinización del conectivo adyacente a la membrana basal (69).



*Figura 2. Ameloblastoma unicístico. (A) Ameloblastoma del cuerpo izquierdo de la mandíbula que causa deformidad facial. (B) Deformación vestibular izquierda a nivel de cuerpo y rama mandibular, exteriorización y solución de continuidad en mucosa de reborde alveolar. (C) Radiografía panorámica (OPT) que muestra imagen unilocular asociada a corona de molar retenido desplazado, en cuerpo y rama mandibular izquierda. (D) Imagen tomográfica que muestra expansión de tablas vestibular y lingual mandibular izquierda. (Gentileza de la Prof<sup>a</sup>. Dra. Laura Cosetti).*

### *Ameloblastoma extraóseo / periférico*

El AMEL extraóseo / periférico es un AMEL que se presenta en los tejidos blandos de la encía o áreas alveolares edéntulas y exhibe características microscópicas de AMEL (2). Es una variante rara e inusual de AMEL de localización extraósea, originado en la mucosa bucal (70).

Es la variedad menos frecuente, representa el 1% de estas lesiones (71) (72).

Los más afectados son los pacientes de mediana edad con una edad promedio de 52 años. Estas lesiones son más comunes en la mandíbula que en el maxilar; se encuentran en los tejidos blandos de la encía posterior, sector retromolar y áreas alveolares edéntulas, seguidos en frecuencia por la tuberosidad maxilar (53). Clínicamente, se presenta como una masa sólida, exofítica, sésil o pediculada, indolora, con una superficie lisa o papilar/granular; la mucosa que lo recubre puede ser de color similar a la mucosa normal o rojo. Su diámetro promedio es de aproximadamente 1.3 cm. Los

dientes adyacentes pueden estar inclinados. La duración de la lesión puede ser de hasta 20 años. La impresión clínica es a menudo la de una lesión reactiva (73).

Radiográficamente, se puede observar una erosión superficial o depresión ósea (29).

Histopatológicamente muestra patrones similares a los observados en el tipo convencional (74), con tendencia al subtipo acantomatoso (75). Se caracteriza por un crecimiento ameloblástico dentro de una capa epitelial escamosa, compuesto por nidos de células débilmente conectadas (76). Esta variante, comparte con el AMEL convencional, las características microscópicas definidas por la Organización Mundial de la Salud: disposición en islas conformadas por células columnares periféricas y células centrales que se asemejan al retículo estrellado; células periféricas hipercromáticas, alineadas en forma de empalizada, cuyos núcleos presentan polaridad invertida y citoplasma vacuolado; y células centrales dispersas que a menudo dan lugar a formaciones quísticas (13).

### *Carcinoma ameloblástico*

El CA es una neoplasia odontogénica epitelial maligna, contraparte maligna del AMEL (2).

Extremadamente rara. Presenta una clara predilección por la mandíbula, dos tercios de estos tumores ocurren en dicha localización y un tercio se originan en el maxilar (77).

Clínicamente se presenta como una gran tumoración, que a menudo es asintomática y de rápido crecimiento, provoca una rápida expansión y deformación cortical, perforación e infiltración en estructuras adyacentes, y puede asociarse con movilidad dentaria y sangrado por ulceración de la mucosa. En el maxilar, los signos predominantes son la deformación, con hemorragia gingival, trismus, disfonía, parestesias, epistaxis y fístulas oroantrales (53) (Figura 3.a.b). Las características clínicas y el comportamiento biológico del CA pueden resultar similares al AMEL convencional en términos de afectación ósea asociada, movilidad dentaria y presentación radiográfica multilocular, sin embargo puede distinguirse de la variante benigna en base a un examen clínico completo y características asociadas, como dolor acompañante, ulceración, rápida tasa de crecimiento y perforación cortical del hueso con o sin invasión de tejidos blandos, que a menudo sugieren malignidad (41) (78). Es un tumor agresivo con tendencia a la metástasis, principalmente al pulmón, con una tasa de supervivencia media que varía entre 5 y 17,6 años según la vigilancia global, y los del maxilar son más agresivos (2).

Radiográficamente, las lesiones de gran tamaño y de larga duración muestran radiolucencias mal definidas, de límites irregulares, carentes de corticalización que concuerdan con malignidad (2).

La evidencia microscópica meticulosa de atipia citológica confirma el diagnóstico de CA. Esta neoplasia exhibe diversas características histopatológicas que representan un dilema diagnóstico, por lo que se recomienda una evaluación adecuada de los pacientes y un análisis exhaustivo de las secciones quirúrgicas de la muestra (38). El CA combina los patrones histológicos globales del AMEL, con atipia citológica que consiste fundamentalmente en actividades mitóticas anormales, hiperchromatismo celular y nuclear y necrosis focal. Se compone de islas y cordones de epitelio odontogénico ameloblástico en un patrón infiltrativo. El epitelio puede revelar una capa externa única de células ameloblásticas de forma columnar o cuboidal que puede o no exhibir una tendencia a la empalizada y la polaridad nuclear inversa. El retículo estrellado dentro de las islas a menudo está condensado e hipercelular. Los rasgos característicos de estas lesiones incluyen el agrandamiento nuclear con núcleo punteado granular, hiperchromatismo nuclear, pleomorfismo leve, una mayor actividad mitótica con formas anormales de mitosis. En algunos casos se puede observar disqueratosis, formación de perlas de queratina, necrosis y calcificaciones distróficas. Se pueden observar diferentes patrones histopatológicos como células escamosas altamente diferenciadas o una variedad más basaloide y poco diferenciada en la contraparte maligna. En raras ocasiones, puede revelar una diferenciación celular clara (13).



*Figura 3. Carcinoma ameloblástico. (A) Tumoración que se exterioriza en sector anteroinferior de reborde mandibular, bordes indefinidos, sangrante, infiltrante hacia vestibular y lingual, que provoca desplazamiento dentario. (B) Imagen vestibular de la misma lesión. (Gentileza de la Prof<sup>a</sup>. Adj. Dra. Cecilia Vercesi).*

### 2.3.3. Avances en histopatogénesis

Uno de los tumores más estudiados genéticamente con el objetivo de comprender su etiopatogenia, comportamiento y pronóstico es el AMEL (79).

En la actualidad se ha observado mutaciones en los genes de la vía MAPK en casi el 90% de los AMELs convencionales, siendo BRAF V600E la mutación más frecuente (79) (80) (81). BRAF es una

proteína quinasa de serina / treonina involucrada en la cascada de señalización, conocida como la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (82). BRAF pertenece a una vía de señalización importante en las MAPK, altamente oncogénica, denominada RAS / RAF / MEK / ERK (83) (84). Diversos estímulos pueden activar receptores de las superficies celulares, iniciando la vía de transducción de señales, entre ellas la reacción en cascada RAS / RAF / MEK / ERK, que finalmente activa diversos factores de transcripción y regula la expresión génica (85). BRAF es una proteína que conduce a diferentes mecanismos celulares, como el metabolismo, proliferación, diferenciación, migración, supervivencia y angiogénesis celular (86). BRAF juega un papel crucial en el cáncer humano, aproximadamente el 7% de todos los casos de cáncer portan una mutación BRAF, entre ellos leucemia de células pilosas, melanomas, carcinomas papilares de tiroides, cánceres colorrectales y cánceres de pulmón (83) (82). En varios tipos de cáncer, la mayoría de las mutaciones de BRAF ocurren en el residuo de aminoácido V600 (87), en la cual 600 residuos del gen BRAF, reemplazan la valina por glutamina (V600E), dando como resultado la activación constitutiva de la señalización de MEK / ERK en tumores (88). Se ha observado ampliamente que BRAF V600E se asocia con la agresividad del cáncer humano, tal como se ha demostrado en diversos tipos de cánceres (89) (90) (91).

La activación constitutiva de BRAF V600E asociada con el desarrollo del AMEL, se ha atribuido a su progresión (92). Esta mutación se correlaciona con varias características clínico patológicas del AMEL convencional, como la ubicación dentro de la mandíbula, la edad del paciente en el momento del diagnóstico, la histología y posiblemente el pronóstico. Se ha demostrado que las mutaciones de BRAF ocurren más en la mandíbula y en pacientes más jóvenes (79), mientras que los AMELs de tipo BRAF salvaje ocurren más en el maxilar y muestran un tiempo libre de recurrencia más corto (80). Se demostró que el estado de la mutación BRAF es un marcador independiente para la recurrencia tumoral, se observó que los tumores de tipo BRAF salvaje recurren antes que los tumores de BRAF mutantes (80). Estudios recientes confirman a BRAF V600E como la mutación más frecuente en AMEL, asociada con frecuencia a otras mutaciones que confieren más agresividad en el comportamiento, con recurrencia y metástasis. Se ha descrito diferentes variantes mutacionales asociadas con BRAF V600E (G606E y L597R) en el subtipo folicular y plexiforme (86). Estos estudios genéticos sugieren que un nuevo tratamiento del AMEL agresivo y / o recurrente puede ser una terapia dirigida al BRAF (58).

Otra mutación comúnmente observada en el AMEL es SMO, en la vía no MAPK (79) (81). SMO es una proteína cuya regulación positiva está relacionada con la señalización de la vía Sonic Hedgehog (SHH) que participa en la patogénesis de varias neoplasias malignas (93).

Las mutaciones SMO exhiben una marcada preponderancia en los AMELs maxilares (81) y, a diferencia de BRAF, con frecuencia no están asociadas con otras mutaciones (86). Se sugiere que la sobreexpresión de SMO puede conducir a una activación constitutiva de la vía de señalización de SHH y finalmente contribuir a la supervivencia y proliferación celular. Una revisión sistemática reciente detecta mutaciones concomitantes de BRAF V600E con SMO en AMEL maxilar; considerando que esta neoplasia podría tener un comportamiento más agresivo en esta localización, debido a la participación de ambas mutaciones. Los autores resaltan la importancia de este hallazgo, dado que el tratamiento de AMELs maxilares podría centrarse principalmente en terapias dirigidas contra SMO (86). También describen cierta correlación entre la mutación y el tipo histológico, destacando la mayoría de las variantes plexiformes con mutación SMO, mientras que las variantes foliculares y desmoplásicas con mutación SMO o BRAF. Los tumores con mutaciones de SMO presentaron una tendencia a la recurrencia más temprana (81).

Estos resultados acerca de BRAF y SMO, podrían definir dos vías genéticas diferentes para el desarrollo de los AMELs (58), basadas en una especificidad anatómica de las mutaciones (dentición superior e inferior), y en señales espaciales, temporales y/o específicas de tipo celular (81).

El AMEL invade agresivamente el hueso circundante. Por tanto, se considera que el papel de los osteoclastos en la resorción ósea de esta neoplasia es importante (94). La remodelación ósea normal está regulada por las interacciones del activador del receptor del factor nuclear kappa B (RANK) en los precursores de los osteoclastos, con su ligando unido a la membrana de los osteoblastos (RANKL). Los osteoblastos también secretan osteoprotegerina (OPG), un receptor soluble que interactúa con RANKL para controlar las interacciones RANK-RANKL (95). El equilibrio de estos tres factores (RANKL, RANK y OPG) es importante para controlar la remodelación ósea (96). Se ha demostrado que los sistemas RANKL, RANK y OPG están regulados de forma aberrante en varias lesiones osteolíticas, incluidas las neoplásicas (97). La señalización desorganizada de RANK-RANKL y los niveles alterados de OPG se han asociado con la pérdida ósea lesional en el AMEL (98).

Recientemente se ha informado que las células del estroma juegan un papel esencial en diversas enfermedades, mediante la secreción de citocinas y factores de crecimiento, que estimulan el crecimiento y la invasión tumoral (99). Estudios han demostrado que la interacción entre las células neoplásicas del AMEL y los fibroblastos del estroma induce la producción de citocinas como IL-6 e IL-8 por parte de los fibroblastos estromales. Se ha informado que la expresión de estos factores promueve la motilidad celular y la proliferación de células neoplásicas (100), e induce la diferenciación de osteoclastos en el AMEL (100). Estos hallazgos sugieren que la interacción entre las células tumorales y las estromales circundantes puede influir en la invasión ósea y progresión del AMEL (94).

Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son una familia de proteinasas capaces de degradar la matriz extracelular y la membrana basal (101). Los AMELs expresan altos niveles de MMP-1, MMP-2 y MMP-9 (102). La agresividad local de esta neoplasia se correlaciona con la actividad de MMP-2 que degrada el colágeno tipo IV abundante en la membrana basal. Como el nivel de MMP-2 está regulado por las acciones activadoras e inhibitoras de MMP-14 y el inhibidor tisular de las metaloproteinasas-2 de la matriz (TIMP-2) respectivamente, los niveles alterados del complejo MMP-14 / MMP-2 / TIMP-2, especialmente en el AMEL convencional y recurrente, se han atribuido a las propiedades de crecimiento invasivo del AMEL (103) (104). Varios estudios han propuesto que la expresión de MMP-9 en los componentes epiteliales y estromales del AMEL está asociada con su invasividad local (105). También se ha informado la expresión de otros tipos de MMP en AMEL, como MMP-13 (106). En la misma línea, se ha demostrado que la podoplanina, una glucoproteína transmembrana de tipo mucina, se expresa mucho más fuertemente en el AMEL recurrente en las células columnares localizadas periféricamente que en las células centrales similares a un retículo estrellado. Por lo tanto, un patrón de expresión diferencial de podoplanina posiblemente contribuya a la migración, agregación y recurrencia de las células ameloblásticas (107).

Otras vías moleculares se han asociado con la patogénesis, la invasividad y la recurrencia del AMEL. Entre ellos marcadores moleculares implicados en la adhesión y migración celular como Syndecan-1 (CD138) (108), E-cadherina (109), integrinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$  (110), y claudinas 1, 4 y 7 (111); en la proliferación celular tales como p16 (112), Ki-67 (113) y ciclina D1 (114); y en el crecimiento tumoral y la angiogénesis como FGF1 y FGF2 (115), VEGF (116) y PDGF (117). Diversas investigaciones en AMEL incluyen también a marcadores apoptóticos como FAS, ligando FAS y caspasa 3 (118), Bcl-2, bax y Survivin (119); y genes supresores tumorales como p53-MDM2 (120), p16 (121) y PTEN (122). Algunos de estos se han considerado como marcadores diagnósticos o pronósticos de AMEL (88).

Respecto al AMEL uniuístico, se ha observado también en algunos estudios, mutaciones de BRAF V600E (80) (92) (123). Otros artículos sugieren que se necesita más evidencia (58).

En el AMEL periférico aún no se ha demostrado alteraciones genéticas, aunque un artículo señala un caso (no publicado) de AMEL uniuístico extraóseo con inmunorreactividad BRAF por IHC (58).

El CA comparte la misma mutación BRAF que el AMEL (124) (2).

El CA también expresa marcadores de células madre SOX2 y OCT-4. Un estudio reciente confirma a estos marcadores como útiles para distinguir el CA y el AMEL convencional agresivo (125). El factor de transcripción SOX2 es ampliamente reconocido por sus funciones críticas durante la

embriogénesis de mamíferos (126). Es necesario para mantener la capacidad pluripotente, se ha demostrado que su eliminación en células madre embrionarias de ratón interrumpe su autorrenovación y conduce a la letalidad del embrión (127). Se ha encontrado que se expresa en la lámina dental y participa en la renovación de las células epiteliales durante el desarrollo dentario (128). SOX2 es también un marcador de células madre cancerígenas que promueve el desarrollo ectodérmico, entre ellos del epitelio odontogénico (129). Su expresión está implicada en el crecimiento, tumorigenicidad, resistencia a los medicamentos y metástasis en al menos 25 cánceres diferentes, incluidos los cánceres de ovario, pulmón, piel, cerebro, mama, próstata y páncreas (130). OCT-4 es un factor de transcripción, regulador clave de la autorrenovación en las células madre embrionarias. Se utiliza con frecuencia como marcador de células indiferenciadas (131). Se ha relacionado con la tumorigénesis de células germinales adultas (132).

Yoon y col. (133) y Bologna-Molina y col. (113) demostraron que la expresión del marcador de proliferación celular Ki-67 es mayor en CA que en AMEL. Esta alta expresión se correlacionó con la agresividad del tumor CA.

Las mutaciones y la pérdida de heterocigosidad del gen supresor tumoral p53 se han asociado con una mayor proliferación celular y potencial maligno. Kumamoto y col. (2004) sugirieron que la alteración de la cascada de p53 conduce a la oncogénesis o transformación maligna del epitelio odontogénico del AMEL (120). Otro estudio concluye que la hipermetilación del gen supresor de tumores p16 podría jugar un papel en la progresión maligna del CA (121).

#### 2.3.4. *Tratamiento*

Los principales objetivos del tratamiento del AMEL son la exéresis quirúrgica completa del tumor y la restauración de la función masticatoria y la estética facial (134).

Se describen tratamientos con enfoque radical: resección marginal, segmentaria hemimandibulectomía o maxilectomía, con reconstrucción inmediata o diferida, o con método conservador: enucleación y legrado extendido (135).

El tratamiento de elección es la resección quirúrgica radical con un amplio margen de tejido normal circundante (136). Las últimas revisiones sistémicas han demostrado que, para formas agresivas como el AMEL convencional, el tratamiento quirúrgico radical es más apropiado, mientras que los AMELs uniuquísticos y periféricos pueden tratarse de forma conservadora (137) (138) (139). Sin embargo, estudios previos respaldan un enfoque quirúrgico radical, no solo en AMEL convencional,

sino también en uniuquístico, principalmente en la variante mural, dada la tasa de recurrencia significativamente más alta que las variantes luminales (140) (141).

Las tasas de recurrencia del AMEL son elevadas, 15% al 25% después del tratamiento radical y 55% al 90% después del tratamiento conservador (136). Hallazgos señalan que el 90% de los casos de AMEL recurrente se asocian a una escisión quirúrgica inadecuada (142), mientras que las recurrencias son excepcionales con la resección segmentaria de la mandíbula (135).

Los AMELs recurren con mayor frecuencia en cinco años, Almeida y col. sugieren que los pacientes deben someterse a control imagenológico cada seis meses durante cinco años, y luego anualmente durante otros cinco años (135). La recurrencia después de un período de tiempo significativo es rara, pero existen informes de casos que recurren luego de casi 50 años desde la resección inicial (143).

La recurrencia puede ocurrir en el sector óseo libre de lesión, así como en el fragmento de reconstrucción. Se han notificado casos de recurrencia en injertos óseos no vascularizados y colgajos libres de peroné; sin embargo, los autores reconocen que no se pudo determinar la idoneidad de los márgenes quirúrgicos iniciales en el análisis histológico (144) (145) (146). En la actualidad, también se describe algún caso de AMEL recidivante con neomandíbula de peroné en presencia de márgenes quirúrgicos iniciales adecuados (147).

Una consideración especial constituye el tratamiento del AMEL metastásico y el CA. Kunze et al demostraron que el pulmón es el órgano con la tasa metastásica más alta de AMEL seguido de pleura, ganglios linfáticos, hueso, cerebro, riñón e hígado (148). La tasa de metástasis en pulmón es de aproximadamente 75-88% de las metástasis (149).

En el AMEL recurrente, ya sea AMEL metastásico o CA, se implementan terapias adyuvantes, que consisten en radioterapia y quimioterapia, las cuales son controvertidas en su uso debido a una alta tasa de recurrencia y resultados impredecibles cuando se utilizan como terapia de primera línea y única sin tratamiento quirúrgico (150) (151).

Debido a estos hechos, se ha implementado nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a derribar las vías de señalización que participan en el desarrollo de esta neoplasia, destacando la vía de señalización MAPK con su mutación BRAF V600E y la presencia de mutaciones adicionales (152).

Vemurafenib, un inhibidor de BRAF, mostró una respuesta prometedora en células de AMEL in vitro (92) (79). Estudios han demostrado la disminución de la proliferación celular neoplásica con Vemurafenib, señalándolo como una alternativa potencial en AMELs cuyo tratamiento quirúrgico está

relacionado con deformidades faciales significativas y recurrencias frecuentes (80). Además, se recomienda su utilización en AMELs metastásicos, tumores locales agresivos y pacientes no candidatos al tratamiento quirúrgico (86). Por lo tanto, los pacientes que presentan la mutación BRAF V600E son candidatos para las terapias dirigidas, utilizando tratamientos combinados basados en la eliminación de las vías de señalización relacionadas con BRAF. Un ejemplo es la terapia combinada de Vemurafenib (inhibidor de BRAF) y Trametinib (inhibidor de MEK), con la cual algunos casos notificados de AMEL han mostrado excelentes resultados (80).

#### 2.4. *Los biomarcadores moleculares como bioreporteros de los TODs*

Las denominadas biomoléculas son moléculas de naturaleza orgánica con diferentes grados de complejidad, estructura y distribución. En una célula existe gran heterogeneidad de biomoléculas, como los carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, cofactores y proteínas. Estas juegan papeles importantes en los procesos celulares que involucran almacenamiento, movimiento, energía, transporte, catálisis, defensa, entre otros. Sin embargo, no todas son utilizadas como biomarcadores moleculares, probablemente debido a que aún no se ha alcanzado el nivel de conocimiento y tecnología que permita su manipulación en la investigación y diagnóstico. Por tanto, se comprende como biomarcador molecular a 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. Un biomarcador predice un punto final clínicamente relevante o un resultado intermedio de un proceso. Se pueden utilizar en la detección, diagnóstico, caracterización y monitoreo de enfermedades; como indicadores pronósticos; para desarrollar intervenciones terapéuticas individualizadas; para predecir y tratar reacciones adversas a medicamentos; para identificar tipos de células; y para estudios farmacodinámicos y de dosis-respuesta. Los buenos biomarcadores deben ser medibles con poca o ninguna variabilidad, deben tener una relación señal / ruido considerable y deben cambiar de manera rápida y confiable en respuesta a los cambios en la condición o su terapia (153).

##### 2.4.1. *Ep-CAM (MOC-31)*

La adhesión celular es un proceso fundamental para el correcto funcionamiento de los organismos multicelulares. Muchas moléculas de adhesión celular (CAM) han sido caracterizadas en las últimas décadas. Las CAM están implicadas en una amplia gama de procesos, incluidas las interacciones célula-célula y célula-matriz, la migración celular, el ciclo celular y la señalización, así como la morfogénesis y la regeneración de tejidos. El papel fundamental de las CAM es destacado por el hecho de que están involucradas en una variedad de patologías, tales como cáncer, inflamación, infecciones y enfermedades autoinmunes (154).

Existen cuatro familias de CAM: caderinas, selectinas, integrinas e inmunoglobulinas CAM; aunque algunas de ellas no comparten ninguno de los patrones estructurales de estas cuatro familias. El ejemplo más destacado es la molécula de adhesión de células epiteliales (Ep-CAM) (155).

Ep-CAM es una glicoproteína transmembrana de 40 kDa, que consiste en un dominio extracelular de 289 aminoácidos de largo EpEX y un dominio intracelular corto EpICD de 26 aminoácidos (156).

Se expresa en la membrana basolateral de la mayoría tejidos epiteliales normales y se sobreexpresa en tumores originarios de los tejidos epiteliales (157) (6). Fue descrita inicialmente como un antígeno asociado a tumores por Koprowski y col en 1979 (158), siendo de particular interés debido a su alto nivel de expresión en una variedad de carcinomas (9).

Permite la formación de uniones homofílicas estrechas entre las células del epitelio (156). Su papel en la adhesión de las células epiteliales es dinámico y está interconectado con la E-cadherina (6). Mediante la regulación por incremento de Ep-CAM, la adhesión celular mediada por E-cadherina disminuye y la adhesión mediada por Ep-CAM se vuelve predominante (159).

Aunque su estructura no se parece a ninguna de las CAM clásicas, se ha propuesto que Ep-CAM sea una molécula de CAM porque puede mediar en la adhesión célula-célula. Esta posición se ha reforzado por la observación de que además de la adhesión, participa en otros procesos específicos de las moléculas CAM, relacionadas a la morfogénesis y metástasis, como la proliferación, diferenciación, regulación del ciclo celular, migración y señalización intracelular. Por tanto, desempeña un papel importante en el inicio, desarrollo, mantenimiento, reparación y función de los epitelios en el organismo (9).

Dadas sus características de una molécula morfo-reguladora, está involucrada, por ejemplo, en el desarrollo de islotes pancreáticos humanos (159), en la regeneración hepática (160) y de la piel (161).

No está presente en el epitelio escamoso, los hepatocitos, las células tubulares proximales renales, las células parietales gástricas y células mioepiteliales (162). Si bien no se observa expresión en el epitelio escamoso, se detecta en el epitelio del colon, el estómago, la próstata y el pulmón (157), y en la mayoría de los epitelios glandulares (162).

La pérdida de Ep-CAM en algunos epitelios adultos, se correlaciona con una disminución en la actividad progenitora, lo que sugiere que el nivel de diferenciación y especialización celular depende, al menos en parte, de la expresión de Ep-CAM (163).

Ep-CAM se sobreexpresa con frecuencia en la mayoría de los cánceres (164). El uso de este anticuerpo está indicado, después de un diagnóstico diferencial clínico de patologías, como ayuda en

la identificación de células epiteliales. Se ha demostrado su utilidad en la diferenciación de adenocarcinoma, mesotelioma y células mesoteliales del líquido pleural, mostrando mayor expresividad en el primero y escasa o nula en los dos últimos. Dicho biomarcador es altamente sensible y específico para la detección de adenocarcinoma (165). También está ausente en los sarcomas, linfomas, melanomas y tumores neurogénicos (164) (166).

Ep-CAM participa en la regulación de la adhesión, la proliferación, la migración, la invasión y la transición epitelial-mesenquimatosa de las células cancerosas durante la progresión del cáncer (167) (168). Se ha comprobado la correlación positiva de la expresión de Ep-CAM con el marcador de proliferación Ki67, con ciclina D1 y la fosforilación de Rb, promoviendo la progresión del ciclo celular a través de la vía clásica regulada por ciclina (169).

Diversos estudios clínicos informan sobre la sobreexpresión de Ep-CAM como un marcador de pronóstico negativo en el cáncer de páncreas, vejiga, vesícula biliar, gástrico y nasofaríngeo (170) (171). En contraposición, algunos estudios destacan un impacto positivo significativo de la sobreexpresión de Ep-CAM en la supervivencia global de los pacientes con carcinoma de células renales, de tiroides y de células escamosas de cabeza y cuello (172) (173). Investigaciones acerca de cáncer gástrico, incluso, no alcanzan un consenso. Mientras ciertos estudios sugieren que la sobreexpresión de Ep-CAM está asociada con una mejor supervivencia, otros identifican a la expresión alta de Ep-CAM intratumoral como un factor de pronóstico precario (170) (174) (175). También para los carcinomas colorrectales, de ovario, de pulmón y de mama se han informado ambas funciones (176) (173).

Recientemente Ep-CAM ha sido identificado como un marcador de células madre iniciadoras del cáncer, por lo que es un objetivo interesante para la terapia contra el cáncer (171). Está implicado en la proliferación de células madre embrionarias humanas, su eliminación en las células reduce significativamente la tasa de proliferación independientemente de otros marcadores de células madre (177), por lo que debe comprenderse como marcador proliferativo, y no solo como un marcador epitelial (7). Algunos autores sugieren que las células madre cancerosas pueden convertirse en células iniciadoras de metástasis, y conformar una población de células tumorales circulantes (178). Estudios clínicos muestran que los cánceres que sobreexpresan Ep-CAM en las células tumorales circulantes, presentan peor pronóstico (179), detectando expresión de esta proteína en todas las líneas de células tumorales circulantes (180).

Debido a la expresión frecuente de Ep-CAM, es seleccionada como antígeno diana para una multitud de enfoques inmunoterapéuticos (157), como ser anticuerpos monoclonales,

quimioterapéuticos y vacunas. Varias inmunoterapias específicas de Ep-CAM se encuentran en ensayos clínicos de fase I y II (181) (182).

**Cuadro 2. Funciones de Ep-CAM.**

	Descripción de la función basada en expresión de Ep-CAM
Adhesión celular	Adhesión homofílica, integridad epitelial (183). Actividad inhibidora de la adhesión mediada por cadherina (6).
Morfogénesis	Primeras etapas de desarrollo. Expresión de Ep-CAM en células madre embrionarias (184). Desarrollo de islotes pancreáticos humanos (159). Regeneración hepática (160). Regeneración de la piel (161).
Diferenciación	Cambios en el nivel de expresión de Ep-CAM y el patrón durante la diferenciación de los epitelios (163). Pérdida de Ep-CAM en algunos epitelios adultos (163).
Proliferación Migración celular Señalización intracelular	Eliminación de Ep- CAM disminuye el potencial de proliferación, migración e invasión celular (185).
Carcinogénesis	Expresión de Ep-CAM en células madre iniciadoras de cáncer (171).
Progresión del cáncer	Regulación de la adhesión, la proliferación, la migración, la invasión y la transición epitelial-mesenquimatoso de las células cancerosas (167) (168).
Metástasis	Sobre expresión de Ep- CAM en tumores metastásicos (185). Expresión de Ep-CAM en células tumorales circulantes (178) (180).

### 3) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El interés por el estudio de la biología tumoral de los AMEL radica en que, a pesar de ser neoplasias raras dentro de la anatomía patológica general, pueden llegar a ser lesiones relativamente frecuentes en los maxilares, y que, a pesar de su naturaleza benigna, presentan comportamiento local agresivo e invasivo, por lo que su tratamiento es radical, en ocasiones mutilante y con altos índices de

recurrencia. Estas neoplasias pueden llegar a presentar metástasis (AMEL metastásico) o bien ser malignos como el CA y comprometer seriamente la vida del paciente, de allí también la importancia del estudio de los CA. Debido a la localización exclusiva en la región maxilofacial el odontólogo puede ser el primero en entrar en contacto con esta lesión.

#### **4) JUSTIFICACIÓN**

El conocimiento de la expresión de Ep-CAM, molécula nunca antes estudiada en las diferentes variantes de AMEL/CA, aporta a la comprensión del comportamiento biológico de estos tumores. Así mismo, el conocimiento del patrón de expresión del biomarcador estudiado podría ser de utilidad en un futuro próximo en la determinación de los parámetros y nuevas estrategias terapéuticas en el manejo de cada variante tumoral.

#### **5) OBJETIVOS**

##### *5.1. Objetivo general*

Determinar la inmunoexpresión de la proteína MOC-31 en AMEL y CA, y compararla con su expresión en GD.

##### *5.2. Objetivos específicos*

1. Clasificar todos los casos disponibles de AMEL/CA de acuerdo a los criterios de la OMS 2017, y los casos de GD de acuerdo a su estadio embrionario.
2. Relacionar todos los casos disponibles de AMEL/CA con los criterios morfológicos: distribución por género, grupo etario, variante clínica y tipo histológico. El último parámetro corresponde a los casos de AMEL y se realiza en base a criterios clasificatorios de la OMS 2017.
3. Describir y cuantificar la inmunoexpresión de la proteína MOC-31 en AMEL/CA y GD.
4. Analizar la asociación entre la inmunoexpresión de la proteína MOC-31 y las características morfológicas de los tumores.
5. Correlacionar la inmunoexpresión de la proteína MOC-31 con el estadio embrionario de los GDs incluidos.
6. Comparar la expresión de MOC-31 entre AMEL/CA y GD.

## **6) METODOLOGÍA**

### *6.1. Diseño de estudio*

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

### *6.2. Fases del estudio*

Se realizó la investigación en dos fases. En la fase inicial del trabajo se reunió e incorporó casos provenientes de centros de referencia de diferentes países latinoamericanos, con la finalidad de recabar mayor información acerca de estas entidades, en la medida que se amplió la casuística. Posteriormente, se clasificó el conjunto de los tumores incluidos en el estudio, de acuerdo a los criterios histopatológicos de la última clasificación de la OMS 2017.

En la segunda fase se realizó el estudio molecular (inmunohistoquímica) de estas neoplasias, utilizando el biomarcador MOC-31.

Por otra parte, se incluyó en el estudio GDs en diferentes etapas o estadios embriológicos, lo que permitió su utilidad como control o tejido sano, y recabar información importante sobre las implicaciones de este biomarcador dentro de la morfogénesis dental. Esto es de gran importancia dado que los AMEL/CA son tumores que se originan a partir de este proceso embrionario (odontogénesis).

### *6.3. Obtención de muestras*

El tipo de muestreo fue no probabilístico, por conveniencia. En el estudio se seleccionaron 16 muestras incluidas en parafina de GD (etapas de brote, casquete y campana) obtenidos de la cátedra de Histología de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República (Uruguay), y 60 muestras tumorales incluidas en parafina de AMEL y nueve de CA, diagnosticadas desde el año 2002 hasta el año 2014 (diagnóstico producto de biopsia incisional y/o escisional), provenientes de servicios latinoamericanos de Patología Bucal de los países México (Universidad Juárez del Estado de Durango), Chile (Universidad de Chile) y Venezuela (Universidad Central de Venezuela).

### *6.4. Criterios de inclusión y exclusión*

#### *Criterios de inclusión*

-Los especímenes con diagnóstico histopatológico previo de AMEL/CA de acuerdo a los criterios de la OMS 2017.

-Los GDs representativos de las etapas de la odontogénesis: brote, casquete y campana.

### *Criterios de exclusión*

-Aquellos especímenes que, al ser reclasificados según la clasificación de los tumores odontogénicos de la OMS del 2017, no fueron diagnosticados como AMEL en cualquiera de sus variantes o como CA.

-Aquellos especímenes que se encontraron en mal estado y no resultaron útiles o representativos.

### *6.5. Definición y operacionalización de las variables*

#### ***Cuadro 3. Operacionalización de las variables dependientes e independientes.***

Dependientes	Independientes
Número de células positivas para MOC-31 en la membrana celular y/o citoplasma de las células ameloblásticas tumorales (AMEL/CA) y normales (germen dentario)	AMEL: Ameloblastoma en sus variantes convencional, uniuística, periférica y metastatizante
	CA: Carcinoma ameloblástico
	Germen Dentario
	Sexo: Masculino/Femenino
	Edad: Años cumplidos del paciente
	Variante histológica de AMEL

### *6.6. Procedimientos*

#### *6.6.1. Obtención de las muestras. Cortes.*

Todas las muestras se obtuvieron de bloques de parafina, tanto las de GDs, como las de tejido tumoral. Estas últimas correspondieron a biopsias incisionales y/o piezas quirúrgicas resecaadas de AMEL y CA. Los bloques recibieron cortes de 2  $\mu$ m de espesor y se montaron en laminillas tratadas con poly-L-lisina.

#### *6.6.2. Técnica de inmunohistoquímica.*

Para el proceso de desparafinación, las laminillas se colocaron en rejillas metálicas y dentro de la estufa a 45° C por 30 min. Posteriormente se cambiaron a rejillas de plástico y se sumergieron en un depósito con xilol durante 5 minutos.

A continuación, se hidrataron en un tren de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 90, 80, 70 y 50%) y se lavaron con agua destilada.

Para el desenmascaramiento de los epítopes se realizó recuperación antigénica con solución de citrato de sodio 10 mM (pH 6.2) con el método de olla a presión-horno de microondas.

La olla a presión se precalentó con 500 ml de agua destilada durante 5 minutos en el horno de microondas a máxima potencia (750W). Las laminillas se colocaron cuidadosamente dentro de los vasos coplin y la solución desenmascaradora se incorporó a los vasos. Los vasos se introdujeron dentro de la olla a presión cuidadosamente, la cual se colocó nuevamente dentro del horno de microondas durante 7 minutos a máxima potencia. Se aguardó hasta que el sonido de la válvula de escape de la olla a presión fuera constante durante 15 segundos, y se esperó un minuto adicional, para luego detener el temporizador del horno de microondas. Posteriormente, se quitó la olla del microondas y se aguardó hasta que la válvula descendiera para proceder a su apertura (8 minutos). Se quitó los vasos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente los vasos se vaciaron y enjuagaron 3 veces con agua destilada.

Las peroxidasas endógenas se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 0.9%, y se lavaron 3 veces con agua destilada.

Las laminillas se montaron cuidadosamente en los cover-plates (sistema por capilaridad) con agua destilada y se colocaron en los racks. Luego se incorporó a estas estructuras, una solución salina de fosfatos pH 7.4 (PBS) durante 5 minutos.

Se incubó el anticuerpo primario contra MOC-31 (Dako, Monoclonal Mouse Anti- Human Epithelial Related Antigen MOC- 31), por un período de 45 min. El anticuerpo se agregó (80µl) con una micropipeta y se colocó en el depósito formado entre el cover-plate y la laminilla cuidando no tocar las paredes, la tapa del rack permaneció colocada.

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

Los productos de la reacción se visualizaron con sustrato de 3,3'-diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dako Corporation, Carpintería, CA, USA). Se realizó el revelado al microscopio óptico, secando las laminillas con una gasa limpia previo agregado de la diaminobenzidina. Posteriormente las laminillas se lavaron con agua destilada descartando los excedentes en un recipiente con cloro, y se colocaron en una rejilla sumergida en agua corriente a temperatura ambiente.

Las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 5 minutos, se lavaron con agua corriente para eliminar los excesos de hematoxilina y luego se fijaron mediante 10 baños de hidróxido de amonio a temperatura ambiente, para ser lavadas nuevamente con agua corriente.

Las laminillas se colocaron en rejillas de plástico y se realizó su inmersión en el tren de deshidratación, a la inversa del proceso de hidratación sin sumergirlas en los contenedores con xilol. Se aguarda su secado a temperatura ambiente.

Finalmente, se montaron con resina líquida (Entellan) y se cubrieron con el cubreobjetos, aguardando su secado durante 24 horas.

### 6.6.3. *Conteo celular.*

Se realizó un conteo celular de forma semi-cuantitativa y cualitativa:

- Inmunomarcador: MOC-31
- Inmunopositividad: Membrana y/o citoplasma

Debido a la dificultad en su interpretación, la evaluación del conteo celular de membrana y citoplasma, se realizó visualizando toda la laminilla en 40x en un microscopio óptico (Eclipse CI-L, Nikon, Japón), recorriendo todos los campos y asignando un porcentaje de positividad subjetivo en cruces.

Se consideró la siguiente escala semi cuantitativa: Neg “esencialmente sin tinción” para preparados negativos o positivos menos del <5% de las células; + “débil a moderado” para tinciones del 5-50% de las células; ++ “positivo intenso” para >50% de las células (186). La gradación utilizada se empleó tomando como base el conteo previamente descrito por HercepTest® (DAKO, Carpinteria, CA, USA) para cáncer de mama (Figura 4).

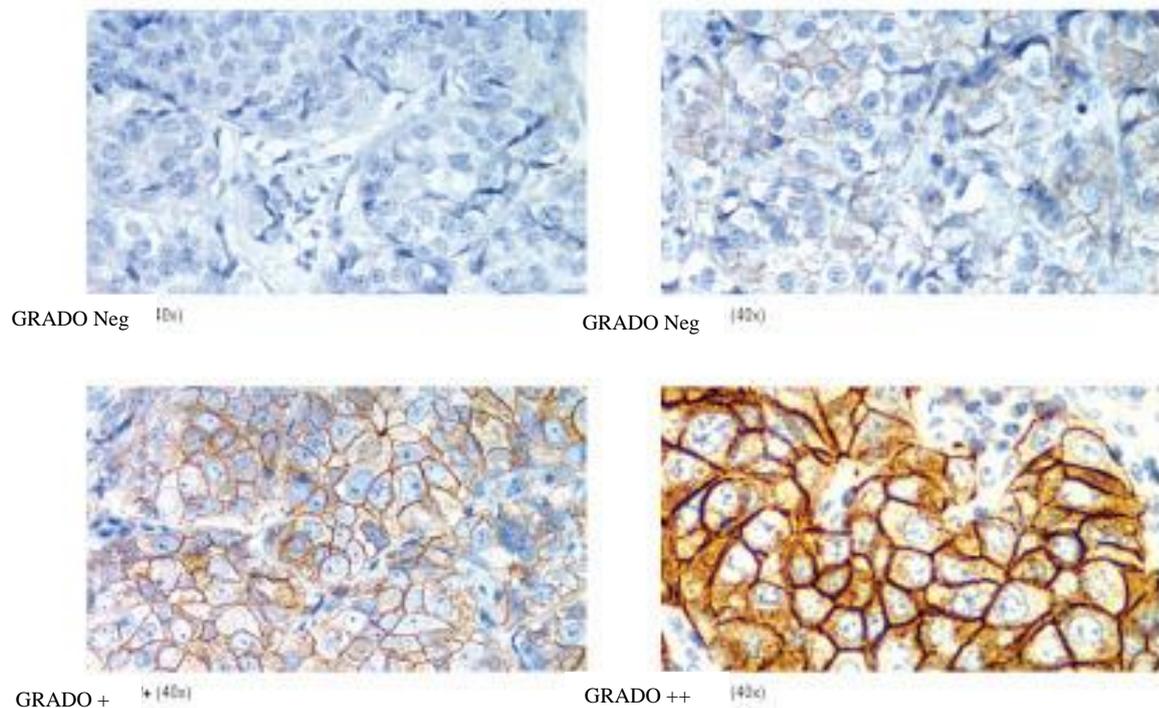


Figura 4. Esquema de la escala de tinción citoplasmática- membrana, en base al conteo descrito por HercepTest® (DAKO, Carpinteria, CA, USA) para cáncer de mama (187).

Se realizó la calibración de los examinadores hasta obtener la Kappa =0.7.

#### 6.6.4. Equipos y materiales

El trabajo se realizó en el Área de Patología Molecular de la Facultad de Odontología, Universidad de la República.

El laboratorio cuenta con el equipamiento necesario para la realización de las técnicas histoquímica e inmunohistoquímica.

Dentro del equipamiento existente, se destaca el horno de microondas, freezer -20 C, balanza estándar, microcentrífuga, vórtex, cámaras de electroforesis (horizontal y vertical), pHmetro portátil, fuente de poder, plancha con agitación y calor, micropipetas, termo de crioconservación LN2 (BioCane 20, ThermoScientific), controlador de estado, microscopios (3), tren de tinciones horizontal, olla a presión para recuperación antigénica, cover plates y racks para inmunohistoquímica por capilaridad, vasos de coplin, micrótopo, incluidor de parafina, horno de incubación y desparafinización, kit de micropipetas.

### 6.6.5. *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se planteó una descripción de la muestra mediante estadísticos de resumen empleando media y desvío estándar para las variables cuantitativas, y distribuciones de frecuencia para las variables cualitativas. En una segunda instancia se planteó la asociación de la positividad del marcador MOC-31 con los factores sociodemográficos e histológicos mediante la confección de tablas de doble entrada. La presencia/ausencia de asociación fue evaluada mediante la prueba  $\chi^2$  de Pearson (188) empleando un nivel de significación del 5%. La fuerza de la asociación fue cuantificada mediante el coeficiente de contingencia (CC). Todos los procedimientos estadísticos fueron realizados en el software R (189).

### 6.7. *Consideraciones éticas*

Este estudio se enmarca en un proyecto macro titulado “Estabilidad, expresión génica y proteica de biomarcadores moleculares asociados al comportamiento biológico en Tumores Odontogénicos” responsable Prof. Dr. Ronell Bologna. Ha recibido la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de la República, Facultad de Odontología, Uruguay, exp.091900-000120-16, aprobado el 31/05/2016.

## 7) **RESULTADOS**

En este estudio fue cuantificada la expresión de la proteína MOC-31, en un total de 60 casos de AMEL, nueve de CA y 16 de GD.

La inmunoexpresión de MOC-31 en el citoplasma y membrana de las muestras de AMEL analizadas, resultó con positividad de valor ++ en cuatro (6.7%) muestras, de valor + en seis (10%) muestras, y negativa en 50 (83.3%) muestras.

Del total de nueve muestras de CA analizadas, una (11.1%) expresó positividad de valor ++ para MOC-31, tres (33,3%) de valor +, y cinco (55.6%) resultaron negativas.

En cuanto a los GD, del total de 16 muestras analizadas, nueve (56,3%) muestras expresaron positividad a MOC-31 de valor ++, cuatro (25%) de valor +, y tres (18.8%) fueron negativas.

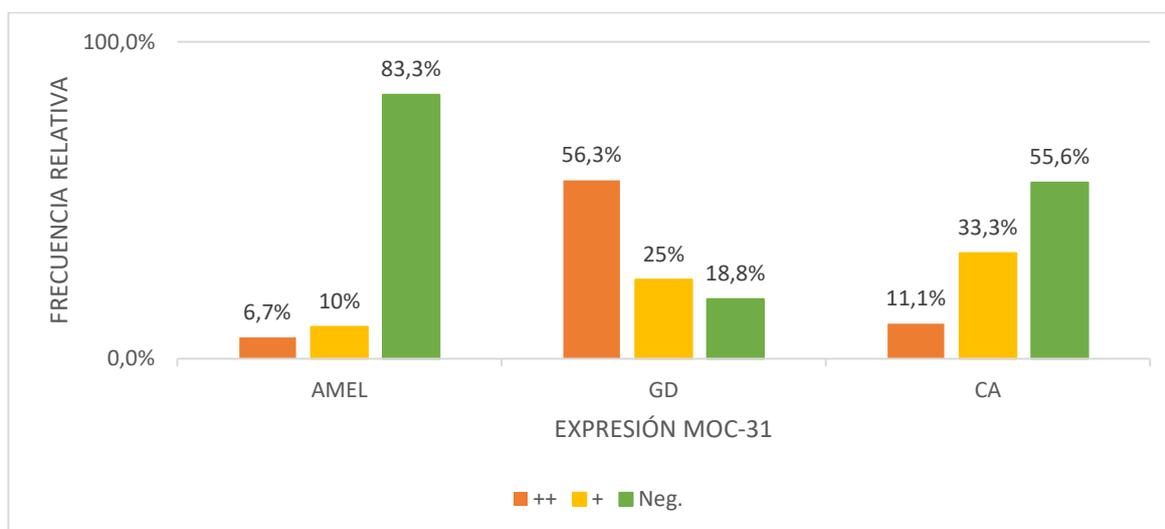
El cuadro 4 y gráfico 1 presentan la frecuencia de expresión de la proteína en cada uno de los grupos de estudio mencionados.

**Cuadro 4. Positividad a MOC-31 en variantes tumorales y gérmenes dentarios.**

		Frecuencia	%
AMEL	++	4	6,70%
	+	6	10,00%
	Neg.	50	83,30%
CA	++	1	11,10%
	+	3	33,30%
	Neg.	5	55,60%
GD	++	9	56,30%
	+	4	25,00%
	Neg.	3	18,80%

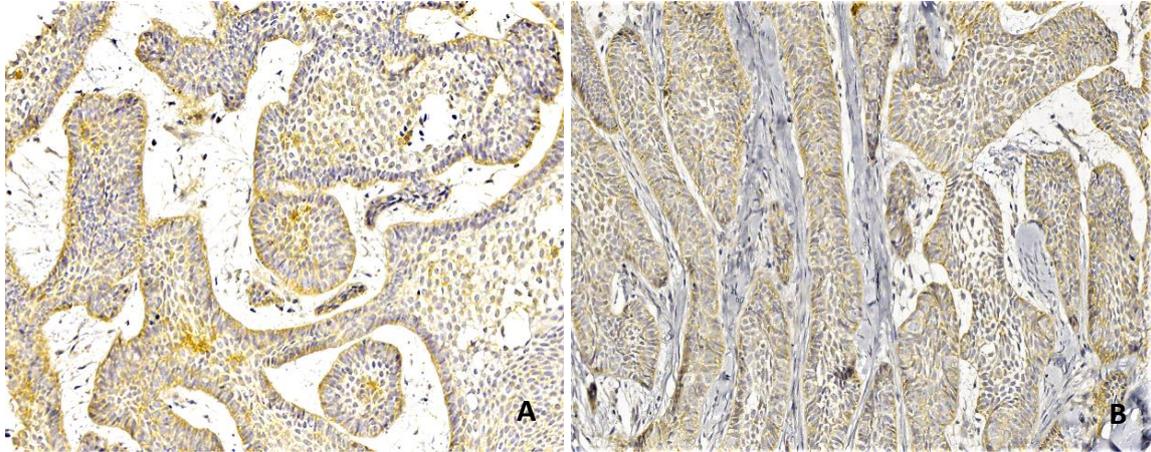
Neg: negativo o positivo <5% de las células, +: 5-50%, ++: >50%.

**Gráfico 1. Frecuencias relativas de la expresión de MOC-31 en variantes tumorales y gérmenes dentarios.**

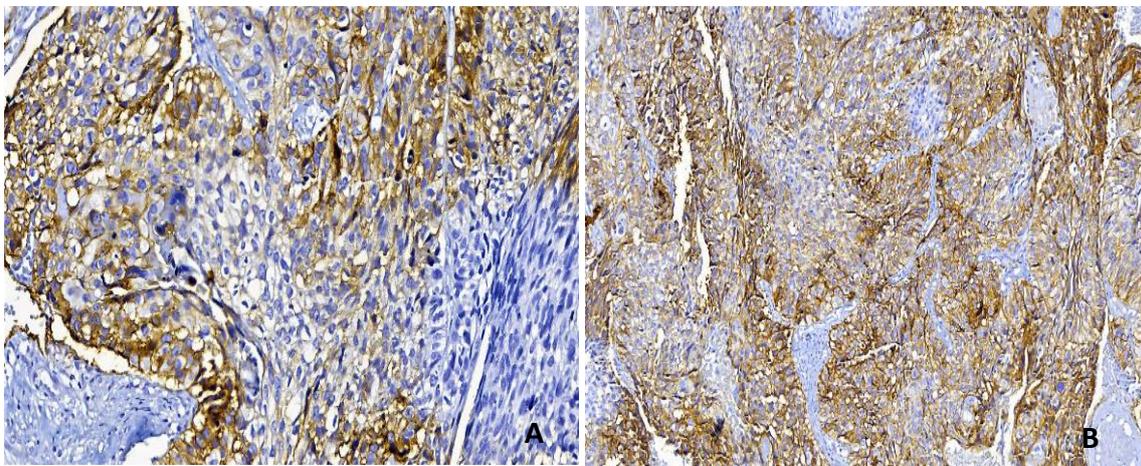


Neg: negativo o positivo <5% de las células, +: 5-50%, ++: >50%.

La expresión de MOC-31 se observó de manera difusa a nivel de membrana y citoplasma epitelial tumoral en AMEL (Figura 5) y en CA (Figura 6).

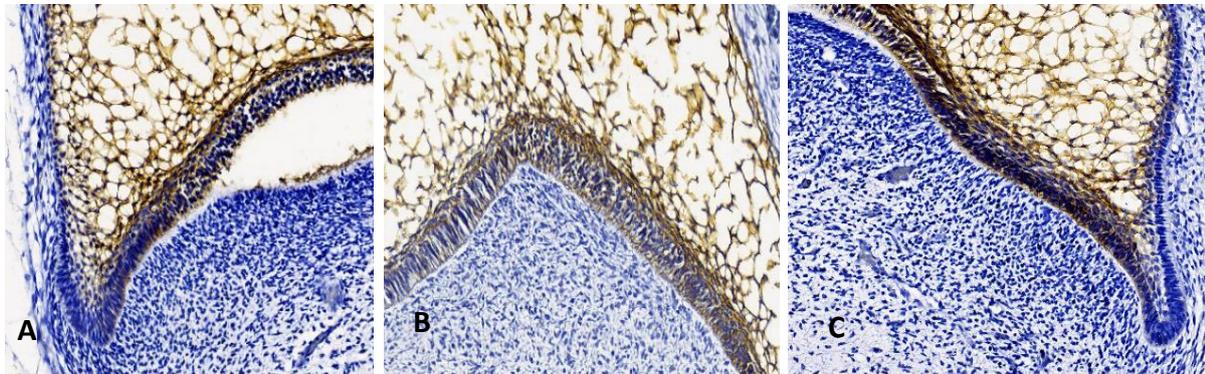


*Figura 5. Inmunexpresión de MOC-31 en ameloblastoma. A- Intensa positividad en islotes epiteliales. B- Positividad moderada a nivel epitelial. 20x.*

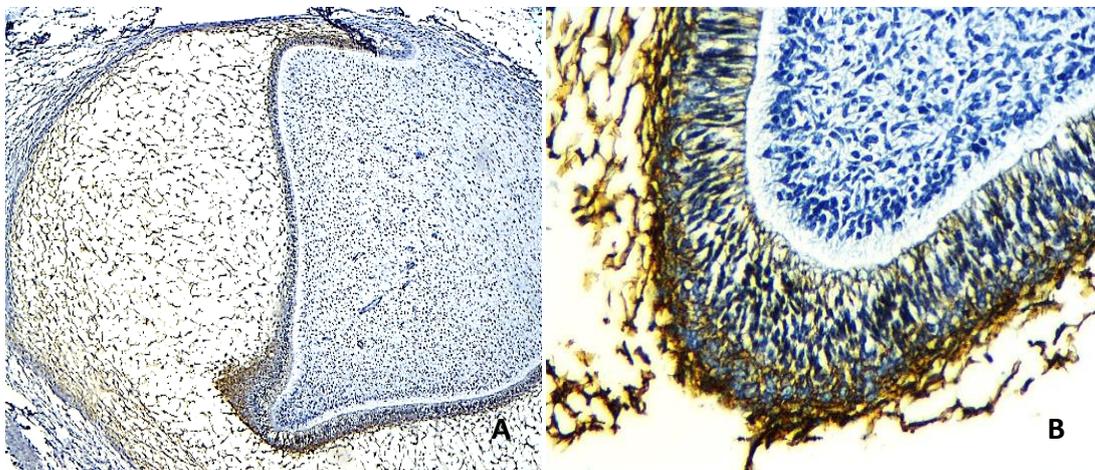


*Figura 6. Inmunexpresión de MOC-31 en carcinoma ameloblástico. A, B- Positividad intensa para MOC-31 en membrana y citoplasma de células epiteliales tumorales. 20x.*

En los GDs se observó de igual forma en el epitelio interno del órgano del esmalte, así como en el retículo estrellado adyacente al mismo (Figura 7).



*Figura 7. Inmunopresión de MOC-31 en germen dentario en etapa de casquete. A- En el asa cervical se observa una disminución de la inmunopresión. B- Intensa inmunopresión en epitelio y papila dental. C- Asa cervical con menor inmunopresión marcando etapa de desarrollo. 20x.*



*Figura 8. Gérmenes dentarios. Positividad intensa para MOC-31 en epitelio interno del órgano del esmalte y retículo estrellado. A-10x. B- 40x.*

Comparando los resultados obtenidos acerca de la expresión de MOC-31 entre los tipos AMEL, CA y GD, se observa una asociación significativa entre la expresión de la proteína y grupo de estudio, constatándose que el marcador se expresa más fuertemente en el grupo GD (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Distribución de la expresión de MOC-31 según grupo de estudio.**

Grupo de estudio	MOC 31				p-valor	CC
	++	+	Neg.	Total		
AMEL	4 (6,7%)	6 (10%)	50 (83,3%)	60 (100%)	<0,001	0,633
CA	1 (11,1%)	3 (33,3%)	5 (55,6%)	9 (100%)		
GD	9 (56,3%)	4 (25%)	3 (18,8%)	16 (100%)		
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>58</b>	<b>85</b>		

Neg: negativo o positivo <5% de las células, +: 5-50%, ++: >50%.

En lo referente a la distribución por género, se observó que el 58,3% de las muestras en el grupo AMEL era femenino, mientras que en el grupo CA dicho porcentaje fue de 44,5%.

En cuanto a la edad media de presentación, para el grupo AMEL resultó en 39,1 +- 18,8 años, mientras que para el grupo CA ascendió a 56,0 +- 10,5 años.

La distribución de los casos en cuanto a las variantes clínicas del AMEL, considerando la clasificación de OMS 2017, fue la siguiente: convencional 71.2%, uniuquístico 22%, periférico 6.8% y metastatizante 0%.

Respecto a la distribución histológica de los casos de AMEL, los datos arrojaron los siguientes resultados. En cuanto a la variante convencional: plexiforme 36,7%, folicular 25%, acantomatoso 6,7%, desmoplásico 1,7%; uniuquístico: luminal 11,7%, intraluminal 1,7% y mural 8,3%; y periférico 6,7%.

En cuanto a la relación de la inmunexpresión del marcador MOC-31 con las variables género, edad, variante clínica y tipo histológico en el grupo AMEL, no se logró detectar ninguna asociación estadísticamente significativa (Cuadro 6 y 7).

**Cuadro 6. Inmunoexpresión de MOC-31 en relación a variables género, edad, variante clínica y tipo histológico en grupo AMEL.**

	MOC-31			p-valor	CC
	++	+	Neg.		
<b>Sexo</b>					
Femenino	2	3	30	0,842	0,106
Masculino	2	3	20		
<b>Edad (años)</b>					
Hasta 20	1	2	10	0,873	0,243
20 a 40	1	3	17		
40 a 60	1	1	15		
Más de 60	1	0	9	0,443	0,230
Hasta 30	2	4	20		
Más de 30	2	2	30		
<b>Variante clínica</b>					
Convencional	4	4	34	0,635	-
Uniquístico	0	2	11		
Periférico	0	0	4		
<b>Tipo histológico</b>					
<b>Convencional</b>					
Plexiforme (22)	4	2	16	0,568	-
Folicular (15)	0	2	13		
Acantomatoso (4)	0	0	4		
Desmoplásico (1)	0	0	1		
<b>Uniquístico</b>					
Intraluminal	0	0	1	0,8737	-
Luminal	0	1	6		
Mural	0	1	4		

Neg: negativo o positivo <5% de las células, +: 5-50%, ++: >50%.

En el caso de las muestras correspondientes al grupo CA, los datos arrojaron resultados similares respecto al grupo AMEL, en relación al género y la edad, no observando asociación significativa entre las variables mencionadas (Cuadro 8).

**Cuadro 7. Inmunoexpresión de MOC-31 en relación a variables género y edad en grupo CA.**

	MOC-31			p-valor	CC
	++	+	Neg.		
<b>Sexo</b>					
Femenino	0	1	3	0,487	0,523
Masculino	1	2	2		
<b>Edad</b>					
Hasta 40	0	0	1	0,281	0,762
40 a 60	1	0	3		
Más de 60	0	2	1		

Neg: negativo o positivo <5% de las células, +: 5-50%, ++: >50%.

Entre los datos del grupo GD, la distribución de la etapa gestacional fue la siguiente: brote 18,7%, casquete 43,7% y campana 37,8%.

En referencia a la asociación entre la inmunoexpresión del marcador MOC-31 y la etapa formativa de los GDs, se puede observar que, a pesar de obtenerse un valor moderado del CC, no se logra alcanzar un nivel suficiente de evidencia para confirmar como significativa la asociación entre ambos (Cuadro 9).

**Cuadro 8. Inmunoexpresión de MOC-31 en relación a la etapa gestacional en grupo GD.**

Etapa gestacional	MOC-31			p-valor	CC
	++	+	Neg.		
Brote	0	2	1	0,278	0,602
Casquete	5	1	1		
Campana	4	1	1		

Neg: negativo o positivo <5% de las células, +: 5-50%, ++: >50%.

## 8) DISCUSIÓN

La morfogénesis de tejidos y órganos ocurre como resultado de interacciones entre diversas poblaciones celulares. Un tipo importante de interacción intercelular implicada en los procesos de morfogénesis tisular, son las adherencias mediadas por moléculas de adhesión celular (190) (191). Se cree que las moléculas de adhesión celular son responsables y cruciales en una variedad de procesos dinámicos que incluyen la locomoción, proliferación y diferenciación celular. Por otra parte, existe evidencia que los sistemas de adhesión dentro de una célula pueden actuar como reguladores de otras

adhesiones celulares, ofreciendo así un medio de señalización de relevancia en la organización de células o tejidos (192) (191).

Aunque Ep-CAM se expresa normalmente en los tejidos epiteliales adultos, también está presente en células madre embrionarias durante el desarrollo embrionario. Esta expresión embrionaria temprana de Ep-CAM en precursores no epiteliales es una característica que esta molécula comparte con otras CAM (184). La mayoría de las CAM se expresan durante la embriogénesis, desde las primeras etapas de desarrollo, de una manera específica en los tejidos (193). En algunos tipos celulares epiteliales, aunque Ep-CAM se expresa durante el proceso de embriogénesis; típicamente deja de expresarse en las células epiteliales adultas diferenciadas terminalmente. Por ejemplo, las células progenitoras del epitelio de la piel expresan Ep-CAM, mientras que los queratinocitos diferenciados no lo hacen (161). Hallazgos similares se describen en cuanto al desarrollo de los islotes pancreáticos; mientras los niveles de Ep-CAM son elevados en células de los islotes pancreáticos fetales, la diferenciación endocrina de estas células se asocia con una regulación negativa de la expresión de esta proteína (159).

En este estudio la expresión de Ep-CAM en GDs resultó positiva en un 81.3% de los casos, lo que concuerda con resultados obtenidos por varias investigaciones, acerca de la expresión de la proteína en distintos epitelios en sus etapas de morfogénesis (160) (161) (159). La positividad de Ep-CAM en los GDs puede asociarse a la importancia que presenta esta molécula morforreguladora en el crecimiento, diferenciación y organización celular durante las etapas formativas de las piezas dentarias.

La expresión marcada de Ep-CAM en las células del epitelio interno del órgano del esmalte y el retículo estrellado, puede explicar la importancia que adquiere la cohesión celular a nivel de estos estratos, durante las dos grandes fases que involucran a la formación dentaria: la morfo diferenciación, que consiste en el desarrollo del patrón coronario y radicular; y la posterior cito diferenciación, que conduce a la formación de los distintos tipos de tejidos dentarios: el esmalte, la dentina y la pulpa. La integridad de la capa de epitelio interno del esmalte, garantizada en gran medida por las estrechas uniones celulares, en las etapas de brote, casquete y campana, permite el cumplimiento de sus diversas funciones, entre las que se destacan la interacción con las células del tejido conectivo adyacentes, diferenciándose en odontoblastos e induciendo la formación de dentina; la diferenciación en ameloblastos y formación de la matriz de esmalte; la maduración del esmalte y la protección del esmalte maduro (epitelio reducido del órgano del esmalte). Por su parte, el retículo estrellado mantiene su estructura a través de uniones celulares de tipo desmosomas, formando una red celular continua, lo que asegura sus funciones metabólicas y morfogenéticas (11) (194) (195) .

Por otra parte, las CAM pueden influir en el desarrollo de las enfermedades y sus características biológicas, sugiriendo una diferenciación o maduración alterada en los tejidos patológicos. Los cambios observados en los patrones de expresión de estas moléculas, pueden contribuir a establecer un diagnóstico (196).

La pérdida de adhesión y cohesión célula-célula y matriz extracelular se encuentran entre los primeros eventos que ocurren en el crecimiento e invasión de los tumores de origen epitelial (109). La pérdida de adhesión celular favorece la motilidad de las células neoplásicas, especialmente en las neoplasias malignas, favoreciendo la progresión, invasión, recurrencia y metástasis (154). Durante y después de la transformación maligna, se ha observado expresión aberrante, regulación al alza y a la baja, o expresión de novo de diversas CAM (166).

Ep-CAM se sobreexpresa en una variedad de carcinomas y metástasis (164), posiblemente promoviendo una proliferación y crecimiento tumoral / metastásico sostenido (168). Su expresión se ha observado en células iniciadoras de tumores y en células tumorales diseminadas, por lo que es considerada candidata para el diagnóstico y la terapia de tumores (197) (167) (198).

Los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis continúan sin esclarecerse (7). Hay informes que sugieren que los mecanismos relacionados con Ep-CAM pueden promover el crecimiento tumoral, induciendo, por ejemplo, la inmunosupresión y la proliferación de células tumorales (185). Maetzel et al. (2009), describen a la proteólisis intramembrana de Ep-CAM como un mecanismo de activación de la señalización oncogénica, debido a la liberación del dominio citoplásmico EpICD, y su posterior translocación al núcleo (156). La acumulación nuclear y citoplásmica de EpICD fue observada en la mayoría de los cánceres epiteliales, asociada a mayor recurrencia, metástasis y muerte de los pacientes (199). Así mismo, la pérdida de EpEx membranoso es descrita como un evento común en los cánceres epiteliales humanos (200). Los mismos autores pudieron demostrar que, en las células tumorales malignas, el desprendimiento de EpICD del núcleo activa la transcripción de genes asociados con la proliferación celular, como c-Myc y ciclinas A y E, promoviendo así la oncogénesis (156).

Algunos autores aluden que, el hecho de que Ep-CAM se informe como un marcador de pronóstico negativo en ciertas entidades tumorales y positivo en otras, sugiere que el papel de esta molécula en la carcinogénesis, esté estrechamente relacionado con la biología tumoral de las diferentes entidades (201).

El AMEL es la neoplasia odontogénica benigna de origen epitelial más frecuente, cuyo comportamiento localmente agresivo, infiltrante y con alta tasa de recurrencia, representan un desafío su manejo terapéutico (202). La contraparte maligna CA, a pesar de su rareza, es la neoplasia

odontogénica más frecuente. Su rápido crecimiento e invasividad, implican un reto su diagnóstico y tratamiento (78) (41).

Diversas moléculas de adhesión han sido caracterizadas en AMEL. Se ha observado que la pérdida de los genes que codifican E-cadherina, importante regulador de la adhesión celular, puede estar asociada con la progresión tumoral en los AMELs, debido a que los tumores pobremente diferenciados presentaban una expresión reducida de la proteína (109). Se ha confirmado que la reducción o defecto de E-Cadherina está estrechamente relacionado también con la desdiferenciación, el crecimiento invasivo y la metástasis de los tumores, y tiene el potencial como factor pronóstico de tumor maligno (203). En relación a Syndecan-1, proteoglicano transmembrana de heparán sulfato (CD 138), regulador de muchos procesos biológicos como la organización del citoesqueleto y la adhesión celular, su expresión resultó disminuida en AMELs, lo que puede atribuirse al comportamiento agresivo de esta neoplasia. La pérdida de Syndecan-1 indica un pronóstico desfavorable en los tumores epiteliales (204).

En concordancia con lo descrito en el párrafo anterior, en este estudio se observó expresión negativa de Ep-CAM en un 83.3% de los casos de AMEL. No se observó correlación entre la expresión de Ep-CAM y las distintas variantes clínicas y tipos histológicos de las muestras analizadas, así como tampoco en relación al género y edad de los pacientes.

La regulación a la baja de Ep-CAM en AMEL, hipotetizamos que suprime significativamente las capacidades adhesivas de las células tumorales, pudiendo facilitar su distribución e infiltración de en los tejidos circundantes, confiriéndole características de progresión, invasión y alta tasa de recurrencia local a esta entidad. Esto sugiere que Ep-CAM está asociado al comportamiento tumoral tal vez cumpliendo una función en la pérdida de adhesión celular.

En referencia al CA, se destacan algunas investigaciones acerca de la expresión de las moléculas de adhesión en esta entidad. Un estudio comparativo entre AMEL convencional y CA, describe que CD138 fue la molécula de adhesión expresada con más fuerza en ambas neoplasias, mientras que la expresión de E-cadherina y  $\beta$ -catenina fue débil en la mayoría de los casos (205). Una actual investigación acerca de la expresión de claudinas en tumores odontogénicos, señala que la mayoría de los CA analizados no mostraron expresión a claudina-1, proteína transmembrana localizada en las uniones intercelulares estrechas (206). En ambas investigaciones, los autores sugieren la necesidad de ampliar el estudio en los CA debido a la escasez de casos, para lograr una mejor comprensión de sus aspectos clínicos y biológicos (205) (206).

En este estudio la expresión de Ep-CAM en CA mostró 55.6% de negatividad en los casos. Esta regulación a la baja creemos podría asociarse a la pérdida de cohesión celular y desdiferenciación celular que caracteriza a entidad maligna, lo que conduciría a una mayor agresividad e invasión hacia las estructuras vecinas. Algunos autores sugieren que, cuando ocurre disminución de la expresión de Ep-CAM en tumores indiferenciados, puede presentarse sobreexpresión de otras proteínas promotoras de crecimiento, que expliquen la proliferación y desarrollo neoplásico (207) (208).

Considerando la relativa mayor expresión de Ep-CAM en el CA respecto a su variante benigna, surge la interrogante acerca de un posible rol de esta molécula en el desarrollo de los cambios morfológicos que sufre el epitelio odontogénico al asumir una transformación maligna. Sin embargo, debido a la escasa casuística de este tumor y los resultados obtenidos, no es posible confirmar esta hipótesis, lo que constituye la principal limitante de nuestra investigación.

## **9) CONCLUSIONES**

En relación a nuestros hallazgos, resulta interesante la mayor expresión de Ep-CAM en el tejido embriológico normal respecto al tejido tumoral.

La inmunoexpresión de Ep-CAM en las distintas etapas de los GD, explican la importancia que adquiere esta proteína morforeguladora en la odontogénesis.

La pérdida de expresión de Ep-CAM en el AMEL, puede relacionarse a los primeros eventos que ocurren en la transformación neoplásica, como la pérdida de adhesión celular y organización arquitectural del epitelio. También puede conferir características de agresividad local a esta neoplasia.

Finalmente, en cuanto al CA, a partir de esta investigación surge la interrogante de la función de Ep-CAM en esta neoplasia maligna. Teniendo en cuenta los hallazgos descritos en la literatura acerca del valor pronóstico de la expresión de Ep-CAM, así como sus múltiples funciones celulares, en dependencia al tipo, el origen o incluso la etapa de progresión del tumor, consideramos que se requiere ampliar la investigación de este biomarcador en esta neoplasia, y conjuntar mayor casuística con trabajos multicéntricos más grandes.

## 10) REFERENCIAS

1. **Mosqueda-Taylor A.** *New findings and controversies in odontogenic tumors.* *Med Oral Patol Oral Cir Oral.* 2008;13(9):555-558.
2. **El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ.** *World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours.* Lyon, France: IARC Press; 2017. pp. 204-260.
3. **Lee SK, Kim YS.** *Current Concepts and Occurrence of Epithelial Odontogenic Tumors: I. Ameloblastoma and Adenomatoid Odontogenic Tumor.* *Korean J Pathol.* 2013;47(3):191–202.
4. **Niu Z, Li Y, Chen W, et al.** *Study on clinical and biological characteristics of ameloblastic carcinoma.* *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1):316.
5. **Litvinov SV, Velders MP, Bakker HAM, et al.** *Ep-CAM: A Human Epithelial Antigen is a Homophilic Cell-Cell Adhesion Molecule.* *J Cell Biol.* 1994;125(2):437–446.
6. **Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, et al.** *Epithelial cell adhesion molecule (ep-cam) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins.* *J Cell Biol.* 1997;139(5):1337-1348.
7. **Huang L, Yang Y, Yang F, et al.** *Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review).* *Int J Mol Med.* 2018;42(2):1771–1785.
8. **Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN.** *EpCAM: Structure and function in health and disease.* *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(8):1989–2001.
9. **Trzpis M, McLaughlin PM, De Leij LM, Harmsen MC.** *Epithelial cell adhesion molecule: More than a carcinoma marker and adhesion molecule.* *Am J Pathol.* 2007;171:386–395.
10. **Nelson G, Ordóñez MD.** *Value of the MOC-31 monoclonal antibody in differentiating epithelial pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma.* *Human Pathology.* 1998;29(2):166-169.
11. **Nanci, A.** *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function.* 9th ed. Elsevier; 2017. pp. 178-231.
12. **Mass R, Bei M.** *The genetic control of early tooth development.* *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1997;8(1):4-39.
13. **Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D.** *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* Lyon, France: IARC Press; 2005. pp. 284-327.
14. **Jaeger F, de Noronha MS, Silva ML, et al.** *Prevalence profile of odontogenic cysts and tumors on Brazilian sample after the reclassification of odontogenic keratocyst.* *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45:267–70. .
15. **Da Silva LP, Serpa MS, Tenório JR, et al.** *Retrospective study of 289 odontogenic tumors in a Brazilian population.* *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(3):271-275.
16. **Koivisto T, Bowles WR, Rohrer M.** *Frequency and Distribution of Radiolucent Jaw Lesions: A Retrospective Analysis of 9,723 Cases.* *J Endod.* 2012;38(6):729-32.
17. **Mamabolo M, Noffke C, Raubenheimer E.** *Odontogenic tumours manifesting in the first two decades of life in a rural African population sample: a 26 year retrospective analysis.* *Dentomaxillofac Radiol.* 2011;40:331–7.

18. **Jing W, Xuan M, Lin Y, et al.** *Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population.* *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(1):20-25.
19. **Siriwardena BSMS, Tennakoon TMPB, Tilakaratne WM.** *Relative frequency of odontogenic tumors in Sri Lanka: Analysis of 1677 cases.* *Pathology – Research and Practice.* 2012;208(4):225-230.
20. **Berger AJ, Son J, Desai NK.** *Malignant ameloblastoma: concurrent presentation of primary and distant disease and review of the literature.* *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(10):2316-2326.
21. **Cusack JW.** *Report of the amputations of the lower jaw.* *Dubl Hosp Rec.* 1827;4:1–38.
22. **Malassez L.** *The role of debris on EPITHELIAL papdentaires.* *Arch Physiol Norm Pathol.* 1885;5:309–40. 6:379-449.
23. **Ivy R, Curtis L.** *Adamantinoma of the jaw.* *Ann Surg.* 1937;105:125–134.
24. **Masthan KMK, Anitha N, Krupaa J, Manikkam.** *Ameloblastoma.* *J. Pharm Bioallied Sci.* 2015;7(1):167-170.
25. **Nurdiansyah F, Van Cann E, Helder MN, et al.** *Global incidence and profile of ameloblastoma: A systematic review and meta-analysis.* *Oral Diseases.* 2020;26(1):12–21.
26. **Lasisi TJ, Adisa AO, Olusanya AA.** *Appraisal of jaw swellings in a Nigerian tertiary healthcare facility.* *J Clin Exp Dent.* 2013;5(1):42-47.
27. **Oginni FO, Stoelinga PJ, Ajike SA, et al.** *A prospective epidemiological study on odontogenic tumours in a black African population, with emphasis on the relative frequency of ameloblastoma.* *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(9):1099–1105.
28. **Adisa AO, Osayomi T, Effiom OA, et al.** *A geographical analysis of ethnic distribution of jaw ameloblastoma in Nigerians.* *Afri Health Sci.* 2019;19(1):1677-1686.
29. **McClary AC, West RB, McClary AC, et al.** *Ameloblastoma: a clinical review and trends in management.* *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016;273(7):1649-1661.
30. **De Medeiros WK, Da Silva LP, Santos PP, et al.** *Clinicopathological analysis of odontogenic tumors over 22 years period: Experience of a single center in northeastern Brazil.* *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2018;23(6):664-671.
31. **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):193-200.
32. **Olusanya AA, Adisa AO, Lawal AO, Arotiba JT.** *Gross surgical features and treatment outcome of ameloblastoma at a Nigerian tertiary hospital.* *Afr J Med Med Sci.* 2013;42(1):59-64.
33. **Oomens MA, van der Waal I.** *Epidemiology of ameloblastomas of the jaws; a report from the Netherlands.* *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014;19(6):581-583.
34. **Bansal S, Desai RS, Shirsat P, et al.** *The occurrence and pattern of ameloblastoma in children and adolescents: an Indian institutional study of 41 years and review of the literature.* *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(6):725-7.
35. **Shafer GW, Hine MK, Levy BM.** *A textbook of oral pathology.* 3rd ed. US, Philadelphia: WB Saunders; 1974. p. 276.

36. **Yoon HJ, Hong SP, Lee JI, et al.** *Ameloblastic carcinoma: an analysis of 6 cases with review of the literature. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2009;108(6):904-913.
37. **Martinez Martinez M, Mosqueda-Taylor A, Carlos R, et al.** *Malignant odontogenic tumors: a multicentric latin American study of 25 cases. Oral diseases.* 2014;20(4):380-385.
38. **Ponnam S, Srivastava G, Sudhakar GS.** *Ameloblastic Carcinoma with diverse histological features: a case report. International Journal of Oral & Maxillofacial Pathology.* 2012;3:60-64.
39. **Oladele Soyele O, Emmanuel Adebisi K, et al.** *Ameloblastic carcinoma: a clinicopathologic analysis of cases seen in a Nigerian Teaching Hospital and review of literature. Pan African Medical Journal.* 2019;31:208.
40. **Dhir K, Sciubba J, Tufano RP.** *Ameloblastic carcinoma of the maxilla. Oral Oncol.* 2003;39(7):736-741.
41. **Li J, Du H, Li P, et al.** *Ameloblastic carcinoma: an analysis of 12 cases with a review of the literature. Oncology letters.* 2014;8(2):914920.
42. **Pindborg JJ, Kramer IRH.** *Histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts, and allied lesions. Geneva: World Health Organization; 1971.*
43. **Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M.** *The WHO histological typing of odontogenic tumours. A commentary on the second edition. Cancer.* 1992;70(12):2988-94.
44. **Wright JM, Vered M.** *Update from the 4th Edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumors. Head and Neck Pathol.* 2017;11(1):68-77.
45. **Speight PM, Takata T.** *New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. Virchows Arch.* 2018;472(3):331-339.
46. **Li TJ, Wu YT, Yu SF, Yu GY.** *Unicystic ameloblastoma: a clinicopathologic study of 33 Chinese patients. Am J Surg Pathol.* 2000;24(10):1385-1392.
47. **Pundir S, Saxena S, Rathod V, Aggrawal P.** *Ameloblastic carcinoma: Secondary dedifferentiated carcinoma of the mandible: report of a rare entity with a brief review. J Oral Maxillofac Pathol.* 2011;15(2):201-204.
48. **Panda S, Sahoo SR, Srivastav G, et al.** *Pathogenesis and nomenclature of odontogenic carcinomas: revisited. Journal of oncology.* 2014;2014:197425.
49. **Elzay RP.** *Primary intraosseous carcinoma of the jaws: review and update of odontogenic carcinomas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;54(3):299-303.
50. **Slootweg PJ, Müller H.** *Malignant ameloblastoma or ameloblastic carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984;57(2):168-176.
51. **Karakida K, Aoki T, Sakamoto H, et al.** *Ameloblastic carcinoma, secondary type: a case report. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics.* 2010;110(6):3337.
52. **Wright JM, Odell EW, Speight PM, Takata.** *Odontogenic tumors, WHO 2005: where do we go from here? Head Neck Pathol.* 2014;8(4):373-382.
53. **Effiom OA, Ogundana OM, Akinshipo AO, Akintoye SO.** *Ameloblastoma: current etiopathological concepts and management. Oral Dis.* 2018;24(3):307-316.

54. **Neville B, Damm D, Allen C, Chi A.** *Oral and Maxillofacial Pathology*. 4th ed. 2016; pp. 653-662.
55. **Philipsen HP, Reichart PA, Takata T.** *Desmoplastic ameloblastoma (including "hybrid" lesion of ameloblastoma). Biological profile based on 100 cases from the literature and own files.* *Oral Oncol.* 2001;37:455-460.
56. **Sun ZJ, Wu YR, Cheng N, et al.** *Desmoplastic ameloblastoma- a review.* *Oral Oncol.* 2009;45(9):752-759.
57. **Bassey GO, Osunde OD, Anyanechi CE.** *Maxillofacial tumors and tumor-like lesions in a Nigerian teaching hospital: an eleven year retrospective analysis.* *Afr Health Sci.* 2014;14(1):56-63.
58. **Suluk-Tekkeşin M, Wright J.** *The World Health Organization classification of odontogenic lesions: a summary of the changes of the 2017 (4th) edition.* *Turk Patoloji Derg.* 2018;34(1).
59. **Hertog D, Bloemena E, Aartman IH, Van-Der-Waal I.** *Histopathology of ameloblastoma of the jaws; some critical observations based on a 40 years single institution experience.* *Med Oral Patol Oral Cir bucal.* 2012;17(1):76-82.
60. **Robinson L, Martinez MG.** *Unicystic ameloblastoma. A prognostically distinct entity .* *Cancer.* 1977;40(5):2278–2285.
61. **Dhanuthai K, Chantarangsu S, Rojanawatsirivej S, et al.** *Ameloblastoma: a multicentric study.* *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;113(6):782-788.
62. **Lee PK, Samman N, Ng IO.** *Unicystic ameloblastoma- use of Carnoy's solution after enucleation.* *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(3):263-267.
63. **Eversole LR, Leider AS, Strub D.** *Radiographic characteristics of cystogenic ameloblastoma.* *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984;57(5):572-577.
64. **Philipsen HP, Reichart PA.** *Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature.* *Oral Oncol.* 1998;34(5):317-325.
65. **Bajpai M, Agarwal D, Bhalla A, et al.** *Multilocular unicystic ameloblastoma of mandible.* *Case Rep Dent.* 2013;2013:835892.
66. **Ackermann GL, Altini M, Shear M.** *The unicystic ameloblastoma: a clinicopathological study of 57 cases.* *J Oral Pathol.* 1988;17(9-10):541–6.
67. **Li TJ, Kitano M, Arimura K, Sugihara K.** *Recurrence of unicystic ameloblastoma: a case report and review of the literature.* *Arch Pathol Lab Med.* 1998;122(4):371-374.
68. **Zainab C, Vandana S, Pal US, Pankaj S.** *Unicystic ameloblastoma: a diagnostic dilemma.* *Natl J Maxillofac Surg.* 2011;2(1):89–92.
69. **Vickers RA, Gorlin RJ.** *Ameloblastoma: Delineation of early histopathologic features of neoplasia.* *Cancer.* 1970;26(3):699-710.
70. **Philipsen HP, Reichart PA, Nikai H, et al.** *Peripheral ameloblastoma: biological profile based on 160 cases from the literature.* *Oral Oncol.* 2001;37(1):17–27.
71. **Odukoya O, Effiom OA.** *Clinicopathological study of 100 Nigerian cases of ameloblastoma.* *Niger Postgrad Med J.* 2008;15(1):1-5.
72. **Siar CH, Lau SH, Ng KH.** *Ameloblastoma of the jaws: a retrospective analysis of 340 cases in a Malaysian population.* *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(3):608-615.

73. **Rizzitelli A, Smoll NR, Chae MP, et al.** *Incidence and overall survival of malignant ameloblastoma. PLoS One.* 2015;10(2):0117789.
74. **Smullin SE, Faquin W, Ausarla SM, Kaban LB.** *Peripheral desmoplastic ameloblastoma: report of a case and literature review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(1):37-40.
75. **Gardner DG.** *Peripheral ameloblastoma: a study of 21 cases, including 5 reported as basal cell carcinoma of the gingiva. Cancer.* 1977;39(4):1625–1633.
76. **Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, et al.** *Podoplanin expression profiles characteristic of odontogenic tumor-specific tissue architectures. Pathol Res Pract.* 2012;208(3):140–146.
77. **Lolachi CM, Madan SK, Jacobs JR.** *Ameloblastic carcinoma of the maxilla. J Laryngol Otol.* 1995;109(10):1019–1022.
78. **Ladeinde AL, Ajayi OF, Ogunlewe MO, et al.** *Odontogenic tumors: a review of 319 cases in a Nigerian teaching hospital. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics.* 2005;99(2):191-195.
79. **Brown NA, Betz BL.** *Ameloblastoma: a review of recent molecular pathogenetic discoveries. Biomark Cancer.* 2015;7(2):19-24.
80. **Brown NA, Rolland D, McHugh JB, et al.** *Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. Clin Cancer Res.* 2014;20(21):5517-5526.
81. **Sweeney RT, McClary AC, et al.** *Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. Nat Genet.* 2014;46(7):722-725.
82. **Cantwell-Dorris E.R., O’Leary J.J., Sheils O.M.** *BRAFV600E: Implications for carcinogenesis and molecular therapy. Mol. Cancer Ther.* 2011;10:385–394.
83. **Lavoie H, Therrien M.** *Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16:281–98. .
84. **Chung E, Kondo M.** *Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development. Immunol Res.* 2011;49:248–268.
85. **Zhang Z, Zhou X, Shen H, et al.** *Phosphorylated ERK is a potential predictor of sensitivity to sorafenib when treating hepatocellular carcinoma: evidence from an in vitro study. BMC Med.* 2009;7:41.
86. **González-González R, López-Verdín S, Lavallo-Carrasco J, et al.** *Current concepts in ameloblastoma-targeted therapies in B-raf proto-oncogene serine/threonine kinase V600E mutation: Systematic review. World J Clin Oncol.* 2020;11(1):31–42.
87. **Davies H., Bignell G. R., Cox C., et al.** *Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature.* 2002;417(6892):949–954.
88. **Jhamb T, Kramer JM.** *Molecular concepts in the pathogenesis of ameloblastoma: implications for therapeutics. Exp Mol Pathol.* 2014;97(3):345-353.
89. **Xing M, et al.** *Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. J. Clin. Oncol.* 2015;33(1):42–50.
90. **Safae Ardekani G, Jafarnejad SM, Tan L, et al.** *The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. PLoS ONE.* 2012;7(10):47054.

91. **Summers MG, et al.** *BRAF and NRAS locus-specific variants have different outcomes on survival to colorectal cancer.* *Clin. Cancer Res.* 2017; 23(11):2742–2749.
92. **Diniz MG, Gomes CC, et al.** *Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours.* *Tumour biol.* 2015;36(7):5649-5653.
93. **Gurgel CA, Buim ME, Carvalho KC, et al.** *Transcriptional profiles of SHH pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma.* *J Oral Pathol Med.* 2014;43(8):619–626.
94. **Fuchigami T, Ono Y, Kishida S, Nakamura N.** *Molecular biological findings of ameloblastoma.* *Jpn Dent Sci Rev.* 2021;57:27-32. .
95. **Stefanik D, Sarin J, Lam T, et al.** *Disparate osteogenic response of mandible and iliac crest bone marrow stromal cells to pamidronate.* *Oral Dis.* 2008;14(5):465-471.
96. **Boyce B.F., Xing L.** *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling.* *Arch Biochem Biophys.* 2008;473:139–146.
97. **Liu W., Zhang X.** *Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review)* *Mol Med Rep.* 2015;11:3212–3218.
98. **De Matos FR, De Moraes M, et al.** *Immunohistochemical detection of receptor activator nuclear kappaB ligand and osteoprotegerin in odontogenic cysts and tumors.* *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(11):1886-1892.
99. **Affo S., Yu L.X., Schwabe R.F.** *The role of cancer-associated fibroblasts and fibrosis in liver cancer.* *Annu Rev Pathol.* 2017;12:153–186.
100. **Fuchigami T., Kibe T., et al.** *Regulation of IL-6 and IL-8 production by reciprocal cell-to-cell interactions between tumor cells and stromal fibroblasts through IL-1alpha in ameloblastoma.* *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;451:491–496.
101. **Nagase H., Visse R., Murphy G.** *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.* *Cardiovasc Res.* 2006;69:562–573.
102. **Ribeiro BF, Iglesias DP, Nascimento GJ, et al.** *Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor.* *Oral Dis.* 2009;15:472-477.
103. **Zhang B, Zhang J, Huang HZ, et al.** *Expression and role of metalloproteinase-2 and endogenous tissue regulator in ameloblastoma.* *J Oral Pathol Med.* 2009;39:219-222.
104. **Florescu A, Margaritescu C, Simionescu CE, Stepan A.** *Immunohistochemical expression of MMP-9, TIMP-2, E-cadherin and vimentin in ameloblastomas and their implication in the local aggressive behavior of these tumors.* *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(4):975-984.
105. **Nunia K., Urs A.B., Kumar P.** *Interplay between MMP-9 and TIMP-2 regulates ameloblastoma behavior and tooth morphogenesis.* *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24:364–372.
106. **de Andrade Santos P.P., Nonaka C.F.W., et al.** *Immunohistochemical analysis of MMP-13 and EMMPRIN in epithelial odontogenic lesions.* *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019;276:3203–3211.
107. **Siar CH, Ishak I, Ng KH.** *Podoplanin, E-cadherin, beta-catenin, and CD44v6 in recurrent ameloblastoma: their distribution patterns and relevance.* *J Oral Pathol Med.* 2015;44(1):51-58.
108. **Al-Otaibi O, Khounganian R, Anil S, Rajendran R.** *Syndecan-1 (CD 138) surface expression marks cell type and differentiation in ameloblastoma, keratocystic odontogenic tumor, and dentigerous cyst.* *J Oral Pathol Med.* 2013;42(2):186-193.

109. **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 Buccal.* 2014;19(1):8–14.
110. **Modolo F, Martins MT, Loducca SV, de Araújo VC.** *Expression of integrin subunits alpha2, alpha3, alpha5, alphav, beta1, beta3 and beta4 in different histological types of ameloblastoma compared with dental germ, dental lamina and adult lining epithelium. Oral Dis.* 2004;10:277–82.
111. **Bello IO, Soini Y, Slootweg PJ, Salo T.** *Claudins 1, 4, 5, 7 and occludin in ameloblastomas and developing human teeth. J Oral Pathol Med.* 2007;36:48–54.
112. **Suzuki H, Sugimura H, Kitayama Y, et al.** *Expression of p16INK4A in ameloblastoma: Immunohistochemical and FISH analysis. Oral Med Pathol.* 2010;14:99–105.
113. **Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, et al.** *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(2):174-179.
114. **Kumar H, Vandana R, Kumar G.** *Immunohistochemical expression of cyclin D1 in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. J Oral Maxillofac Pathol.* 2011;15:283–7. .
115. **Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, et al.** *Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-1(FGF-1) and FGF-2 in cultured human ameloblastoma epithelial cells and ameloblastoma tissues. J Oral Pathol Med.* 1995;24:387–92.
116. **Kumamoto H, Ohki K, Ooya K.** *Association between vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and tumor angiogenesis in ameloblastomas. J Oral Pathol Med.* 2013;71:62–5.
117. **Sulzbacher I, Wick N, Pichlhofer B, Mazal PR.** *Expression of platelet-derived growth factor-AA and platelet-derived growth factor-alpha receptor in ameloblastomas. J Oral Pathol Med.* 2008;37:235–40.
118. **Kumamoto H, Kimi K, Ooya K.** *Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors (Fas, Fas ligand, caspase-3 and single-stranded DNA) in ameloblastomas. J Oral Pathol Med.* 2001;30:596–602.
119. **Luo HY, Yu SF, Li TJ.** *Differential expression of apoptosis-related proteins in various cellular components of ameloblastomas. Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35:750–5.
120. **Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, et al.** *p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14 proteins in ameloblastomas. J Oral Pathol Med.* 2004;33:292–9.
121. **Khojasteh A, Khodayari A, Rahimi F, et al.** *Hypermethylation of p16 tumor-suppressor gene in ameloblastic carcinoma, ameloblastoma, and dental follicles. J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71:62–5.
122. **Scheper MA, Chaisuparat R, Nikitakis NG, Sauk JJ.** *Expression and alterations of the PTEN/AKT/mTOR pathway in ameloblastomas. Oral Dis.* 2008;14:561–8.
123. **Pereira NB, Pereira KM, Coura BP, et al.** *BRAF V600E mutation in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. J Oral Pathol Med.* 2016; 45(10):780-785.
124. **Brunner P, Bihl M, Jundt G, et al.** *BRAF p.V600e mutations are not unique to ameloblastoma and are shared by other odontogenic tumors with ameloblastic morphology. Oral Oncol.* 2015;51(10):77-78.
125. **Khan W, Augustine D, Rao RS, et al.** *Stem Cell Markers SOX-2 and OCT-4 Enable to Resolve the Diagnostic Dilemma between Ameloblastic Carcinoma and Aggressive Solid Multicystic Ameloblastoma. Adv Biomed Res.* 2018;7:149. .

126. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. *Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3.* *Genes & development.* 1995;9(21):2635–2645.
127. Chew JL, Loh YH, Zhang W, et al. *Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells.* *Molecular and cellular biology.* 2005;25(14):6031–6046.
128. Juuri E, Jussila M, Seidel K, et al. *Sox2 marks epithelial competence to generate teeth in mammals and reptiles.* *Development.* 2013;140:1424–32.
129. Luo W, Li S, Peng B, et al. *Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma.* *PLoS One.* 2013; 8:56324.
130. Wuebben E, Rizzino A. *The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview.* *Oncotarget.* 2017;8(27):44917–44943.
131. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. *The Oct4 protein: More than a magic stemness marker.* *Am J Stem Cells.* 2014;3:74–82.
132. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. *Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues.* *Cell.* 2005;121:465–77.
133. Yoon H.-J., Jo B.-C., Shin W.-J., et al. *Comparative immunohistochemical study of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma.* *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2011;112(6):767–776.
134. Neagu D, Escuder-de la Torre O, Vázquez-Mahía I, et al. *Surgical management of ameloblastoma. Review of literature.* *J Clin Exp Dent.* 2019;11:70–75.
135. Almeida RDAC., Andrade ESDS, Barbalho JC, et al. *Recurrence rate following treatment for primary multicystic ameloblastoma: Systematic review and meta-analysis.* *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016;45(3):359–367.
136. Laborde A, Nicot R, Wojcik T, et al. *Ameloblastoma of the jaws: Management and recurrence rate.* *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2017;134(1):7–11.
137. Hendra FN, Van Cann EM, Helder MN, et al. *Global incidence and profile of ameloblastoma: A systematic review and meta-analysis.* *Oral Diseases.* 2020;26:12–21.
138. Troiano G, Dioguardi M, Cocco A, et al. *Conservative vs Radical Approach for the Treatment of Solid/Multicystic Ameloblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis of the Last Decade.* *Oral Health Prev Dent.* 2017;15:421–6. .
139. Hendra FN, Natsir Kalla DS, Van Cann EM, et al. *Radical vs conservative treatment of intraosseous ameloblastoma: Systematic review and meta-analysis.* *Oral Diseases.* 2019;25:1683–96.
140. Infante-Cossio P, Prats-Golczer V, Gonzalez-Perez LM, et al. *Treatment of recurrent mandibular ameloblastoma.* *Exp Ther Med.* 2013;6(2):579–583.
141. Chae MP, Smoll NR, Hunter-Smith DJ, et al. *Establishing the natural history and growth rate of ameloblastoma with implications for management: systematic review and meta-analysis.* *PLoS One.* 2015;10(2):e0117241. .
142. De Silva I, Rozen WM, Ramakrishnan A, et al. *Achieving adequate margins in ameloblastoma resection: the role for intra-operative specimen imaging. Clinical report and systematic review.* *PLoS One.* 2012;7(10):47897. .

143. **Belli E, Rendine G, Mazzone N.** *Ameloblastoma relapse after 50 years from resection treatment.* *J Craniofac Surg.* 2009;20(4):1146–1149.
144. **Eckardt AM, Kokemüller H, Flemming P, Schultze A.** *Recurrent ameloblastoma following osseous reconstruction - a review of twenty years.* *J Cranio-Maxillofac Surg.* 2009;37(1):36–41.
145. **Basat SO, Öreroğlu AR, Orman C, et al.** *Recurrent ameloblastoma in the free fibula flap: review of literature and an unusual case report.* *J Maxillofac Oral Surg.* 2015;14(3):821–825.
146. **Sharma R, Menon S, Kulkarni V, Muralidharan CG.** *Recurrence of ameloblastoma in free fibula: were we expecting it?* *J Craniofac Surg.* 2016;27(3):813–814.
147. **Beecher SM, Lennon P, O'Shaughnessy M, Barry CP.** *Recurrent Ameloblastoma Involving Fibula Neomandible: Management with Digital Planning and Reconstruction Using a Contralateral Free Fibula Flap.* *Cureus.* 2020;12(4):7880.
148. **Kunze E, Donath K, Luhr HG, et al.** *Biology of metastasizing ameloblastoma.* *Pathol Res Pract.* 1985;180(5):526–35.
149. **Van Dam SD, Unni KK, Keller EE.** *Metastasizing (malignant) ameloblastoma: review of a unique histopathologic entity and report of Mayo Clinic experience.* *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(12):2962–2974.
150. **Huang CM, Chen JY, Chen CH, Huang CJ.** *Radiotherapy for a repeatedly recurrent ameloblastoma with malignant transformation.* *Head Neck.* 2014;36:1-3.
151. **Amzerin M, Fadoukhair Z, Belbaraka R, et al.** *Metastatic ameloblastoma responding to combination chemotherapy: case report and review of the literature.* *J Med Case Rep.* 2011;5:491.
152. **You Z, Liu SP, Du J, et al.** *Advancements in MAPK signaling pathways and MAPK-targeted therapies for ameloblastoma: A review.* *J Oral Pathol Med.* 2019;48:201–205.
153. **Aronson JK, Ferner RE.** *Biomarkers-A General Review.* *Curr Protoc Pharmacol.* 2017;76:9.23.1-9.23.17.
154. **Okegawa T, Pong RC, Li Y, Hsieh JT.** *The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy.* *Acta Biochim Pol.* 2004;51(2):445–457.
155. **Baeuerle PA, Gires O.** *EpCAM (CD326) finding its role in cancer.* *Br J Cancer.* 2007;96(3):417–423.
156. **Maetzel D, Denzel S, Mack B, et al.** *Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM.* *Nat Cell Biol.* 2009;11(2):162-171.
157. **Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, et al.** *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM).* *J Mol Med (Berl).* 1999;77(10):699-712.
158. **Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, et al.** *Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.* *Somatic Cell Genet.* 1979;5(6):957–971.
159. **Cirulli V, Crisa L, Beattie GM, et al.** *KSA antigen Ep-CAM mediates cell–cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development.* *J Cell Biol.* 1998;140(6):1519–1534.
160. **De Boer CJ, Van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV.** *Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver.* *J Pathol.* 1999;188(2):201–206.
161. **Klein CE, Cordon-Cardo C, Soehnchen R, et al.** *Changes in cell surface glycoprotein expression during differentiation of human keratinocytes.* *J Invest Dermatol.* 1987;89(5):500–506.

162. **Ryu HS, Lee K, Shin E, et al.** *Comparative analysis of immunohistochemical markers for differential diagnosis of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma.* *Tumori.* 2012;98(4):478-484.
163. **Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT.** *Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue.* *Breast Cancer Res Treat.* 2001;67(2):93–109.
164. **Went PT, Lugli A, Meier S, et al.** *Frequent EpCam protein expression in human carcinomas.* *Hum Pathol.* 2004;35(1):122–128.
165. **González-Lois C, Ballestín C, Sotelo MT, et al.** *Combined use of novel epithelial (MOC31) and mesothelial (HBME-1) immunohistochemical markers for optimal first line diagnostic distinction between mesothelioma and metastatic carcinoma of the pleura.* *Histopathology.* 2001;38(6):528-534.
166. **Momburg F, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Moller P.** *Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues.* *Cancer Res.* 1987;47(11):2883–2891.
167. **Keller L, Werner S, Pantel K.** *Biology and clinical relevance of EpCAM.* *Cell Stress.* 2019;3(6):165–180.
168. **Gires O, Pan M, Schinke H, et al.** *Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: Where are we after 40 years?* *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39(3):969-987.
169. **Chaves-Pérez A, Mack B, Maetzel D, et al.** *EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression.* *Oncogene.* 2013;32(5):641–650.
170. **Kroepil F, Dulian A, Vallböhmer D, et al.** *High EpCAM expression is linked to proliferation and lauren classification in gastric cancer.* *BMC Res Notes.* 2013;6:253.
171. **Wang MH, Sun R, Zhou XM, et al.** *Epithelial cell adhesion molecule overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via the PTEN/AKT/mTOR pathway.* *Cell Death Dis.* 2018;9(1):2.
172. **Pan M, Schinke H, et al.** *EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers.* *PLoS Biol.* 2018;16(9):2006624.
173. **Herreros-Pomares A, Aguilar-Gallardo C, et al.** *EpCAM duality becomes this molecule in a new Dr. Jekyll and Mr. Hyde tale.* *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;126:52–63.
174. **Songun I, Litvinov SV, Van de Velde CJ, et al.** *Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer.* *Br J Cancer.* 2005;92(9):1767–1772.
175. **Wang YY, Li L, Zhao ZS, et al.** *L1 and epithelial cell adhesion molecules associated with gastric cancer progression and prognosis in examination of specimens from 601 patients.* *J Exp Clin Cancer Res.* 2013;32(1):66.
176. **van der Gun BT, de Groot ML, Kazemier HG, et al.** *Transcription factors and molecular epigenetic marks underlying EpCAM overexpression in ovarian cancer.* *Br J Cancer.* 2011;105(2):312–319.
177. **Ng VY, Ang SN, Chan JX, Choo ABH.** *Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells.* *Stem Cells.* 2010;28(1):29–35.
178. **Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C.** *Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells.* *Cells.* 2020;9(8):1836.

179. **Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al.** *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.* *N. Engl. J. Med.* 2004;351(8):781–791.
180. **Yu M, Bardia A, Aceto N, et al.** *Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility.* *Science.* 2014;345(6193):216–220.
181. **De Bono JS, Tolcher AW, Forero A, et al.** *ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas.* *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7555–7565.
182. **Prang N, Preithner S, Brischwein K, et al.** *Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines.* *Br J Cancer.* 2005;92(2):342–349.
183. **Litvinov SV, Bakker HAM, Gourevitch MM, et al.** *Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion.* *Cell Adhes Commun* 1994;2(5):417-428.
184. **Choi D, Lee HJ, Jee S, et al.** *In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the embryoid body.* *Stem Cells.* 2005;23:817–827.
185. **Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, et al.** *EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy.* *Cancer Res.* 2004;64(16):5818–5824.
186. **López-Verdín S, Soto-Avila JJ, Zamora-Perez AL, et al.** *Patients with advanced oral squamous cell carcinoma have high levels of soluble E-cadherin in the saliva.* *Med oral, patol oral y cirugia bucal.* 2017;22(6):694.
187. **Dako.** *Hercep Test TM. Interpretation Manual Breast Cancer.* Agilent Technologies Company. Disponible en ([https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/28630\\_herceptest\\_interpretation\\_manual-breast\\_ihc\\_row.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/28630_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_row.pdf)) Acceso: (28/08/2021).
188. **Karl P.** «On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling.» *Philosophical Magazine* 5. 1900;50:157-175.
189. **Team R, Core R.** *A Language and Environment for Statistical Computing.* Vienna. 2019.
190. **Steinberg MS, Pool TJ.** *Cellular adhesive differentials as determinants of morphogenetic movements and organ segregation.* *In Developmental Order: Its Origin and Regulation.* 1982;351–378.
191. **Gumbiner BM.** *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.* *Cell.* 1996;84(3):345–357.
192. **Edelman G.M.** *A golden age for adhesion.* *Cell Adhes. Commun.* 1993;1(1):1–7.
193. **Tarmann T, Dohr G, Schiechl H, et al.** *Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development.* *Acta Anat (Basel).* 1990;137(2):141–145.
194. **Lesot H, Hovorakova M, Peterka M, Peterkova R.** *Three-dimensional analysis of molar development in the mouse from the cap to bell stage.* *Aust Dent J.* 2014;59(1):81-100.
195. **Svandova E, Peterkova R, Matalova E, Lesot H.** *Formation and Developmental Specification of the Odontogenic and Osteogenic Mesenchymes.* *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:640.
196. **Winter MJ, Nagtegaal ID, J. Van Krieken HJ, Litvinov SV.** *The Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) as a Morphoregulatory Molecule Is a Tool in Surgical Pathology.* *Am J Pathol.* 2003;163(6):2139–2148.

197. **Riesenberg R, Buchner A, Pohla H, Lindhofer H.** *Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3).* *J Histochem Cytochem.* 2001;49(7):911–917.
198. **Wang H, Stoecklein NH, Lin PP, Gires O.** *Circulating and disseminated tumor cells: diagnostic tools and therapeutic targets in motion.* *Oncotarget.* 2017; 8(1):1884–1912.
199. **Srivastava G, Assi J, Kashat L, et al.** *Nuclear Ep-ICD accumulation predicts aggressive clinical course in early stage breast cancer patients.* *BMC Cancer.* 2014;14:726.
200. **Fong D, Seeber A, Terracciano L, et al.** *Expression of EpCAMMF and EpCAMMT variants in human carcinomas.* *J Clin Pathol.* 2014;67(5):408–414.
201. **Woopen H, Pietzner K, Richter R, et al.** *Overexpression of the epithelial cell adhesion molecule is associated with a more favorable prognosis and response to platinum-based chemotherapy in ovarian cancer.* *J Gynecol Oncol.* 2014;25(3):221–228.
202. **Aramanadka C, Kamath AT, Kudva A.** *Recurrent Ameloblastoma: A Surgical Challenge.* *Case Rep Dent.* 2018; 2018:8271205.
203. **Behnsawy HM, Miyake H, Harada K, Fujisawa M.** *Expression patterns of epithelial-mesenchymal transition markers in localized prostate cancer: significance in clinicopathological outcomes following radical prostatectomy.* *BJU Int.* 2013;111(1):30–37.
204. **Leocata P, Villari D, Fazzari C, et al.** *Syndecan-1 and Wingless-type protein-1 in human ameloblastomas.* *J Oral Pathol Med.* 2007;36(7):394–9.
205. **Martínez-Martínez M, Mosqueda-Taylor A, Carlos-Bregni R, et al.** *Comparative histological and immunohistochemical study of ameloblastomas and ameloblastic carcinomas.* *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22(3):324–332.
206. **Phattararatip E, Sappayatosok K.** *The Significance of Relative Claudin Expression in Odontogenic Tumors.* *Head Neck Pathol.* 2020;14(2):480-488.
207. **Simon R, Atefy R, Wagner U, et al.** *HER-2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer.* *Int J Cancer.* 2003;107(5):764–772.
208. **Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, et al.** *Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer.* *Cancer Res.* 2004;64(23):8534–8540.

## 11) CRONOGRAMA

**Cuadro 9. Cronograma de actividades realizadas.**

		Trimestre 1	Trimestre 2	Trimestre 3	Trimestre 4	Trimestre 5	Trimestre 6	
	Actividades							Resultados esperados
1	Selección de las laminillas de AMEL n=60, CA n=9 y GD n=16. Análisis histológico de las laminillas.							Generar un banco de muestras de tejido tumoral y sano de los pacientes.
2	Realización de los ensayos inmunohistoquímicos de MOC-31.							Determinar la presencia “in situ” de la proteína en AMEL/CA y GD
3	Interpretación de los resultados obtenidos de inmunohistoquímica en los tumores.							Integrar la información obtenida mediante inmunohistoquímica con los criterios morfológicos tumorales.
4	Análisis global de los resultados.							Integrar la información inmunohistoquímica obtenida, elaborar conclusiones que permitan mejorar la comprensión acerca del comportamiento biológico de los tumores.
5	Escritura de artículo científico.							Generar un artículo científico.
6	Escritura de la tesis.							Finalizar el proyecto planteado.

## 12) ANEXOS

---

Article submitted to *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* in review process.

Prof. Prof. Jose V. Bagan  
Editor-in-Chief

*Medicina Oral Patologia Oral Cirugia Bucal*

I wish to submit for publication a manuscript titled “**Ep-CAM (MOC-31) expression in tooth germ and ameloblastoma**” in *Medicina Oral Patologia Oral Cirugia Bucal*. The paper was coauthored by Nathalie Derderian, Vanesa Pereira-Prado, Marcela Hernandez-Rios, Mario Isirdia-Espinoza, Miguel Arocena, Rogelio González-González, Omar Tremillo-Maldonado, Nelly Molina-Frechero. In this manuscript, we discuss the expression of Ep-CAM (MOC-31) in tooth germ and ameloblastoma by immunohistochemistry technique. We review the roles of Ep-CAM (MOC-31) in the relationship between ameloblastoma and tooth germ.

This manuscript was accepted by all the authors, has not been published or presented elsewhere in part or entirety, and is not under consideration by another journal. We have read and understand the *Medicina Oral Patologia Oral Cirugia Bucal* policies, and we believe that neither the manuscript nor the study violates any of these. There are no conflicts of interest to declare.

Thank you for your consideration. Sincerely,



---

Ronell Bologna-Molina  
Molecular Pathology Area, School of Dentistry Universidad de la  
Republica (UDELAR)  
Las Heras 1925, 14600  
Montevideo, Uruguay  
Email address: ronellbologna@odon.edu.uy

**Title: Ep-CAM (MOC-31) expression in tooth germ and ameloblastoma**

Nathalie Derderian <sup>1</sup>, Vanesa Pereira-Prado <sup>1</sup>, Marcela Hernandez-Rios <sup>2</sup>, Mario Isirdia-Espinoza <sup>3</sup>, Miguel Arocena <sup>4</sup>, Rogelio González-González <sup>5</sup>, Omar Tremillo-Maldonado <sup>5</sup>, Nelly Molina-Frechero <sup>6</sup>, Ronell Bologna-Molina <sup>1, 5\*</sup>.

1. Molecular Pathology, School of Dentistry Universidad de la República (UDELAR), Las Heras 1925, Montevideo 14600, Uruguay
2. Periodontal Biology Laboratory, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile.
3. Instituto de Investigación en Ciencias Médicas, Cuerpo Académico Terapéutica y Biología Molecular (UDG-CA-973), Departamento de Clínicas, División de Ciencias Biomédicas, Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, Tapatitlán de Morelos, Mexico.
4. Biochemistry and Biophysics, School of Dentistry Universidad de la República (UDELAR), Las Heras 1925, Montevideo 14600, Uruguay.
5. Department of Research, School of Dentistry, Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango 34070, Mexico
6. Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, 04900 Ciudad de México, Mexico.

Correspondence: Molecular Pathology, School of Dentistry Universidad de la República (UDELAR), Las Heras 1925, Montevideo 14600, Uruguay. [ronellbologna@odon.edu.uy](mailto:ronellbologna@odon.edu.uy)

**Running title:** Ep-CAM in tooth germ and ameloblastoma

**Key words:** Tooth germ, ameloblastoma, Ep-CAM, MOC-31, immunohistochemistry.

De: medoral.es <medoral@medoral.es>

Enviado: lunes, 15 de noviembre de 2021 13:33

Para: ronellbologna@hotmail.com <ronellbologna@hotmail.com>

Asunto: Med Oral Patol Oral Cir Bucal\_Ref.25145\_Date.2021-11-15

### Med Oral Patol Oral Cir Bucal

Indexed and abstracted in: Science Citation Index Expanded, Journal Citation Reports, Index Medicus, MEDLINE, PubMed, Scopus, Embase and Emcare, Indíce Médico Español, IBECs, Dialnet, Latindex

2021-11-15

Ref. 25145

Title: Ep-CAM (MOC-31) expression in tooth germ and ameloblastoma

Dr. Ronell Bologna-Molina

Email: ronellbologna@hotmail.com

PLEASE, follow the recommendations of our journal.

<http://www.medicinaoral.com/04b.pdf>

Dear Dr.

We inform you that your article has been evaluated by the reviewers; however, a series of changes are required before publication is possible (see the report below).

For submitting your **MODIFIED article**, please log in.... [www.medoral.es](http://www.medoral.es) and then click on ... Submissions needing revision (You do not have to Submit as a New Manuscript).

You must resubmit your article following the instructions of the journal.

#### **Please follow the journal guidelines when resubmitting your article. Resubmission directions are listed below.**

1. Log in to <http://www.medoral.es>

2. Click on "Submit a manuscript" for submitting a NEW articles. Click on "Submissions needing revision" for submitting a MODIFIED article.

3. Upload a word document entitled: "Letter to the Editor". If this is a modification of a previously submitted article, this letter should include the answers to ALL the reviewer's comments.

4. Include a separate word document entitled: "Manuscript".

The manuscript must include the following items:

- Title of the article
- Authors (First and last name)
- Contact address for the corresponding author
- Running title
- Key words

• Abstract

• Text of the article

• References

• Insert ALL TABLES in the main manuscript. Each table in one page

• Figure legends

Please note that tables must have portrait orientation; we do not accept tables with landscape orientation.

**DO NOT INCLUDE THE FIGURES IN THE MAIN MANUSCRIPT**

If you are resubmitting a modified document in response to the reviewers' comments, all changes MUST be highlighted in RED.

5. Upload figures, one at a time. Do not include figures in the manuscript document. Figures must be at least 900 X 600 pixels in size and in JPEG (.jpg) format; file size must be less than 5 MB. Please transform your figures to JPEG format without compression in RGB format, not CMYK. All figures that do not correspond to these requirements will be rejected.

In order to continue the evaluation process, please submit your modified article through our web site within 30 days. We reserve the right to refuse consideration of revisions received after this date.

Yours sincerely,

Professor Jose V. Bagan

Editor Med Oral Patol Oral Cir Bucal

Indexed in: SCI-JCR, INDEX MEDICUS, MEDLINE, PUBMED, EXCERPTA MEDICA, EMBASE, SCOPUS, IME

Activar Window  
Ve a Configuración pa

Activar Window

INFORM OF THE REVIEWERS:

Comments for authors:

Thank you very much for this informative and original study. It seems to be well written and it may also be of interest to the readers. However, some revision is necessary before it can be further considered for publication. Please, find below some comments that you might consider useful to strengthen your manuscript:

- The abstract is too short. The authors may better describe the methods and the main results obtained. The word limit is 300 and only 167 words were used in this version.
- The conclusion in the last paragraph of the introduction section is too strong and to my view it goes beyond the methodologic limits of the study. Please, consider revise it. I don't think it is possible to correlate the protein expression with tumor behavior.
- Ethics statement and approval protocol are missing.
- What positive control was used for IHC reactions?
- The results section must be better developed and organized. Please, describe how many cases of TG were classified in each stage of odontogenesis? Was there any difference in the staining pattern according to odontogenesis stages?
- Please, regarding ameloblastoma group, first characterize in a single paragraph the sample used (sex, age, site, microscopic subtypes, etc...) then, provide the IHC results obtained.
- Table titles and Figures legends are not supposed to be placed inside the manuscript, but rather in the end of the text.
- Was there any expression in the stromal components of ameloblastoma or in the other non-epithelial structures of dental germs?
- Some representative H&E photos could be added to the manuscript, especially the TG stages.
- The number of references seems to be higher than the journal limit. Please, consider revise it.

I hope this peer-review can be considered useful to the authors.

---

**De:** medoral.es <medoral@medoral.es>

**Enviado:** miércoles, 24 de noviembre de 2021 13:32

**Para:** ronellbologna@hotmail.com <ronellbologna@hotmail.com>

**Asunto:** Med Oral Patol Oral Cir Bucal, Ref. 25145, 2021-11-24

2021-11-24

Reference: 25145

Dear Dr. Ronell Bologna-Molina,

Your manuscript entitled "Ep-CAM (MOC-31) expression in tooth germ and ameloblastoma" has been submitted online. In due time, you will be informed as to its possible publication in Med Oral Patol Oral Cir Bucal.

You can download the pdf of the article at:

[http://www.medoral.es/pdf/documentos\\_generados/finder/files/25145/25145.pdf](http://www.medoral.es/pdf/documentos_generados/finder/files/25145/25145.pdf)

For any comment or problems do not reply to this email.

Yours sincerely,

Professor Jose V. Bagan

*Editor Med Oral Patol Oral Cir Bucal*

Indexed in: Science Citation Index Expanded, Journal Citation Reports, Index Medicus, MEDLINE, PubMed, Scopus, Embase and Emcare, Indice Médico Español, IBECS, Dialnet, Latindex

*A todo puedo hacerle frente, gracias a que Cristo me fortalece.*

*Fil. 4:13.*