



---

# **ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL TUMOR ODONTOGÉNICO PRIMORDIAL**

---

**Mg. Vanesa Pereira Prado**

TESIS DE DOCTORADO  
PROGRAMA DE DOCTORADO PEDECIBA  
ÁREA BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

NOVIEMBRE 2022  
MONTEVIDEO, URUGUAY



## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Pereira Prado, Vanesa.

Bologna Molina, Ronell

Landini, Gabriel

Estudio estructural del tumor odontogénico primordial / Vanesa Pereira Prado.

Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Biológicas. Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA). Universidad de la República, 2022

Montevideo: Universidad de la República, 2022

1. Tumores Odontogénicos. Diagnóstico Diferencial. Tumor Odontogénico Primordial.

Pereira Prado, Vanesa

WU140PERe

# **ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL TUMOR ODONTOGÉNICO**

## **PRIMORDIAL**

Tesis de doctorado presentada al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Facultad de Ciencias, Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas.

## **EQUIPO DE INVESTIGACIÓN**

Autora: Mg. Vanesa Pereira Prado

Tutor: Ph.D. Ronell Bologna Molina

Co-tutor: Ph.D. Gabriel Landini

El trabajo fue realizado en el Área de Patología Molecular Estomatológica, en la Facultad de Odontología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, con una estancia de desarrollo y análisis en la Escuela Dental, Universidad de Birmingham, Reino Unido.

Contacto: Dra. Vanesa Pereira Prado

Celular: 095 18 33 18

Mail: [vanesapereira91@hotmail.com](mailto:vanesapereira91@hotmail.com)



## **AGRADECIMIENTOS**

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

Gracias a mi familia por acompañarme en todas las etapas de este programa, apoyándome y motivándome incondicionalmente.

Gracias a la Universidad de Birmingham, especialmente a Danielle Williams, por su ayuda en la tramitación de la pasantía que realicé, y por recibirme de forma tan cálida.

Gracias a la Facultad de Odontología, Universidad de la República, por brindarme la posibilidad de desarrollar este trabajo.

Gracias a PEDECIBA, CSIC y Santander Universidades por el financiamiento recibido para la compra de equipamiento y la beca a pasantía en el extranjero.

Gracias a mis colegas y amigos Gabriela Vigil y Felipe Martins por su ayuda y apoyo durante la realización de la técnica de inmunohistoquímica. Miles de gracias a mi compañera y amiga Estefanía Sicco por su ayuda con la estadística y la instalación de diferentes softwares. Gracias a Tere Hernández por su apoyo emocional en las últimas etapas de este camino.

Gracias a mis profesores por todas sus enseñanzas y consejos que me ayudaron a crecer como persona y como profesional. Miles de gracias a los Dres. Ronell Bologna y Gabriel Landini por esta oportunidad y este nuevo camino dentro de la Odontología.

# **ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL TUMOR ODONTOGÉNICO**

## **PRIMORDIAL**

### RESUMEN

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

El diagnóstico definitivo de esta neoplasia es histopatológico, pero existen tumores odontogénicos y tejidos embrionarios que pueden compartir algunas características histológicas con TOP. De aquí surge el interés de este trabajo en lograr una caracterización histomorfológica a base de algoritmos aplicados a imágenes digitales como herramientas auxiliares en el diagnóstico y estudio de este tumor.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron un total de 7 casos de TOP, 10 casos fibroma ameloblástico (FA), 7 casos de odontoma (OD), 10 casos de ameloblastoma convencional/uniquístico (AM/AU), 10 casos de queratoquiste odontogénico (QO) y 7 casos de germen dental (GD) de la región maxilofacial producto de biopsia excisional. Se realizaron cortes para la tinción con Hematoxilina y Eosina (HE), Azul Alcian, y para la técnica de inmunohistoquímica contra colágeno IV, laminina, conexina 43 (Cx43) y CD34.

Las láminas fueron analizadas mediante algoritmos utilizando diferentes softwares dependiendo de cada caso.

## RESULTADOS

En los casos de TOP teñidos con Azul Alcian se observó la presencia de mucopolisacáridos ácidos a nivel subepitelial, sector en el cual también se constató una mayor densidad celular, diferente a lo observado en GD. En la interfase epitelio-mesenquimática la expresión de colágeno IV fue positiva en todos los casos, mientras que laminina fue negativa tanto para OD como GD, evidenciando una expresión menor al 50% en el resto de los casos. Por su parte, Cx43 se observó positiva para todos los casos exceptuando TOP. La expresión de CD34 fue positiva en todos los casos a nivel del endotelio vascular, mientras que en TOP también se evidenció a nivel de células mesenquimáticas subepiteliales.

El análisis morfológico nuclear de TOP mostró diferencias estadísticamente significativas entre los estratos epitelial y mesenquimático. El análisis morfológico celular reveló que las células virtuales del estrato epitelial son de menor área respecto al resto de los estratos, presentando heterogeneidad en el tamaño de las mesenquimáticas en todos los casos. Al comparar el área de las células virtuales del estrato epitelial de TOP vs el resto de las entidades se encontraron diferencias significativas con un p valor  $<0,0001$ . A su vez, al comparar el área de las células virtuales entre los estratos de TOP también se encontraron diferencias significativas con un p valor  $<0,0001$ .

Al estudiar las agrupaciones no supervisadas de celulares virtuales se encontraron similitudes entre los casos de FA, OD y AM, mientras que TOP no se asemejó a ninguna de las entidades investigadas. El índice Jaccard determinó una coincidencia mayor entre las agrupaciones no supervisadas y el estrato epitelial para los casos de

TOP CD43 negativo, AU, QO, TG, siendo menor para aquellos casos con presencia de islas epiteliales.

## CONCLUSIONES

La integridad de las proteínas estructurales presentes en TOP sugiere el desarrollo en las etapas primarias de la odontogénesis, sin progresar su evolución más allá de los estadios de casquete tardío y campana temprana.

Los patrones de inmunoexpresión de Cx43 indicarían que esta proteína tiene un rol importante en la diferenciación celular, influenciando en la posterior secreción de proteínas del esmalte y dentina en los diferentes TODs y el GD.

El análisis de imágenes de la expresión de CD34 y la arquitectura de TOP reveló características no observadas en otros TODs y GD, apoyando la información existente de que esta neoplasia es diferente al OD en desarrollo o a las etapas primarias del FA.

**PALABRAS CLAVE:** tumor odontogénico primordial, CD34, Labkit, StarDist.

# **STRUCTURAL STUDY OF PRIMORDIAL ODONTOGENIC**

## **TUMOR**

### **ABSTRACT**

Odontogenic tumors (OTs) are lesions located exclusively in the maxillary bones, relative rare although relevant because they could develop a destructive aggressive behavior that occasionally compromises the life of the patient. Primordial odontogenic tumor (POT) is a recent discovery among this classification, characterized by a loose fibrous tissue, with areas that resemble the dental papilla, surrounded by a cuboidal to columnar epithelium that resembles the inner enamel epithelium of the enamel organ, surrounded at least partially by a thin fibrous capsule.

The diagnosis of this neoplasm is histopathological, although there are some odontogenic tumors and embryonic tissues that share similar histological characteristics with POT. This study aims to clarify to what degree it is possible to achieve histomorphological characterization of this tumor, based on algorithms applied to digital images as an auxiliary tool for diagnosis.

### **MATERIALS AND METHODS**

7 cases of POT, 10 cases of ameloblastic fibroma (AF), 7 cases of odontoma (OD), 10 cases of conventional/unicystic ameloblastoma (MA/UA), 10 cases of odontogenic keratocyst (OKQ) and 7 cases of tooth germ (TG) were obtained by excisional biopsy. Cuts were performed for Haematoxylin & Eosin stain, Alcian Blue stain and immunohistochemistry technique against collagen IV, laminin, connexin 43 (Cx43) and CD34. Slides were analyzed with different softwares and algorithms depending on each case.

## RESULTS

Alcian Blue cases showed the presence of acid mucopolysaccharides in the subepithelial area of POT, which also presented a higher cellular density, different to TG subepithelial area.

In the epithelial-mesenchymal interface, collagen IV expression was positive for all the cases, whereas laminin was negative for OD and TG, showing less than 50% of expression in the rest of the cases. Cx43 was positive for all the entities except POT. CD34 expression was positive for all the cases in the vascular endothelium, and in POT was also observed in the mesenchymal subepithelial cells.

A comparison of the area of virtual epithelial cells of POT vs. the other entities investigated showed significant differences at p value  $<0.0001$ . The comparison the virtual cells area of epithelial and mesenchymal tissues in POT also revealed significant differences at p value  $<0.0001$ .

Unsupervised virtual cell clustering determined similarities between AF, OD and MA, whereas POT was different from all the entities studied. The Jaccard index showed a higher coincidence between unsupervised clusters and epithelial tissue for POT negative for CD34, UA, OKQ and TG.

## CONCLUSIONS

Structural proteins present in POT suggest its development from early stages of odontogenesis, without progressing its evolution towards late cap and early bell stages.

Cx43 immunohistochemical patterns suggest that this protein has a role in cell differentiation, allowing enamel and dentin proteins secretion in TG and OTs.

CD34 expression image analysis and POT architecture revealed characteristics not observed in other OTs and TG, supporting the existing information that this neoplasm is different from OD and early stages of AF.

**KEY WORDS:** primordial odontogenic tumor, CD34, Labkit, StarDist.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción .....	pág.21
2. Marco teórico.....	pág.22
2.1. Odontogénesis.....	pág.22
2.2. Tumores odontogénicos.....	pág.30
2.2.1. Clasificación. ....	pág.31
2.2.2. Tumor odontogénico primordial.....	pág.33
2.2.3. Fibroma ameloblástico.....	pág.38
2.2.4. Odontoma.....	pág.39
2.2.5. Ameloblastoma.....	pág.41
2.2.6. Queratoquiste Odontogénico.....	pág.44
2.3. Biomarcadores moleculares.....	pág.46
2.3.1. Colágeno IV.....	pág.46
2.3.2. Laminina.....	pág.48
2.3.3. Conexina 43.....	pág.49
2.3.4. CD34.....	pág.50
2.4. Digitalización y análisis de imágenes histológicas.....	pág.52
2.4.1. Umbralización o “thresholding”.....	pág.54
2.4.2. StarDist.....	pág.55
2.4.3. Watershed Transform.....	pág.55
2.4.4. Trainable WEKA segmentation.....	pág.56
2.4.5. Labkit.....	pág.56
3. Planteamiento del problema de investigación.....	pág.57
4. Justificación.....	pág.57
5. Objetivos.....	pág.58



5.1. Objetivo general. ....	pág.58
5.2. Objetivos específicos.....	pág.58
6. Estrategia y metodología de investigación.....	pág.59
6.1. Consideraciones éticas.....	pág.59
6.2. Diseño de estudio.....	pág.59
6.3. Obtención de muestras.....	pág.59
6.3.1. Criterios de inclusión.....	pág.59
6.3.2. Criterios de exclusión.....	pág.60
6.4. Procedimientos.....	pág.60
6.4.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina.....	pág.60
6.4.2. Tinción de Azul Alcian.....	pág.61
6.4.3. Técnica de inmunohistoquímica.....	pág.61
6.4.4. Obtención de imágenes histológicas en alta resolución.....	pág.64
6.4.5. Análisis de la localización de la expresión de CD34.....	pág.65
6.4.6. Análisis de la densidad nuclear.....	pág.68
6.4.7. Análisis de la morfología celular.....	pág.69
6.4.8. Análisis por agrupamiento de células virtuales.....	pág.70
7. Resultados.....	pág.73
7.1. Azul Alcian.....	pág.73
7.2. Colágeno IV.....	pág.75
7.3. Laminina.....	pág.77
7.4. Conexina 43.....	pág.79
7.5. CD34. ....	pág.81
7.6. Análisis de la localización de la expresión de CD34.....	pág.84
7.7. Análisis de la densidad nuclear.....	pág.93

7.8. Análisis de la morfología celular .....	pág.99
7.9. Análisis por agrupamiento de células virtuales.....	pág.114
8. Discusión. ....	pág.123
8.1. Azul Alcian. ....	pág.123
8.2. Inmunoexpresión de colágeno IV, laminina y conexina 43.....	pág.124
8.3. Inmunoexpresión de CD34 y análisis de imágenes.....	pág.127
8.4. Análisis de la densidad nuclear .....	pág.129
8.5. Análisis de la morfología celular.....	pág.131
8.6. Análisis por agrupamiento de células virtuales.....	pág.133
8.7. Consideraciones finales.....	pág.135
9. Conclusiones.....	pág.136
10. Proyecciones a futuro.....	pág.136
11. Cronograma de ejecución.....	pág.137
12. Financiación.....	pág.137
13. Referencias bibliográficas.....	pág.138
14. Anexos.....	pág.159

## **LISTA DE ABREVIACIONES**

- AM: Ameloblastoma convencional.
- AU: Ameloblastoma unicuístico.
- Cx43: Conexina 43.
- FA: Fibroma ameloblástico.
- GD: Germen dental.
- HE: Hematoxilina y Eosina.
- Labkit: Labeling and Segmentation Toolkit for Big Image Data.
- OD: Odontoma.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PAS: tinción Periodic acid – Schiff.
- QQQ: Queratoquiste odontogénico.
- TODs: Tumores odontogénicos.
- TOP: Tumor odontogénico primordial.
- WEKA: Waikato Environment for Knowledge Analysis.

## **LISTA DE TABLAS Y FIGURAS**

### **TABLAS**

- Tabla 1. Expresión de colágeno, laminina y fibronectina en las etapas de la odontogénesis.
- Tabla 2. Clasificación de los Tumores Odontogénicos según la Organización Mundial de la Salud.
- Tabla 3. Distribución de las características clínicas, radiográficas, tratamiento y seguimiento de los casos de tumor odontogénico primordial.
- Tabla 4. Parámetros utilizados en Trainable WEKA Segmentation 2D para la segmentación de fibroma ameloblástico.
- Tabla 5. Parámetros utilizados en StarDist 2D para la segmentación nuclear.
- Tabla 6. Variables morfológicas estudiadas con el plugin Particles8.
- Tabla 7. Resultados inmunohistoquímicos para colágeno IV, laminina, conexina 43 y CD34 en todas las entidades analizadas.
- Tabla 8. Estadística descriptiva para los núcleos del estrato epitelial.
- Tabla 9. Estadística descriptiva para los núcleos del estrato mesenquimático.
- Tabla 10. Estadística descriptiva del estrato 1 para todas las entidades estudiadas.
- Tabla 11. Comparación morfológica entre los casos de tumores odontogénicos y germen dental.
- Tabla 12. Resultados del índice Jaccard para el estrato epitelial en los diferentes tumores odontogénicos y germen dental.

## FIGURAS

- Fig. 1. Etapas de la odontogénesis.
- Fig. 2. Estructura histológica del germen dental en etapa de campana temprana.
- Fig. 3. Cortes histológicos de entidades odontogénicas con tinción de HE.
- Fig. 4. Secuencia de procedimientos del análisis de imágenes para la localización de la expresión de CD34.
- Fig. 5. Corte histológico con tinción Azul Alcian en tumor odontogénico primordial.
- Fig. 6. Corte histológico con tinción Azul Alcian en germen dental.
- Fig. 7. Expresión de colágeno IV en los diversos casos estudiados.
- Fig. 8. Expresión de laminina en los diversos casos estudiados.
- Fig. 9. Expresión de conexina 43 en los diversos casos estudiados.
- Fig. 10. Expresión de CD34 en tumor odontogénico primordial, fibroma ameloblástico y germen dental.
- Fig. 11. Expresión de CD34 en queratoquiste odontogénico, ameloblastoma convencional y odontoma.
- Fig. 12. Análisis de la distribución espacial de CD34 en tumor odontogénico primordial.
- Fig. 13. “Hot spots” de la expresión de CD34 en diferentes casos de tumor odontogénico primordial.
- Fig. 14. Análisis de la distribución espacial de CD34 en fibroma ameloblástico con Labkit.
- Fig. 15. Análisis de la distribución espacial de CD34 en fibroma ameloblástico con WEKA.
- Fig. 16. Análisis de la distribución espacial de CD34 en odontoma.
- Fig. 17. Análisis de la distribución espacial de CD34 en ameloblastoma convencional.

- Fig. 18. Análisis de la distribución espacial de CD34 en ameloblastoma uniuquístico.
- Fig. 19. Análisis de la distribución espacial de CD34 en queratoquiste odontogénico.
- Fig. 20. Análisis de la distribución espacial de CD34 en germen dental.
- Fig. 21. Gráfica de la expresión relativa de CD34 en tumores odontogénicos y germen dental en función de la profundidad tisular.
- Fig. 22. Análisis de la densidad nuclear en tumor odontogénico primordial.
- Fig. 23. Representación gráfica de la densidad nuclear en tumor odontogénico primordial.
- Fig. 24. Análisis por estratos de la densidad nuclear de tumor odontogénico primordial.
- Fig. 25. Frecuencia de la forma nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial.
- Fig. 26. Frecuencia de la circularidad nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial.
- Fig. 27. Frecuencia del perímetro nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial.
- Fig. 28. Frecuencia del área nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial.
- Fig. 29. Frecuencia de la rectangularidad nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial.
- Fig. 30. Análisis de la morfología de células virtuales de tumor odontogénico primordial.
- Fig. 31. Representación gráfica del área de las células virtuales en tumor odontogénico primordial, organizado por estratos celulares.
- Fig. 32. Análisis de la morfología de células virtuales de tumor odontogénico primordial.

- Fig. 33. Representación gráfica del área de las células virtuales en tumor odontogénico primordial, organizado por estratos celulares.
- Fig. 34. Análisis de la morfología de células virtuales de fibroma ameloblástico.
- Fig. 35. Representación gráfica del área de las células virtuales en fibroma ameloblástico, organizado por estratos celulares.
- Fig. 36. Análisis de la morfología de células virtuales de odontoma.
- Fig. 37. Representación gráfica del área de las células virtuales en odontoma, organizado por estratos celulares.
- Fig. 38. Análisis de la morfología de células virtuales de ameloblastoma convencional.
- Fig. 39. Representación gráfica del área de las células virtuales en ameloblastoma convencional, organizado por estratos celulares.
- Fig. 40. Análisis de la morfología de células virtuales de ameloblastoma uniuquístico.
- Fig. 41. Representación gráfica del área de las células virtuales en ameloblastoma uniuquístico, organizado por estratos celulares.
- Fig. 42. Análisis de la morfología de células virtuales de queratoquiste odontogénico.
- Fig. 43. Representación gráfica del área de las células virtuales en queratoquiste odontogénico, organizado por estratos celulares.
- Fig. 44. Análisis de la morfología de células virtuales de germen dental.
- Fig. 45. Representación gráfica del área de las células virtuales en germen dental, organizado por estratos celulares.
- Fig. 46. Representación gráfica de la comparación del área de las células virtuales entre el estrato 1 de todos los tumores odontogénicos y germen dental.

- Fig. 47. Gráfica comparativa del área de las células virtuales correspondientes al epitelio, subepitelio, mesénquima medio y profundo en tumor odontogénico primordial.
- Fig. 48. Comparación del agrupamiento de células virtuales de tumor odontogénico primordial.
- Fig. 49. Agrupación de células virtuales de fibroma ameloblástico.
- Fig. 50. Agrupación de células virtuales de odontoma.
- Fig. 51. Agrupación de células virtuales de ameloblastoma convencional.
- Fig. 52. Agrupación de células virtuales de ameloblastoma unicuístico.
- Fig. 53. Agrupación de células virtuales de queratoquiste odontogénico.
- Fig. 54. Agrupación de células virtuales de germen dental.



## **1. INTRODUCCIÓN**

Los tumores odontogénicos (TODs) son neoplasias que derivan de los restos odontogénicos o sus remanentes, los cuales se encuentran confinados a los huesos maxilares y/o los tejidos blandos adyacentes. Biológicamente algunas de estas lesiones son consideradas hamartomas, es decir neoplasias benignas compuestas por tejidos normales y/o una proporción anormal de componentes simples que muestran diversos grados de diferenciación, mientras que otras comprenden tanto neoplasias benignas como malignas, exhibiendo variable agresividad y potencial metastásico (1).

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

Hasta la fecha, sólo 22 casos de TOP han sido reportados en la literatura, siendo identificados como lesiones radiolúcidas bien definidas, adyacentes a la corona de un diente no erupcionado, produciendo diferentes grados de expansión ósea, resorción radicular y desplazamiento de piezas vecinas (2).

El objetivo del presente trabajo se centra en caracterizar a TOP mediante múltiples métodos de análisis computarizado de imágenes histopatológicas para elucidar la estructura y distribución espacial de los compartimentos epitelial y mesenquimático, relacionar la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en dichos compartimentos, y realizar comparaciones con otras entidades con orígenes similares.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Odontogénesis

La odontogénesis es el proceso de formación de las piezas dentarias. Estas son estructuras derivadas de células totipotenciales del ectodermo del primer arco faríngeo y del ectomesénquima de la cresta neural, conformando el denominado germen dental (GD) (3). El GD se encuentra organizado en tres componentes principales: el órgano del esmalte, la papila dental y el saco o folículo dental.

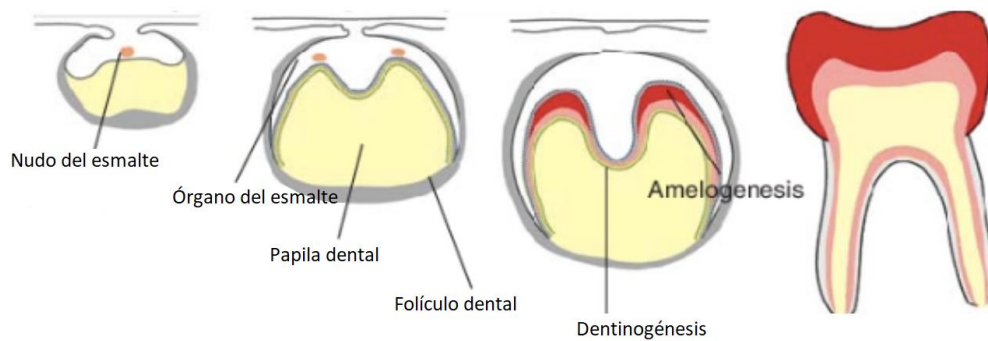
El órgano del esmalte está compuesto por cuatro grupos epiteliales: los epitelios externo e interno, el retículo estrellado y el estrato intermedio. Las células del epitelio interno dan lugar a los ameloblastos que producirán el esmalte y finalmente formarán parte del epitelio reducido del esmalte, luego de la maduración del órgano dentario. La localización donde confluyen el epitelio externo e interno del órgano del esmalte se denomina cresta cervical (3). El crecimiento de la cresta cervical hacia la profundidad de los tejidos forma la vaina epitelial radicular de Hertwig, que determinará y guiará la forma radicular de cada pieza dentaria.

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

El saco o folículo dental da lugar a tres líneas celulares importantes: los cementoblastos, osteoblastos y fibroblastos. Los cementoblastos son formadores del cemento dental que cubre la superficie radicular, los osteoblastos forman el hueso alveolar que rodea a las raíces dentarias, mientras que los fibroblastos se encuentran involucrados en el

desarrollo del ligamento periodontal que conecta al diente con el hueso alveolar y el cemento (5).

El proceso de odontogénesis se sistematiza para su estudio en una serie de fases consecutivas que se denominan: brote, casquete, y campana (6) en un intento de categorizar los cambios que tienen lugar en el desarrollo del diente (**Fig. 1**). Las interacciones epitelio-mesenquimáticas son esenciales para pasar por las diferentes etapas de la odontogénesis, y consisten en una serie programada, secuencial y recíproca de vías de señalización entre ambos tejidos, resultando en la diferenciación de las poblaciones celulares (7). Diversos experimentos han demostrado que el epitelio y mesénquima de un diente en desarrollo (al estudiarse por separado como unidades aisladas, en las etapas de brote, casquete y campana) proliferan sin formar estructuras dentales reconocibles (8-10).



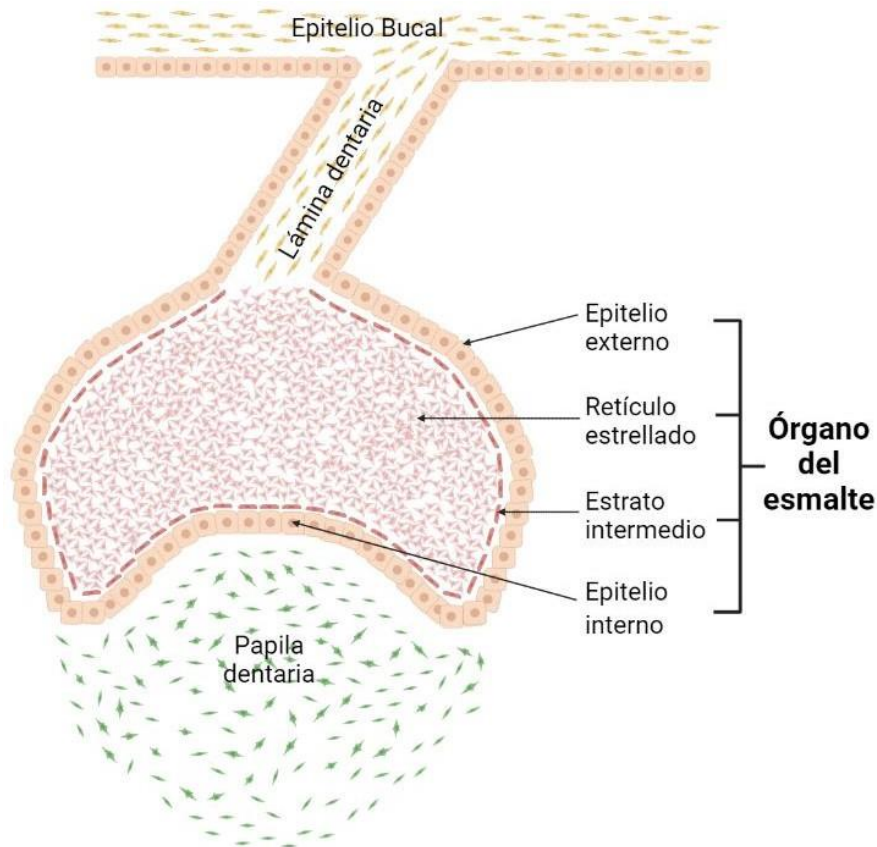
**Fig. 1.** Etapas de la odontogénesis, desde el brote a la formación de un diente maduro.

El inicio del desarrollo dental está impulsado desde la sexta semana en el embrión humano por la proliferación del epitelio bucal para formar una banda de tejido celular con una configuración en herradura, llamada lámina dental, en el mesénquima donde aparecerán los maxilares y la mandíbula. En el sitio de cada futuro diente hay una proliferación adicional de células originadas en la lámina dental que producen un brote celular redondeado, uno para cada diente, que se proyecta en el tejido mesenquimático

subyacente. Esta proliferación celular corresponde a la etapa de brote (3). El epitelio dental induce la condensación del mesénquima que lo rodea a través de la expresión de moléculas señalizadoras relacionadas con los genes Shh (Sonic hedgehog), FGF (Fibroblast Growth Factor), BMP (Bone Morphogenetic Protein) y Wnt, los cuales a su vez promueven la formación de éste brote epitelial que actuará como centro coordinador del desarrollo del GD (11).

Gradualmente esta masa celular aumenta de tamaño y adquiere una concavidad en el lado opuesto al de su origen en la lámina dental. En la décima semana, el órgano del esmalte se considera en la etapa de casquete, y el mesénquima adquiere la capacidad instructiva para dirigir el desarrollo en base a las interacciones epitelio-mesenquimáticas (12, 13).

El crecimiento y desarrollo ulteriores resultan en la etapa de campana, entre la semana 14-18 de la gestación embrionaria, en donde el órgano del esmalte posee cuatro estratos celulares identificables: epitelio interno, epitelio externo, estrato intermedio y retículo estrellado (**Fig. 2**). La formación de la papila dental a partir del componente mesenquimático comienza con la producción de sustancias extracelulares, y la aparición de una nueva condensación celular mesenquimática que rodea al órgano del esmalte y limita la papila dental, formando el folículo dental (3).



**Fig. 2.** Estructura histológica del germen dental en etapa de campana temprana.

La etapa de campana se caracteriza por los procesos de histodiferenciación y morfodiferenciación, dividiéndose en dos etapas: temprana y avanzada (3). Las células mesenquimáticas alineadas próximas a las células del epitelio interno del esmalte adoptan una configuración cilíndrica y un aspecto epitelial, diferenciándose en preodontoblastos. Estas células luego pasan a ser los odontoblastos que formarán la matriz dentinaria. Las células del epitelio interno del esmalte maduran formando los ameloblastos y tienen a cargo, junto con las células del estrato intermedio, la producción de la matriz del esmalte. Los componentes extracelulares de la membrana basal que separa el tejido epitelial del mesenquimal regulan entonces la polarización de ambos tipos de células (14).

La lámina dental se degenera en las etapas iniciales, justo antes de la dentinogénesis y amelogénesis, lo cual separa el primordio del diente en desarrollo de su sitio de origen (3).

Existe una inducción recíproca entre la formación de la dentina y el esmalte; la formación de la dentina sucede antes que la del esmalte (3).

La formación de la dentina, conocida como dentinogénesis, es la primera característica identificable del estado de corona en el desarrollo dentario, la misma se clasifica en: predentina, dentina primaria, dentina secundaria y dentina terciaria (3). Los odontoblastos comienzan a segregar matriz orgánica a su alrededor y en contacto con el epitelio interno del esmalte, cercano al área de la/s futura/s cúspide/s del diente, y migran hacia el centro de la pulpa dentaria, formando una invaginación denominada proceso odontoblástico (3). El proceso odontoblástico origina una secreción de cristales de hidroxiapatita, que mineralizan la matriz, en un área laminar denominada predentina (6). Los odontoblastos se hipertrofian y colaboran en la elaboración de una matriz extracelular rica en colágeno, que resulta crucial en la nucleación heterogénea durante el proceso de mineralización, si bien también intervienen lípidos, fosfoproteínas y fosfolípidos secretados (6). La dentina secundaria se produce después de la formación de la raíz dentaria cuando la pieza entra en oclusión, y a una velocidad mucho menor y de forma heterogénea a lo largo del diente (3). La dentina terciaria, también conocida como dentina reparadora, se produce como respuesta a estímulos externos, como las caries o la atricción (3).

Por su parte, el esmalte se produce en dos etapas: secretora y de maduración (4).

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

La formación del cemento se conoce como cementogénesis, y ocurre tardíamente en el desarrollo dentario. Existen dos tipos de cemento: el acelular y el celular (3). El cemento acelular aparece primero en la odontogénesis. Los cementoblastos se diferencian a partir de células foliculares, que sólo afloran en la superficie de la raíz dentaria cuando la cubierta epitelial de la vaina de Hertwig ha comenzado a desorganizarse. Los cementoblastos segregan fibrillas de colágeno a lo largo de la superficie radicular antes de migrar fuera del diente. En cuanto lo hacen, más colágeno es depositado para incrementar la robustez y longitud de las fibras. No obstante, intervienen también otro tipo de proteínas como la sialoproteína del hueso o la osteocalcina (4). La mineralización de esta matriz rica en proteínas fibrilares indica el momento en el cual los cementoblastos migran, abandonando el cemento, y se establecen en la estructura ligamentaria del periodonto. El cemento celular se desarrolla después de que la mayoría de los procesos de la odontogénesis han finalizado y el diente se pone en contacto oclusal con los antagonistas (3). Este tipo de cemento se forma alrededor del ligamento periodontal y por ello los cementoblastos que secretan la matriz cementoide se quedan incluidos en ella, dotándola del componente celular (3).

Una vez finalizada la formación del primordio dental el mismo presenta las subsecuentes capas de esmalte, dentina, predentina y pulpa dentaria. Esta última es un tejido mesenquimático con diferentes capas estructurales y topográficas: odontoblastos, zona basal de Weil o acelular, estrato de células polimorfas, zona central de tejido pulpar (15). El estrato de células polimorfas consiste en fibroblastos con caracteres embrionarios con forma estrellada y comúnmente condensadas en este sector (15). Luego de formadas todas las estructuras que conforman a la futura pieza dentaria en función se produce el proceso de erupción dental, el cual corresponde al momento en que el diente sobresale de la encía y es visible (3).

Se han detectado variaciones moleculares a lo largo del desarrollo de las etapas de la odontogénesis. En particular se destaca la composición de la membrana basal, la cual expresa diferentes proteínas y filamentos intermedios con interdependencia con el grado de diferenciación y maduración de los tejidos circundantes, es decir el órgano del esmalte y la papila dental, acompañando las interacciones epitelio-mesenquimáticas que se producen en todo el proceso. Las variaciones en la expresión de las cadenas de laminina, de los tipos de colágeno y de fibronectina se sintetizan en la **Tabla 1**.



**Tabla 1.** Expresión de colágeno, laminina y fibronectina en las etapas de la odontogénesis.

	<b>Colágeno</b>	<b>Laminina</b>	<b>Fibronectina</b>
<b>Etapas de Brote</b>	Distribución asimétrica de colágeno IV 4-5-6 en la MB (16). El pro-colágeno III se distribuye similar a la fibronectina, pero el mesénquima que subyace inmediatamente al brote epitelial es más tenue (16).	Expresión continua rodeando el brote epitelial (18, 19).	Expresión en mesénquima y MB, pero no en el epitelio (17).
<b>Etapas de Casquete</b>	Se detectó menos pro colágeno III en el mesénquima. MB debajo del epitelio oral se presenta más intensa que entre el epitelio dental y el mesénquima. No se presenta pro colágeno III en el tejido epitelial (17).	Expresión continua rodeando el epitelio dental (18).	Expresión de fibronectina similar en el mesénquima. No se presenta en el epitelio interno o externo del esmalte, ni en el epitelio oral, pero si moderadamente en el retículo estrellado (17).
<b>Etapas de Campana</b>	MB del epitelio interno expresa cadenas 1, 2,4 de colágeno IV cadenas, mientras que el externo solo las cadenas 1,2. Con el inicio de la formación de predentina el colágeno IV de la MB desaparece (16). No se expresa pro colágeno III en MB del epitelio interno, pero si en mesénquima de la papila dental. Solo colágeno I comienza a presentarse en predentina y dentina (17). No se presenta ninguna fibra colágena en esmalte ni epitelio.	Presente de manera similar en todas las MB, incluido el revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos (18). Ante la presencia de predentina, se localizan fibras subepiteliales de la papila dental pero no en predentina ni ameloblastos (20). Se pierde ante la presencia de odontoblastos secretores y la pérdida de la MB (19).	La distribución de fibronectina es similar a la etapa anterior, con mayor presencia en MB al haber predentina, así como en el retículo estrellado y capilares del mesénquima de la papila dental (17). No se observa en relación a odontoblastos ni en epitelio. No se observa en dentina ni esmalte (17).

MB: membrana basal.

## 2.2. Tumores Odontogénicos

Los tumores son un conjunto de enfermedades originadas de cualquier órgano o tejido del organismo cuyas células crecen de manera anormal y descontrolada, sobrepasando los límites habituales y pudiendo invadir tejidos adyacentes (21).

Los TODs son lesiones que se originan exclusivamente en relación con los huesos maxilares y mucosa bucal que los reviste, derivando de células epiteliales, mesenquimales y/o ectomesenquimales que son o fueron parte de la odontogénesis (21).

Los TODs constituyen un grupo de lesiones de particular interés, cuyo comportamiento biológico va desde el tipo hamartomatoso o proliferaciones de tejido no neoplásico, hasta neoplasias benignas y malignas con potencial metastásico. Su etiología es desconocida y la mayoría suele aparecer de forma esporádica y sin causa aparente (22).

La mayoría de los TODs se presentan de forma intraósea en el esqueleto maxilofacial, mientras que los tumores extraóseos aparecen en la mucosa gingival o alveolar. Las características clínicas de los TODs suelen ser inespecíficas: los benignos muestran un crecimiento expansivo lento y casi siempre asintomático; en contraste, el dolor es el síntoma más común en los malignos, seguido por un rápido aumento de volumen (23), aunque hay tumores benignos con un comportamiento similar.

Otras características como localización, género y edad (sobre todo en pacientes jóvenes, ya que los TODs contienen tejidos similares a los presentes en el GD), contribuyen al diagnóstico diferencial. Sin embargo, es importante destacar que, debido a la similitud entre algunos de estos tumores, el diagnóstico definitivo se determina mediante el estudio histopatológico de la lesión (23).

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

Brasil, Canadá, Chile, China, Estados Unidos, Japón, México y Nigeria que muestran diferencias marcadas en la frecuencia de los TODs benignos, sin embargo, los más comunes son: odontoma (OD), ameloblastoma (AM) y mixoma odontogénico (24).

### 2.2.1. Clasificación

En el 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualizó la clasificación de los TODs, la cual está basada principalmente en su comportamiento, dividiéndolos así en malignos (carcinomas y sarcomas), benignos y no neoplásicos, agregando a su vez las subdivisiones de tumores óseos y cartilagosos, quistes, lesiones fibro óseas y óseo condromatosas, y desórdenes hematolinfoideos (1, 25). Además, los tumores benignos se subdividen dependiendo del tipo de tejido odontogénico involucrado en: tumores compuestos por epitelio odontogénico con estroma fibroso y maduro sin ectomesénquima odontogénico, tumores mixtos epiteliales y mesenquimáticos y tumores derivados del mesénquima o ectomesénquima (**Tabla 2**). La clasificación histológica incluye 16 tumores benignos y 7 malignos (1, 25).

**Tabla 2.** Clasificación de los Tumores Odontogénicos según la Organización Mundial de la Salud (1).

<b>Tumores malignos</b>	Carcinoma	Ameloblástico Primario intraóseo Odontogénico esclerosante Odontogénico de células claras Odontogénico de células fantasma
	Sarcoma odontogénico	
	Carcinosarcoma odontogénico	
<b>Tumores benignos</b>	Derivado del epitelio odontogénico con estroma fibroso maduro sin ectomesénquima odontogénico	Ameloblastoma convencional Ameloblastoma uniuístico Ameloblastoma extraóseo periférico Ameloblastoma metastásico Tumor odontogénico escamoso Tumor odontogénico epitelial calcificante Tumor odontogénico adenomatoide
	Mixtos epiteliales mesenquimáticos	Fibroma ameloblástico Tumor odontogénico primordial Odontoma Tumor dentinogénico de células fantasma
	Mesenquimáticos	Fibroma odontogénico Mixoma odontogénico Cementoblastoma Fibroma cemento osificante

### 2.2.2. Tumor Odontogénico Primordial

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

Mosqueda Taylor y cols. fueron los primeros en describir este tumor en 2014 (2), a la fecha existen 22 casos reportados en todo el mundo (**Tabla 3**) (2, 26-36). La edad de estos pacientes va de un rango entre 2-19 años, con una media de 11.4, siendo más prevalente en el sexo masculino, con una relación masculino-femenino 12:10.

**Tabla 3.** Distribución de las características clínicas, radiográficas, tratamiento y seguimiento de los casos de tumor odontogénico primordial (2, 26-36).

Nº	Referencia	País	Edad/ Género	Ubicación	Clínica	RX	Pieza no erupcionada relacionada	Tratamiento	Seguimiento
1	Mosqueda Taylor et al., 2014	México	18/M	Izq. Post. mandibular	Tumoración asintomática 45x40mm	RL, UL, BD, DD, RR	3er molar	Enucleación y extracción dental	20años, SEE
2	Mosqueda Taylor et al., 2014	España	16/M	Izq. Post. mandibular	Expansión cortical 55x50mm	RL, UL, BD, DD, RR	3er molar	Enucleación y extracción dental	13años, SEE
3	Mosqueda Taylor et al., 2014	Brasil	16/M	Izq. Post. mandibular	Tumoración asintomática 65x50mm	RL, UL, BD, DD, RR	3er molar	Enucleación y extracción dental	10años, SEE
4	Mosqueda Taylor et al., 2014	Guatemala	3/F	Izq. Post. mandibular y rama ascendente	Expansión ósea 90x70mm	RL, BL, BD, DD, RR	2do deciduo y 1er molar permanente	Enucleación y extracción dental	9años, SEE
5	Mosqueda Taylor et al., 2014	Brasil	13/F	Izq. Post. mandibular y rama ascendente	Tumoración asintomática 80x50mm	RL, BL, BD, DD, RR	3er molar	Enucleación y extracción dental	3años, SEE
6	Mosqueda Taylor et al., 2014	México	3/F	Izq. Post. maxilar	Expansión ósea 35x30mm	RL, UL, BD, DD, RR	2do deciduo y 1er molar permanente	Enucleación y extracción dental	6 meses, SEE
7	Slater et al., 2016	EEUU	19/M	Der. Post. mandibular	Hallazgo rx asintomática 25x19mm	RL, UL, BD, RR	3er molar	Escisión y extracción dental	7 meses, SEE
8	Ando et al., 2017	Japón	8/F	Izq. Post. maxilar	Tumoración asintomática 16x15mm	RL, BD, DD	1er molar deciduo	Enucleación	16 meses, SEE

9	Mikami et al., 2017	Japón	5/M	Der. Post. mandibular	Erupción tardía 8x8x9mm	RL, UL, BD, DD, RR	2do molar deciduo	Excisión y extracción dental	7 meses, SEE
10	Amer et al., 2018	Egipto	2/M	Post. mandibular	Tumoración asintomática 30x40mm	RL, ML, BD, DD	Pieza en desarrollo	Excisión y extracción dental	2 años, SEE
11	Pardhe et al., 2018	India	17/M	Izq. Post mandibular y rama ascendente	Tumoración asintomática	RL, ML, BD, DD, RR	3er molar	Enucleación y extracción dental	6 meses, SEE
12	Almazayad et al., 2018	EEUU	15/F	Der. Post. mandibular	Tumoración vestibular 35x20mm	RL, ML, BD, DD, RR	3er molar	Excisión y extracción dental	Recurrencia 2021
13	Almazayad et al., 2018	México	18/M	Der. Post. mandibular	Hallazgo rx asintomática 17x12mm	RL, UL, BD	3er molar	Curetaje y extracción dental	20 meses, SEE
14	Bomfim et al., 2018	Brasil	4/M	Izq. Post. mandibular	Tumoración asintomática 30x20mm	RL, UL, BD, DD, RR	2do molar deciduo	Excisión y extracción dental	S/R
15	Novaes et al., 2019	Brasil	13/F	Izq. Post. Mandibular	Tumoración	RL, UL, BD, DD, RR	3er molar	Excisión	S/R
16	Poomsawat et al., 2019	Filipina	17/F	Izq. Post. mandibular	Tumoración asintomática	RL, UL, BD, DD	3er molar	Mandibulectomía parcial	18 meses, SEE
17	Zeng et al., 2020	China	12/F	Der. Post. maxilar	Tumoración asintomática 35x25mm	BD, RL, UL, RR	S/R	Excisión	13 años, SEE
18	Zeng et al., 2020	China	2/M	Der. Maxilar	Tumoración asintomática 25x22mm	BD, RL	1er molar deciduo	Enucleación	11 meses, SEE
19	Kayamori et al., 2020	Japón	10/M	Der. Post. maxilar	Tumoración asintomática	BD, UL, RL,	2do molar temporario	Enucleación y extracción dental	30 meses, SEE
20	Delgado et al., 2021	Perú	12/F	Der. post mandibular	Tumoración asintomática 30x25mm	BD, UL, RL, DD, RR	2do premolar	Excisión y extracción dental	15 meses, SEE
21	Delgado et al., 2021	Brasil	13/F	Izq. post mandibular	S/R	BD, UL, RL,	3er molar	Enucleación	5 años, SEE
22	Naina et al., 2021	India	14/M	Der. Ant. Maxilar	Tumoración sintomática 20x15mm	BD, RL	Incisivo central y canino	Enucleación y extracción dental	3 años, SEE

M: masculino, F: femenino, Izq.: izquierdo, Der.: derecho, Post: posterior, Ant: anterior, RX: radiografía, RL: radiolúcido, UL: unilocular, BL: bilocular, ML: multilocular, BD: bien definido, DD: diente desplazado, RR: reabsorción radicular, SEE: sin evidencia de enfermedad, S/R: sin resultados.

Clínicamente, las lesiones hasta el momento descritas se han presentado de forma intraósea con un leve cambio de coloración y abultamiento a nivel mucoso, con una

marcada preferencia del sector posterior mandibular y una proporción de incidencia mandibular-maxilar de 16:6 (36).

Radiográficamente, se presentan como lesiones radiolúcidas bien definidas adyacentes a la corona de un diente no erupcionado (más comúnmente el tercer molar inferior, en 11 casos reportados), produciendo una aparente relación pericoronar con la pieza. En general son lesiones asintomáticas, pero pueden causar diferentes grados de expansión ósea, reabsorción radicular de piezas adyacentes y migración dental. A su vez, se ha relacionado con molestias al tragar cuando se localiza en el sector posterior mandibular, invadiendo la oro-faringe (37).

Macroscópicamente, se presenta como un tumor sólido blancuzco, más frecuentemente multilobulado y sin espacios quísticos, que tiende a ser encapsulado o al menos bien definido respecto a las estructuras que lo rodean (37). Se ha encontrado que en la mitad de los casos reportados la corona del diente en relación estaba incluida en el tumor, siendo fácilmente desprendida en el resto de los casos, sin formar una estructura quística (37). Los TOPs son tratados mediante enucleación total y extracción de la/s pieza/s dentaria/s en relación al tumor. Con respecto al pronóstico post-operatorio, no se han reportado recurrencias luego de seguimientos de 3 meses a 20 años (37).

Histopatológicamente, se encuentra formado por un tejido fibroso variablemente celular, con fibroblastos fusiformes y estelares con poca producción de colágeno. Se observan áreas similares a la papila dental del germen dentario, cubiertas por un epitelio cuboide- columnar que se asemeja al epitelio interno del órgano del esmalte, rodeado al menos parcialmente por una cápsula fibrosa delgada (**Fig. 3A**). A su vez, comúnmente se observa una condensación de células mesenquimáticas subepiteliales e invaginaciones focales del epitelio periférico, resultando en cortes tangenciales como islas del fibroma ameloblástico (FA). El hecho de que el epitelio se encuentre localizado

periféricamente recuerda a la relación entre el epitelio interno del órgano del esmalte y la papila dental primitiva del GD, sin observar efectos inductivos ectomesenquimáticos, similar a las primeras etapas del desarrollo dental, mostrando falta de habilidad de seguir una evolución inductiva normal para producir la histo y morfo diferenciación de los tejidos dentales (2). Hasta el momento no hay evidencia de diferenciación odontoblástica ni de producción de dentina o esmalte (2). A pesar de esto, cuatro casos mostraron calcificaciones pequeñas y focales (28, 31), sugiriendo que la fosfatasa alcalina puede jugar un rol en su formación, como ocurre en tumores odontogénicos epiteliales calcificantes (38, 39).

Varios autores han sugerido que las filas epiteliales cuboidales y escamosas de TOP corresponden al epitelio externo del órgano del esmalte y el estrato intermedio de GD, sugiriendo una heterogeneidad en el grado de diferenciación de las capas epiteliales (26-28).

Como se ha mencionado anteriormente, los TODs comparten algunas características clínicas y radiográficas, por lo que el diagnóstico definitivo se establece mediante su estudio histopatológico; TOP no es la excepción. Sin embargo, la histopatología muchas veces no es totalmente certera; el diagnóstico diferencial que se propone para esta entidad considera principalmente al FA y OD. Es mandatorio identificar las características distintivas de TOP para evitar un incorrecto diagnóstico, particularmente en biopsias incisionales que puedan confundirlo con FA o mixoma odontogénico, como se ha reportado previamente (40). En una biopsia representativa o completa de TOP es posible excluir al mixoma odontogénico dado que no presenta epitelio que lo rodee, así como diferenciarlo del FA por no presentar islas y bandas de epitelio odontogénico en estroma mixoide. Algunos autores también han establecido que el epitelio de TOP es



similar al del ameloblastoma unicuístico (AU) (27); sin embargo, TOP se presenta como una masa tumoral sólida y no como una lesión quística.

Desde el punto de vista inmunohistoquímico, de acuerdo con la expresión de 23 proteínas estudiadas por Bologna y cols. (41), se determinó que TOP posee un índice de proliferación celular disminuido, definiéndolo como una lesión de crecimiento lento con producción variable de tejido fibroso, en donde la proliferación celular no pareciera ser el único mecanismo implicado en el crecimiento y expansión tumoral. TOP es un tumor moderadamente vascularizado en donde hay una mayor densidad y neo-formación vascular en el mesénquima localizado próximo al epitelio circundante, a pesar de encontrar un área libre de vasos a nivel subepitelial. Esta área a su vez muestra una actividad proliferativa mayor y se sugiere que corresponde al área de desarrollo tumoral (42). A su vez, hay evidencia sobre un incremento de la actividad anti apoptótica, la cual pueda favorecer el crecimiento (41). La expresión de CK19, vimentina, amelogenina, Syndecan-1, Caveolina-1, DSPP, Glut-1, MOC31, en el epitelio circundante puede ser interpretada como grupos de células en diferentes estados de desarrollo, con una estructura epitelial única aparente desde el punto de vista histológico. Esta situación conlleva a especular que el compartimento epitelial de TOP no es uniforme o estático, pero que expresa la transición entre las etapas tempranas del desarrollo dental y aquellas en donde la maduración pre-ameloblástica se encuentra presente pero previamente a tener el potencial de inducción de diferenciación odontoblástica o producción de tejido mineralizado (41).

Por otra parte, la ausencia de una proteína mutante identificable para BRAF V600E sugiere que la mutación del gen BRAF no está implicada en la patogénesis de TOP y se puede confirmar que este tumor no pertenece a la categoría de tumores ameloblásticos con BRAF mutante (41).

Hasta la fecha 151 genes asociados al cáncer y 42 genes asociados a la odontogénesis han sido analizados en TOP mediante secuenciación de próxima generación sin detectar mutaciones somáticas (43). A pesar de esto, la expresión de genes asociados a la dentinogénesis como ser Bglap, Ibsp y Nfic fue negativa o muy débil, mientras que el ARNm detectado para colágeno I y sialofosfoproteína dentinaria (DSP) fue alto. La matriz dentinaria extracelular se encuentra compuesta en un 90% de colágeno tipo I y un 10% de proteínas no colágeno, como ser DPP y DGP. Por tanto, se sugiere la presencia de preodontoblastos en TOP, a pesar de no constatar células con morfología compatible a la de odontoblastos diferenciados y así a su vez se explica la inhibición de la formación dentinaria y la subsecuente ausencia de esmalte (43).

### 2.2.3. Fibroma Ameloblástico

El FA es una neoplasia benigna mixta compuesta por un mesénquima odontogénico que se asemeja a la papila dental e islas epiteliales similares al epitelio del órgano del esmalte del GD, sin presencia de tejido duro. Epidemiológicamente, representa el 1,5-6,5% de todos los TODs (44, 45), con una edad media de presentación de 14,9 años, ocurriendo generalmente en pacientes menores a 20 años (anterior a la finalización de la odontogénesis). El 82% de los casos se presentan en el sector posterior mandibular, siendo menos frecuente en el sector anterior, tanto maxilar como mandibular (44, 45).

Clínicamente, se presenta como una lesión indolora de crecimiento lento, pudiendo provocar expansión ósea y raramente deformidad facial en casos donde adquiere gran tamaño. Se considera un hallazgo radiográfico en el 12% de los casos, presentándose comúnmente como una lesión bien definida, unilocular y radiolúcida (44). En el 80% de los casos se encuentra asociada con una pieza impactada, más frecuentemente el primer o segundo molar permanente.

Macroscópicamente, se observa como una masa sólida, generalmente encapsulada. Histopatológicamente, el componente mesenquimático es mixoide y rico en células, similar a la papila dental del GD. El componente epitelial puede presentarse como bandas angostas y alargadas de dos filas celulares cuboides-columnares, así como islas epiteliales con un patrón similar al retículo estrellado en su centro (**Fig. 3B**). Las características histopatológicas del FA pueden confundirse con las etapas primarias del OD (44), a pesar de que el FA no presenta tejidos duros.

Genéticamente, solamente dos casos reportados de FA detectaron mutaciones en BRAFV600E (46), incluyendo a estas lesiones dentro de la categoría BRAF mutante.

El tratamiento de esta neoplasia consiste en su remoción conservadora en caso de tumores pequeños y asintomáticos de pacientes jóvenes; sin embargo, el tratamiento ultraconservador puede llevar a la recurrencia de estas lesiones en un 16% de los casos. En caso de lesiones extensas y destructivas, la conducta debe ser radical con márgenes de seguridad (47).

#### 2.2.4. Odontoma

El OD es una malformación mixta, epitelial y mesenquimática, compuesta por tejido dental mineralizado, considerado el TOD más frecuente, diagnosticado en las primeras dos décadas de vida (48). Los pacientes con OD multifocales suelen asociarse al síndrome de Gardner. Se pueden encontrar dos tipos los cuales se diferencian en OD compuesto, localizado en el sector antero superior, y complejo, el cual muestra predilección por el sector postero inferior (48).

Suelen detectarse en primera instancia radiográficamente, estando asociados a piezas no erupcionadas y caracterizados por ser clínicamente asintomáticos, poder provocar

impactaciones, diastemas, mal posiciones, desvitalización de piezas vecinas, entre otras. En casos de gran tamaño pueden provocar expansión ósea (49).

Radiográficamente, se localiza entre las raíces o sobre la corona de una pieza impactada, presentando una radiopacidad bien marcada, rodeado por una cápsula delgada, y con corticalización ósea adyacente. Los ODs compuestos presentan un producto radiopaco que consiste en numerosas estructuras similares a piezas dentarias, mientras que los complejos consisten en una masa desorganizada de tejido calcificado. En etapas tempranas del desarrollo del OD se puede observar una radiolucidez con zonas focales de calcificaciones (49).

Macroscópicamente, el OD compuesto se observa como un conglomerado de estructuras blanquizcas similares a las piezas dentales, también llamadas dentículos, con diferente forma y tamaño. El OD complejo por su parte se observa como una masa amorfa, blanquizca y dura. Ambos casos pueden presentar una cápsula fibrosa que los rodea (48).

Histopatológicamente, en el OD compuesto se observa tejido desorganizado de esmalte, dentina, cemento y pulpa, y un tejido conjuntivo fibroso adyacente similar al folículo dental. En etapas tempranas del OD en desarrollo se observan tejidos similares al GD en desarrollo. El OD complejo presenta dentina tubular que encierra zonas de matriz del esmalte, así como epitelio reducido del esmalte con células fantasma, y una delgada capa de cemento puede presentarse en la periferia de esta masa. En casos donde se observa una cápsula fibrosa se pueden apreciar islas o bandas epiteliales, semejantes a las presentes en FA (**Fig. 3C**) (48).

El tratamiento de estas lesiones es mediante cirugía conservadora, siendo inusual su recurrencia (48).

### 2.2.5. Ameloblastoma

El AM es una neoplasia odontogénica benigna epitelial intraósea la cual presenta un crecimiento expansivo, agresivo y con tendencia a la recurrencia (1). Es considerado el segundo TOD más frecuente a nivel mundial, con un pico de incidencia en la cuarta y quinta década de vida, sin predilección por sexo (50, 51). Un 80% de los casos se localizan a nivel posterior mandibular, seguidos por una predilección por el sector anterior mandibular, siendo en última instancia de ubicación posterior maxilar y anterior maxilar (50, 51).

Clínicamente, se manifiesta como un tumor expansivo, de crecimiento lento e indoloro, el cual puede progresar a un crecimiento agresivo, destructivo y acelerado. Esto genera complicaciones como ser: pérdida dentaria, mal oclusiones, parestesia, dolor, trismo, deformidad facial, obstrucción aérea, pudiendo llegar a ser letal para el paciente (52).

Radiográficamente, a pesar de no ser patognomónico para esta neoplasia, se suele observar un patrón radiolúcido multilocular llamado en “panal de abeja”, siendo menos común el patrón unilocular. A su vez, se observa expansión vestibular y lingual, reabsorción radicular y asociación con piezas no erupcionadas.

Macroscópicamente, su apariencia puede variar desde un tumor sólido a uníquístico (AU).

Histopatológicamente, se observan seis tipos diferentes de ameloblastoma, siendo en orden de frecuencia: folicular, plexiforme, acantomatoso, granular, desmoplásico y basal (51). El patrón folicular se asemeja a islas de epitelio del órgano del esmalte con células similares a los ameloblastos, cuboides-columnares con polarización inversa, encontrando en el centro un tejido similar al retículo estrellado (**Fig. 3D**) (53). El patrón plexiforme se observa como bandas de epitelio ameloblástico con un retículo estrellado

en su centro, pudiendo presentar degeneración estromal. El patrón desmoplásico consiste en células periféricas cuboides a planas con células ahusadas centrales y con colágeno denso en su estroma. A su vez, el tipo desmoplásico presenta predilección por el sector antero superior y radiográficamente se aprecia un patrón mixto, radiopaco y radiolúcido (54).

Estudios moleculares han sugerido el origen de esta neoplasia a partir de células de la lámina dental, que fallan en desarrollarse correctamente, dada la temprana expresión de marcadores moleculares como ser PITX2, MSX2, DLX2, RUNX1 e ISL1 (55, 56). A su vez, se han detectado mutaciones en los genes de la vía de señalización MAPK, en un 90% de los casos analizados (46), siendo BRAFV600E la mutación más común, principalmente para aquellos casos de localización mandibular (46, 57). Otras mutaciones referentes a esta vía pueden encontrarse en los genes KRAS, NRAS, HRAS y FGFR2 (46, 58), remarcando su importancia en la patogénesis de este tumor. Por otra parte, se han encontrado mutaciones simultáneamente en referencia a SMO, principalmente en casos ubicados a nivel del maxilar superior (46, 58).

El tratamiento del AM es la escisión quirúrgica con márgenes de seguridad, más allá de los límites radiográficos de la lesión, dado que la cirugía conservadora tiene una tasa de recurrencia del 60-90% (59). El seguimiento debería realizarse hasta los 25 años considerando que más del 50% de las recurrencias ocurren dentro de los primeros 5 años luego del tratamiento (60). En casos de AM recurrente o con un perfil agresivo, siempre que pueda indicarse, se sugieren las nuevas terapéuticas dirigidas a BRAF, de manera complementaria a la cirugía (46, 58).

Si bien los AU y ameloblastoma periférico comparten ciertas características con el AM, también presentan diferencias significativas.

El AU se presenta como una cavidad quística única con/sin proliferación luminal.

Representa el 5-22% de todos los casos de ameloblastoma (61), siendo diagnosticados principalmente en la segunda década de vida, con una media etaria de 16 años para casos con impactación dental, y de 35 años para casos sin impactación dental (62).

Radiográficamente, se presenta como una lesión unilocular, radiolúcida, bien definida, que puede provocar reabsorción radicular y perforación cortical (63).

Histopatológicamente, podemos encontrar el patrón luminal e intraluminal. El patrón luminal presenta una única línea de células epiteliales quísticas similares a los ameloblastos, con un tejido similar al retículo estrellado subyacente (**Fig. 3E**). El tipo intraluminal presenta extensiones epiteliales en patrón plexiforme. Además de estas características, se puede presentar invasión mural del epitelio, considerado un patrón más agresivo (61). El AU es tratado mediante enucleación, pudiendo presentar recurrencias a los 10 años o más de realizado el tratamiento (61).

El ameloblastoma periférico, también conocido como extraóseo, se presenta a nivel de los tejidos blandos de la encía y en rebordes edéntulos, representando el 1-10% de todos los casos de ameloblastoma (64). La edad media de aparición es a los 50-54 años, siendo más prevalente de la quinta a séptima década de vida (64). Clínicamente, se presenta como una lesión indolora, exofítica, sésil, de coloración normal a rojiza.

Radiográficamente, se presenta como una erosión superficial o depresión ósea (64).

Macroscópicamente, se observa como una masa firme, ocasionalmente con pequeños espacios quísticos. El tratamiento consiste en cirugía conservadora, la cual tiende a ser curativa, sin recurrencias descritas (64).

### 2.2.6. Queratoquiste Odontogénico

El queratoquiste odontogénico (QO) es un quiste odontogénico caracterizado por poseer un recubrimiento delgado de epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado, con células basales hipercromáticas en empalizada. Representa el 10-20% de los quistes odontogénicos, siendo el tercero más común en frecuencia a nivel mandibular (80% de los casos) (65, 66). Presenta una incidencia mayor en la segunda a tercera década de vida, con un segundo pico en pacientes de 50-70 años (66). A su vez, tiene una leve predilección por el género masculino (67), y en el 5% de los casos ocurre como parte del síndrome de Gorlin (con localización en sector postero superior) (68). QO difiere de otros quistes odontogénicos por su comportamiento biológico agresivo e infiltrante, asociado a una tasa de recurrencia alta.

Clínicamente, se presentan como lesiones indoloras pero de gran tamaño que pueden provocar desplazamiento dentario. Se consideran hallazgos radiográficos, observándose como lesiones radiolúcidas bien delimitadas, frecuentemente con un margen cortical, uni o multiloculares (69).

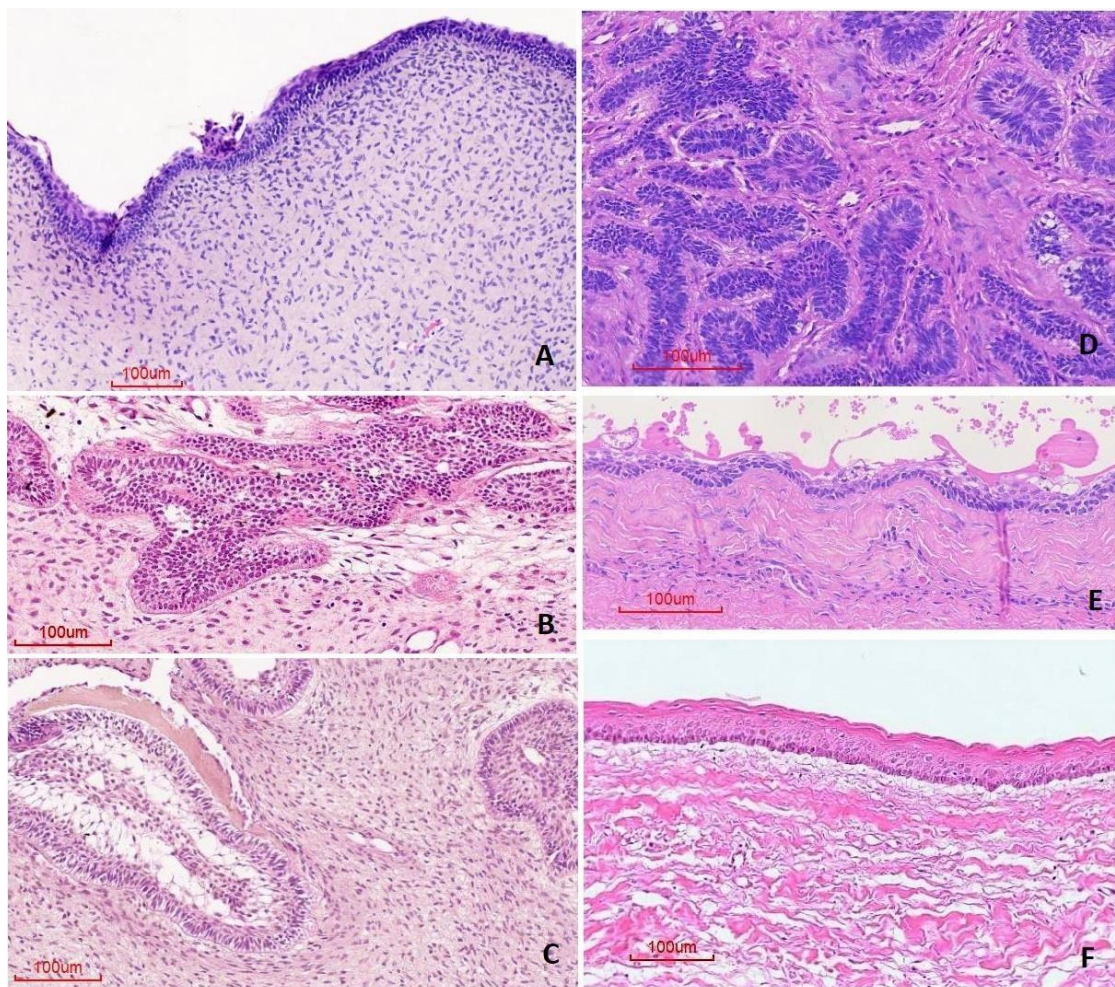
Histopatológicamente, se observan con un recubrimiento delgado de epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado, con células basales hipercromáticas en empalizada, con áreas focales de polaridad inversa (**Fig. 3F**). Pueden presentar crestas epiteliales de la lámina basal así como islotes epiteliales en su pared (69).

Estudios moleculares han sugerido que el origen de esta lesión es a partir de remanentes de la lámina dental o restos derivados de las células basales, asociados a una mutación o inactivación del gen PTCH1, el cual activa la vía de señalización Hedgehog, resultando en una proliferación aberrante del epitelio (67, 68). Sin embargo, esta mutación se



asocia principalmente a QOO sintromicos y no todos los casos reportados la presentan (70-72).

Las modalidades de tratamiento son variadas, pudiendo ser conservadoras o quirurgicas, siendo la más popular la descompresión quirurgica. Esta técnica busca reducir la presión interna de la cavidad quística permitiendo la aposición ósea y la reducción en tamaño de la lesión, generando cambios estructurales tanto en el epitelio como en el conjuntivo, pero sin alterar el ciclo celular o apoptosis (73). La aplicación de la solución Carnoy al realizar la enucleación reduce a un 8% la probabilidad de recurrencia del QOO (74).



**Fig. 3.** Cortes histológicas de entidades odontogénicas con tinción de HE. A) Tumor odontogénico primordial. B) Fibroma ameloblástico. C) Odontoma. D) Ameloblastoma convencional. E) Ameloblastoma uniuquístico. F) Queratoquiste odontogénico.

### 2.3. Biomarcadores Moleculares

Los biomarcadores moleculares son biomoléculas (i.e. moléculas de naturaleza orgánica) con diferentes grados de complejidad, estructura y distribución (75). No todas las biomoléculas son utilizadas como biomarcadores; los biomarcadores moleculares han sido estudiados y caracterizados con el potencial de permitir la identificación de un fenómeno particular a nivel del espacio y tiempo en un organismo (75). Estos biomarcadores pueden clasificarse según su aplicación, de acuerdo al National Health Institute USA 2001, en: biomarcadores de diagnóstico, pronóstico, predictivos, y de investigación. A su vez, según su función a nivel tisular pueden diferenciarse en proteínas que forman parte de los procesos de histogénesis y maduración, adhesión, proliferación celular, angiogénesis, apoptosis, supresión tumoral, así como también integrar un grupo de marcadores ya conocidos por conformar la estructura de ciertos tejidos (76).

#### 2.3.1. Colágeno IV

El colágeno es una proteína esencial de la matriz extracelular que brinda una estructura de soporte y señalización para los tejidos. Esta familia de proteínas comprende 28 tipos de colágeno, de los cuales el tipo IV juega un papel importante en la conformación de la membrana basal (77) e interviene en procesos de adhesión celular, migración, diferenciación y crecimiento, mientras que su degradación promueve la angiogénesis, el remodelado tisular y la progresión de procesos fisiológicos o patológicos (78).

Se han observado cambios en la distribución del colágeno en el proceso de odontogénesis, principalmente del tipo IV a nivel de la membrana basal del epitelio del esmalte, como se ha mencionado anteriormente (**Tabla 1**). Esta modificación de la composición de la membrana basal se relaciona con las interacciones epitelio-

mesenquimáticas, que impulsan la diferenciación celular y las subsiguientes etapas de morfogénesis dental (16, 17).

En primera instancia, el colágeno es secretado por las células del brote, mientras que en la etapa temprana de campana es secretado por el epitelio del órgano del esmalte, los pre-ameloblastos, para luego ser eliminado al depositarse las primeras capas de la preentina (16, 79). Las cadenas de colágeno IV cambian en su conformación a medida que se van desarrollando las etapas de la odontogénesis, pasando de 3-4-5 a 1-2 $\alpha$  (16).

Para los casos de FA y AM también se han observado modificaciones en las cadenas del colágeno IV, apoyando la idea de que las células en estos tumores no alcanzan un estado de diferenciación total de ameloblasto secretor (16, 79, 80), observando zonas focales negativas en las islas epiteliales, así como zonas positivas de variable intensidad (81). Además, se ha sugerido que la degradación del colágeno IV mediante metaloproteinasas de la matriz extracelular promueve la progresión de la lesión y la invasión local en el caso del AM (82).

Para el QOO, en los casos esporádicos (no sindrómicos) se ha descrito la expresión de colágeno IV en la membrana basal de manera continua y discontinua (83), relacionándolo con la capacidad de proliferación de estas lesiones; mientras que en casos sindrómicos la ausencia de esta proteína sugiere una alteración de la interacción epitelio-mesenquimática y un comportamiento más agresivo (84, 85).

### 2.3.2. Laminina

La laminina es una glicoproteína no colágena producida por células epiteliales y presente en la membrana basal, con un rol preponderante en el mantenimiento de la integridad de la interfase epitelio-mesenquimática, así como en procesos de morfogénesis, adhesión, angiogénesis, proliferación y migración celular (86-88). Se conocen ocho cadenas de laminina distintas genéticamente ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ) y siete formas de ensamblajes diferentes (laminina-1 a -7) (89). Mediante su interacción con integrinas, participa de vías de señalización, en especial de la vía MAPK, importante para la migración y proliferación celular (90).

Como ya se describió previamente en el capítulo de odontogénesis, laminina se encuentra expresada a nivel de la membrana basal del GD en desarrollo (18, 19, 91). Ante la presencia de predentina, se localiza a nivel de fibras subepiteliales de la papila dental pero no en predentina ni en ameloblastos maduros. Su expresión se pierde ante la presencia de odontoblastos secretores y la degradación de la membrana basal (**Tabla 1**).

La expresión de esta proteína ha sido reportada con una localización similar a nivel de las islas epiteliales de FA y AM (16). Para los casos de AM se ha sugerido que la membrana basal, conectada con las células similares a pre-ameloblastos, no se degrada como lo hace durante desarrollo normal de la odontogénesis, cuando los ameloblastos se diferencian, motivo por el cual se encuentra integridad de la misma (18). Algunos autores han reportado que subtipos específicos de laminina, como ser laminina 5  $\gamma 2$ , se expresa más débil y fragmentado a nivel de membrana basal del epitelio de AM (92).

En el QGO no se reportaron diferencias significativas entre los casos sindrómicos y esporádicos; algunos autores determinaron la ausencia de la misma a nivel de la membrana basal (84), mientras que otros encontraron su expresión continua en un 90%

de los casos analizados (83). Algunos autores relacionan la recurrencia y recidiva de estas lesiones con la ausencia de laminina (93).

### 2.3.3. Conexina 43

Las interacciones entre células adyacentes influyen en su comportamiento biológico, siendo fundamental en diversos procesos, principalmente en los relacionados con la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Uno de los sistemas intercelulares más importantes son las uniones Gap, que poseen una alta capacidad de intercambio iónico-molecular (94).

Estas uniones Gap se encuentran formadas por proteínas especializadas de la familia de las conexinas, que constituyen la membrana celular y forman canales intercelulares, permitiendo el pasaje de iones y moléculas, cumpliendo el rol de comunicación intercelular (95). Hasta el momento se han descrito más de 20 tipos de conexinas, siendo la conexina 43 (Cx43) de las más importantes, considerando su función en la supresión tumoral (96-98).

Se ha reportado la presencia de Cx43 durante la odontogénesis, en el órgano del esmalte (pre-ameloblastos, estrato intermedio y odontoblastos en diferenciación) y mesénquima dental (99, 100), lo que sugiere que su expresión en estos tejidos se relaciona con las capacidades de diferenciación e interacciones epitelio-mesenquimáticas (95) y que contribuye con la diferenciación de los ameloblastos permitiendo el transporte de iones desde células de la papila dental.

No se han encontrado reportes de la expresión de esta proteína en AM, FA, TOP u OD. Sin embargo, se ha estudiado la expresión de Cx43 en QOO encontrando que la misma es baja en comparación con la mucosa normal, lo que favorece el desarrollo y comportamiento de la lesión (101).

#### 2.3.4. CD34

La proteína CD34 integra una familia de sialomucinas compuesta por 3 miembros: el antígeno CD34, podocalixina y endoglicano (CD105), los cuales comparten patrones de expresión pero a su vez cada proteína se expresa de forma única en cierto tipo de tejidos (102).

CD34 es una glicoproteína transmembrana de células madre precursoras del sistema hematopoyético, cuya detección a través de inmunohistoquímica puede ser útil para identificar células leucémicas y tumores vasculares; igualmente se ha utilizado para precisar el diagnóstico de numerosos tumores de partes blandas con apariencia fusocelular (103). Esta proteína es inicialmente detectada en las células del sistema linfohematopoyético, precursoras de la serie mieloide y presentes en la médula ósea; se observa también en endotelio vascular, en células dendríticas de la dermis superior, en el endoneuro y en diversos tumores de partes blandas como el tumor fibroso solitario, el dermatofibrosarcoma protuberans, el sarcoma epitelioides, los tumores del estroma gastrointestinal, los lipomas atípicos y fusocelulares y el sarcoma de Kaposi (103). A su vez, se encuentra expresada en fibroblastos embrionarios y una gran variedad de células no hematopoyéticas, disminuyendo su expresión de manera progresiva a medida que la célula madura y se diferencia (104). La morfología de estas células tiende a ser alargada con ausencia de uniones estrechas (105).

CD34 se ha utilizado para determinar la densidad microvascular intratumoral en TODs por ser un antígeno endotelial (106). La sobreexpresión de esta proteína se ha correlacionado con una conducta agresiva en varios TODs, como ser QO, AM y carcinoma ameloblástico (106-110). Se ha observado su presencia en QO, en células dendríticas adyacentes al epitelio quístico, así como en AM, próximas a las islas epiteliales, sin presentar aparente relación con el endotelio vascular (107).

Por otra parte, se ha reportado que las células madre del GD expresan marcadores mesenquimales tales como CD146, CD106, CD90, CD73 CD29 y CD13; sin embargo, según Aydin y cols. no expresan marcadores de célula madre hematopoyética como ser CD34 (111). Un estudio realizado por Muica y cols. determinaron la presencia de esta proteína en el GD, tanto en el endotelio vascular de la papila dental (semana 9-10) como en la capa externa de la papila dental (semana 12-16) y en la pulpa dental (semana 21-24), así como en la capa externa epitelial del órgano del esmalte; donde se observa una disminución paulatina de la misma hasta la semana 16 para luego aumentar hasta la semana 24 (112), demostrando una variación de su expresión en las diferentes etapas de la odontogénesis.

#### 2.4. Digitalización y análisis de imágenes histológicas

Los componentes celulares y no celulares de los preparados histopatológicos coexisten al mismo tiempo y en tejidos adyacentes resultando en una heterogeneidad estructural temporo-espacial. La identificación de dichos componentes para el diagnóstico histopatológico de rutina con tinciones como hematoxilina-eosina (HE) es en primer lugar realizado por el reconocimiento de la arquitectura tisular y morfología nuclear (113). Recientemente, el área de diagnóstico patológico asistido por la tecnología ha progresado significativamente, teniendo una relevancia clínica y biológica, al estudiar imágenes histopatológicas combinadas con técnicas moleculares, evaluándolas mediante métodos como el procesamiento de imágenes y la inteligencia artificial. La inteligencia artificial consiste en emular “inteligencia” humana a nivel computacional en función de que el software tenga conocimientos del entorno y parámetros de entrada para realizar determinadas tareas, en donde su respuesta tenga cierta utilidad o interés. Dentro de un gran conjunto de aplicaciones de inteligencia artificial encontramos al denominado machine learning (114, 115).

El término machine learning refiere a un conjunto de enfoques metodológicos que permiten conformar modelos predictivos o clasificatorios de análisis de fenómenos basados en la acumulación de datos y entrenamiento o aprendizaje, que luego pueden usarse para clasificar nuevas observaciones y por lo tanto emulan el comportamiento inteligente de los humanos (114).

El término deep learning refiere a una sub-área de inteligencia artificial que trabaja con métodos asociados al aprendizaje representativo, el cual mejora el manejo de los datos al ganar experiencia (115). Estos métodos explotan configuraciones de procesamiento de redes neurales convolucionales, que también emulan en cierto modo los circuitos neuronales del sistema nervioso, y que se pueden entrenar para resolver ciertos



problemas (por ejemplo clasificaciones de objetos o determinación del estado de un sistema) cuando existe suficiente información.

La segmentación automática de imágenes histológicas digitalizadas en regiones que representan diferentes tipos tisulares es de fundamental importancia para desarrollar herramientas diagnósticas digitales. La segmentación es una técnica computacional que procesa imágenes digitales agrupando píxeles con propiedades colorimétricas similares en regiones que (en el caso de histopatología) probablemente representen objetos de interés (por ejemplo organelas, células, tejidos u otras estructuras). Éstos entonces pueden ser caracterizados geoméricamente para obtener información cualitativa o cuantitativa de los objetos que representan (114, 115).

Éstas técnicas cuantitativas/cualitativas de análisis de imágenes reducen el error humano, que es asociado a cierto grado de subjetividad de la percepción visual, y por lo tanto incrementan la precisión diagnóstica, reducen el volumen de trabajo y estandarizan los sistemas de patrones para la clasificación de las patologías, los cuales muchas veces tienden a ser subjetivos o ambiguos (114, 115).

Las técnicas de reconocimiento de patrones son otro tipo de métodos en el cual se seleccionan determinadas características (por ejemplo el color, la forma, el tamaño) y se agrupan los resultados en regiones que pueden corresponder a clases histológicas determinadas, facilitando el análisis de los objetos de interés (114, 115).

Estos métodos de análisis pueden ser supervisados o no supervisados. Los métodos supervisados se construyen normalmente a partir de regiones (conjuntos de píxeles) de entrenamiento previamente etiquetadas que se utilizan para entrenar un modelo clasificador que luego se utiliza para predecir las clases de nuevos datos sin etiquetar.

Para esto, es requerido el acceso a imágenes de referencia como evidencia empírica para

el entrenamiento (114, 115). En contraste, los enfoques no supervisados (análisis de clusters o conglomerados) no requieren entrenamiento con grupos pre-etiquetados para el aprendizaje, sino que se basan en medidas de similitud de los datos para agrupar las observaciones en conglomerados homogéneos. En el análisis histopatológico de imágenes, los conglomerados son de particular interés por su potencial como herramienta exploratoria que puede prever información sobre estructuras anatómicas o funcionales que no son inmediatamente evidentes para el operador (114, 115).

#### 2.4.1. Umbralización o “thresholding”

La mayoría de los métodos aplicados para el análisis de imágenes histopatológicas teñidas con HE, inmunohistoquímica e histoquímica, se basan en procedimientos de umbralización, o en inglés thresholding, en donde a partir de un valor de umbral (threshold) del color o intensidad de la imagen se logra identificar (o segmentar) el objeto de interés (116).

Es una técnica de segmentación instantánea que resulta en el agrupamiento de píxeles en base a los componentes o características compartidas. El resultado es una imagen binaria donde los objetos de interés tienen píxeles de valor por ejemplo 1 y el fondo valor 0. Según Sezgin y cols. (117) los algoritmos para la binarización de imágenes se pueden agrupar en base a diversos métodos o principios: explotando la forma del histograma, de la escala de grises, entropía de regiones de la imagen, atributos de los objeto de interés, según la distribución espacial, entre otros. Dentro de las posibilidades que ofrece la plataforma para análisis de imágenes ImageJ (118) se encuentran implementadas una variedad de opciones automatizadas de thresholding en base a la distribución de intensidades de escala de grises, por ejemplo los métodos de: Huang, Intermodos, isoData, Li, Maximum Entropy, Mean, Minimum Error, Mínimum,

Moments, Otsu, Percentile, Renyi Entropy, Shanbhag, Triangle, y Yen (119). Estas opciones permiten la binarización de imágenes en base a diferentes principios de partición en objeto y fondo de acuerdo a la intensidad de los píxeles en la imagen.

#### 2.4.2. StarDist

Es un método relativamente reciente de detección de núcleos celulares que predice su perfil morfológico, suficientemente flexible y preciso para competir con otros métodos de segmentación. Stardist utiliza una construcción poligonal geométrica de “star-convex-polygons” para aproximar la forma redondeada nuclear (120). El método está basado en redes neurales (deep learning) para predecir la representación del objeto de interés y determinar así que píxeles son parte de un núcleo y su forma.

#### 2.4.3. Watershed Transform

El watershed transform o transformación de vertientes es un método morfológico de segmentación de imágenes que separa a los objetos de interés mediante líneas de vertientes (watershed lines) en cuencas fluviales (catchment basins). Estos términos se refieren a la representación de imágenes como mapas topográficos tridimensionales (donde la intensidad de la imagen es la altitud del terreno) sobre las cuales se simula una inmersión de agua. Las líneas de vertientes son definidas cuando diferentes cuencas fluviales entran en contacto (121).

Aplicado al ámbito de la histología, la posición e intensidad de los núcleos celulares permiten segmentar el resto del tejido en células virtuales o v-cells (121) donde cada una contiene exclusivamente un núcleo, lo cual permite determinar una aproximación a la forma y tamaño de las células en un tejido.

#### 2.4.4. Trainable WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis) Segmentation

Este método ha sido implementado en un software de acceso abierto el cual combina el procesador Fiji con algoritmos de machine learning de WEKA (una librería de procedimientos analíticos para machine learning creada por Waikato University, Nueva Zelanda) para clasificar píxeles (122) basado en un procedimiento llamando forest fire. Para la utilización de este tipo de herramientas se deben conocer y anotar/etiquetar regiones típicas de las estructuras de interés a identificar, previo al entrenamiento del mismo. Las regiones etiquetadas sirven de ejemplo para entrenar el modelo, basado en un grupo de transformaciones de la imagen que son usadas como nuevos datos relacionados a cada píxel para luego segmentar el resto de los píxeles, y también puede usarse para para clasificar nuevas imágenes (122). El usuario puede elegir diferentes transformaciones y parámetros para la segmentación, por ejemplo: detección de bordes, textura, reducción de ruido, detección de membranas, entre otras (122).

#### 2.4.5. Labkit (Labeling and Segmentation Toolkit for Big Image Data)

El plugin de la plataforma Fiji Labeling and Segmentation Toolkit for Big Image Data (Labkit) es otra herramienta para la segmentación de imágenes, también basada en el clasificador de píxeles de WEKA, pero más eficiente y rápida en cuanto a los requerimientos de hardware, permitiendo integrar esta función como un paso en el procesamiento automático de imágenes (123). Labkit permite identificar objetos de interés y segmentar las imágenes en imágenes binarias o con múltiples etiquetas.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

El TOP es una entidad recientemente descrita y reconocida por la OMS, existen pocos casos reportados a la fecha y poca información sobre su caracterización morfológica. A su vez, la histomorfología de este tumor sigue siendo discutida; existen lesiones y tejidos cuya histopatología es similar (por ejemplo el OD en desarrollo, el FA) y por lo tanto es necesario desarrollar una caracterización morfológica que permita obtener información auxiliar para complementar el diagnóstico de esta nueva entidad.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

El procesamiento digital de imágenes se ha convertido en parte integral de la microscopía moderna, lo que permite el análisis y la reconstrucción de estructuras de interés por medio de diferentes algoritmos. En el presente trabajo se busca aplicar técnicas de segmentación basadas en superpixels para realizar una caracterización estructural de TOP, en especial su arquitectura conjuntamente con la expresión inmunohistoquímica de determinadas proteínas. Este estudio contribuye a generar nuevo conocimiento sobre la maduración del tumor, con la intención de aportar información para el desarrollo de nuevos conceptos diagnósticos, terapéuticos, o brindar datos relevantes sobre marcadores pronósticos y de avance tumoral de utilidad para el manejo del paciente.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Lograr una caracterización de la arquitectura del tumor odontogénico primordial por medio del procesamiento y análisis de imágenes usando algoritmos, y facilitar su comparación con otras entidades odontogénicas.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar la región epitelial, subepitelial y mesenquimática de TOP, FA, OD, AM, AU, QGO y GD.
2. Determinar la expresión de las proteínas estructurales colágeno IV y laminina en la interfase epitelio-mesenquimática en TOP, FA, OD, AM, AU, QGO y GD.
3. Determinar la expresión de la proteína de adhesión Cx43 en TOP, FA, OD, AM, AU, QGO y GD.
4. Determinar la expresión de la proteína CD34 en el componente mesenquimático de TOP, FA, OD, AM, AU, QGO y GD.
5. Comparar las características estructurales y la expresión proteica de TOP con FA, OD, AM, AU, QGO y GD.
6. Dilucidar si la estructura de TOP es comparable a un estado intermedio de evolución entre las variantes tumorales comparadas.

## **6. ESTRATEGIA Y METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN**

### **6.1. Consideraciones Éticas**

Este estudio ha recibido la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de la República, Facultad de Odontología, Uruguay (21/11/19, Exp. No. 091900-000319-19).

### **6.2. Diseño de estudio**

Este estudio es analítico, transversal y retrospectivo.

### **6.3. Obtención de muestras**

El tipo de muestreo fue no probabilístico, por conveniencia. La muestra está representada por todas las historias clínicas y muestras tumorales con diagnóstico histopatológico previo de TOP, FA, OD, AM, AU, QO y GD en el período existente hasta el año 2020. Las muestras se encuentran almacenadas en bloques de parafina en el Laboratorio de Patología Molecular Estomatológica de la Facultad de Odontología, Universidad de la República, Montevideo Uruguay, y provienen de diferentes servicios de Patología Bucal e Histología que incluyen los países Uruguay, México, Brasil y Japón. Se incluyeron un total de 7 casos de TOP, 10 casos FA, 7 casos de OD, 10 casos de AM/AU, 10 casos de QO y 7 casos de GD de la región maxilofacial producto de biopsia excisional. Se realizaron cortes para tinción con HE, Azul Alcian, así como también para la técnica de inmunohistoquímica para detectar colágeno IV, laminina, Cx43 y CD34.

#### **6.3.1. Criterios de inclusión**

- Especímenes con diagnóstico previo de TOP, FA, OD, AM, AU, QO y GD.
- Muestras exentas de errores de manejo de procedimiento.

### 6.3.2. Criterios de exclusión

- Especímenes que al ser revalorados y reclasificados acorde a la clasificación de los TODs de la OMS del 2017 no sean diagnosticados como TOP, FA, OD, AM, AU, QOQ y GD.
- Especímenes que se encuentren deteriorados por fijación inadecuada o que no sean útiles o representativos.

## 6.4. Procedimientos

### 6.4.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina

HE es el método de tinción más comúnmente utilizado en microscopía diagnóstica de rutina, en donde la hematoxilina tiñe sustancias ácidas incluyendo ácidos nucleicos y núcleos en color azul/violeta, mientras que la eosina es usada como una tinción de contraste para revelar proteínas en los compartimentos intra y extra celulares en color rosa.

En primer lugar se desparafinaron las láminas en un horno a 60° por 60 minutos.

Luego, los cortes se hidrataron en un tren de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 96, 80, 70 y 50%) y dos lavados con agua destilada, realizando 15 baños en cada uno. Se considera un baño como una sumergida instantánea.

Se lavaron las láminas con agua destilada por 1 minuto para luego sumergirlas en hematoxilina durante 3 minutos. Posteriormente se lavaron las láminas con agua destilada durante 10 minutos, para luego teñirlas con eosina durante 7 minutos.

Finalmente, se realizaron lavados con agua corriente para su posterior deshidratación en el tren de alcoholes, ahora en sentido creciente, y montaje.



#### 6.4.2. Tinción de Azul Alcian

Las láminas de TOP y GD desparafinadas y rehidratadas se sumergieron en una solución de ácido acético al 3% durante 5 min. Posteriormente, se tiñeron con solución de azul alcian al 0,5% pH durante 30 min a temperatura ambiente, ácido peryódico al 0,5% durante 10 min y reactivo de Schiff durante 20 min (PAS). Finalmente, las secciones se deshidrataron en etanol graduado. Esta técnica se realizó para revelar cualquier cambio en la composición del tejido en las regiones subepiteliales. Como resultado los mucopolisacáridos ácidos son teñidos con un tono azul y los mucopolisacáridos básicos se tiñen de púrpura-violeta.

#### 6.4.3. Técnica de inmunohistoquímica

Las laminillas se sometieron a un proceso de silanización, el cual consiste en sumergirlas durante 10 minutos en 250ml de poly-l-lisina (solución adherente de tejidos) a una concentración de 10x; y posteriormente se dejan secar a temperatura ambiente por 24 horas. Los cortes se realizaron en un micrótomo calibrado con un grosor de 3 $\mu$  a una inclinación de 10°. Se llevaron a una tina con agua a 40°C y se colocaron en las laminillas previamente silanizadas.

Para el proceso de desparafinación, las laminillas se colocaron en una rejilla metálica y se pusieron dentro de una estufa de desparafinado a 60°C durante una hora.

Posteriormente se cambiaron a rejillas de plástico y se sumergieron en un depósito con xilol durante 5 minutos; los residuos de parafina se eliminaron mediante 15 baños en otro depósito de xilol.

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

La recuperación antigénica o desenmascaramiento de los epítopes para laminina y colágeno IV se realizó mediante el uso de proteinasa k 100mg/ml por 15min.

La recuperación antigénica se realizó mediante el método de olla a presión-horno de microondas para los anticuerpos Cx43 y CD34. La solución desenmascaradora utilizada dependió de cada uno de los anticuerpos, así como de las recomendaciones del fabricante, en estos casos solución de citrato de sodio 10mM (pH 6.2).

La olla a presión se precalentó con 500ml de agua destilada durante 5 minutos en el horno de microondas a máxima potencia (750W). Mientras, las laminillas se colocaron dentro de los vasos copplin con la zona esmerilada hacia arriba, la solución desenmascaradora se agregó a los vasos tomando como referencia de tope dicha zona esmerilada. Los vasos se cerraron e introdujeron dentro de la olla a presión, la cual se colocó nuevamente dentro del horno de microondas programado 7 minutos a máxima potencia.

Se esperó hasta que el sonido de la válvula de escape de la olla a presión fuera constante durante 15 segundos, a partir de los cuales se contó un minuto y se detuvo el temporizador del microondas. La olla se sacó del microondas y se esperó hasta que la válvula bajara para poder abrirla (8 minutos), se sacaron los vasos y se colocaron abiertos dentro de un recipiente con agua corriente durante 10 minutos.

Los vasos se enjuagaron 3 veces con agua destilada. Las peroxidasas endógenas se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 0.9%, seguidos por 3 lavados con agua destilada.

Las laminillas se montaron en los coverplates (sistema por capilaridad vertical) con agua destilada y en los racks. Para verificar el correcto sellado entre el coverplate y la

laminilla se agregó al depósito formado por estas dos estructuras PBS a 1x durante 5 minutos.

Se incubaron los anticuerpos primarios monoclonales contra colágeno IV (Biocare/Col94, RTU), laminina (DAKO/4C7, dilución 1:50), Cx43 (Thermo Fisher/CX-1B1, dilución 1:100) y CD34 (Biocare/QBEnd10, dilución 1:50), por un período de 45 min. El anticuerpo monoclonal correspondiente se agregó (80µl) con una pipeta y colocó en el depósito formado entre el cover-plate y la laminilla; la tapa del rack se cerró.

Posteriormente, los cortes se incubaron con el segundo anticuerpo biotinilado anti-ratón/Rnti-conejo y con el complejo streptavidina/peroxidasa (LSA-B + Labeled streptavidin-biotin, Dako Corporation, Carpintería CA, USA) por 30 minutos 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 cuidando que los excedentes cayeran en un recipiente con cloro y luego se colocaron en una rejilla sumergida en agua corriente a temperatura ambiente.

Las secciones se contra tiñeron 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 (todas estas soluciones a temperatura ambiente), para nuevamente ser lavadas con agua corriente. Las laminillas se colocaron en rejillas de plástico y se llevaron al tren para su deshidratación, esta vez a la inversa del proceso de hidratación sin sumergirlas en xilol.

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

Para el control negativo, el anticuerpo primario se sustituyó por PBS.

La cuantificación citoplasmática y/o membranosa se realizó visualmente utilizando un microscopio óptico (Eclipse CI-L, Nikon, Japón) amplificado a 40x.

#### 6.4.4. Obtención de imágenes histológicas en alta resolución

Para la digitalización de las láminas con sus diferentes tinciones se utilizó el escáner

Motic EasyScan© con un objetivo x40 en modo estándar. Se utilizó el software

PMA.start (124) de Pathomation para la visualización y captura de regiones de interés.

Para las muestras de TOP, AU, QO y GD, el borde superior del marco de la imagen se

usó como referencia para alinear el componente epitelial, de modo que todas las

imágenes pudieran alinearse de manera comparable. Las imágenes RGB se guardaron

en formato TIFF. Para la comparación de las imágenes teñidas con CD34 se obtuvo un

campo de visión de 315 x 638  $\mu\text{m}$ , para el resto de las imágenes analizadas no se

consideró un tamaño específico.

#### 6.4.5. Análisis de la localización de la expresión de CD34

Se analizaron los márgenes del tejido en las imágenes de TOP teñidas con CD34 para estimar la proporción (%) de margen tumoral en donde se observó positividad subepitelial. Para llevarlo a cabo se utilizó la herramienta freehand line de ImageJ y se determinó la longitud de las áreas positivas en TOP.

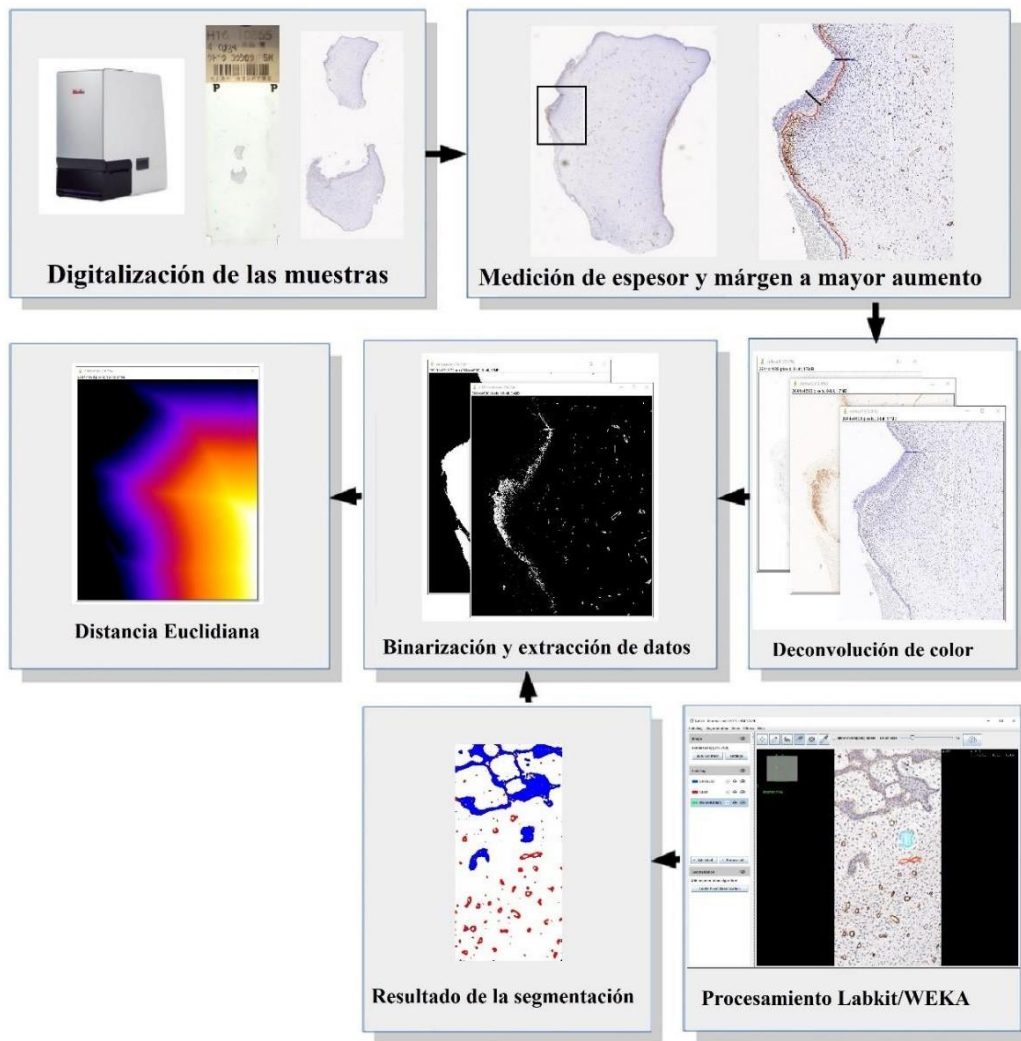
Las imágenes de TOP, AU, QQQ y GD teñidas con CD34 se analizaron utilizando el plugin de ImageJ que realiza deconvolución de color (125). Por medio del macro stain distance se calculó el perfil de expresión desde el borde superior de la imagen (que corresponde al límite externo del tumor, siendo en estos casos tejido epitelial) hasta el borde inferior (que corresponde a una profundidad máxima de 638 $\mu$ m) y se determinó para todos los casos la presencia de tinción de CD34 en función de la profundidad de la imagen (distancia del eje Y). Se estableció el promedio de espesor de epitelio entre todos los casos de TOP y entre todos los casos de AU, QQQ y GD para que posteriormente fueran comparables en la distancias calculadas desde el límite epitelio-mesenquimático.

La tinción inmunohistoquímica utiliza una precipitación cromógena basada en un sistema enzimático para evidenciar el resultado, la cual es difícil de controlar y, por lo tanto, la tinción no es estequiométrica. Por esta razón, y para evitar el problema de la cuantificación de la intensidad del cromógeno que no es robusto, se optó por detectar la presencia/ausencia de tinción en las muestras luego de aplicar un método automático de binarización. La distancia de los pixeles representando tinción positiva al borde del tejido fue determinada usando la distancia Euclidiana en ImageJ (126).

Este análisis tuvo que modificarse cuando se aplicó a FA, OD y AM debido a la diferencia de topología del componente epitelial entre estas neoplasias y TOP: mientras

que TOP contiene epitelio en la periferia, las otras entidades contienen múltiples islas epiteliales y la distancia de estas al componente mesenquimal necesita ser modificada. Con este fin, la distancia entre el epitelio y las regiones positivas de CD34 se determinó utilizando la distancia Euclidiana de las regiones epiteliales identificadas de FA, OD y AM. Se utilizaron dos plugins diferentes pero con similar funcionalidad: Labkit (123) y Trainable WEKA segmentation 2D (122) en Fiji (**Tabla 4**). Estos identificaron el componente epitelial mediante el entrenamiento de un clasificador, reconociendo los píxeles de la imagen pertenecientes a diferentes clases de tejido que el operador proporciona de forma interactiva: tejido mesenquimal, vasos teñidos con CD34 e islas epiteliales. El resultado del entrenamiento es una imagen segmentada de tres fases, y el clasificador se puede usar para segmentar imágenes nuevas. Luego, se aplicó la distancia Euclidiana a los píxeles etiquetados como “no epiteliales” para calcular su distancia al epitelio segmentado más cercano. Posteriormente, las etiquetas se usaron para calcular la distancia de las regiones de CD34 al componente epitelial.

La secuencia de procedimientos se esquematiza en la **Fig.4**.



**Fig. 4.** Secuencia de procedimientos del análisis de imágenes para la localización de la expresión de CD34. Nótese que los primeros pasos describen el modelo propuesto para entidades con epitelio en la periferia del tumor, por otro lado se describe para los que presentan islas epiteliales.

**Tabla 4.** Parámetros utilizados en Trainable WEKA segmentation 2D para la segmentación de fibroma ameloblástico:

Training features	Gaussian blur Hessian Membrane projections Sobel filter Difference of gaussians
Membrane thickness	1
Membrane patch size	19
Minimum sigma	1.0
Maximum sigma	16.0
Classifier options	FastRandomForest
Result overlay opacity	33

#### 6.4.6. Análisis de la densidad nuclear

Las imágenes de TOP teñidas con Azul Alcian (que proporcionaron un contraste adecuado para visualizar los núcleos) se procesaron utilizando el complemento ImageJ/Fiji StarDist 2D (**Tabla 5**) (120) para segmentar los perfiles nucleares.

**Tabla 5.** Parámetros utilizados en StarDist 2D para la segmentación nuclear:

Model	Versatile (H&E nuclei)
Normalize image	Yes
Percentile low	1.0
Percentile high	99.8
Threshold	0.05-0.40
Output	Both
Number of tiles	8
ROI	Automatic

Para determinar la densidad nuclear en función de la profundidad del mesénquima circundante se separaron las máscaras de los núcleos que contactaban, utilizando watershed transform (121), y se alinearon las imágenes tomando como referencia el espacio entre el borde superior de la imagen y la primera máscara nuclear, para permitir un cálculo comparable de la distancia de cada núcleo a la capa epitelial superficial. Después de la alineación de todos los cortes, se creó un stack (imagen con múltiples planos) en donde cada plano representa una muestra diferente. Luego se calculó la integral de la escala de grises en todos los cortes para representar la probabilidad nuclear de encontrar un píxel que represente un núcleo en cada ubicación de la profundidad de la muestra del tumor.

A las imágenes de Azul Alcian se les delimitó la interfase epitelio-mesenquimática con freehand tool, para luego hacer una separación en escala de grises de los núcleos epiteliales y mesenquimáticos, evaluándolos por estratos (127). Para ello se debe alinear la interfase epitelio-mesenquimática, con un macro para remover el espacio superior, el



cual separa el estrato epitelial del mesenquimal, dejando los núcleos mesenquimáticos alineados. Posteriormente, se aplicó el plugin Morphology – particles8 para realizar un análisis morfológico nuclear por estratos (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Variables morfológicas estudiadas con el plugin Particles8

Perímetro	Calculado desde el centro de los píxeles de los límites
Área	El área definida por el perímetro
Circularidad	$4*\pi*\text{área}/\text{perímetro}^2$
Forma	$\text{perímetro}^2/\text{área}$
Rectangularidad	$\text{área}/\text{ArBBBox}$

ArBBBox = Feret\*Breadth.

Para la circularidad el valor 1 equivale a un círculo perfecto mientras que valores <1 son característicos de formas distorsionadas no circulares. Para la forma, un círculo digital equivale a valores de 13-14, dependiendo del radio. En el caso de la rectangularidad el valor 1 equivale a rectángulos, 0,79 para formas con tendencia circular, 0,5 a cuadrados y el 0 para objetos en cruz.

A partir de estos valores se realizó estadística descriptiva para establecer diferencias entre los estratos epitelial y mesenquimático.

#### 6.4.7. Análisis de la morfología celular

La arquitectura del tejido epitelial y mesenquimático se analizó en los diferentes estratos celulares. En primer lugar se localizaron los núcleos de cada célula para posteriormente realizar la partición por estratos. Se procesaron las láminas teñidas con HE para detectar los perfiles nucleares utilizando el macro StarDist 2D (con los parámetros ya mencionados) (120), los cuales acto seguido se separaron (en caso de encontrarse superpuestos o adyacentes) mediante el macro Separate Labels (126), que separa regiones con etiquetas adyacentes. Posteriormente, se creó una imagen binaria y se identificó el espacio libre (sin tejido) como “background”, para los casos en donde el

epitelio se encuentra en la periferia. Esto limita la segmentación al sector donde existe tejido, y evita abarcar las zonas libres del mismo.

La partición de la imagen binaria en múltiples células virtuales (cada una de las cuales encierra un núcleo), se obtuvo mediante el método de watershed transform, en donde los píxeles que no pertenecen a la zona de influencia de ningún núcleo en particular serán tomados como los límites (watershed lines) entre células virtuales adyacentes (121). A la imagen resultante se le aplicó el plugin Morphology – particles8, para extraer los valores del área celular en los diferentes estratos de células virtuales (127). Se compararon mediante estadística los valores del área del primer estrato de TOP vs el primer estrato de cada uno de los TODs aplicando T Student (ajustado a Mann Whitney). A su vez, se realizó estadística descriptiva para el estrato 1 de todos los TODs. Por último, se realizó T Student (ajustado a Mann Whitney) para comparar el área entre las células virtuales de los estratos: epitelial, subepitelial, mesénquima y mesénquima profundo de TOP.

#### 6.4.8. Análisis por agrupamiento de células virtuales

A partir de la imagen de células virtuales obtenida en el procedimiento anterior se realizó el análisis por agrupamiento (clustering) mediante métodos no supervisados (sin previo etiquetado) para investigar qué grado de clasificación automática se puede obtener en los tejidos segmentados. Estos métodos de agrupamientos no tienen información previa sobre el contenido de la imagen y es el usuario quien determina el número de clases o grupos en que se clasificarán los datos de acuerdo a la similitud de los parámetros extraídos de cada observación (geometría y descriptores de la distribución valores de los píxeles en cada célula virtual).

Se probaron siete métodos diferentes para realizar la segmentación por agrupaciones para investigar la posibilidad de una clasificación no supervisada de la segmentación de las células virtuales basada en la información presente en la imagen. Estos métodos fueron: Expectation maximization (128), *k*-means (129), Hierarchical (130), Farthest first, Make Density Based (131), X Means y Learning Vector Quantization (132).

Expectation maximization es un método iterativo para estimar la probabilidad máxima de datos incompletos en diferentes niveles de generalización (128). Alterna pasos de esperanza (E), donde se computa la esperanza de la expectación mediante la inclusión de variables latentes como si fueran probabilidad, y un paso de maximización (M), donde se computan estimadores de máxima verosimilitud de parámetros mediante la maximización de la verosimilitud esperada del paso E, repitiendo el proceso (128).

El algoritmo de agrupación por *k*-means es un método que tiene como objetivo clasificar “*m*” puntos en “*n*” dimensiones en “*k*” grupos, en el que cada punto pertenece al grupo cuyo valor medio es el más cercano (129).

El método Hierarchical se basa en la descomposición jerárquica de los datos, representado generalmente por un árbol que iterativamente se divide en subunidades más pequeñas hasta que cada una de ellas se componga de un único objeto (130, 131). De esta forma, cada nudo del árbol representa un agrupamiento de datos.

El algoritmo Make Density Based se basa en el reconocimiento de agrupaciones determinadas por la densidad de puntos de las mismas (131). La base de este algoritmo radica en que para cada punto de un grupo el vecindario de un radio dado tiene que contener una mínima cantidad de puntos.

Learning Vector Quantization es un método de aprendizaje supervisado basado en el principio computacional denominado “winner-take-all”, en donde no se define el

vecindario alrededor del ganador durante el aprendizaje, siendo su único propósito definir regiones (132).

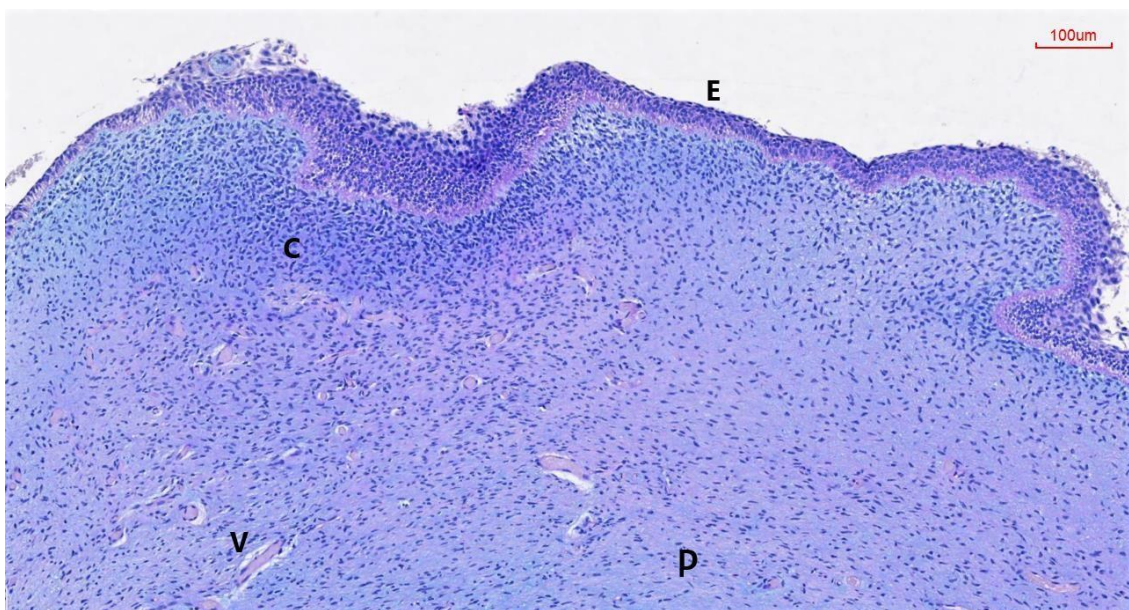
Posteriormente se aplicó el índice Jaccard para determinar el grado de coincidencia entre los clusters obtenidos de manera no supervisada y el epitelio definido manualmente por el usuario en la imagen HE.

## 7. RESULTADOS

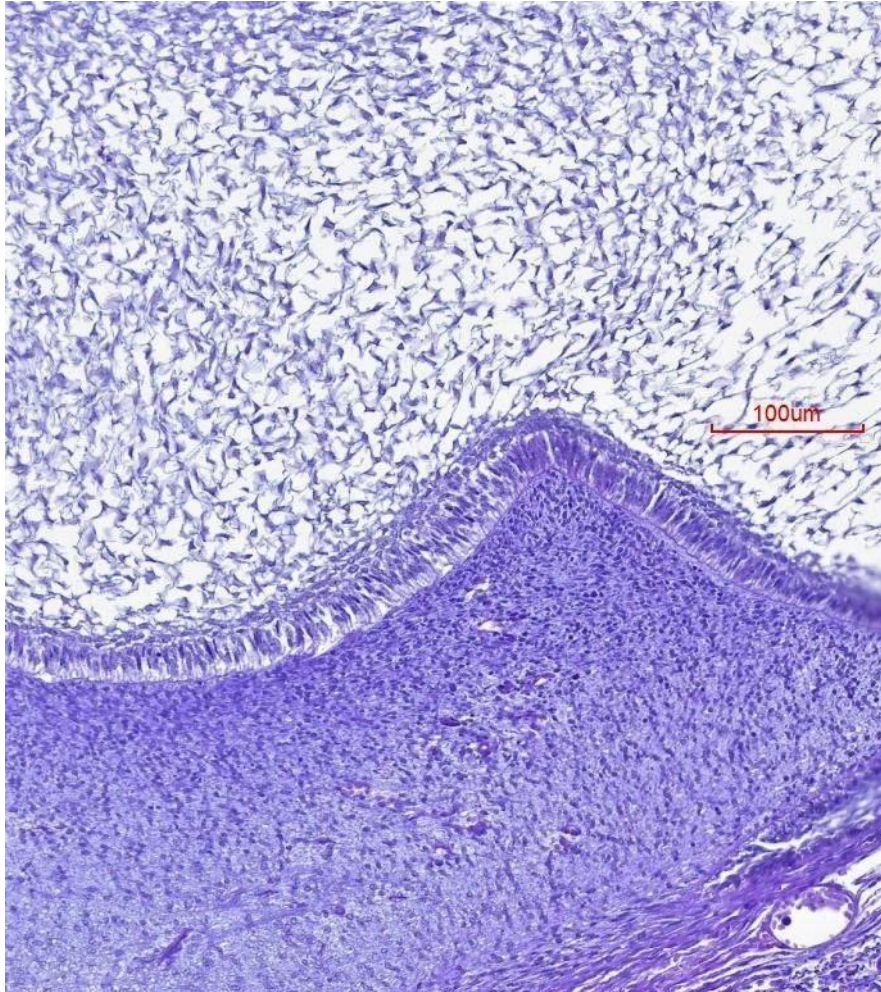
### 7.1. Azul Alcian

La tinción de Azul Alcian en las láminas de TOP reveló regiones de color celeste que representan la presencia de mucopolisacáridos ácidos a nivel subepitelial. Esto sugiere una zona diferente en cuanto a su composición y funcionalidad, que a su vez coincide con un incremento en la densidad celular, cuando se compara con zonas más profundas del mesénquima (**Fig. 5**).

En el caso de GD se observó la presencia de mucopolisacáridos ácidos a nivel del retículo estrellado, así como en sectores de la papila dental, sugiriendo una composición similar a la de TOP pero con una localización diferente (**Fig. 6**).



**Fig. 5.** Corte histológico con tinción Azul Alcian en tumor odontogénico primordial. E: epitelio, C: condensación mesenquimática, V: vasos sanguíneos, P: mesénquima profundo. Se observa la zona de condensación mesenquimática con predominio de tinción celeste correspondiente a mucopolisacáridos ácidos, lo cual no se aprecia en el mesénquima profundo.



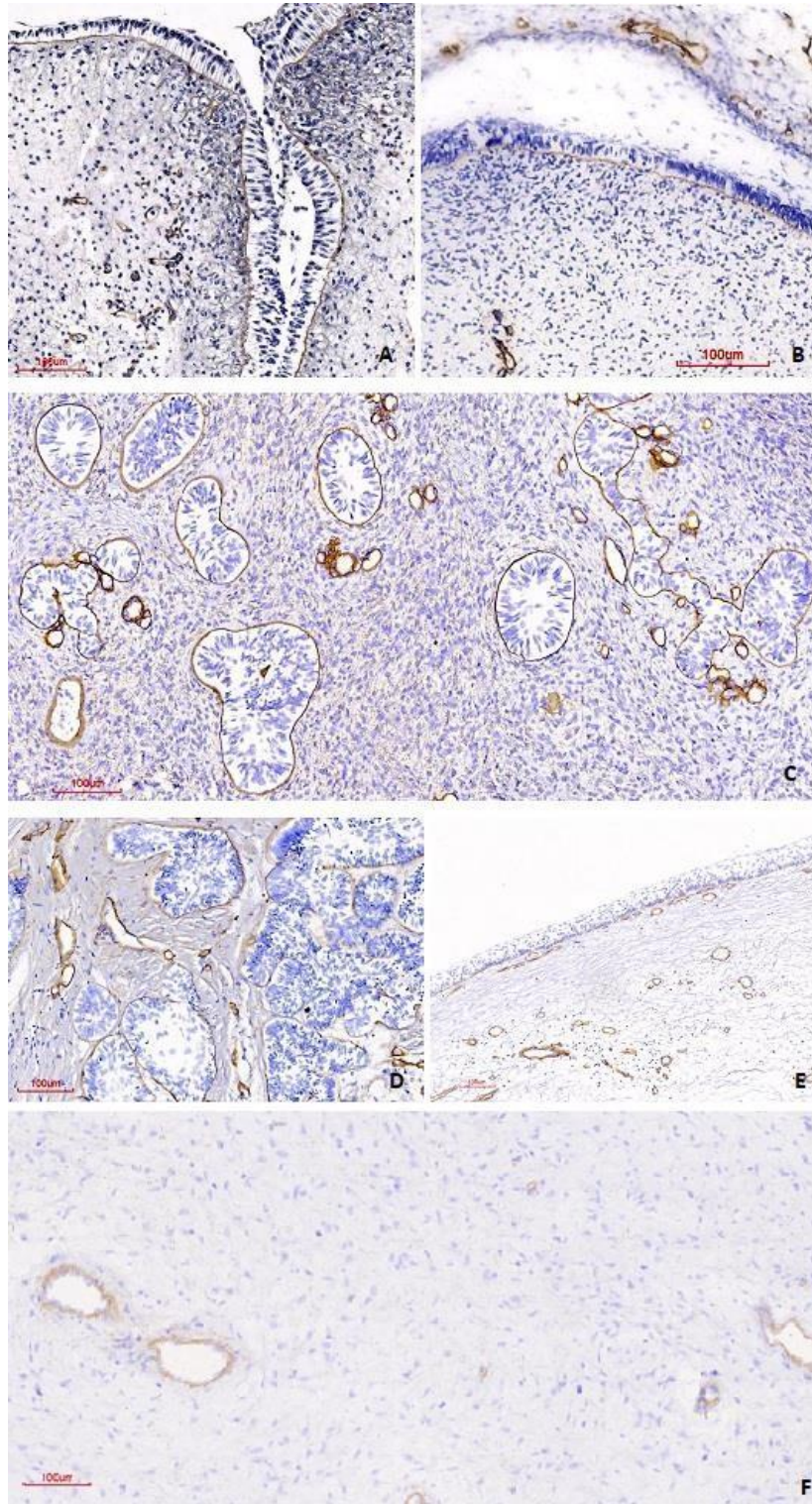
**Fig. 6.** Corte histológico con tinción Azul Alcian en germen dental. Se observa presencia de mucopolisacáridos en el retículo estrellado y la papila dental, pero sin predominio por el área subepitelial.

## 7.2. Colágeno IV

Debido a la recuperación enzimática con proteinasa K para colágeno IV, los límites celulares del epitelio cuboide-columnar no se aprecian correctamente (**Fig. 7**).

La inmunoexpresión de colágeno IV en TOP (**Fig. 7A**) se observó positiva en la membrana basal y en los vasos sanguíneos, con un patrón de expresión lineal, continua y fina. En el GD se observó positividad en la membrana basal y vasos en etapa de casquete tardío de manera continua y fina, siendo que en etapa de campana temprana solamente se apreció a nivel de los vasos (**Fig. 7B**). Para los casos de FA y AM, la positividad fue encontrada tanto en la membrana basal de los islotes epiteliales como en el endotelio vascular, con un patrón de expresión lineal, fina y continua, con algunas zonas negativas (**Fig. 7C, D**). Esto también fue observado en los casos de AU y QOO (**Fig. 7E**). Para el OD se encontró positividad en 6 casos (87%) tanto a nivel de la membrana basal del endotelio vascular como en los islotes epiteliales, encontrando un patrón de expresión lineal, continuo y grueso (**Fig. 7F**). Solamente en los casos de TOP se encontraron fibras colágenas con proyecciones hacia el tejido subepitelial.





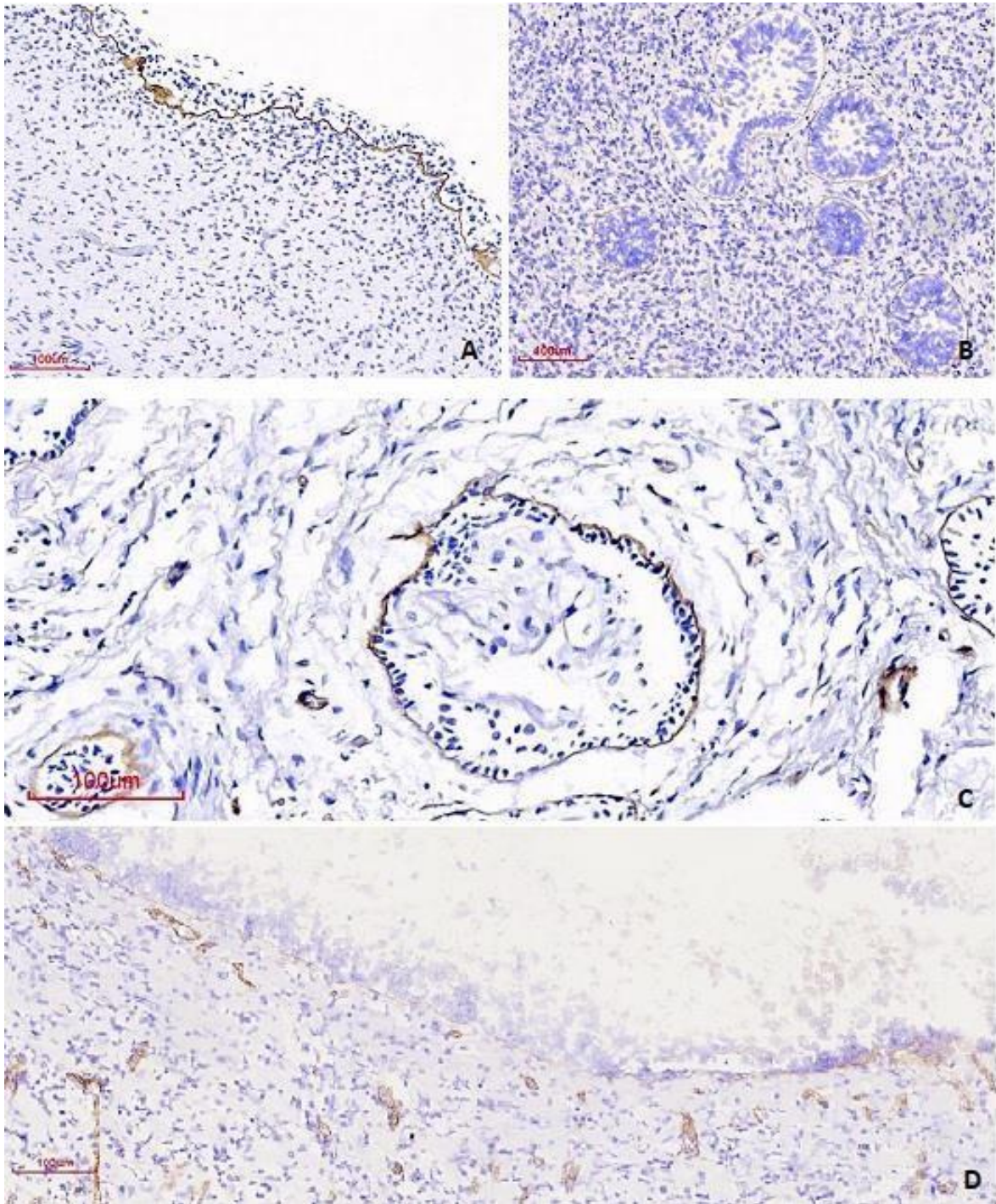
**Fig. 7.** Expresión de colágeno IV en los diversos casos estudiados. A) Tumor odontogénico primordial B) Germen dental C) Fibroma ameloblástico D) Ameloblastoma convencional E) Queratoquiste odontogénico F) Odontoma. Nótese que solamente se observan proyecciones subepiteliales de colágeno IV en el tumor odontogénico primordial.



### 7.3. Laminina

Debido a la recuperación enzimática con proteinasa K para laminina, los límites celulares del epitelio cuboide-columnar no se aprecian correctamente (**Fig. 8**).

Laminina se expresó en la membrana basal en 3 casos de TOP (43%) de manera lineal, continua y fina, con zonas focales negativas (**Fig. 8A**). Por su parte, se observó en 4 casos (40%) de FA (**Fig. 8B**) a nivel de los islotes epiteliales, predominantemente de manera lineal, continua y gruesa, siendo que para AM/AU fue positivo en 4 casos (40%) con un patrón lineal, discontinuo y fino (**Fig. 8C**). Para QO se expresó con un patrón similar a AM en membrana basal en 1 caso (10%) (**Fig. 8D**). Estas últimas 4 entidades se presentaron más tenues que para TOP. En GD (tanto en etapa casquete y campana) y OD no se encontró positividad en ningún caso.

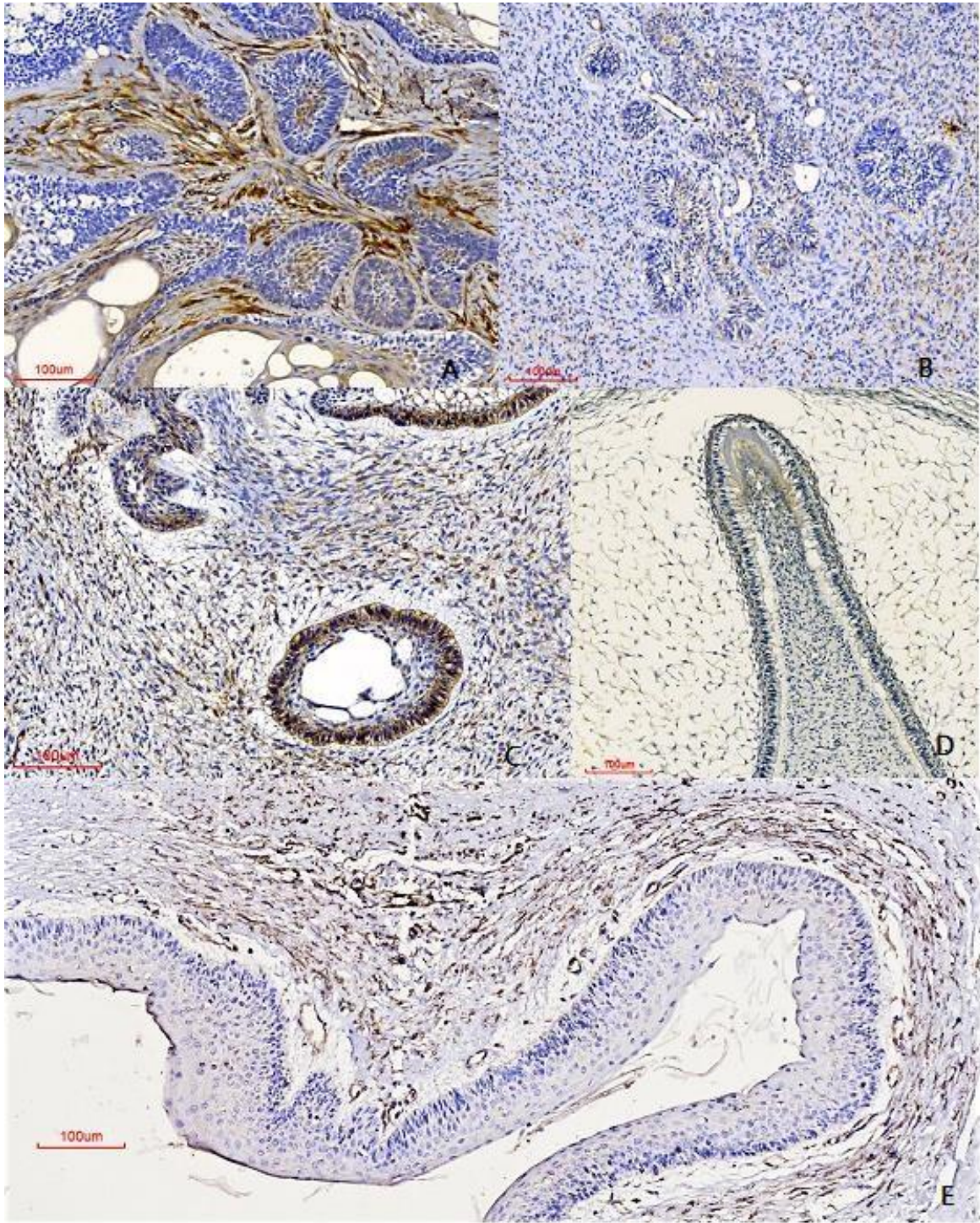


**Fig. 8.** Expresión de laminina en los diversos casos estudiados. A) Tumor odontogénico primordial B) Fibroma ameloblástico C) Ameloblastoma convencional D) Queratoquiste odontogénico. Nótese la pérdida de estructura epitelial en A y D por la recuperación antigénica.

#### 7.4. Conexina 43

La inmunoexpresión de Cx43 en TOP fue negativa tanto a nivel mesenquimático como en el epitelio. En AM/AU la expresión a nivel epitelial fue positiva en 5 casos (50%). Se observó positividad en áreas centrales similares al retículo estrellado así como en fibroblastos y vasos sanguíneos del mesénquima (**Fig. 9A**). En los casos de FA se observó mayor intensidad a nivel del mesénquima, siendo menor a nivel epitelial, en especial en células de tipo ameloblástico. De los casos analizados 1 fue negativo (10%) a nivel epitelial, sin encontrar negatividad en el mesénquima (**Fig. 9B**). Para OD la expresión mesenquimática se observó más intensa que en el epitelio, encontrando 3 casos negativos para este último (43%) (**Fig. 9C**). En el GD fue positiva en ambos estratos, siendo que solo 2 casos (29%) fueron negativos en el epitelio y en el mesénquima. En el citoplasma del epitelio del órgano del esmalte se presentó de manera intensa, siendo mayor en el epitelio interno, ameloblastos y capa intermedia, así como en el mesénquima, para la etapa de campana (**Fig. 9D**). Para los casos de QO se observó positiva tanto a nivel mesenquimático como en zonas focales del epitelio, siendo más tenue en este último. La expresión de Cx43 también se vio representada en el endotelio vascular (**Fig. 9E**).





**Fig. 9.** Expresión de conexina 43 en los diversos casos estudiados. A) Ameloblastoma convencional B) Fibroma ameloblástico C) Odontoma D) Germen dental E) Queratoquiste odontogénico. Nótese la intensa positividad a nivel mesenquimático para el ameloblastoma convencional.

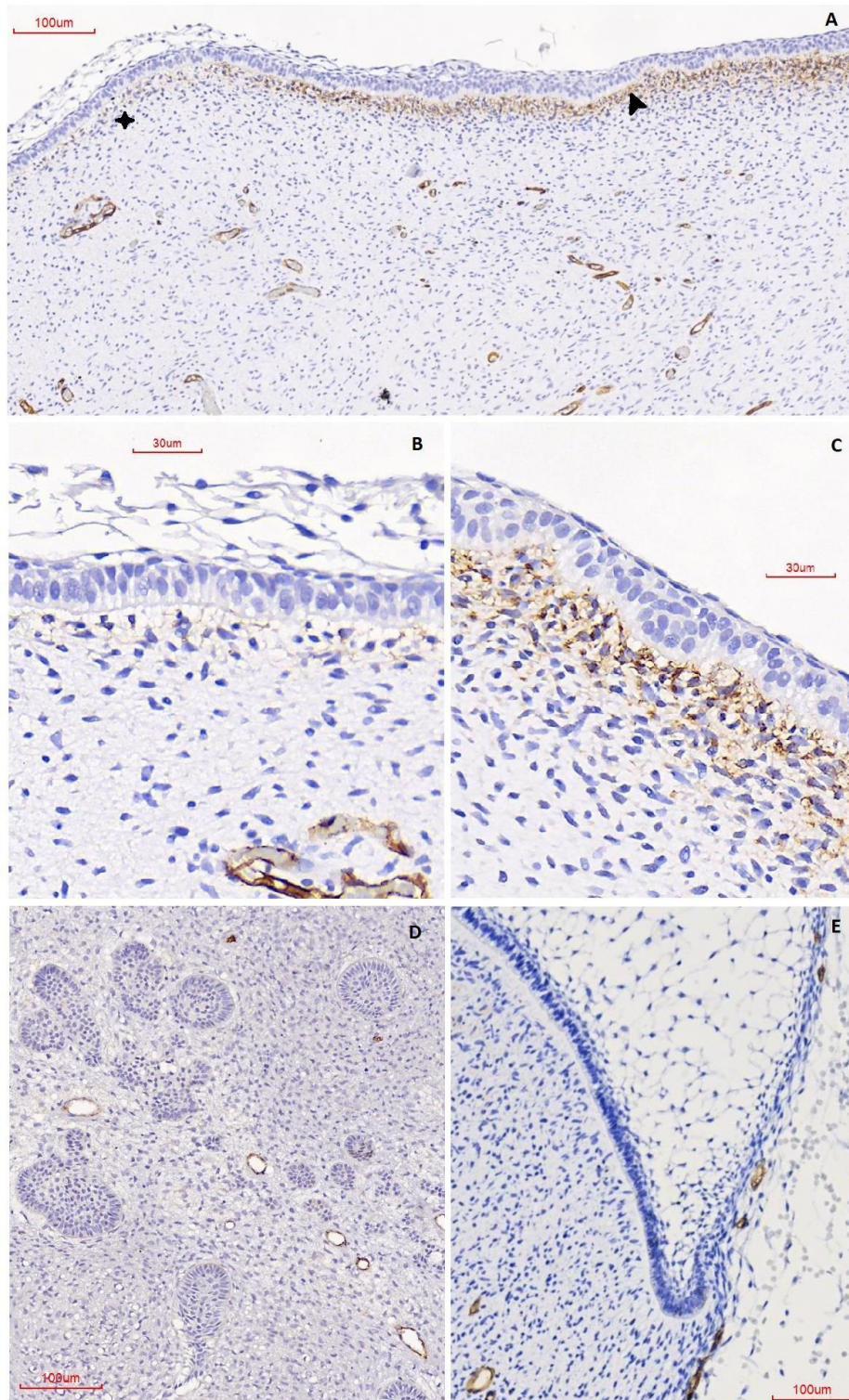
## 7.5. CD34

La expresión de CD34 fue observada en todas las muestras a nivel del endotelio vascular. A su vez, en los casos de TOP se observó positividad en la región subepitelial, aproximadamente en un 84-86% de los márgenes tisulares, siendo que en ciertas zonas focales no se presentó esta expresión mesenquimática (**Fig. 10 A, B, C**). La expresión positiva de CD34 subepitelial coincidió con áreas de incremento en la celularidad, en donde también se observó una tinción celeste intensa con la técnica Azul Alcian. Por su parte, en las zonas focales CD34 subepitelial negativa hubo un descenso en la densidad celular.

En FA se observaron vasos positivos para CD34, algunos de los cuales se encontraban próximos al epitelio, a diferencia de lo que se observa en TOP y GD donde hay una zona libre de vasos adyacente al epitelio odontogénico (**Fig. 10 D, E**). Esta proximidad vascular al epitelio odontogénico también fue observada en los casos de QOQ y AM/AU (**Fig. 11 A, B**). Para los casos de OD no se encontró una relación de proximidad de los vasos sanguíneos a los islotes epiteliales, así como tampoco se observó expresión mesenquimática de CD34 (**Fig. 11 C**).

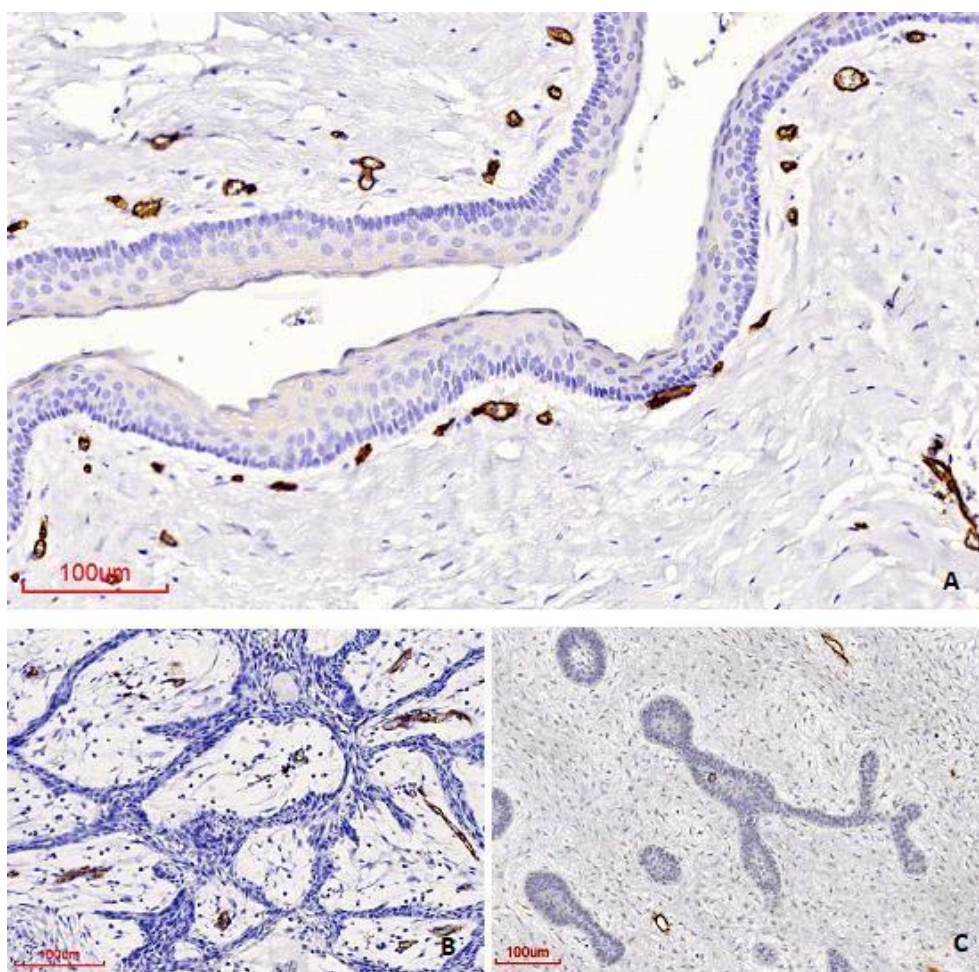
En la **Tabla 7** se resumen los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica para todos los anticuerpos y todas las entidades estudiadas.





**Fig. 10.** Expresión de CD34 en tumor odontogénico primordial, fibroma ameloblástico y germen dental. A) Tumor odontogénico primordial, la expresión subepitelial puede observarse de positiva – flecha negra derecha – a negativa – estrella negra izquierda. B) Aumento de A en zona negativa subepitelial. C) Aumento de A en zona positiva subepitelial. D) Fibroma ameloblástico. E) Germen dental.





**Fig. 11.** Expresión de CD34 en queratoquiste odontogénico, ameloblastoma convencional y odontoma. A) Queratoquiste odontogénico B) Ameloblastoma convencional C) Odontoma.

**Tabla 7.** Resultados inmunohistoquímicos para colágeno IV, laminina, conexina 43 y CD34 en todas las entidades analizadas.

Lesión	Colágeno IV	Laminina	Cx43	CD34
TOP (n=7)	100% Pos.	43% Pos.	Neg.	100% Pos. EV 86% Pos. SE
FA (n=10)	100% Pos.	40% Pos.	90% Pos. EP, 100% Pos. MQ.	100% Pos. EV
OD (n=7)	87% Pos.	Neg.	100% Pos. MQ, 57% Pos. EP	100% Pos. EV
AM/AU (n=10)	100% Pos.	40% Pos.	50% EP, 100% MQ	100% Pos. EV.
QO (n=10)	100% Pos.	10% Pos.	100% Pos. MQ, 40% Pos. EP.	100% Pos. EV
GD (n=7)	100% Pos	Neg.	71% Pos. MQ EP	100% Pos. EV

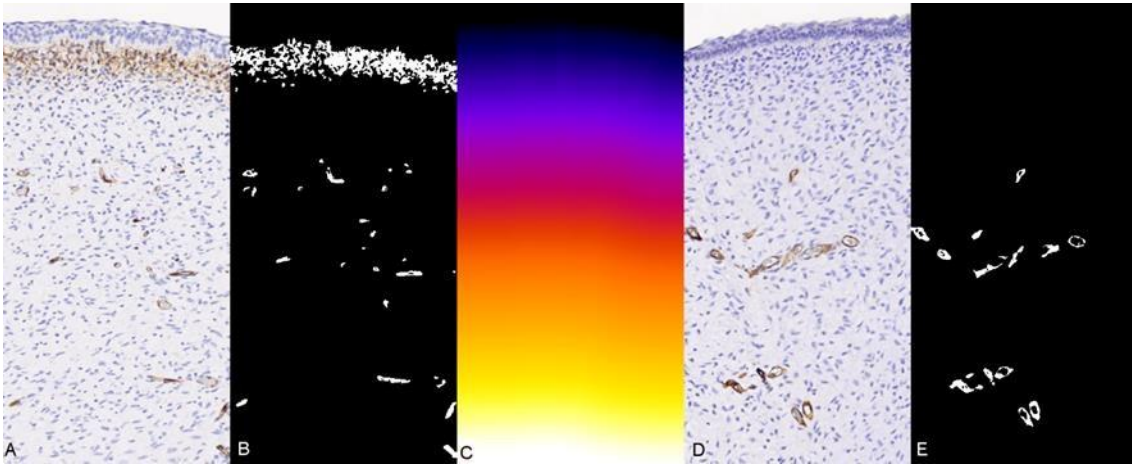
MQ: mesénquima. EP: epitelio. Neg: negativo. Pos: positivo. EV: endotelio vascular. SE: subepitelio.

## 7.6. Análisis de la localización de la expresión de CD34

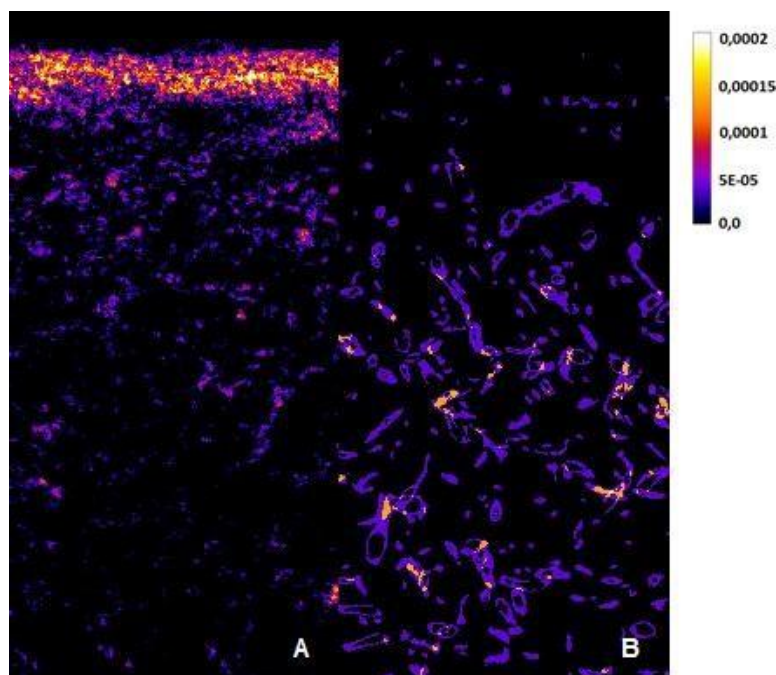
Para obtener resultados comparativos en el análisis de imágenes se determinó el promedio del espesor epitelial para TOP ( $27\mu\text{m} \pm 19$ ), AU ( $52\mu\text{m} \pm 30$ ), QO ( $56\mu\text{m} \pm 23$ ) y GD ( $33\mu\text{m} \pm 6$ ), y se estableció una posición de la interfase epitelio-mesenquimática comparable para todas las muestras.

Al procesar las imágenes de TOP se diferenciaron aquellas en las que se expresaba CD34 positivo adyacente al epitelio de las que no, para establecer una comparativa entre las zonas dentro del tumor. Las imágenes binarias obtenidas permitieron realizar la cuantificación de la positividad de CD34 y relacionarla con la distancia al tejido epitelial (**Fig. 12**). Se presentó una mayor proporción de sitios (píxeles) positivos para CD34 en el área subepitelial, como un “hot spot” o zona de mayor expresión (**Fig.13A**). Al contrario de lo observado en los casos donde no hubo expresión de CD34 subepitelial, no hubo una zona predominante con presencia de vasos o expresión del marcador, pero sí se detectó una banda libre de CD34 (**Fig. 13B**).





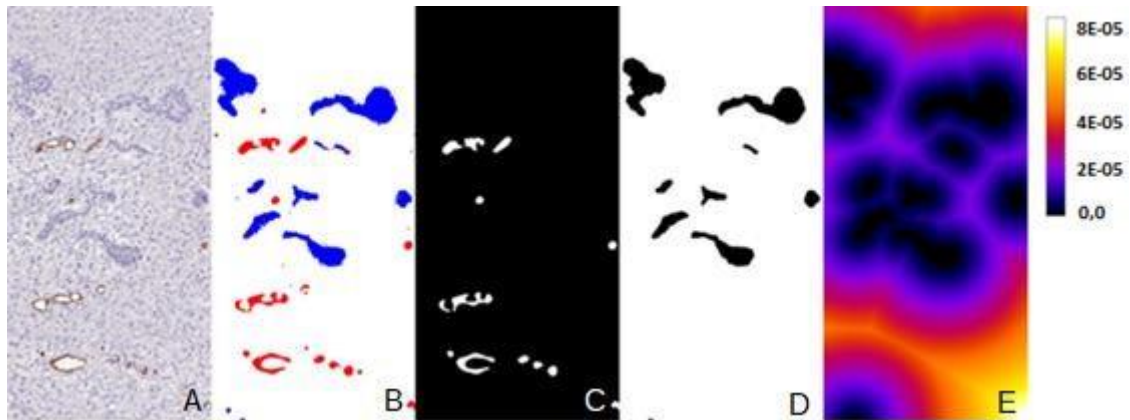
**Fig. 12.** Análisis de la distribución espacial de CD34 en tumor odontogénico primordial. A) Expresión subepitelial positiva de CD34. B) Segmentación de A, mostrando una imagen binaria. Las áreas blancas indican la presencia de células mesenquimáticas subepiteliales y vasos positivos para CD34. C) La transformada distancia Euclidiana fue usada para codificar la imagen con valores (mostrados en color falso) correspondientes a la distancia entre cada pixel perteneciente al tejido en A, y los márgenes tisulares (dados por el fondo vacío). La profundidad desde los márgenes de cada pixel positivo para CD34 (mostrados en blanco en B) puede ser determinada al examinar su valor correspondiente en la imagen en C. D) Expresión subepitelial negativa de CD34. E) Segmentación de A, mostrando una imagen binaria. Las áreas blancas indican la presencia de vasos positivos para CD34. Este proceso fue repetido en 99 imágenes.



**Fig. 13.** “Hot spots” de la expresión de CD34 en diferentes casos de tumor odontogénico primordial. A) Promedio entre las 82 imágenes procesadas de tumor odontogénico primordial con CD34+ subepitelial. B) Promedio entre las 17 imágenes procesadas de tumor odontogénico primordial con CD34- subepitelial. Escala colorimétrica de valores, en donde el color blanco representa la zona de mayor expresión. Nótese el aumento de expresión hacia el borde superior de la imagen A, en comparación con lo que se observa hacia la profundidad tumoral y en la imagen B.

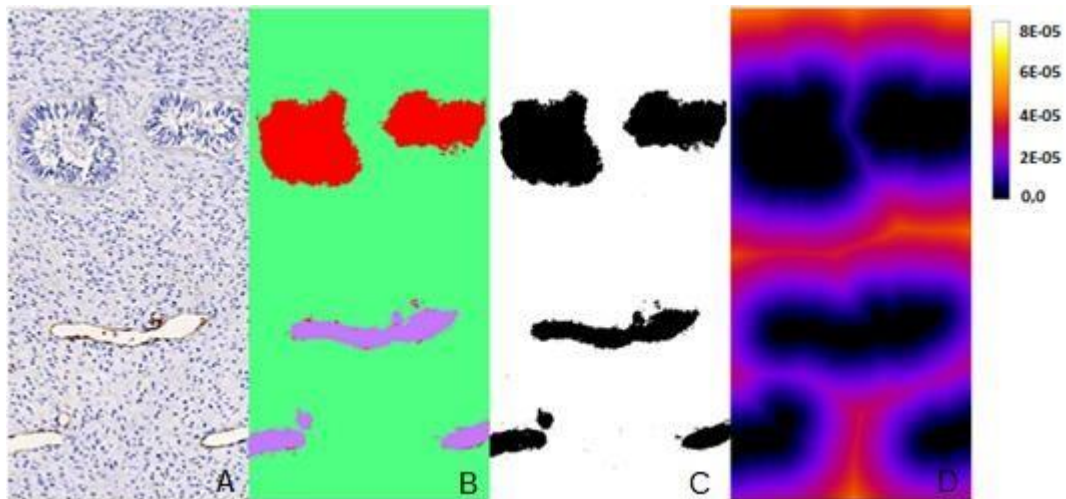
Al realizar el análisis en los casos de FA mediante el procesador Labkit se obtuvieron como resultado imágenes de tres colores, las que luego se binarizaron constatando la proximidad de CD34 en el endotelio vascular a los islotes de epitelio odontogénico

(Fig. 14).



**Fig. 14.** Análisis de la distribución espacial de CD34 en fibroma ameloblástico con Labkit. A) Inmunoexpresión de CD34. B) Segmentación obtenida mediante Labkit en donde los colores representan: azul: islas epiteliales, rojo: endotelio vascular, blanco: mesénquima. C) Imagen binaria del endotelio vascular segmentado, luego de realizar una sustracción de pequeñas regiones. D) Imagen binaria de las islas epiteliales segmentadas. E) La transformada distancia Euclidiana codifica como valor de un pixel la distancia de cada pixel en D a la región negra más cercana (también en D). La distancia de cada estructura blanca en C a las negras en D puede ser determinada al examinar la imagen E. Escala colorimétrica de valores. Este proceso fue repetido en 62 imágenes.

Al realizar el procesamiento de FA con Trainable WEKA Segmentation 2D se presentó la dificultad de que el clasificador reconociera únicamente el perímetro del endotelio vascular teñido con CD34, marcando también la luz de los vasos, generando la percepción de una mayor tinción en estas láminas (Fig. 15).

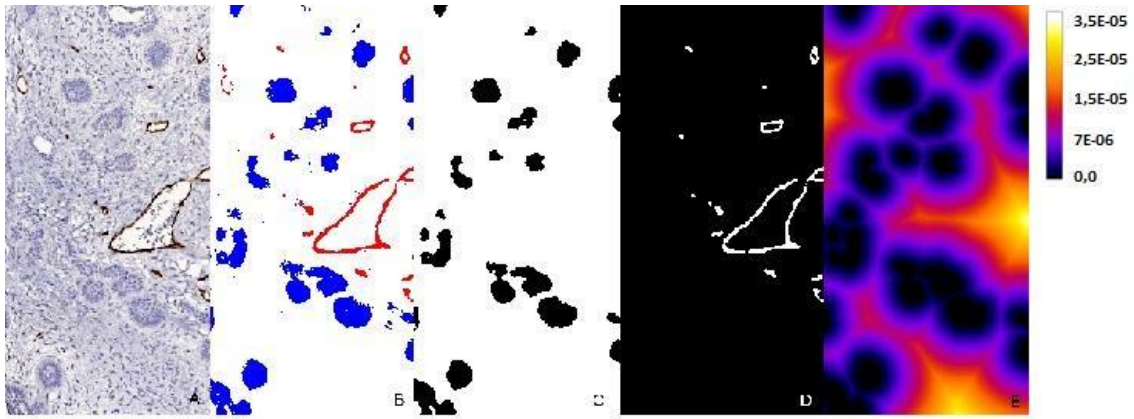


**Fig.15.** Análisis de la distribución espacial de CD34 en fibroma ameloblástico con WEKA. A) Inmunoeexpresión de CD34. B) Segmentación obtenida con WEKA, en donde los colores representan: rojo: islas epiteliales, violeta: vasos teñidos con CD34, verde: mesénquima. C) Imagen binaria del endotelio vascular y las islas epiteliales, luego de realizar una sustracción de pequeñas regiones. D) La transformada distancia Euclidiana codifica como valor de un pixel la distancia de cada pixel en C a la región negra más cercana (también en C). Escala colorimétrica de valores. Este proceso fue repetido en 62 imágenes.

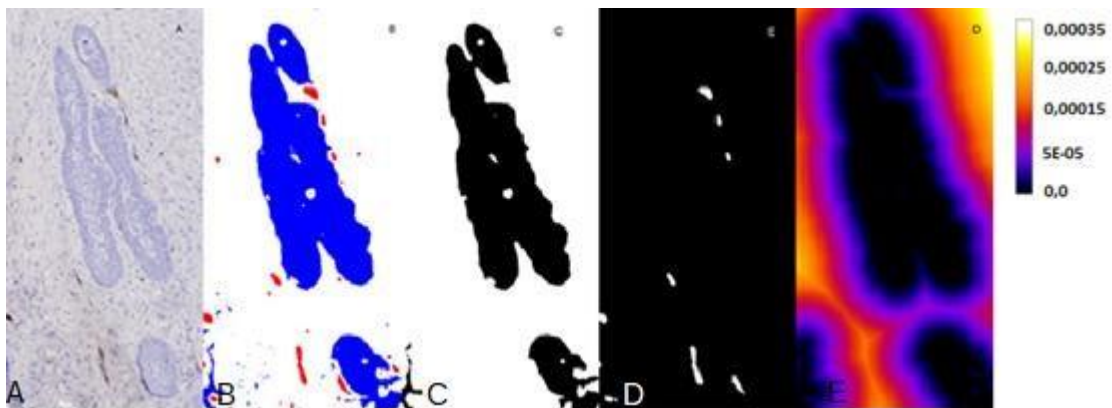
Luego de considerados los resultados obtenidos entre Labkit y Trainable WEKA

Segmentation 2D, se decidió continuar con la técnica Labkit para casos similares a FA:

OD (**Fig. 16**) y AM (**Fig. 17**). En estos casos, se detectaron vasos próximos a los islotes epiteliales odontogénicos, de pequeño/mediano calibre.



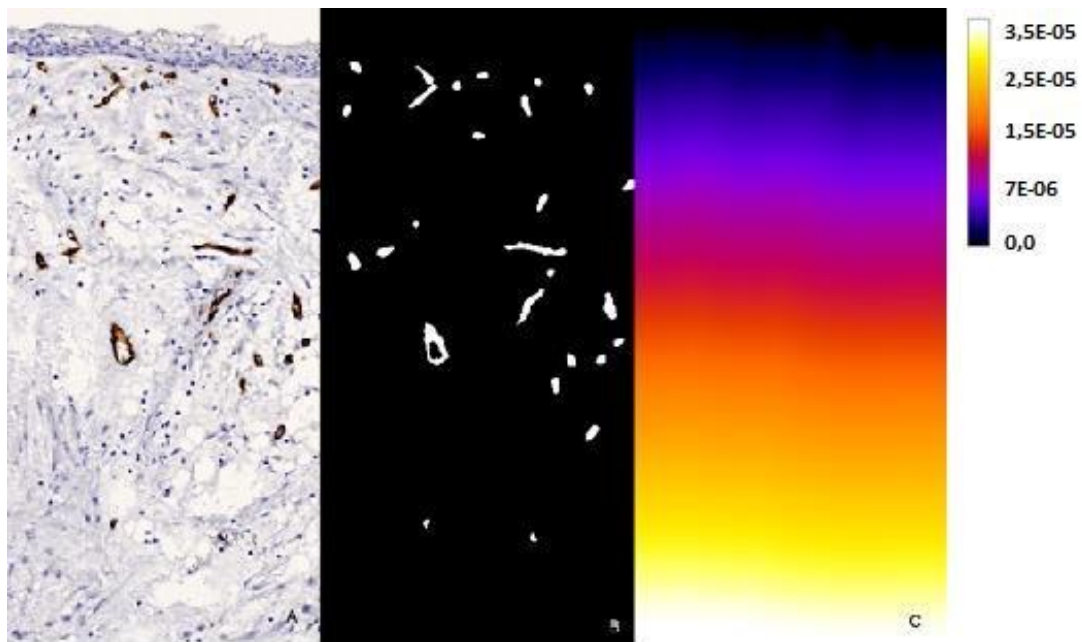
**Fig. 16.** Análisis de la distribución espacial de CD34 en odontoma. A) Inmunoexpresión de CD34. B) Segmentación obtenida con Labkit, en donde los colores representan: azul: islas epiteliales, rojo: endotelio vascular, blanco: mesénquima. C) Imagen binaria de las islas epiteliales segmentadas. D) Imagen binaria del endotelio vascular segmentado, luego de realizar una sustracción de pequeñas regiones. E) La transformada distancia Euclidiana codifica como valor de un pixel la distancia de cada pixel en D a la región negra más cercana (también en D). La distancia de cada estructura blanca en C a las negras en D puede ser determinada al examinar la imagen E. Escala colorimétrica de valores. Este proceso fue repetido en 51 imágenes.



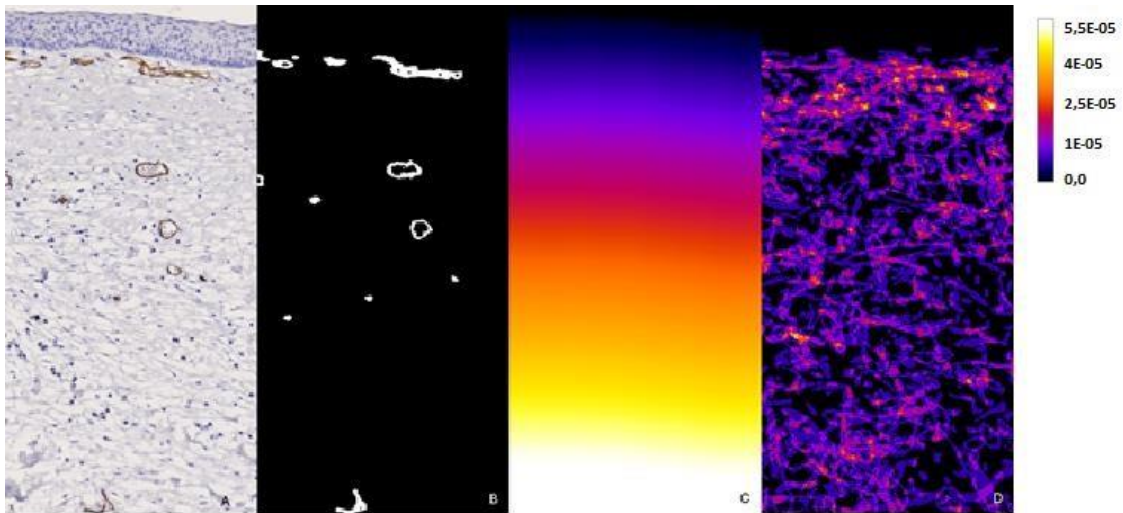
**Fig. 17.** Análisis de la distribución espacial de CD34 en ameloblastoma convencional. A) Inmunoexpresión de CD34. B) Segmentación obtenida mediante Labkit, en donde los colores representan: azul: islas epiteliales, rojo: endotelio vascular, blanco: mesénquima. C) Imagen binaria de las islas epiteliales segmentadas. D) Imagen binaria del endotelio vascular segmentado, luego de realizar una sustracción de pequeñas regiones. E) La transformada distancia Euclidiana codifica como valor de un pixel la distancia de cada pixel en D a la región negra más cercana (también en D). La distancia de cada estructura blanca en C a las negras en D puede ser determinada al examinar la imagen E. Escala colorimétrica de valores. Este proceso fue repetido en 18 imágenes.



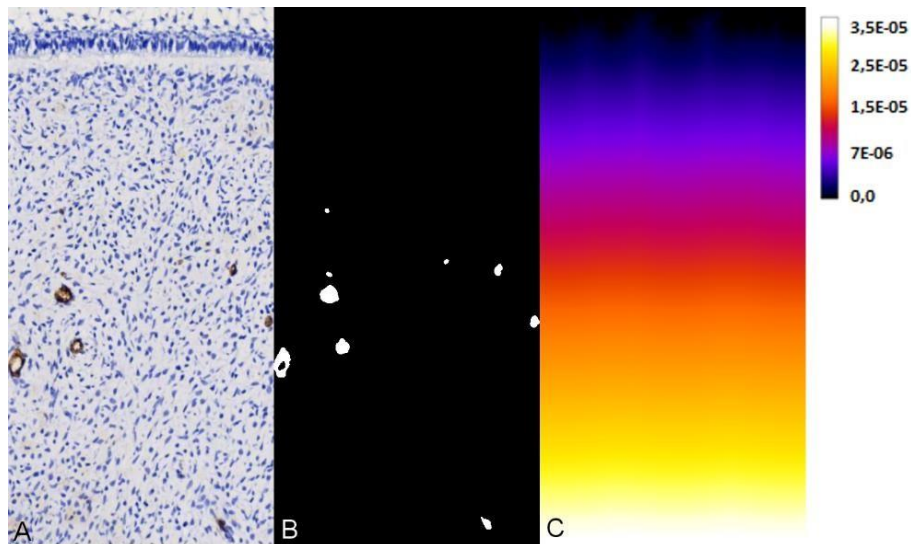
Para los casos de AU (**Fig. 18**), QO (**Fig. 19**) y GD (**Fig. 20**) el procedimiento utilizado fue igual que para TOP. En los dos primeros se observó la presencia de endotelio vascular positivo para CD34 próximo al epitelio odontogénico, sin presentar una zona libre de vasos adyacente al mismo, diferente de cómo se observó en TOP. Para el caso de GD se detectó una zona libre de vasos adyacente al epitelio odontogénico, tanto en etapa de casquete como de campana.



**Fig. 18.** Análisis de la distribución espacial de CD34 en ameloblastoma uniuquístico. A) Inmunoeexpresión de CD34. B) Segmentación de A, mostrando una imagen binaria. La región blanca indica la presencia de vasos positivos para CD34. C) La transformada distancia Euclidiana fue usada para codificar la imagen con valores (mostrados en color falso) correspondientes a la distancia entre cada pixel perteneciente al tejido en A, y los márgenes tisulares (dados por el fondo vacío). La profundidad desde los márgenes de cada pixel positivo para CD34 (mostrados en blanco en B) puede ser determinada al examinar su valor correspondiente en la imagen en C. Escala colorimétrica de valores. Este procedimiento se repitió en 18 imágenes.

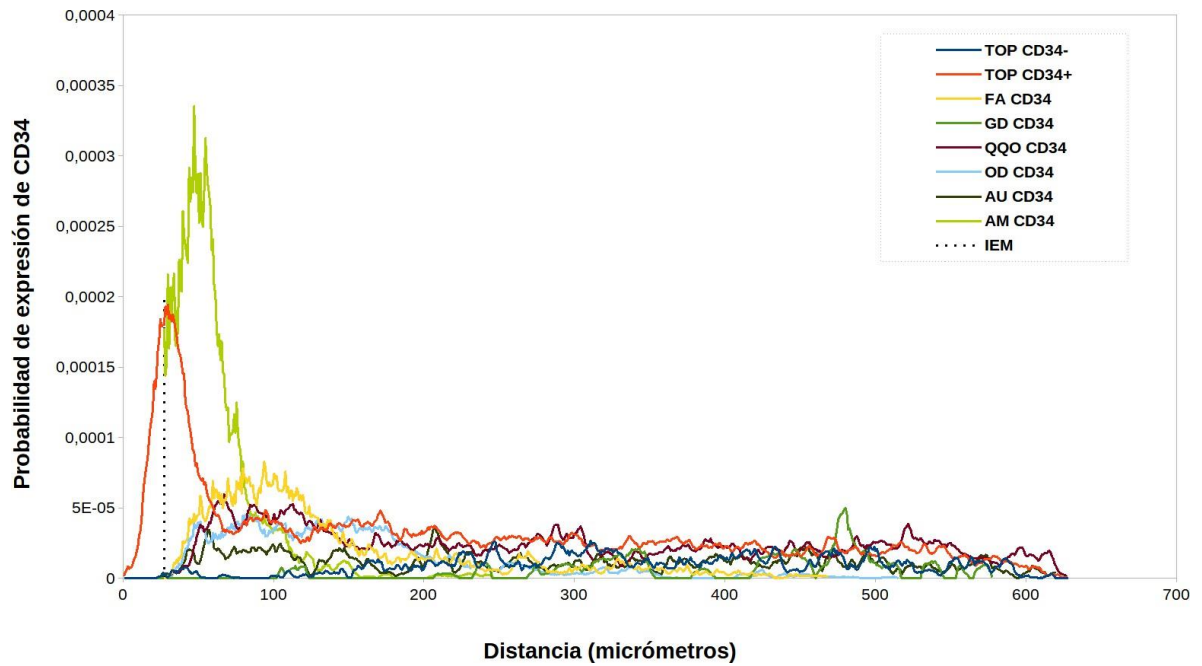


**Fig. 19.** Análisis de la distribución espacial de CD34 en queratoquiste odontogénico. A) Inmunoeexpresión de CD34. B) Segmentación de A, mostrando una imagen binaria. La región blanca indica la presencia de vasos positivos para CD34. C) La transformada distancia Euclidiana fue usada para codificar la imagen con valores (mostrados en color falso) correspondientes a la distancia entre cada pixel perteneciente al tejido en A, y los márgenes tisulares (dados por el fondo vacío). La profundidad desde los márgenes de cada pixel positivo para CD34 (mostrados en blanco en B) puede ser determinada al examinar su valor correspondiente en la imagen en C. D) Promedio entre las 49 imágenes procesadas. Las zonas amarillas presentan mayor concentración de CD34. Escala colorimétrica de valores.



**Fig. 20.** Análisis de la distribución espacial de CD34 en germen dental A) Inmunoeexpresión de CD34. B) Imagen binaria del endotelio vascular segmentado. C) La transformada distancia Euclidiana fue usada para codificar la imagen con valores (mostrados en color falso) correspondientes a la distancia entre cada pixel perteneciente al tejido en A, y los márgenes tisulares (dados por el fondo vacío). La profundidad desde los márgenes de cada pixel positivo para CD34 (mostrados en blanco en B) puede ser determinada al examinar su valor correspondiente en la imagen en C. Escala colorimétrica de valores. Este proceso fue repetido en 8 imágenes.

La **Fig. 21** muestra una gráfica que representa la probabilidad de expresión de CD34 con respecto a la distancia en relación al tejido epitelial para los casos de TOP, FA, OD, AM, AU, QQQ y GD. La gráfica reveló un pico que progresivamente decrece en TOP subepitelial CD34+, AM y FA (líneas roja, verde claro y amarilla respectivamente). En el gráfico TOP subepitelial CD34+ (rojo) se observó un pico máximo a una distancia de 31µm, que se corresponde con la expresión positiva subepitelial; de allí en adelante, la positividad está dada por la presencia de endotelio vascular, que decrece progresivamente hacia la profundidad del mesénquima. La gráfica FA (amarilla) mostró una distribución diferente a la de TOP, con un amplio pico a una distancia de 96µm. Esto también se observó en AM (verde claro), en donde se presentó un pico máximo a 87µm, lo cual puede estar influenciado por el patrón histopatológico plexiforme. En algunos casos de FA, OD, AM, AU y QQQ se observaron vasos de pequeño calibre próximos al epitelio, algo que no se vio en las muestras de TOP, independiente de si expresó CD34 subepitelial o no (gráfica azul). La expresión de CD34 en GD fue dada exclusivamente por la presencia de endotelio vascular, similar a las muestras de TOP cuando no presentó expresión subepitelial (gráfica verde oscuro y azul), mostrando una zona libre de vasos adyacente al epitelio. Cabe destacar que en algunas muestras de TOP, FA, OD y QQQ se observó una zona de hialinización adyacente al epitelio, de espesor variable a lo largo de las muestras.

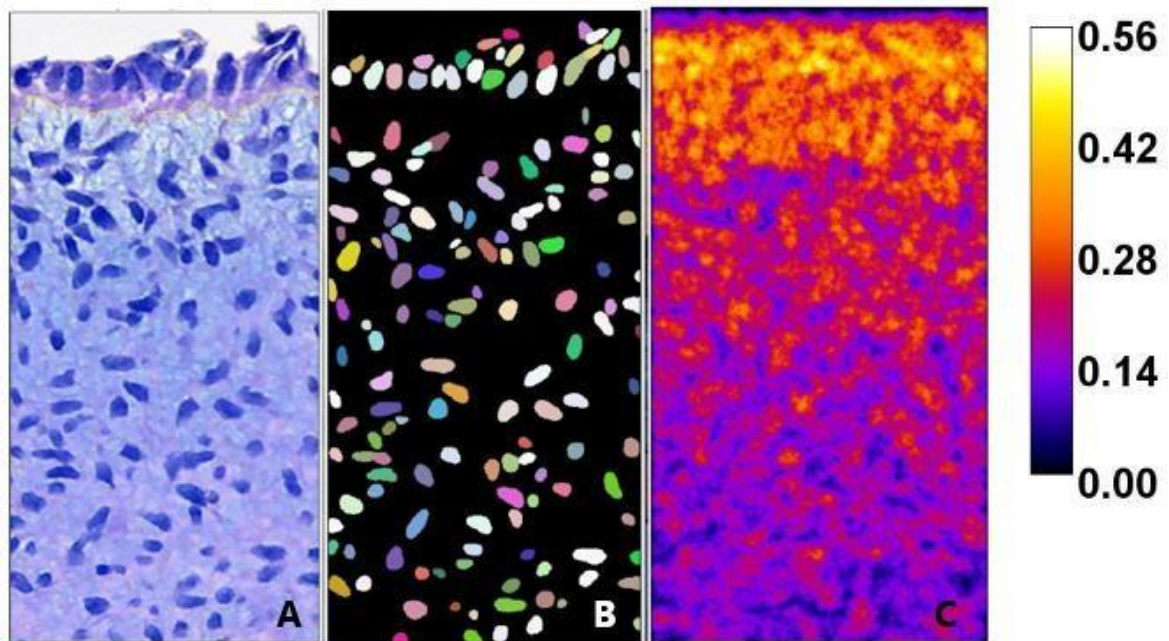


**Fig. 21.** Gráfica de la expresión relativa de CD34 en tumores odontogénicos y germen dental en función de la profundidad tisular. La gráfica muestra la distribución de las distancias entre pixeles con positividad para CD34 y los márgenes tisulares epiteliales más cercanos. Esta distribución corresponde a la distancia entre el endotelio y las islas epiteliales/epitelio en tumor odontogénico primordial CD34 positivo (rojo), CD34 negativo (azul), fibroma ameloblástico (amarillo), odontoma (celeste), ameloblastoma convencional (verde claro), ameloblastoma uniuquístico (negro), queratoquiste odontogénico (violeta) y germen dental (verde oscuro). La línea punteada indica la interfase epitelio-mesenquimática (IEM) en las muestras de tumor odontogénico primordial.



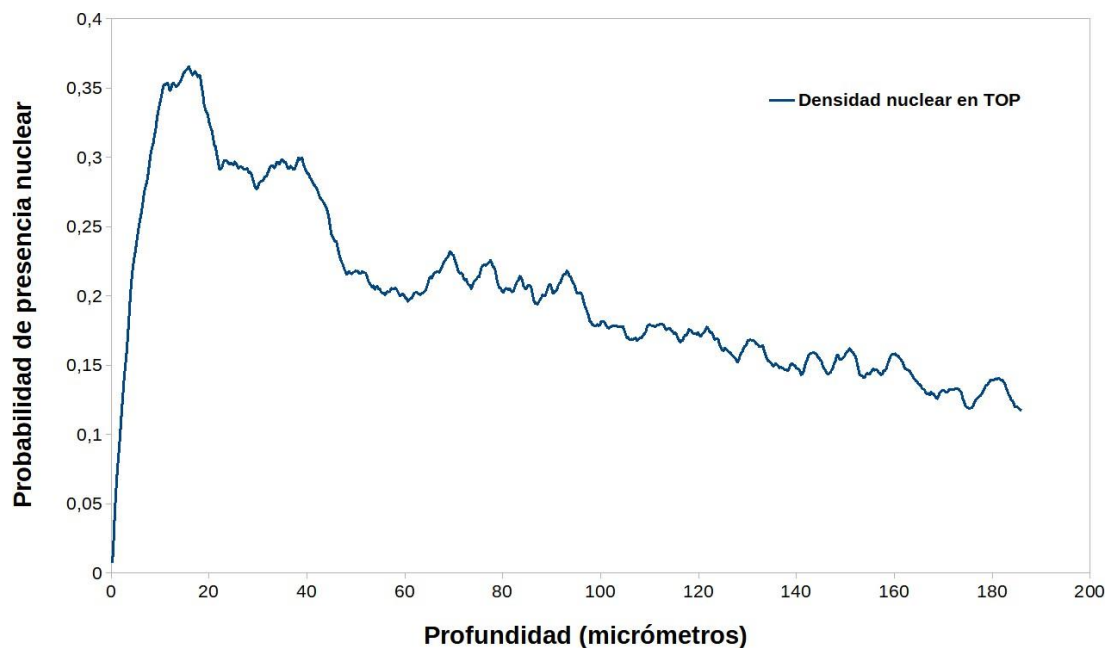
### 7.7. Análisis de la densidad nuclear

Se realizó el análisis de la densidad nuclear para TOP en imágenes teñidas con Azul Alcian (**Fig.22**). Los resultados mostraron una mayor concentración nuclear en el tercio superior del tejido, que corresponde a las zonas epitelial y subepitelial, mientras que en el mesénquima profundo se detectó baja densidad nuclear. Esto se corresponde con el cambio de composición de mucopolisacáridos ácidos y la expresión de CD34, lo cual sugiere una diferencia en la composición (y posiblemente función) del área subepitelial respecto a las zonas profundas del mesénquima.



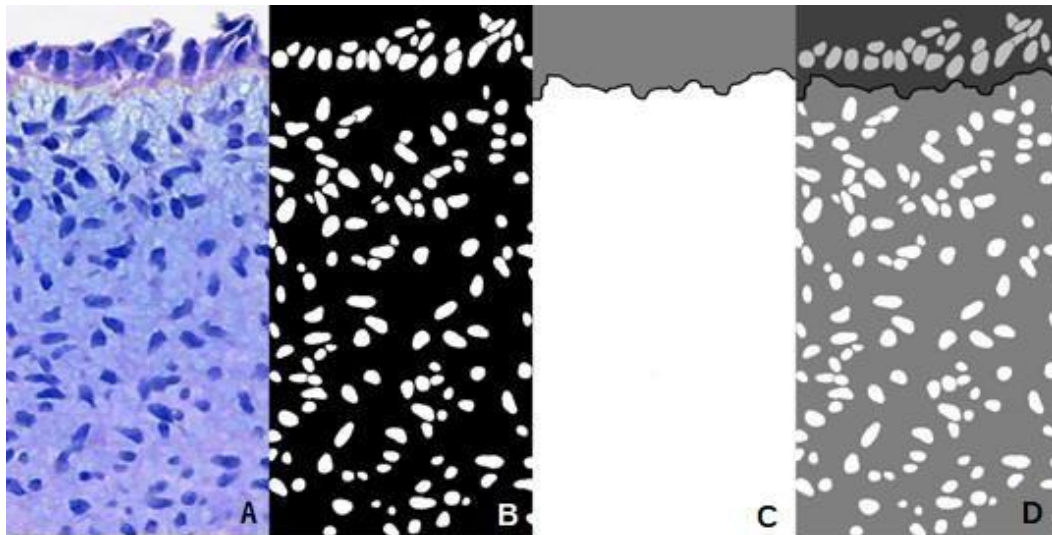
**Fig. 22.** Análisis de la densidad nuclear en tumor odontogénico primordial. A) Tinción Azul Alcian en donde se delimita la interfase epitelio-mesenquimática con freehand tool. B) Segmentación con StarDist 2D. C) Sumatoria de todas las láminas (n=71) que demuestran un aumento de la densidad nuclear en el tercio superior de la imagen. Escala colorimétrica de valores, en donde el color blanco representa la zona de mayor densidad nuclear.

La **Fig. 23** muestra la representación gráfica de la sumatoria de láminas de TOP. Nótese que la escala en la **Fig. 22** no corresponde al rango de valores de la **Fig. 23**, ya que en ésta última se presenta el promedio de píxeles en profundidad. En la distancia de 0 a 26 $\mu$ m se observa un pico que se corresponde con el área epitelial, mientras que de 26 a 52 $\mu$ m se observa un segundo pico correspondiente al área subepitelial. De allí en adelante se constata una disminución paulatina de la densidad, a medida que se profundiza en el mesénquima. El descenso de la densidad nuclear entre los dos picos puede corresponderse con una zona hialina o presencia de la membrana basal en la interfase epitelio-mesenquimática, ausente de núcleos.



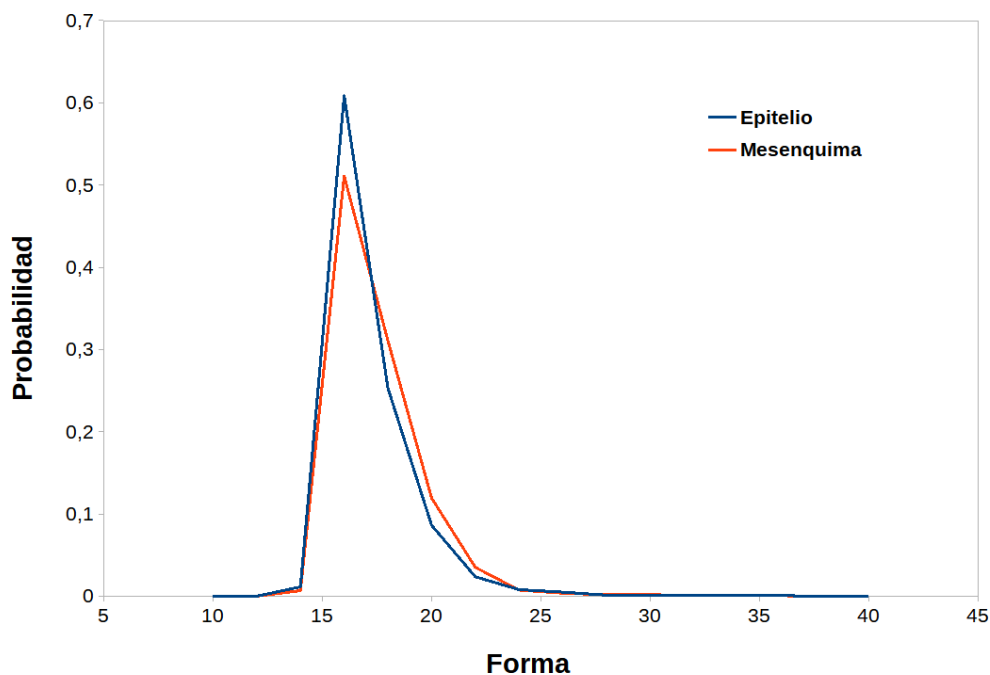
**Fig. 23.** Representación gráfica de la densidad nuclear en tumor odontogénico primordial. El resultado corresponde al procesamiento de 71 imágenes. Se observa el perfil nuclear de la imagen 21C, en donde hay una mayor densidad a nivel epitelial y subepitelial, decreciendo paulatinamente hacia la profundidad del mesénquima.

Se realizó un análisis de la morfología nuclear al separar las imágenes de TOP por estratos (**Fig. 24**).



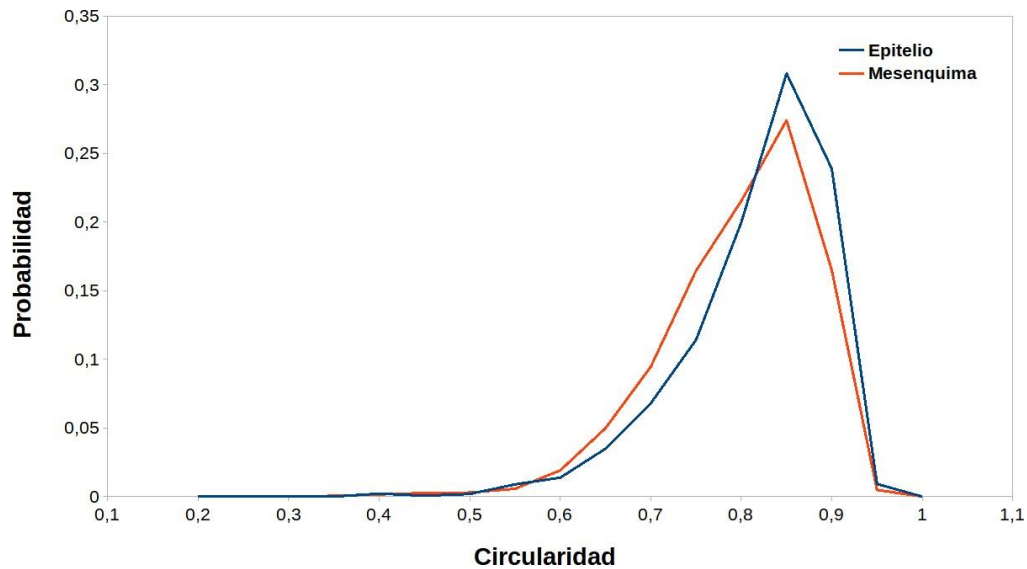
**Fig. 24.** Análisis por estratos de la densidad nuclear de tumor odontogénico primordial. A) Tinción Azul Alcian. B) Imagen binaria de la segmentación nuclear. C) Segmentación por compartimentos separados por la interfase epitelio-mesenquimática realizada con freehand tool. D) Combinación de B y C. El procedimiento se realizó en 71 imágenes.

La forma de los núcleos epiteliales y mesenquimáticos presentados son relativamente similares, con un rango de 13 a 57 y una media de 16 para ambos casos, resultando en formas más circulares (**Fig. 25**).



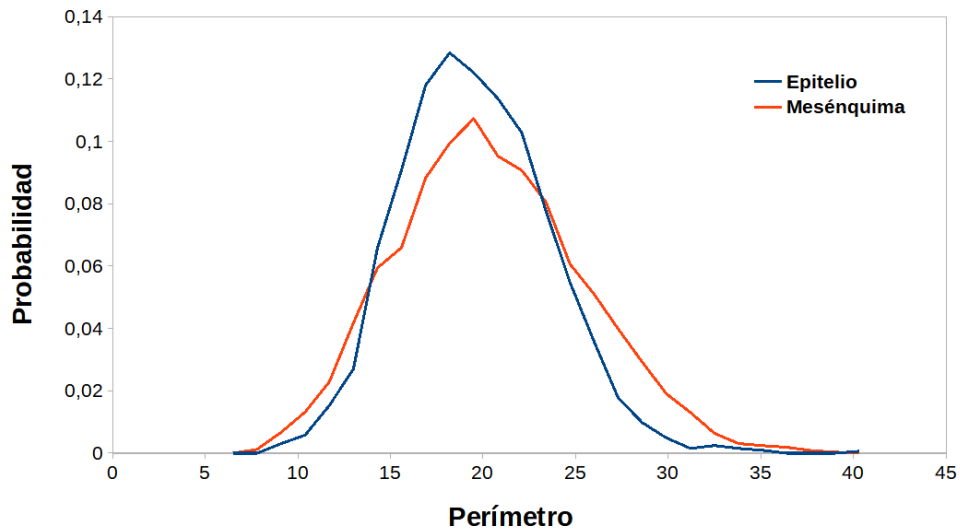
**Fig. 25.** Frecuencia de la forma nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial. Obsérvese que hay mayor probabilidad nuclear de presentar una forma similar a un círculo digital para ambos casos.

La circularidad de los núcleos epiteliales ronda en valores próximos a 0,7-0,8, con una media de 0,79 y un desvío estándar de 0,08, mostrando una tendencia circular de los mismos (**Fig. 26**). Esto también se observa en el mesénquima, con un valor máximo de 0,92 pero una media de 0,77 y desvío estándar de 0,08, marcando la tendencia circular. El rango para ambos casos es de 0,22 a 0,92.

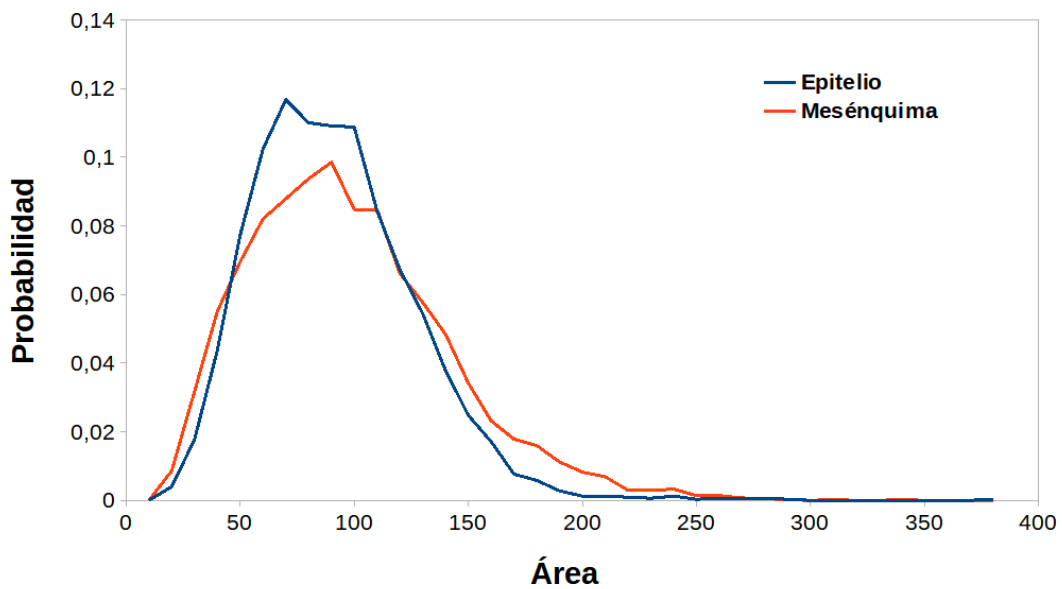


**Fig. 26.** Frecuencia de la circularidad nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial. Nótese la tendencia a la circularidad para ambos casos.

El perímetro y el área que conforman los núcleos a nivel epitelial presentan valores de media de 18,90 y 89,53 respectivamente, siendo que para el mesénquima estos datos corresponden a valores de 19,73 y 96,31 respectivamente. A pesar de que a nivel mesenquimático los núcleos son de mayor tamaño, la diferencia entre estos valores es significativa al realizar los test estadísticos (**Fig. 27, 28**).

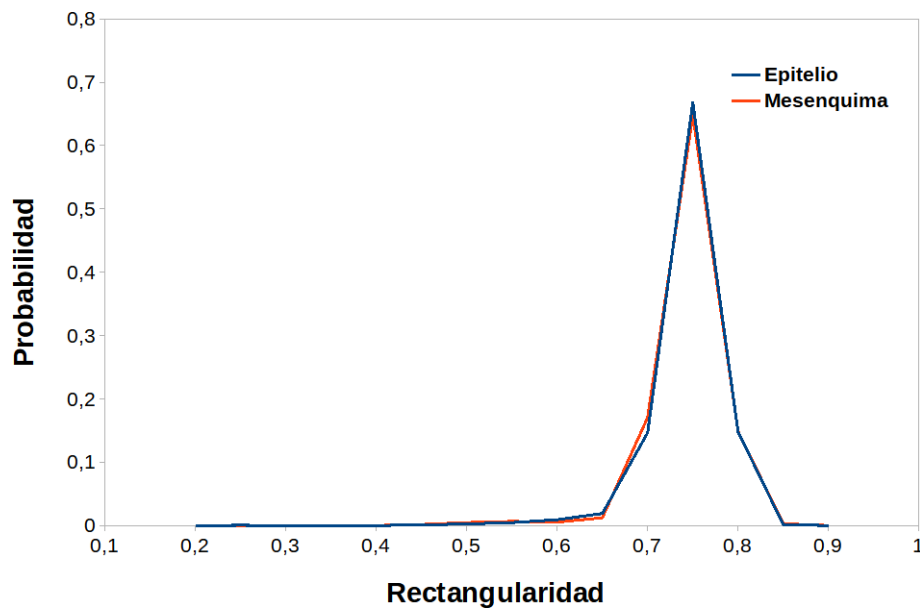


**Fig. 27.** Frecuencia del perímetro nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial. En la mayoría de los casos el perímetro epitelial tiende a ser igual o menor que el del mesénquima.



**Fig. 28.** Frecuencia del área nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial. El área de los núcleos epiteliales tiende a ser igual o menor en comparación con los del mesénquima.

Referente a la rectangularidad de los núcleos, tanto epiteliales como mesenquimáticos, tienen una tendencia más circular y cuadrados por encontrarse próximos a valores 0,7-0,8 (**Fig. 29**). En ningún caso se registran valores con tendencia a la rectangularidad, encontrando una media de 0,72 y desvío estándar de 0,04 para ambos estratos.



**Fig. 29.** Frecuencia de la rectangularidad nuclear en imágenes de tumor odontogénico primordial. Nótese la tendencia a la circularidad para ambos casos.

El análisis de estos parámetros reveló que los núcleos del estrato mesenquimático son de un tamaño ligeramente mayor a los del compartimento epitelial (en términos de perímetro y área) mientras que la forma entre el epitelio y la región subepitelial parece ser similar. A pesar de ello, al aplicar T Student (ajustado a Mann Whitney) y comparar estos parámetros entre el epitelio y el mesénquima en todos los casos se encontró una diferencia significativa, con un p valor <0,0001 para la forma, circularidad, perímetro y área, y un p valor <0,0273 para la rectangularidad. Sin embargo, la estadística descriptiva (**Tablas 8 y 9**) muestra poca diferencia entre los núcleos de ambos estratos. Se presentan los valores de percentiles, mínimo y máximo a manera de información pero se utilizará la media y desvío estándar para la comparación entre ambos estratos.

**Tabla 8.** Estadística descriptiva para los núcleos del estrato epitelial.

	<b>Forma</b>	<b>Circularidad</b>	<b>Perímetro</b>	<b>Área</b>	<b>Rectangularidad</b>
Mínimo	13,70	0,22	7,98	15,34	0,22
Percentil 25%	14,79	0,75	16,04	63,18	0,71
Mediana	15,51	0,81	18,70	85,63	0,73
Percentil 75%	16,72	0,85	21,49	111,4	0,74
Máximo	57,73	0,92	39,44	387,9	0,83
Moda	14,87	0,85	17,81	52,91	0,73
Media	16,09	0,79	18,90	89,53	0,72
Desviación estándar	2,11	0,08	3,98	36,55	0,04
Asimetría	4,67	-1,41	0,39	1	-2,99

**Tabla 9.** Estadística descriptiva para los núcleos del estrato mesenquimático.

	<b>Forma</b>	<b>Circularidad</b>	<b>Perímetro</b>	<b>Área</b>	<b>Rectangularidad</b>
Mínimo	13,60	0,33	6,88	12,74	0,40
Percentil 25%	15,03	0,72	16,19	63,05	0,71
Mediana	15,92	0,79	19,44	90,74	0,72
Percentil 75%	17,36	0,84	23,05	122,8	0,74
Máximo	38,38	0,92	38,93	348,3	0,82
Moda	14,94	0,83	18,33	75,66	0,72
Media	16,47	0,77	19,73	96,31	0,72
Desviación estándar	2,13	0,08	5,03	45,20	0,04
Asimetría	2,72	-1,06	0,29	0,80	-2,72

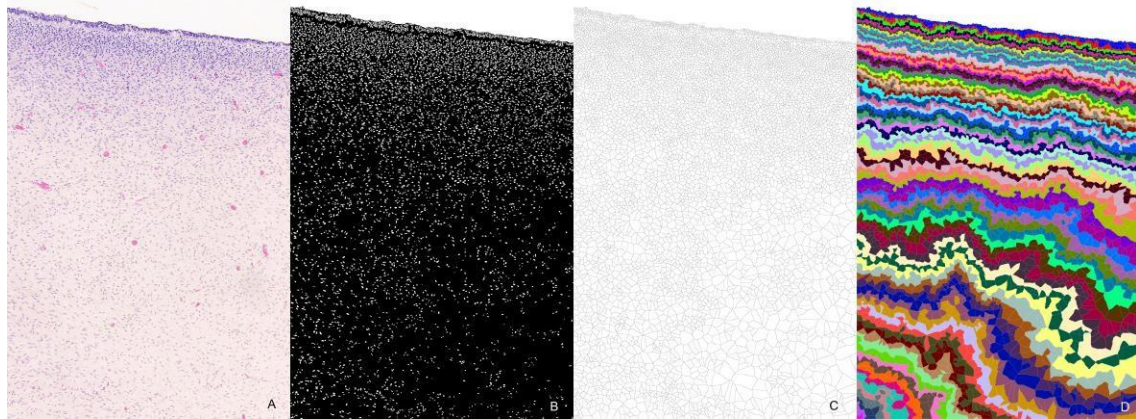
### 7.8. Análisis de la morfología celular

Se detectaron un total de 79 estratos en la imagen de TOP subepitelial CD34+ teñida con HE, siendo que las que corresponden al estrato epitelial (estrato 1, azul) son las de menor área en comparación con las del mesénquima profundo (**Fig. 30**). Los resultados del análisis de estratificación se basan en la adyacencia de las células virtuales que son generadas de acuerdo a las zonas de influencia de los núcleos (es decir cada célula virtual está compuesta por el grupo de píxeles más cercano a cada núcleo).

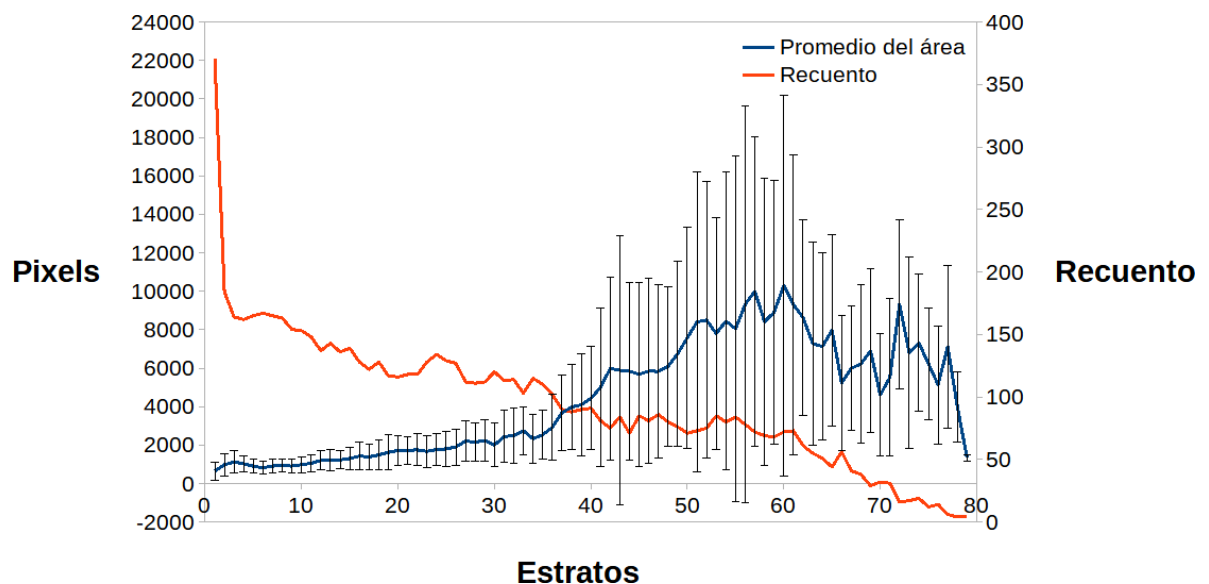
Consecuentemente, cuando la densidad de núcleos en el tejido es alta, menores son las zonas de influencia. Por lo tanto, a nivel epitelial y subepitelial, se observa más densidad nuclear que en las zonas profundas del mesénquima (las cuales son más laxas). Esto se condice con el análisis de densidad celular reportado previamente.



Las células del estrato 2 presentan un área mayor por incluir la zona correspondiente a la membrana basal y un espacio de hialinización libre de núcleos, observado en algunos sectores, pero es a partir del estrato 39 mesenquimático en adelante donde se observan los mayores valores de área (**Fig.31**).



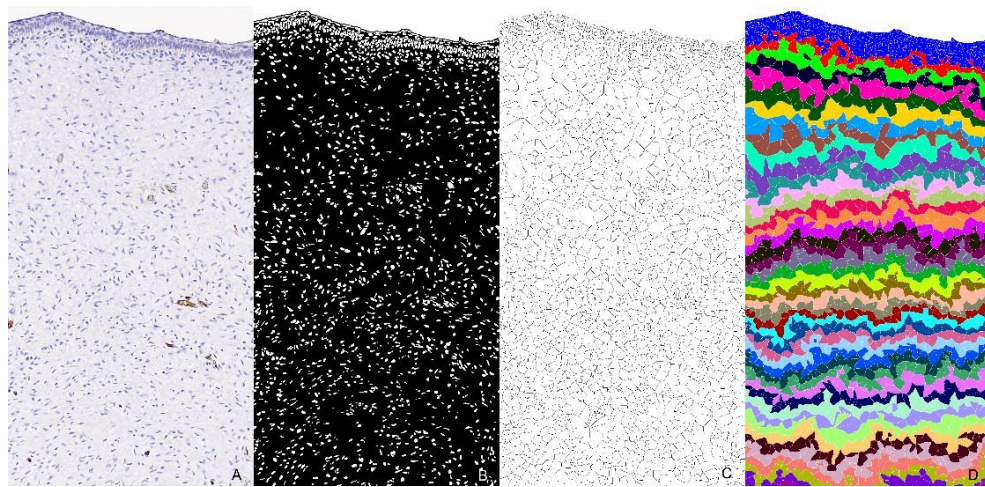
**Fig. 30.** Análisis de la morfología de células virtuales de tumor odontogénico primordial. A) Tinción HE. B) Segmentación de núcleos con StarDist 2D, obteniendo una imagen binaria. C) Segmentación de células virtuales mediante watershed transform. D) Análisis de estratos de células virtuales desde el borde superior del tejido hacia la profundidad.



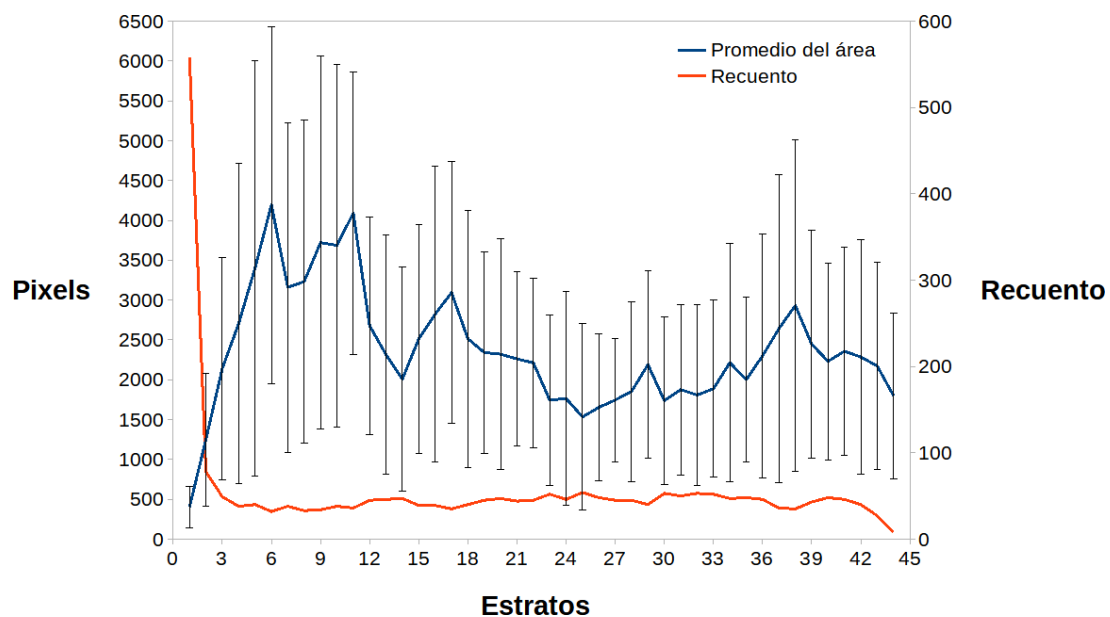
**Fig. 31.** Representación gráfica del área de las células virtuales en tumor odontogénico primordial, organizado por estratos celulares. Nótese como el recuento es mayor a nivel del epitelio y descende paulatinamente hacia el mesénquima. De manera inversa, el área de las células virtuales se ve aumentado en el mesénquima.



La segmentación de TOP negativo para CD34 subepitelial detectó un total de 44 estratos celulares, de los cuales el primero representa al epitelio (observado en azul en la **Fig. 32**). Se destacan las siguientes características: un alto recuento a nivel epitelial con un descenso brusco en el mesénquima, siendo que las células virtuales de menor área corresponden al estrato 1 epitelial, aumentando a nivel subepitelial. A partir del estrato 6-10 en adelante se observaron los mayores valores de área correspondiendo a las células mesenquimáticas (**Fig. 33**).

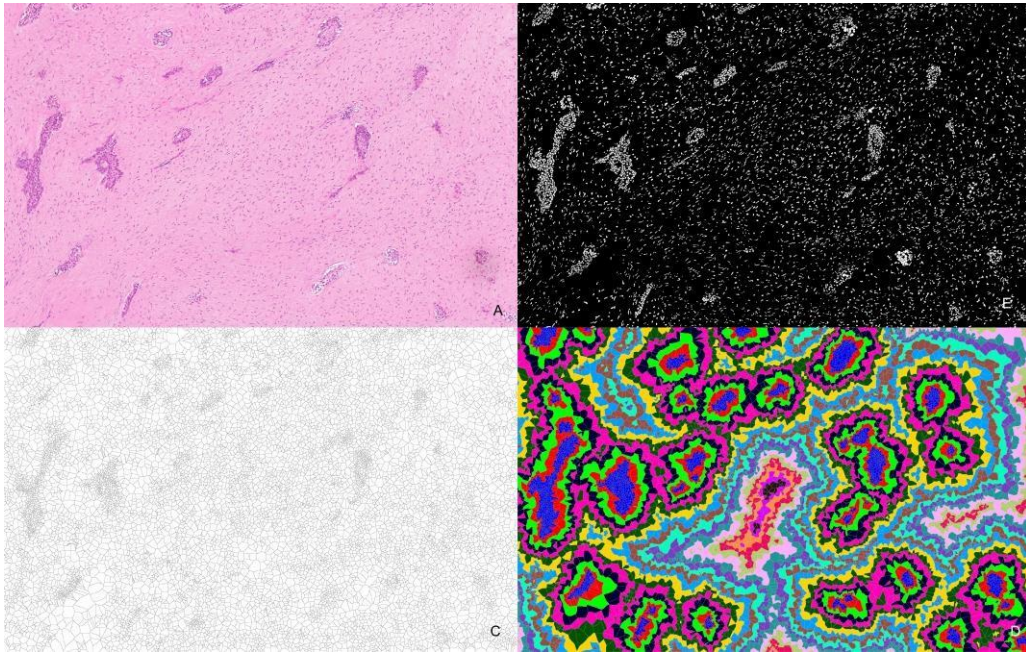


**Fig. 32.** Análisis de la morfología de células virtuales de tumor odontogénico primordial. A) Tinción inmunohistoquímica subepitelial negativa para CD34. B) Segmentación de núcleos con StarDist 2D, obteniendo una imagen binaria. C) Segmentación de células virtuales mediante watershed transform. D) Análisis de estratos de células virtuales desde el borde superior del tejido hacia la profundidad.

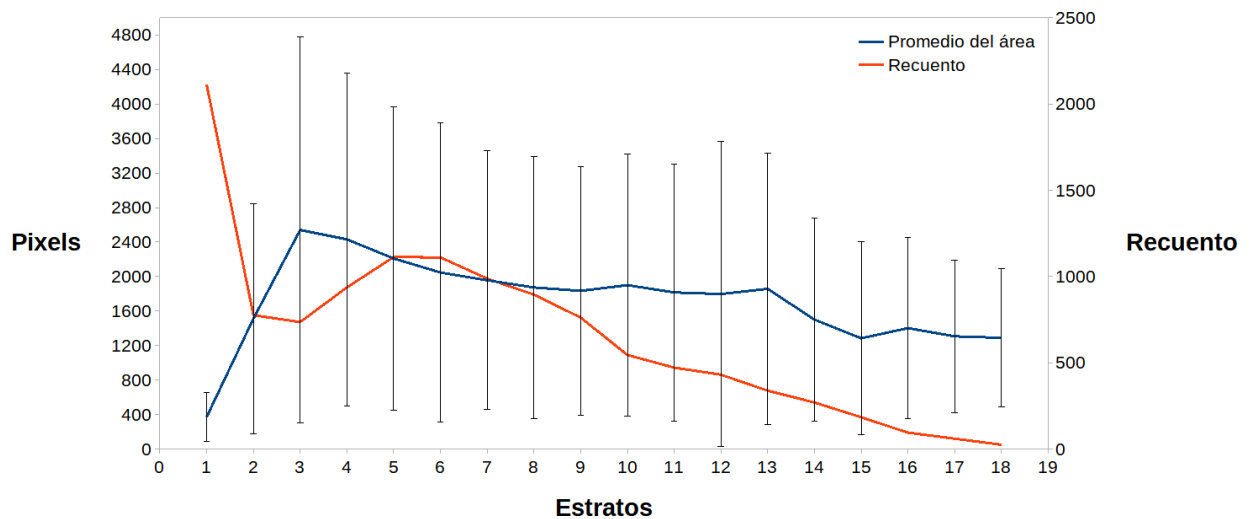


**Fig. 33.** Representación gráfica del área de las células virtuales en tumor odontogénico primordial, organizado por estratos celulares. El análisis es en base a la figura 31, en donde el área subepitelial es negativa para CD34.

Del procesamiento de FA se obtuvieron un total de 18 estratos, de los cuales el estrato 1 etiquetado en azul (**Fig. 34**) corresponde al epitelio, siendo las células virtuales de menor área (**Fig. 35**). La gráfica que representa el área de las células virtuales de acuerdo al estrato en que se encuentran reveló un pico en el estrato 3, donde las células virtuales poseen un área mayor que el resto. El estrato 3 se encuentra próximo a la zona hialina, que rodea algunas islas epiteliales, lo que resulta en un aumento del tamaño celular. A su vez, se observa que el tamaño de las células virtuales mesenquimáticas depende de la proximidad de las islas epiteliales entre sí, compartiendo mayor o menor espacio intercelular.



**Fig. 34.** Análisis de la morfología de células virtuales de fibroma ameloblástico. A) Tinción HE. B) Segmentación de núcleos con StarDist 2D, obteniendo una imagen binaria. C) Segmentación de células virtuales mediante watershed transform. D) Análisis de estratos de células virtuales.

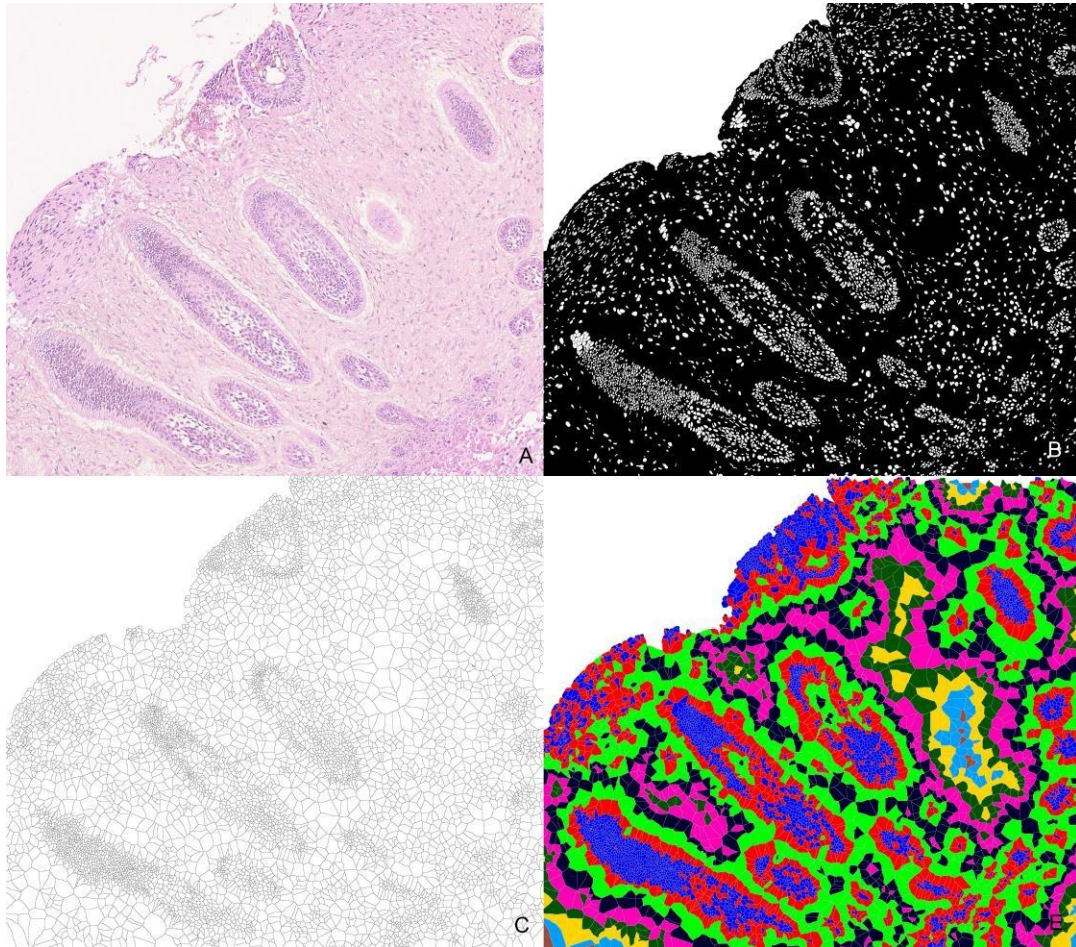


**Fig. 35.** Representación gráfica del área de las células virtuales en fibroma ameloblástico, organizado por estratos celulares. Nótese que las células virtuales del estrato 3 presentan mayor área que el resto.

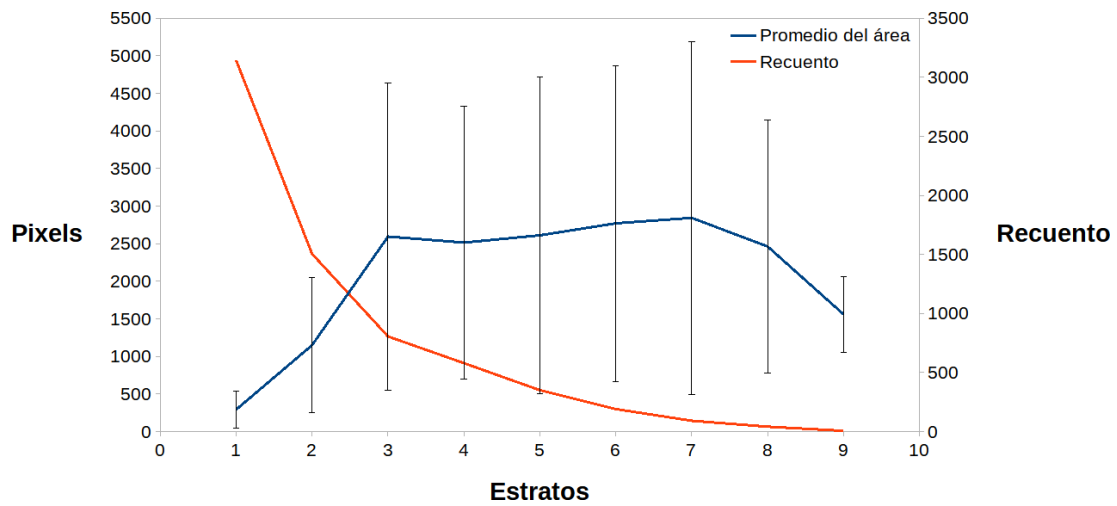
El análisis de OD reveló un total de 9 estratos, de los cuales el estrato 1 en azul representa al epitelio (**Fig. 36**). Al estudiar la imagen en HE se observa la presencia de una zona hialina rodeando los islotes epiteliales, sector donde encontramos los estratos rojo-verde (estratos 2-3), siendo que la mesenquimática verde (estrato 3) exhibe un pico



en la gráfica para luego descender hasta el estrato 9 (marrón) (**Fig. 37**). A su vez, del análisis del área de las células virtuales mesenquimáticas, se observa que éstas comparten una proporción similar en los estratos 3-7, considerando así que los espacios intercelulares son relativamente constantes y homogéneos, sin detectar un sector con mayor/menor densidad celular.



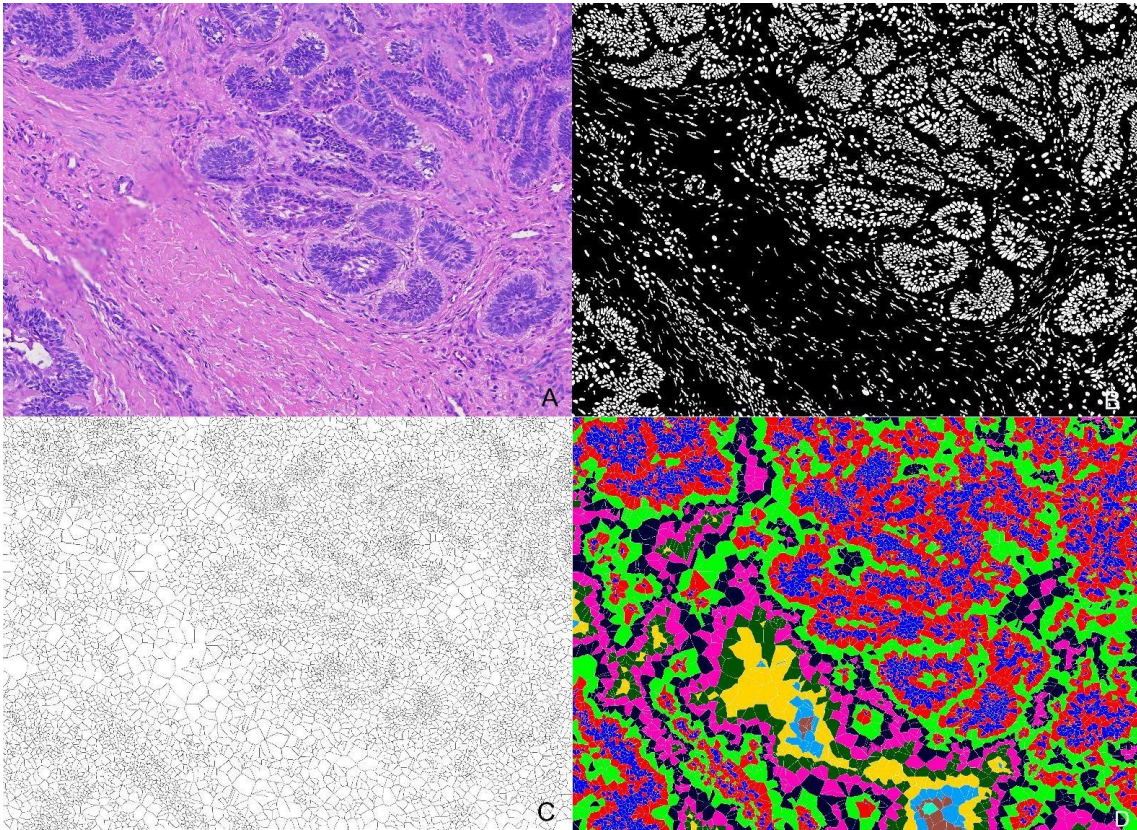
**Fig. 36.** Análisis de la morfología de células virtuales de odontoma. A) Tinción HE. B) Segmentación de núcleos con StarDist 2D, obteniendo una imagen binaria. C) Segmentación de células virtuales mediante watershed transform. D) Análisis de estratos de células virtuales.



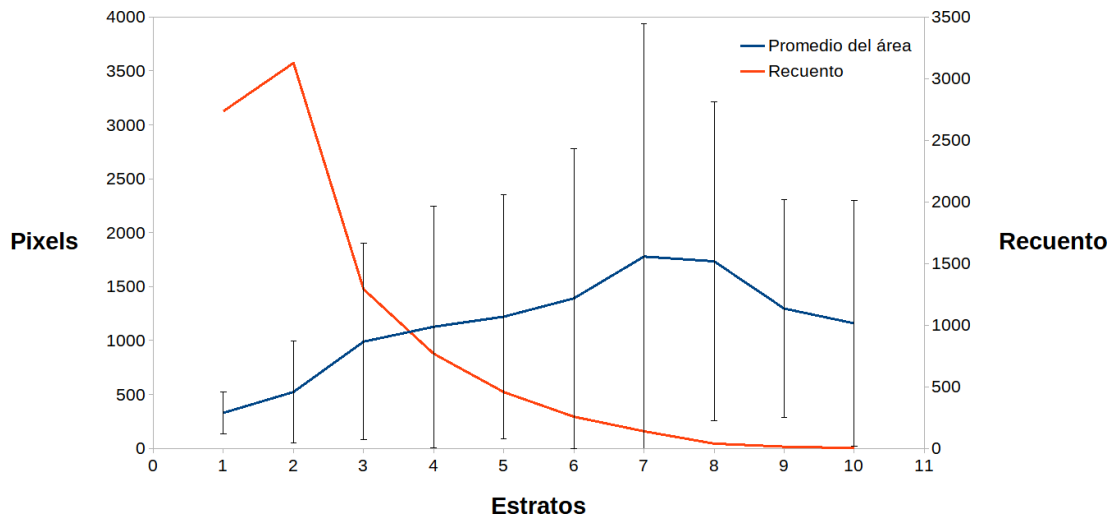
**Fig. 37.** Representación gráfica del área de las células virtuales en odontoma, organizado por estratos celulares. Se observa un área relativamente homogénea entre los estratos 3 y 7.

En el caso de AM la segmentación dio un total de 10 estratos, siendo el estrato 1 en azul el epitelio (**Fig. 38**). Las células virtuales del estrato 1 presentan menor área en comparación con el resto, las representadas en color amarillo (estrato 7) son las de mayor área, posiblemente por estar ubicadas en una zona laxa con menor densidad nuclear (**Fig. 39**).



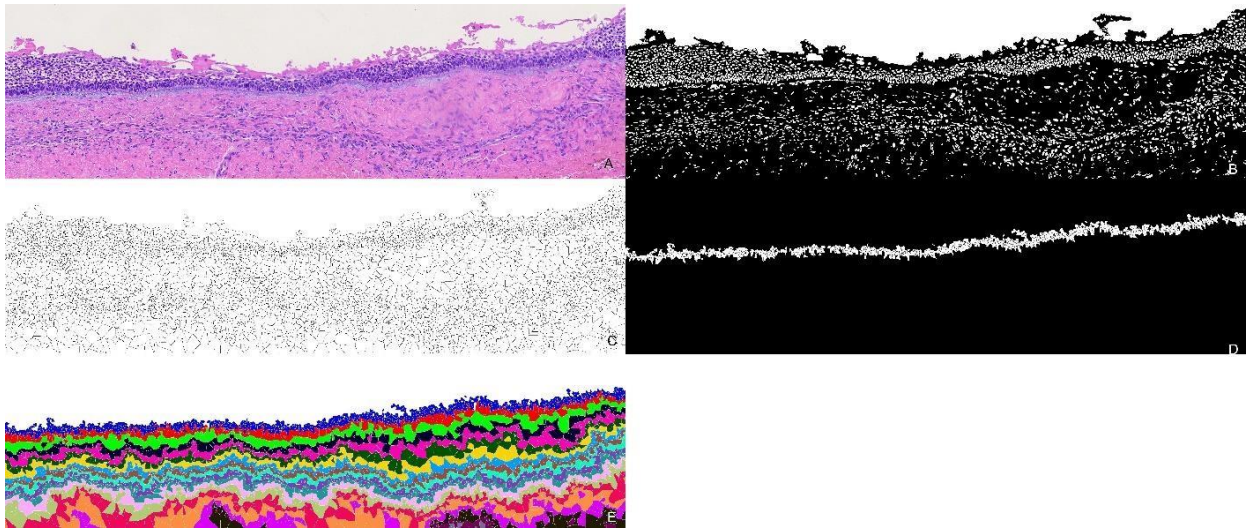


**Fig. 38.** Análisis de la morfología de células virtuales de ameloblastoma convencional. A) Tinción HE. B) Segmentación de núcleos con StarDist 2D, obteniendo una imagen binaria. C) Segmentación de células virtuales mediante watershed transform. D) Análisis de estratos de células virtuales.

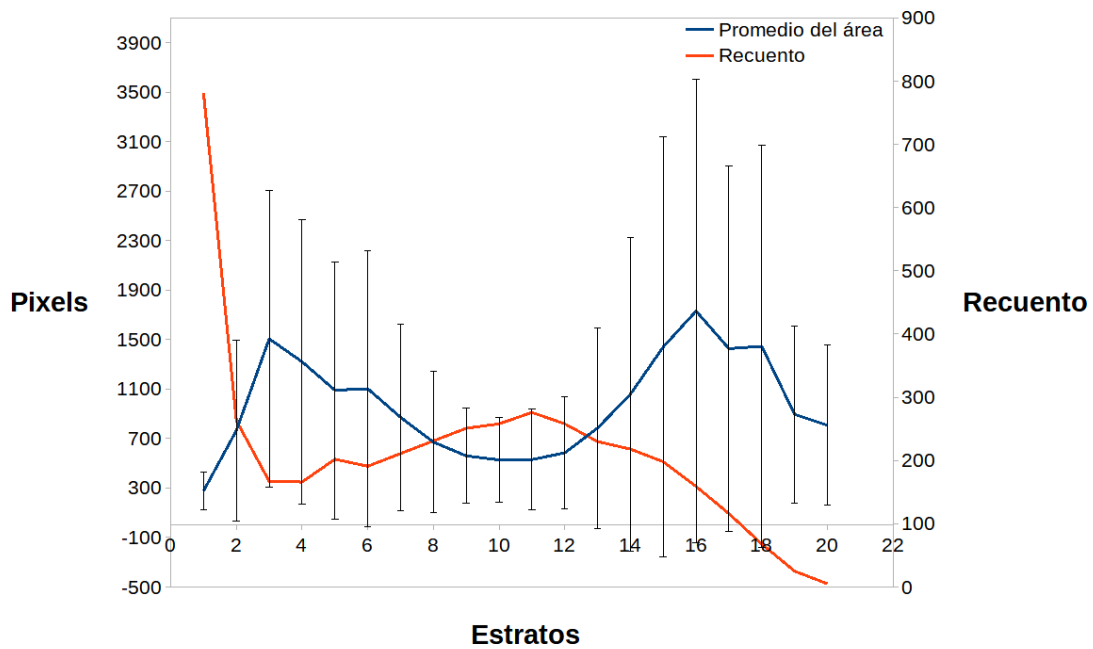


**Fig. 39.** Representación gráfica del área de las células virtuales en ameloblastoma convencional, organizado por estratos celulares. Nótese que el estrato 7 es el que presenta la mayor área.

En el caso de AU se observó un total de 20 estratos (**Fig. 40**), de los cuales el estrato 1, que corresponde a las células epiteliales (representadas en azul), y las mesenquimáticas del estrato 10 (en verde claro) presentan menor área. Por su parte, las mesenquimáticas del estrato 3 (representadas en color verde) y 16 (naranja) muestran dos picos en la gráfica, que indican el mayor valor del área (**Fig. 41**). Comparando estos resultados con la imagen HE, se constata la presencia de una banda de células mesenquimáticas con mayor densidad nuclear (estrato 10). La zona subepitelial así como el mesénquima profundo revelaron un área laxa con menor densidad celular.



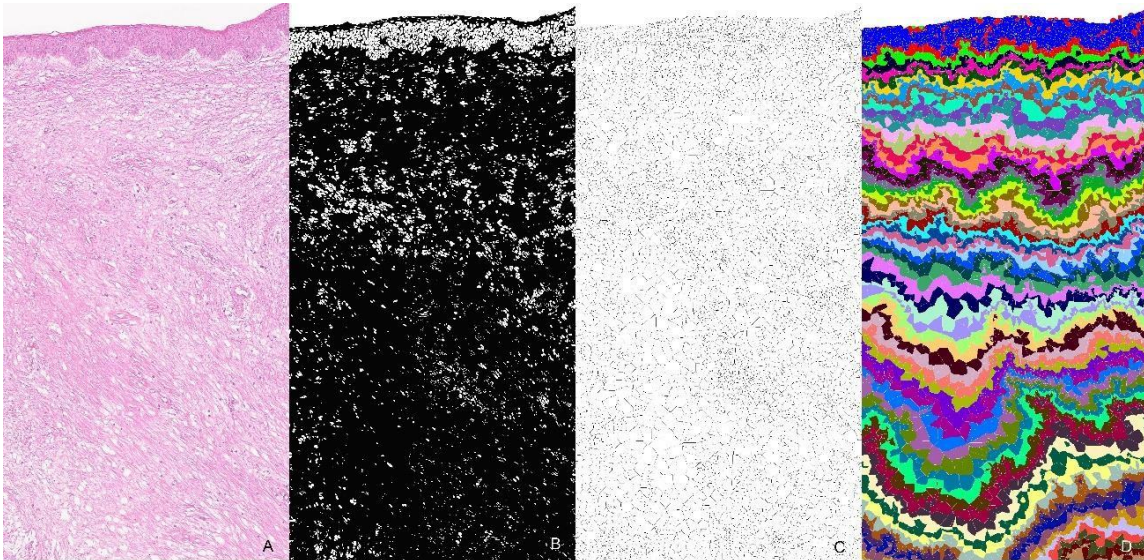
**Fig. 40.** Análisis de la morfología de células virtuales de ameloblastoma uniuquístico. A) Tinción HE. B) Segmentación de núcleos con StarDist 2D, obteniendo una imagen binaria. C) Segmentación de células virtuales mediante watershed transform. D) Segmentación de células virtuales epiteliales para remover aquellas que se encuentren por encima del epitelio. E) Análisis de estratos de células virtuales desde el borde del tejido hacia la profundidad.



**Fig. 41.** Representación gráfica del área de las células virtuales en ameloblastoma uniuístico, organizado por estratos celulares. Obsérvese los dos picos de la gráfica correspondientes al estrato mesenquimático 3 y 16.

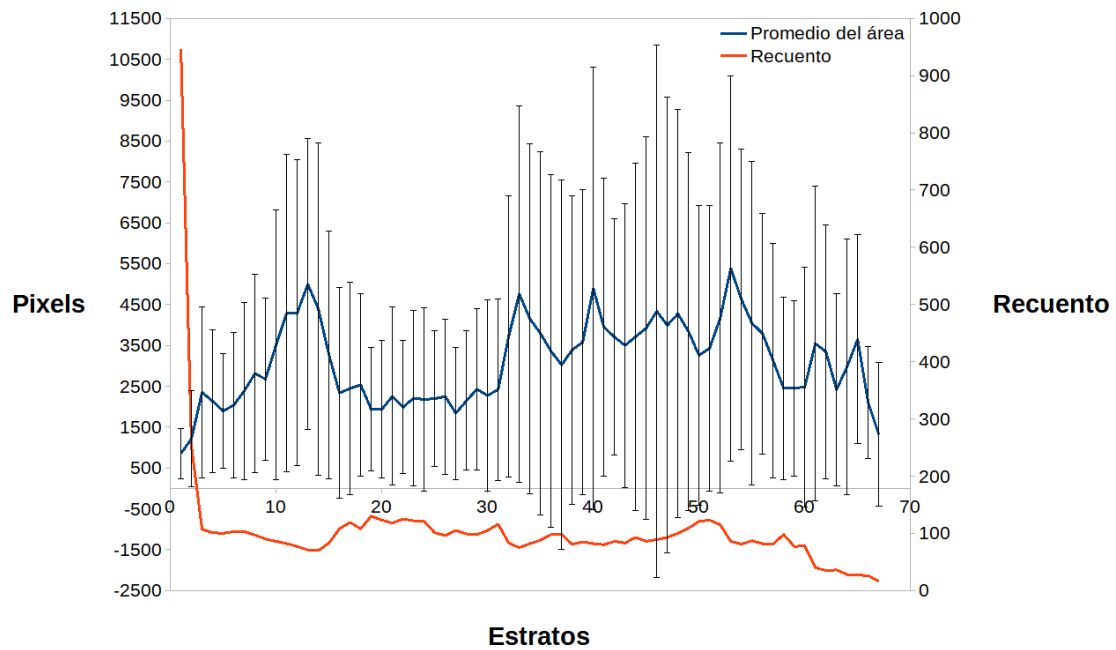
La segmentación de QO generó un total de 67 estratos (**Fig. 42**) donde el estrato 1 en azul corresponde mayormente al epitelio, conjuntamente con algunas células del estrato 2 en rojo, las cuales comparten un espacio adicional con una delgada zona hialina adyacente a la membrana basal.





**Fig. 42.** Análisis de la morfología de células virtuales de queratoquiste odontogénico. A) Tinción HE. B) Segmentación de núcleos con StarDist 2D, obteniendo una imagen binaria. C) Segmentación de células virtuales mediante watershed transform. D) Análisis de estratos de células virtuales desde el borde superior del tejido hacia la profundidad.

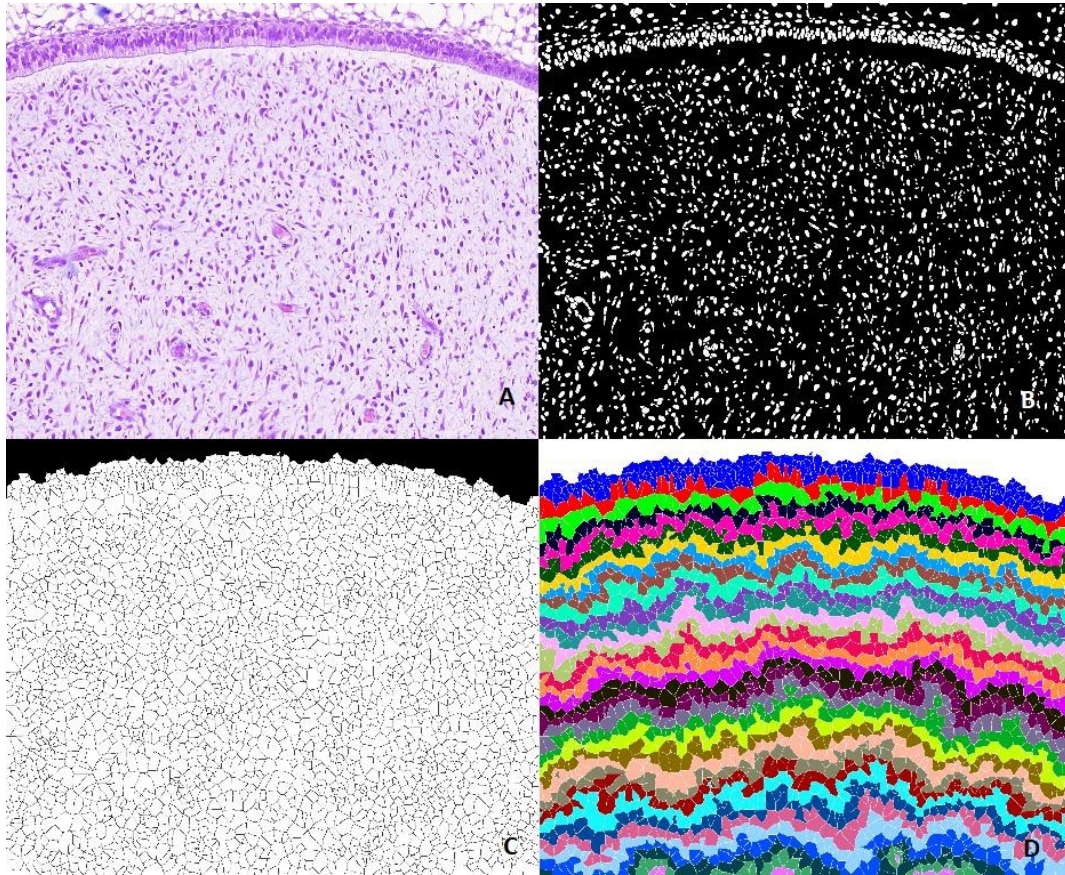
Gráficamente se observaron variaciones importantes del área celular, siendo reducida a nivel del epitelio y subepitelio, con un posterior aumento en los estratos más profundos (por ejemplo estrato 13 en la **Fig. 43**), correspondientes a células mesenquimáticas por debajo del subepitelio, y un aumento mayor (estrato 53) relativamente constante en la profundidad mesenquimática (**Fig. 43**). Del estrato 16 al 30 se observa un aumento de la densidad celular, encontrando menor laxitud tisular, representado gráficamente como una disminución del área celular.



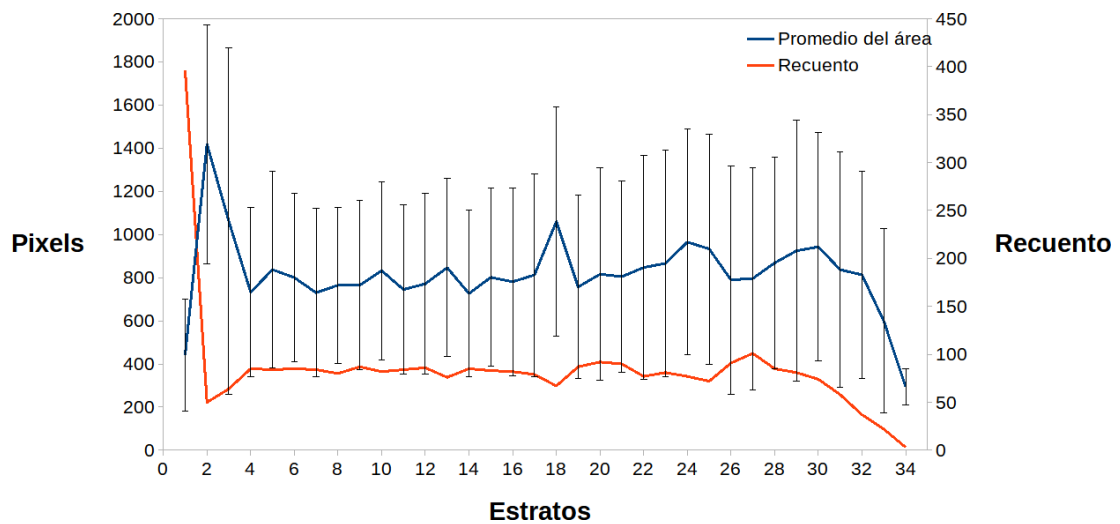
**Fig. 43.** Representación gráfica del área de las células virtuales en queratoquiste odontogénico, organizado por estratos celulares. Se presenta una heterogeneidad del área de las células virtuales en todo el mesénquima.

Para el caso de GD se constataron un total de 34 estratos de células virtuales (**Fig. 44**).

Las células epiteliales se encontraron representadas por el estrato 1 (azul), mientras que el espacio correspondiente a la interfase epitelio-mesenquimática se encontró representado por los estratos 2 y 3 (rojo y verde). Esto se expresa gráficamente como un aumento en el área celular, con una posterior disminución de la misma (**Fig. 45**). A su vez, el área en los estratos correspondientes al mesénquima se presentó relativamente constante con un aumento puntual en el estrato 18.



**Fig. 44.** Análisis de la morfología de células virtuales de germen dental. A) Tinción HE. B) Segmentación de núcleos con StarDist 2D, obteniendo una imagen binaria. C) Segmentación de células virtuales mediante watershed transform. D) Análisis de estratos de células virtuales desde el borde del tejido hacia la profundidad.

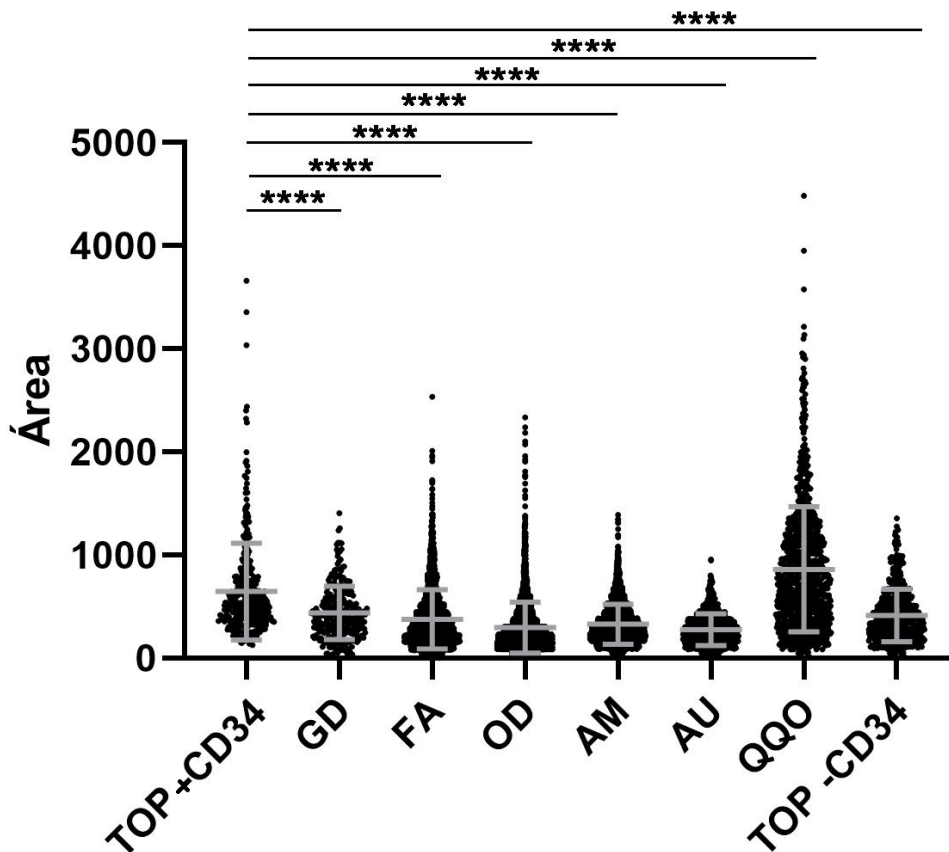


**Fig. 45.** Representación gráfica del área de las células virtuales en germen dental, organizado por estratos celulares. Obsérvese el aumento en el área del estrato 2-3.



Se realizó la comparación estadística del área de las células virtuales del estrato 1 de TOP subepitelial CD34+ con el estrato 1 de todos los TODs y GD aplicando T Student (ajustado a Mann Whitney) encontrando un p valor significativo:

$p^* < 0,0001$  (Fig. 46).



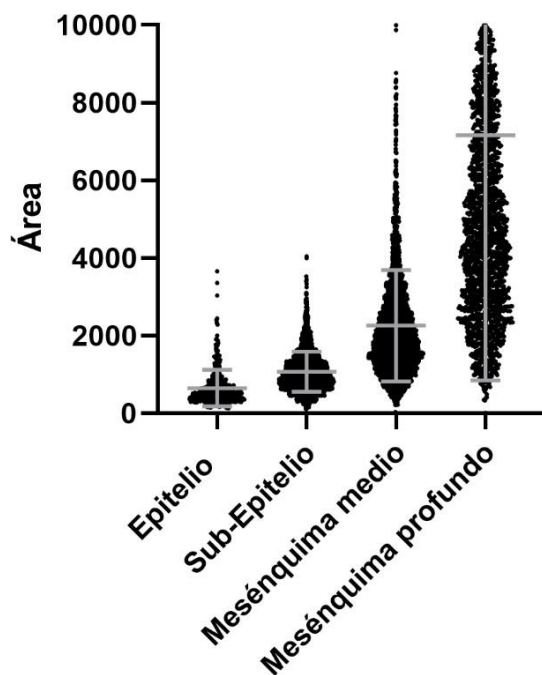
**Fig. 46.** Representación gráfica de la comparación del área de las células virtuales entre el estrato 1 de todos los tumores odontogénicos. Obsérvese la significancia entre el tumor odontogénico primordial y el resto de los casos.

Además, se realizó estadística descriptiva para el análisis del estrato 1 de todos los TODs (Tabla 10), encontrando similitudes en la media entre TOP CD34 negativo y GD, FA y AM, OD Y AU, siendo que los casos de QQO y TOP subepitelial CD34+ presentaron valores superiores en comparación con el resto.

**Tabla 10.** Estadística descriptiva del estrato 1 para todas las entidades estudiadas.

	TOP CD34 +	TOP CD34-	GD	FA	OD	AM	AU	QQO
<b>Mínimo</b>	28	14,5	35,5	11	10	14,5	11,5	10
<b>Percentil 25%</b>	364	218,3	249	177	139	190,5	159	413
<b>Mediana</b>	514,5	374	405	304	230,5	286	260,5	737
<b>Percentil 75%</b>	748	556,8	580,6	494,5	367,1	430	363,1	1170
<b>Máximo</b>	3659	1357	1405	2535	2334	1392	956,5	4487
<b>Media</b>	646,3	415,2	438	376,3	296,5	329,5	277,4	862,5
<b>Desviación estándar</b>	470,1	254,8	258,2	286,7	247,8	194,2	154,5	607,9

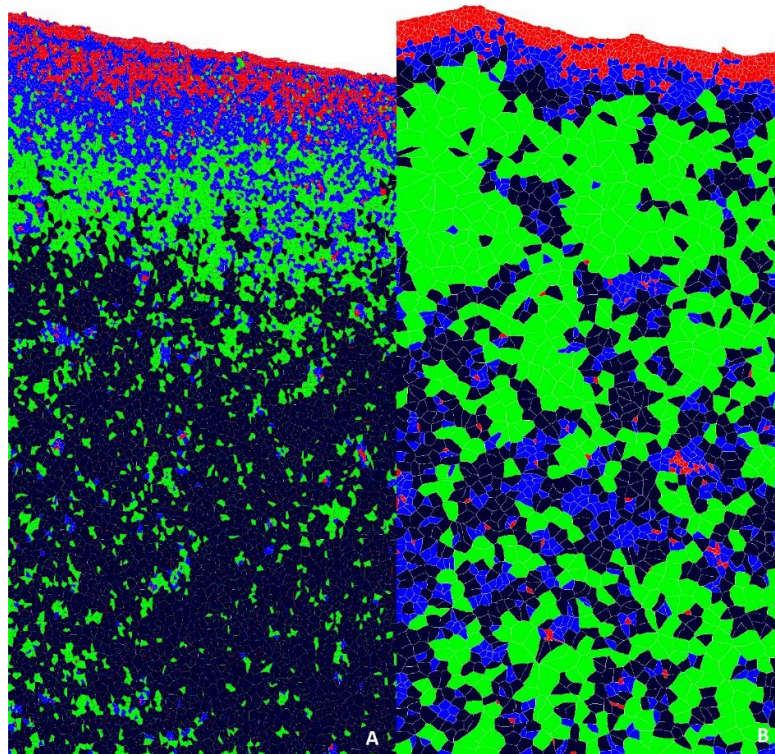
Además, se realizó la comparación estadística del área de las células virtuales de los diferentes estratos de TOP subepitelial CD34+ aplicando T Student (ajustado a Mann Whitney) encontrando un p valor significativo:  $p^* < 0,0001$  (**Fig. 47**). Estos resultados muestran que el área de las células virtuales epiteliales y subepiteliales es menor en comparación con las presentes en el mesénquima.



**Fig. 47.** Gráfica comparativa del área de las células virtuales correspondientes al epitelio, subepitelio, mesénquima medio y profundo en tumor odontogénico primordial. Véase que las células virtuales consideradas epiteliales y subepiteliales son las de menor área.

### 7.9. Análisis por agrupamiento de células virtuales

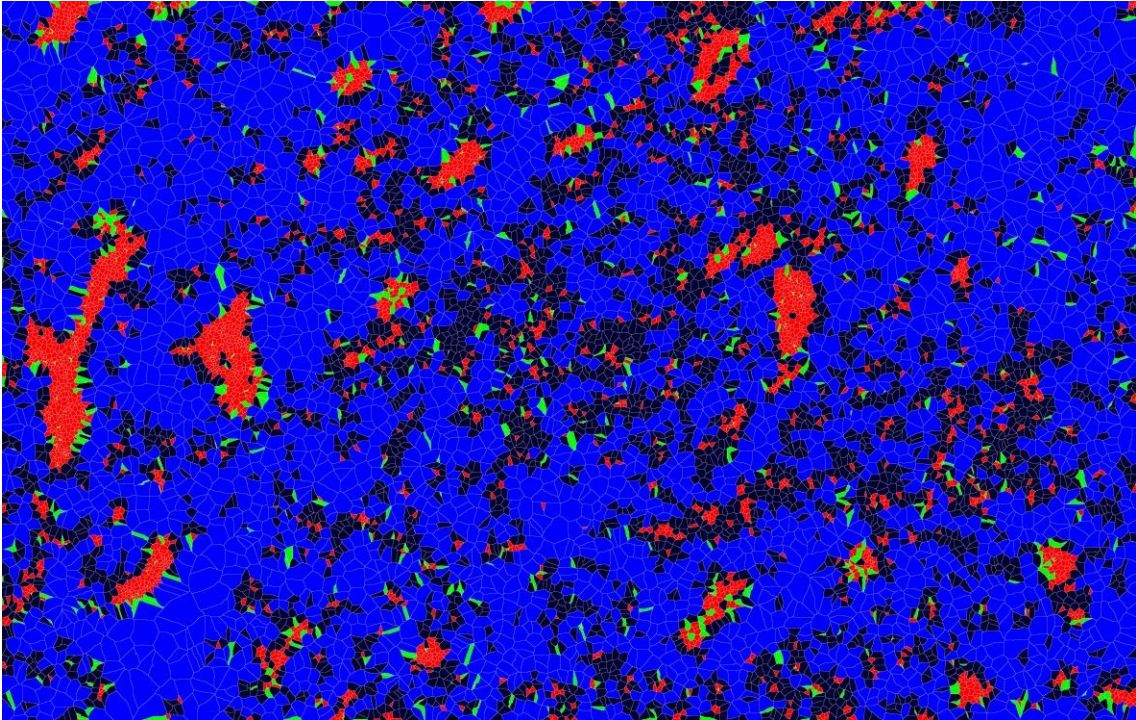
Se tomó como resultado de este análisis la moda de los siete métodos probados. Para el caso de TOP subepitelial positivo para CD34 se observó la conformación de cuatro grupos que coinciden con distintos tipos de células (**Fig. 48A**): epitelio (rojo), subepitelio (azul), mesénquima (verde) y mesénquima profundo (negro). En ausencia de CD34 a nivel subepitelial solamente se identifica el estrato rojo, que coincide con el epitelio, encontrando una desorganización espacial de las agrupaciones que representarían al mesénquima, pudiendo ser más representativa del mismo la presente en color verde (**Fig. 48B**). Esto se condice con lo estudiado en el análisis de la densidad celular, de las células virtuales y referentes a las zonas focales de expresión de CD34, identificando un sector subepitelial característico de esta entidad.



**Fig. 48.** Comparación del agrupamiento de células virtuales de tumor odontogénico primordial. A) Segmentación a partir de la imagen HE, subepitelial positivo para CD34. B) Segmentación a partir de la imagen inmunohistoquímica subepitelial negativo para CD34. Nótese la organización de las agrupaciones mesenquimáticas en A, en comparación con B.

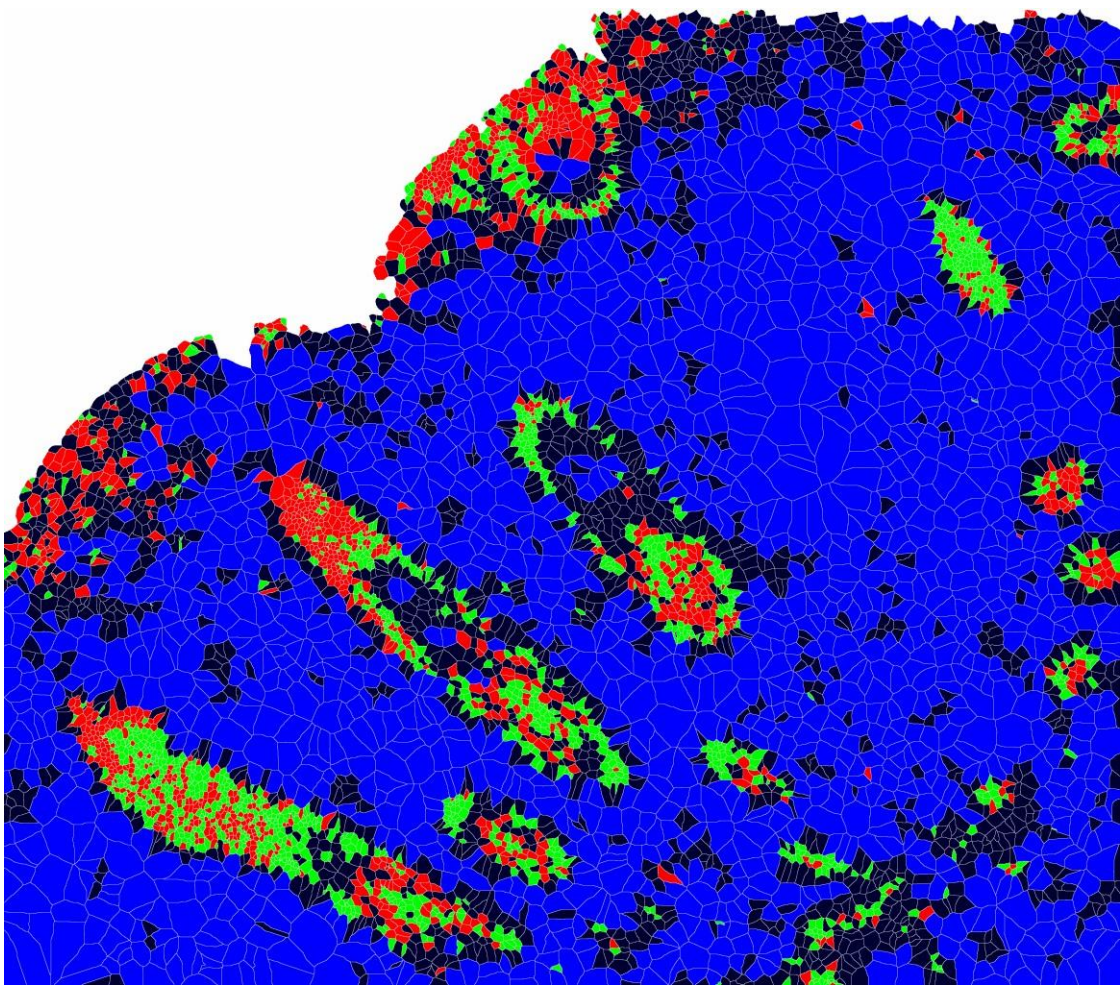


En el caso de FA se detectaron dos grupos principales (**Fig. 49**) que coinciden con las células epiteliales (en rojo) y las mesenquimáticas (en azul). Los grupos correspondientes a los colores verde y negro no son representativos de elementos histológicos y corresponden a células aisladas sin una organización específica, pudiendo encontrarse en la periferia de las islas epiteliales así como dispersos en el mesénquima.



**Fig. 49.** Agrupación de células virtuales de fibroma ameloblástico. Nótese la organización de las agrupaciones en color azul y rojo.

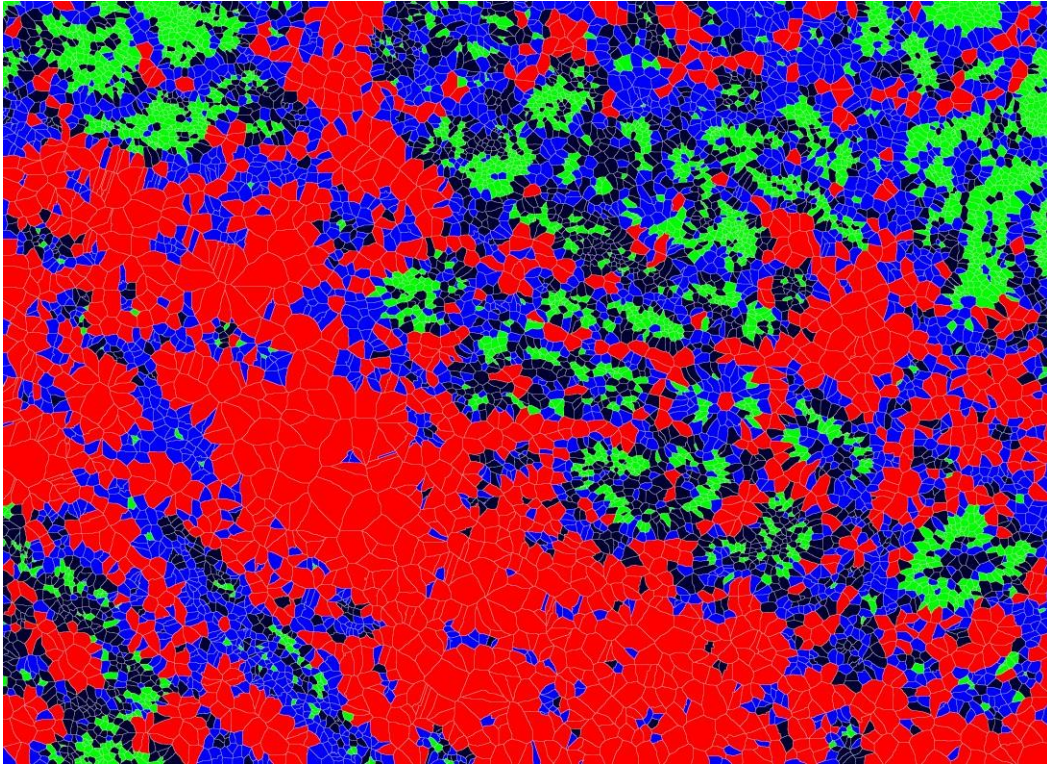
Para OD la disposición de los agrupamientos se distribuyen en 4 grupos identificables, pero diferentes a los encontrados en TOP, en donde el color rojo coincide con el centro de los islotes epiteliales, el verde el epitelio propiamente dicho, el negro con las células ubicadas sobre la periferia del epitelio y por último el azul representando al mesénquima (**Fig. 50**). A pesar de ello, y como observado en FA, hay dos agrupaciones celulares (rojas y negras) las cuales también presentan cierta dispersión a nivel del mesénquima.



**Fig. 50.** Agrupación de células virtuales de odontoma. Nótese las agrupaciones que coinciden con el epitelio, representadas en color rojo, verde y negro y el mesénquima en azul.

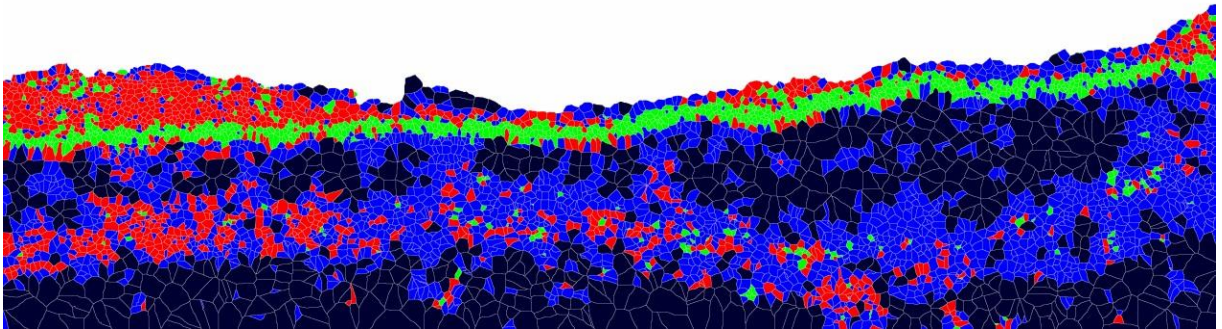


Al analizar AM se detectaron tres grupos representativos que coinciden con diferentes estratos celulares: en verde el epitelio, en azul la periferia epitelial y en rojo el mesénquima (**Fig. 51**). En negro se observan células aisladas en baja proporción en el mesénquima, pudiendo representar el centro de los islotes epiteliales. Esto refleja un patrón diferente al observado en el TOP, pero similar a lo encontrado en FA y OD.



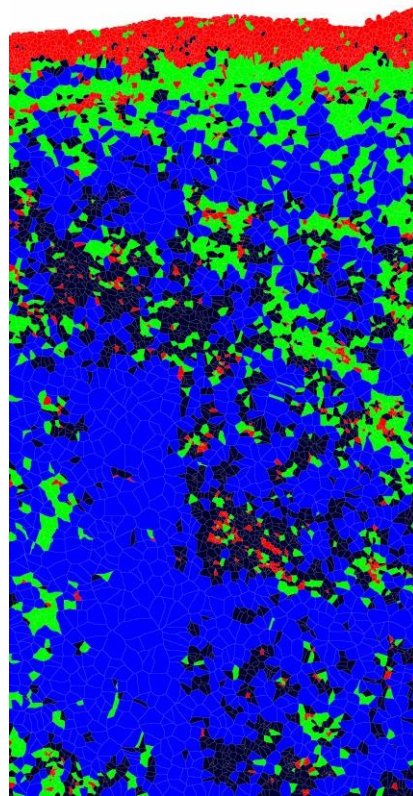
**Fig. 51.** Agrupación de células virtuales de ameloblastoma convencional. Nótese las agrupaciones coincidentes con las islas epiteliales en verde y azul, encontrando mayor dispersión de las representadas en negro.

Las muestras de AM y AU revelaron diferencias considerables en la organización de los estratos. Para AU se observa que las agrupaciones de células virtuales son similares a las descritas referente al área de las mismas (**Fig. 52**), coincidiendo: un grupo de células epiteliales (verde), subepiteliales y del mesénquima profundo (negro), mesenquimáticas (azul) y referente a la banda de células del mesénquimas centrales observamos una agrupación de células virtuales rojas, las cuales también se observan por encima del epitelio. Ésta última agrupación corresponde con un aumento de la densidad celular en la zona central del mesénquima, agrupadas por su similitud en cuanto al área, pero sin representar a un grupo celular en particular.



**Fig. 52.** Agrupación de células virtuales de ameloblastoma unicístico. Nótese la agrupación en color rojo en la periferia y el centro del tejido.

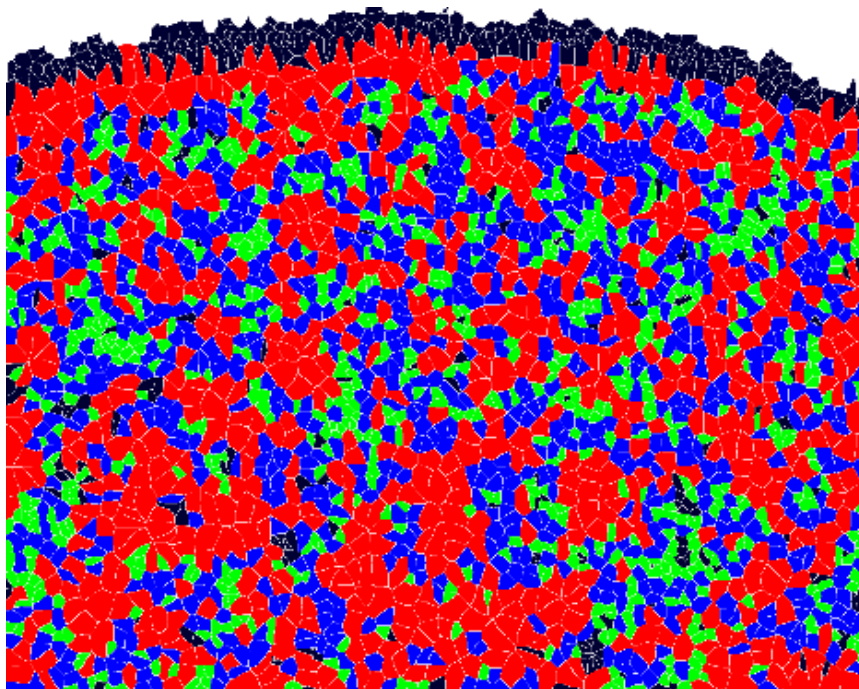
El análisis de QQQ reveló dos agrupaciones específicas correspondientes a diferentes estratos: uno rojo que coincide con el epitelio y uno verde-azul-negro que coincide con el mesénquima subepitelial y profundo. Esto se asemeja con la disposición de células subepiteliales de TOP subepitelial CD34+, pero para el caso de QQQ las agrupaciones verdes (subepitelial) también se encuentran en una zona más profunda del mesénquima, y de manera más heterogénea en todo el tejido, no pudiendo considerarse un agrupamiento único (**Fig. 53**). Las aparentes agrupaciones de células en color negro pueden representar áreas de mayor densidad celular al realizar la comparación con el HE.



**Fig. 53.** Agrupación de células virtuales de queratoquiste odontogénico. Nótese la desorganización en la distribución de los grupos verde y negro.



Al realizar el análisis de GD se detectaron dos grupos característicos correspondientes a células virtuales negras que coinciden con el estrato epitelial y rojas con el estrato mesenquimático (**Fig. 54**). Los grupos verde y azul no son representativos de un componente histológico en particular, aunque en ciertas regiones coinciden con la presencia de vasos sanguíneos, pudiendo marcar endotelio vascular. Las agrupaciones presentes en GD se asemejan a las observadas en TOP cuando no se expresa CD34 a nivel subepitelial, presentando en ambos casos una distinción epitelial pero desorganización mesenquimática.



**Fig. 54.** Agrupación de células virtuales de germen dental. Nótese la desorganización de las agrupaciones verde y azul.

Mediante los resultados obtenidos por el análisis del área de las células virtuales y el de agrupaciones celulares, se establece un resumen de las diferencias morfológicas entre TOP y el resto de las entidades estudiadas (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Comparación morfológica entre los casos de tumores odontogénicos y germen dental.

	Área de células virtuales	Agrupaciones celulares
TOP CD34+	Epitelio con menor área. Subepitelio con aumento del área. Mesénquima profundo con mayor área.	4 grupos definidos: epitelio, subepitelio, mesénquima y mesénquima profundo.
TOP CD34-	Epitelio con menor área. Subepitelio con aumento del área. Mesénquima profundo con heterogeneidad de área.	2 grupos definidos: epitelio y mesénquima. Desorganización mesenquimática.
FA	Epitelio con menor área, con aumento en capas adyacentes y disminución progresiva en el mesénquima profundo.	2 grupos definidos: epitelio y mesénquima. 2 grupos próximos a las islas epiteliales pero también aisladas no específicas.
OD	Epitelio con menor área, con aumento progresivo al mesénquima profundo donde se mantiene homogénea para luego decrecer.	4 grupos definidos: centro de islas, epitelio, periferia de islas, mesénquima.
AM	Epitelio con menor área, con aumento progresivo en el mesénquima.	4 grupos definidos: centro de islas, epitelio, periferia de islas, mesénquima.
AU	Epitelio con menor área, pero con dos aumentos y descensos en diferentes sectores del mesénquima, marcando heterogeneidad.	4 grupos definidos: epitelio, subepitelio y mesénquima profundo, mesénquima, y banda mesenquimática central.
QQO	Epitelio con menor área, pero variaciones bruscas en todo el mesénquima.	2 grupos definidos: epitelio, mesénquima. Con grupo subepitelial desorganizado en el resto del tejido.
GD	Epitelio con menor área, subepitelio con mayor área y posterior disminución de la misma, mantenida en todo el mesénquima.	2 grupos definidos: epitelio y mesénquima. Posible agrupación vascular, no específica. Desorganización mesenquimática.

Se realizó el índice Jaccard para determinar el grado de coincidencia entre las agrupaciones definidas de manera no supervisada por parte del algoritmo y las definidas por el operador de manera manual en la imagen HE. Considerando que los valores más cercanos a 1 corresponden con un mayor grado de coincidencia entre los grupos, y los más cercanos a 0 una menor coincidencia, se obtuvieron los resultados expresados en la **Tabla 12** para el estrato epitelial. Interesantemente, las mayores coincidencias encontradas al usar este índice se observan en los casos en donde el epitelio se presenta hacia la periferia del tumor (TOP CD43 negativo, AU, QQQ, GD) excepto en el caso de TOP en el sector donde CD34 da positivo a nivel subepitelial. Para los casos que presentaron islas epiteliales la coincidencia fue menor.

**Tabla 12.** Resultados del índice Jaccard para el estrato epitelial en los diferentes tumores odontogénicos y germen dental.

<b>Tumores odontogénicos</b>	<b>Índice Jaccard</b>
TOP CD34 positivo	0,22
TOP CD34 negativo	0,66
FA	0,41
OD	0,16
AM	0,17
AU	0,46
QQQ	0,50
GD	0,68

## 8. DISCUSIÓN

El presente estudio es pionero en la evaluación y comparación de componentes histológicos mediante técnicas de inteligencia artificial para describir la morfología, arquitectura y marcación inmunohistoquímica de los TODs y GD. La cuantificación de la arquitectura tisular permite de esta manera obtener información para el mejor entendimiento y comprensión de la conformación y biología tumoral.

### 8.1. Azul Alcian

En GD teñido con Azul Alcian los resultados reportados en esta tesis coinciden con las observaciones de Quintarelli y cols. en 1963 (133) y de Lau y cols. en 1983 (134): positividad de estructuras como el retículo estrellado y la membrana basal, indicando una mayor concentración de componentes ácidos en relación a las glucoproteínas. También describieron que en estados avanzados de odontogénesis la membrana basal pierde esta expresión para dar lugar a la positividad de estructuras mineralizadas como la dentina y la matriz del esmalte (133). A su vez, Lau y cols. no detectaron tinción de Azul Alcian en la capa odontoblástica ni en el epitelio interno y externo del esmalte (134). En nuestro análisis del GD el retículo estrellado y la papila dental se mostraron positivas de manera heterogénea (tenue a negativa en el área subepitelial), tal como sucede en etapas próximas a la calcificación (133). Algunos autores han sugerido que el procesamiento y digestión enzimática de esta técnica puede generar variaciones en el enmascaramiento de mucopolisacáridos ácidos por parte de las proteínas básicas (135-137).

En TOP se pudo determinar por primera vez que el área subepitelial expresa mucopolisacáridos ácidos (tonalidad celeste), con un aumento en zonas de condensación celular. Este hallazgo difiere con lo encontrado en GD en donde los radicales ácidos

parecen estar localizados en el retículo estrellado, la membrana basal y áreas focales mesenquimáticas de la papila dental, y cuya expresión disminuye al progresar en la odontogénesis (133). Esto sugiere que el área de condensación subepitelial de TOP muestra una composición diferente, lo que nos hace suponer que esté asociado a una función diferente a la observada en la contraparte normal, el GD.

## 8.2. Inmunoexpresión de colágeno IV, laminina y conexina 43

El estudio de la expresión de proteínas estructurales permite relacionar los sucesos en las diferentes etapas de la odontogénesis, dado que la composición de colágeno IV y laminina varían en las diversas etapas del desarrollo dental, conjuntamente con lo observado en algunos TODs (16-20). Estas proteínas, si bien son importantes para el correcto desarrollo y maduración del GD, han sido poco estudiadas en los TODs.

En este trabajo colágeno IV fue detectado en TOP a nivel de la membrana basal y con proyecciones hacia el área subepitelial, así como en la membrana del endotelio vascular, encontrando integridad en todo el tejido. En la mayoría de los TODs mixtos, como el OD, fibrodentinoma ameloblástico, fibroodontoma y odonto ameloblastoma la formación de dentina y esmalte resulta como consecuencia de interacciones epiteliales-mesenquimales que ocurren a través de la membrana basal (1). En TOP se ha reportado presencia tenue de proteínas relacionadas con el proceso de dentinogénesis (DSPP) en este sector subepitelial, lo que sugiere un posible intento de formación de matriz extracelular el cual falla por el silenciamiento de determinados genes que inhiben la diferenciación odontoblástica normal y por lo tanto la formación de dentina (43). La alteración en la producción de proteínas asociadas a la dentinogénesis y en la composición de la membrana basal genera cambios en el proceso inductivo que estimular a los ameloblastos pre-secretores a producir proteínas del esmalte y, por consiguiente, en TOP se constata la ausencia de formación de tejido mineralizado (43).



Por lo tanto, esta integridad de colágeno IV en TOP se relacionaría con su desarrollo en etapas previas a la formación de dentina y esmalte, como reportado en GD (16, 17).

En los casos de FA, OD, AM, AU, QOO y GD la expresión de colágeno IV solamente se detectó a nivel de la membrana basal epitelio-mesenquimática, y en la membrana basal de los vasos sanguíneos. Para los casos de FA, AM, AU y QOO, en donde la expresión de esta proteína se observó de forma fina, lineal y discontinua, se sugiere, en base al trabajo de Zhang y col. (82), la posible degradación del colágeno IV mediante metaloproteinasas de la matriz extracelular, lo que puede facilitar la progresión de la lesión y la expansión o incluso invasión local. En GD la expresión positiva de colágeno IV se correlaciona con las etapas de casquete y campana, en donde aún no hay formación de pre dentina ni degradación de la membrana basal (16, 79, 91), encontrando discontinuidad de su expresión en etapa de campana.

La expresión de laminina fue tenue en TOP, FA, AM, AU y QOO, y negativa para OD y GD, en estos dos últimos posiblemente debido a la presencia de odontoblastos secretores que inhiben la expresión de moléculas constituyentes de la membrana basal en las etapas avanzadas de la odontogénesis como han sugerido algunos autores (19, 20). En TOP, FA, AM y AU se observó integridad de laminina en la membrana basal en menos del 50% de los casos. Esta presencia parcial puede estar relacionada con los eventos previos a la degradación, observada durante el proceso normal de la odontogénesis, previo a la mineralización pero donde la cohesión estructural es necesaria para mantener la integridad de la arquitectura tisular (18).

Para el QOO solamente un caso (10%) presentó positividad para laminina a nivel de la membrana basal. Esto concuerda con el trabajo de Amorim y cols. (84) donde se reportó la falta de laminina en casos agresivos, en los cuales se pierde la integridad de la

membrana, lo que posiblemente facilite la separación epitelio-mesenquimática y el subsecuente desprendimiento epitelial, característico del QOO.

En ninguno de los casos analizados se observó la presencia de laminina a nivel subepitelial ni en la zona de hialinización. La sustancia hialina es una estructura acelular eosinofílica que suele ser rica en colágeno IV, laminina, proteoglicanos y ácido hialurónico (138, 139). El tejido hialinizado en procesos patológicos se modifica bioquímicamente e influye el comportamiento biológico de las neoplasias y las interacciones epitelio-mesenquimáticas. En los TODs la presencia de hialina adyacente al epitelio odontogénico puede significar un intento de odontogénesis, donde los ameloblastos segregan matriz para la mineralización, pero sin diferenciación odontoblástica evidente (140, 141). Varios autores han sugerido que esta zona hialina puede ser un marcador de recurrencia para casos de QOO, en donde se produce una deposición subepitelial que genera alteraciones en el epitelio basal, que puede resultar en el desprendimiento del mismo (142, 143).

La expresión de Cx43 fue variable en las diversas entidades, siendo totalmente negativa en TOP. Estudios previos han reportado la expresión de Cx43 asociada a la formación de uniones GAP, las cuales participan en la amelogénesis, dentinogénesis y en la deposición de material mineral odontoblástico (144). Por otra parte, João y cols. (145) observaron que la expresión de Cx43 puede presentarse en etapas tempranas de la odontogénesis, en las células epiteliales en proceso de diferenciación. Al ser TOP un tumor que se origina a partir de etapas tempranas de la odontogénesis pareciera quedar atrapado en este estadio embrionario, sin posterior maduración (por eso su nomenclatura “primordial”), motivo por el cual no se observa Cx43 en él. En los casos de GD estudiados en esta tesis, la expresión de Cx43 fue detectada más intensamente en etapas

más tardías de la odontogénesis (campana), localizada en estratos mesenquimáticos y en el órgano del esmalte.

En los casos de FA, OD, AM, AU y QGO la expresión fue similar en el epitelio y mesénquima, particularmente intensa en OD y de menor intensidad en QGO sugiriendo la participación de la Cx43 en las interacciones epitelio-mesenquimáticas que promueven la diferenciación celular (95, 99-101). A su vez, la expresión mesenquimal de Cx43 en FA y AM puede indicar la actividad intercelular entre fibroblastos y células endoteliales, relacionada con el desarrollo tumoral por la estimulación de la angiogénesis. Un estudio de Toth y cols. (146) demostró que la desregularización de esta proteína se relaciona con alteraciones ameloblásticas, hipoplasia del esmalte y respuestas tisulares secundarias.

Estos resultados sugieren que Cx43 es una molécula con funciones en la intercomunicación celular y puede tener un rol en las etapas tardías de la odontogénesis, en la diferenciación celular.

### 8.3. Inmunoexpresión de CD34 y análisis de imágenes

La comparación sistemática de la arquitectura de TOP con la de FA, OD, AM, AU, QGO y GD, basada en la distribución espacial del marcador CD34, demuestra la presencia de un área subepitelial diferente en TOP, de alta celularidad y que no representa al endotelio vascular.

De acuerdo con reportes de caso de TOP, varios estudios demostraron la positividad de CD34 de igual forma que en el presente trabajo (33-36). Previamente se describió en TOP esta banda subepitelial de células mesenquimáticas positivas para CD34, sugiriendo que puede representar regiones con fibroblastos embrionarios (28, 41). La expresión de CD34 fue observada en dos tipos celulares distintos: en el

endotelio vascular y en las células mesenquimáticas adyacentes al epitelio. Sin embargo, en zonas focales se observó la falta de esta marcación subepitelial (14-17%) correlacionándose con una menor condensación celular. Esto puede interpretarse como diferentes etapas de diferenciación o inducción odontogénica, lo que puede jugar un papel importante en la tumorigenesis de esta neoplasia ya que parece ser una característica única que distingue al TOP de otros TODs. Al comparar esta característica con lo observado en GD se sugiere que la condensación subepitelial de TOP pueda ser semejante al área de condensación típica de la papila dental observada en las etapas tempranas que preceden la diferenciación odontoblástica durante la odontogénesis (15). Esto refuerza la información que considera a TOP un tumor que se origina en etapas tempranas de la odontogénesis.

Se observaron diferencias interesantes al comparar la expresión de CD34 en tejidos histopatológicamente similares a TOP: solamente en TOP se evidencia la zona subepitelial positiva para CD34, mientras que es negativa en esta ubicación para los casos de FA, OD, AM, AU y GD. Se han observado células aisladas positivas para CD34 en zonas focales de QO, pero en ningún momento se ha descrito una condensación mesenquimal en banda positiva para este marcador. La expresión positiva de CD34 en FA, AM, AU y QO es debida solamente al endotelio vascular, incluyendo en algunos casos vasos próximos al epitelio odontogénico. Sin embargo, no se observaron vasos en sectores adyacentes al epitelio en TOP, así como tampoco en GD u OD.

La expresión de CD34 en el estroma de los TODs ha sido utilizada para determinar la densidad microvascular como medida del potencial angiogénico tumoral, en un intento de dilucidar el comportamiento biológico de estas lesiones (107). En este contexto, Chacham y cols. (107) reportaron la presencia de células dendríticas positivas para

CD34 adyacentes a la membrana basal epitelial de QOO recurrente y sugirieron que esta expresión positiva puede diferenciarlas de células más maduras como ser miofibroblastos, células adipogénicas, osteoblasticas y condroblásticas. También se ha hipotetizado que los fibroblastos embrionarios pueden ser responsables de desencadenar efectos en el epitelio circundante como ser transición epitelio-mesenquimática, proliferación celular, angiogénesis, invasión y metástasis (76).

En este estudio la expresión inmunohistoquímica de CD34 en el GD se observó limitada al endotelio de la papila dental, siendo negativa en células próximas al epitelio odontogénico, tanto en la etapa de casquete como de campana. Mientras que el GD es conocido por ser rico en células madre mesenquimáticas, según Aydin y cols. (111) estas células expresan una variedad de marcadores incluyendo CD146, CD106, CD90, CD29 y CD13, pero no marcadores de células madre hematopoyéticas como CD34. En un estudio previo se reportó la presencia de CD90 y CD105 en TOP, limitado al endotelio vascular (41). Por lo tanto, en el presente estudio, la expresión subepitelial de CD34 puede representar un tipo celular diferente de la odontogénesis normal en TOP.

#### 8.4. Análisis de la densidad nuclear

Para mejor caracterizar esta zona de alta condensación celular en TOP se realizó un análisis de la densidad celular en base a la profundidad tisular, desde el epitelio hacia el centro del mesénquima. Este procesamiento se realizó únicamente en TOP dado que no se encontraron zonas de alta densidad celular en el resto de las entidades incluidas en el presente estudio.

Los resultados muestran que las zonas del epitelio y subepitelio son donde la densidad nuclear (cantidad de núcleos por unidad de área) es máxima, y hacia la profundidad del tejido se constata una disminución paulatina de la misma.

Al estudiar la caracterización morfológica de los perfiles nucleares se observaron diferencias entre epitelio, subepitelio y mesénquima profundo, encontrando siempre una mayor similitud entre los núcleos próximos a la membrana basal (epiteliales y mesenquimáticos).

A pesar de ello, la estadística descriptiva realizada para ambos estratos muestra poca diferencia entre los núcleos, considerando una media muy similar en todas las características estudiadas. Los resultados de circularidad para el epitelio marcan una tendencia a la circularidad; así mismo la rectangularidad de estos núcleos presenta una media y mediana similar de 0,72-0,73 respectivamente con un desvío estándar de 0,04, siendo también tendientes a la forma circular. Con los núcleos mesenquimáticos sucede lo mismo, encontrando parámetros tendientes a la forma circular. Por su parte, el tamaño nuclear tiende a ser levemente superior en caso del mesénquima, al evaluar los parámetros de perímetro y área. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas al comparar todos los parámetros entre ambos estratos, con un p valor  $p < 0,05$ .

La importancia de estos resultados radica en la obtención de datos cuantitativos que comprueban lo que se sugería de forma cualitativa al describir una posible condensación nuclear en la zona subepitelial del TOP. El evidente aumento de la densidad nuclear en la zona estudiada respalda la hipótesis de una posible interacción epitelio-mesénquima activa en dicha zona, que recuerda etapas tempranas de la odontogénesis previa a la diferenciación odontoblástica (42). Esta zona con gran densidad nuclear refleja una actividad biológica tumoral que caracteriza al TOP.

## 8.5. Análisis de la morfología celular

En la actualidad son pocos los estudios que utilizan y correlacionan la detección nuclear con parámetros morfológicos o espaciales, determinando la practicidad del análisis automático en la caracterización y comportamiento tumoral (147, 148); hasta el momento no se ha reportado este tipo de procesamientos en TODs y GD.

Para poder comparar los resultados morfológicos entre los TODs y GD se realizó la segmentación de células virtuales y posteriormente se analizó su morfología por estratos, desde el epitelio hacia la profundidad del mesénquima, o de forma concéntrica alrededor de las islas epiteliales hacia la periferia. La identificación de estos compartimentos mediante métodos automáticos es importante para la localización espacial, análisis y caracterización de tejido tumoral y su microambiente. Este procesamiento se realizó con láminas HE e inmunohistoquímica. Este estudio reveló que las muestras teñidas con HE contienen suficiente información morfológica para la segmentación de imágenes en diferentes categorías celulares, lo que podría ayudar en el relevamiento automático de imágenes de cortes histológicos y potencialmente contribuir al diagnóstico diferencial de los TODs.

En el caso de TOP una característica morfológica ya destacada es la condensación subepitelial, sin embargo, no es característico de todas las zonas de contacto entre epitelio y mesénquima en el TOP. Para diferenciarlas se estudiaron zonas con condensación y sin condensación subepitelial mediante inmunohistoquímica con CD34, que marca claramente esta zona, como lo discutimos anteriormente. Los casos de TOP que presentaron positividad subepitelial para CD34 mostraron células epiteliales con menor área, en comparación con las células del mesénquima profundo, las cuales eran de mayor área. Estas diferencias en el tamaño celular se evidenciaron en los resultados del estudio de densidad nuclear, dado que el área de cada célula virtual está no

solamente limitada por el espacio celular sino que también el intercelular. Por otra parte, la segmentación de TOP subepitelial negativo para CD34 reveló que la morfología de TOP era diferente entre las regiones con o sin presencia de la condensación celular, observando la presencia de núcleos de mayor tamaño a nivel subepitelial en este último caso. Esto confirma la observación de que en las áreas negativas para CD34 la banda de condensación celular está ausente, sugiriendo la presencia de diferentes estados de maduración y diferenciación celular. En otras palabras, TOP es un tumor no estático cuyo crecimiento y evolución va cambiando y modificándose en las diversas áreas del tejido, posiblemente acompañando el crecimiento tumoral. Estas diferencias pueden darse de manera alternada dependiendo del crecimiento y la expansión tumoral al infiltrar el tejido óseo que lo rodea, donde intervienen otros factores asociados al microambiente tumoral.

Para poder tener un respaldo cuantitativo de las diferencias encontradas se realizó la comparación estadística del área de las células virtuales del estrato 1 de TOP subepitelial CD34+ con el estrato 1 de todos los TODs y GD encontrando un p valor significativo:  $p^* < 0,0001$ . Este estrato correspondería con el epitelio de todos los TODs y GD.

A su vez, se realizó la comparación estadística del área de las células virtuales de los diferentes estratos de TOP subepitelial CD34+, encontrando un p valor significativo:  $p^* < 0,0001$  para todos los estratos. Al observar la **Fig.46** se rectifica que los estratos epitelial y subepitelial son los que presenta menor área, aumentando paulatinamente hacia la profundidad del mesénquima.

El estudio de las células virtuales de FA, GD, OD, AM, AU y QQO reveló que el estrato que corresponde al epitelio contiene células con la menor área, que aumentan de tamaño progresivamente en estratos adyacentes más profundos, posiblemente debido a



la presencia de la capa hialina o la propia interfase epitelio-mesenquimática. En el caso de QOO el tamaño de las células es más heterogéneo, mientras que para AM hubo un aumento paulatino hacia la profundidad del mesénquima.

Landini (149) comparó QOO solitario, quiste radicular y QOO relacionado con el síndrome de Gorlin mediante el estudio de la morfología de las células virtuales a nivel del estrato epitelial, estableciendo que los quistes radiculares contienen más cantidad de estratos epiteliales pero no pudiendo diferenciar QOO solitario con sindrómicos basado en los 27 parámetros evaluados. En esta tesis se evaluó el área de las células virtuales epiteliales, lo que permitió establecer diferencias entre TOP y QOO, en donde a pesar del análisis histomorfológico, no existen resultados que relacionen a estas dos entidades.

#### 8.6. Análisis por agrupamiento de células virtuales

El análisis por agrupamiento de células virtuales en base a los parámetros morfológicos ya establecidos reveló una distinción de estratos para ambas imágenes de TOP. En regiones donde TOP es CD34 positivo en la zona subepitelial se observan que los cuatro grupos celulares preestablecidos coinciden con el epitelio, subepitelio, mesénquima medio y mesénquima profundo. Sin embargo, en zonas CD34 negativo subepitelial solamente se observan correlaciones con el estrato epitelial, encontrando una desorganización celular en las otras tres agrupaciones, sin poder relacionarlas espacialmente. Estos resultados apoyan a los ya presentados de densidad celular, morfología de células virtuales y expresión de CD34 en base a la profundidad, en donde esta banda no es encontrada en otras entidades patológicas de origen odontogénico y que apoya la idea de un rol estructural y funcional en TOP.

La comparación de los agrupamientos de células virtuales reveló similitudes entre FA, OD y AM, en donde se diferencia claramente el agrupamiento de células pertenecientes

al mesénquima, pero no aquellas de las islas epiteliales. Los casos de GD fueron similares y comparables a TOP cuando el tejido subepitelial no expresa CD34, encontrando una distinción de las células epiteliales pero sin poder definir claramente células que correspondan al mesénquima, con predominancia de un grupo en particular pero sin una distribución organizada en todo el tejido. Los resultados obtenidos de AU y QQQ son semejantes entre sí en cuanto al agrupamiento dado que exhiben una capa epitelial y dos grupos de células mesenquimáticas con localizaciones similares, pero de área diferente entre ellas. Esta información generada puede tener utilidad auxiliar diagnóstica en algunos casos, así como generar información relevante que ayude a comprender la morfología tumoral de las lesiones estudiadas.

Al realizar el índice Jaccard se encontraron coincidencias entre el método no supervisado y la asignación manual de agrupaciones observando que para el caso de TOP CD43 negativo, AU, QQQ, GD presentaban mayor similitud en comparación con TOP CD34 positivo subepitelial, AM, AU y en mayor medida FA.

A pesar de que haya marcadores que pueden detectar los diferentes tejidos, investigar a que grado se pueden analizar con HE en base a métodos no supervisados es importante dado que no siempre se pueden aplicar técnicas de inmunohistoquímica por falta de tejido o costos.

Landini y cols. (127) analizaron la conformación espacial de células virtuales por medio de redes locales (local networks) para establecer diferencias en la arquitectura de los tejidos epiteliales orales normales, displásicos y neoplásicos. Sin embargo, los autores determinaron que la discriminación de estos grupos no fue 100% precisa, probablemente por la heterogeneidad celular de los tejidos.

A pesar de que el gold standard para el diagnóstico definitivo de estas lesiones es el análisis histopatológico con su correlación clínica, en este trabajo se presentó una metodología cuantitativa que puede ayudar a avanzar en el análisis automatizado.

### 8.7. Consideraciones finales

El análisis de imágenes histopatológicas mediante técnicas cuantitativas provee métodos novedosos para el análisis morfológico y su correlación con la expresión de biomarcadores, facilitando el entendimiento de la patogénesis tumoral así como el diagnóstico diferencial y posible pronóstico. Dejando de lado las consideraciones clínicas que contribuyen con el diagnóstico de estas entidades, es importante remarcar que TOP no induce la diferenciación odontoblástica o la producción de proteínas dentinarias como se observa en otros tumores, por ejemplo el OD. A su vez, TOP puede ser diferenciado por las características anteriormente descritas, enfatizado desde la morfología tisular por la ausencia de densidad celular subepitelial en FA, OD, AM, AU, QQQ y GD.

Una limitación del presente estudio es el número de casos e imágenes analizadas, así como los sectores de interés, dada la rareza de estas lesiones, pero más estudios basados en los principios descritos en este trabajo pueden contribuir y confirmar los hallazgos reportados. El análisis de marcadores adicionales también ayudará a dilucidar más detalles en relación con la arquitectura y comportamiento de TOP.

Considerando que las características histopatológicas de TOP sugieren un origen de las etapas primarias de GD, los resultados reportados en el presente trabajo apoyan la idea de que TOP es una neoplasia odontogénica morfológicamente diferente de las demás estudiadas, y no un OD en desarrollo o una etapa temprana del FA, como se ha propuesto anteriormente (28, 41).

## **9. CONCLUSIONES**

La integridad de las proteínas estructurales presentes en TOP sugiere un desarrollo relacionado con las etapas tempranas de la odontogénesis.

Los patrones de inmunoexpresión de Cx43 indican que esta proteína tiene un rol importante en la diferenciación celular en los diferentes TODs y el GD, excepto en TOP.

El análisis de imágenes de la expresión de CD34 y la arquitectura de TOP reveló características no observadas en otros TODs y GD, apoyando la teoría de que esta neoplasia es diferente al OD en desarrollo y a las etapas primarias del FA.

Son necesarios más estudios con una casuística mayor y analizando proteínas relacionadas con la odontogénesis para clarificar el comportamiento biológico de estas entidades.

## **10. PROYECCIONES A FUTURO**

El análisis de proteínas relacionadas con el proceso de amelogénesis y dentinogénesis mediante el procesamiento de imágenes y técnicas de machine learning continuará aportando al conocimiento de estas patologías íntimamente relacionadas con los procesos de morfogénesis y diferenciación celular. Este estudio es innovador en aplicar técnicas originales y novedosas para el estudio de TODs. Una casuística más grande y con otras entidades odontogénicas ayudarán a clarificar el comportamiento biológico comparativo de estas lesiones, así como también ayudará en el diagnóstico morfológico diferencial. Nuevas líneas de investigación se desarrollarán en torno a los conceptos presentados en este trabajo de doctorado.

## 11. CRONOGRAMA DE EJECUCIÓN

Descripción de la actividad	2020	2021	2022	Resultados obtenidos
Realizar HE y valorar las muestras de TOP, FA, OD, AM, AU, QOO, GD.				Obtención de la muestra de estudio.
Realizar inmunohistoquímica contra laminina, colágeno IV, Cx43 y CD34 en la muestra obtenida.				Obtención de la expresión proteica en los diferentes tejidos.
Realizar ensayos de segmentación de imágenes mediante diferentes técnicas.				Obtención de patrones morfológicos diferenciales entre las muestras.
Análisis global de los resultados.				Integración de la información obtenida para caracterizar estructuralmente a TOP.
Escritura y publicación de artículos científicos.				Difusión de los resultados.
Escritura de la tesis.				Finalización del programa de doctorado.

## 12. FINANCIACIÓN

El presente trabajo recibió financiación para la compra de equipos e insumos, así como para la realización de una estancia académica por parte de la Dra. Vanesa Pereira Prado, a través de los siguientes organismos:

- CSIC grupos I+D.
- PEDECIBA.
- Santander.
- SUIO.

### **13.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th edition. IARC: Lyon, 2017.
2. Mosqueda-Taylor A, Pires FR, Aguirre-Urizar JM, Carlos-Bregni R, de la Piedra-Garza JM, Martínez-Conde R, Martínez-Mata G, Carreño-Álvarez SJ, da Silveira HM, de Barros Dias BS, de Almeida OP. Primordial odontogenic tumour: clinicopathological analysis of six cases of a previously undescribed entity. *Histopathology*. 2014 Nov;65(5):606-12. doi: 10.1111/his.12451. Epub 2014 Sep 2. PMID: 24807692.
3. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology-E-Book: Development, Structure, and Function. 8th edition. Elsevier Health Sciences, 2017.
4. Thesleff I, Keränen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*. 2001 Aug;15:14-8. doi: 10.1177/08959374010150010401. PMID: 12640732.
5. Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(1):4-39. doi: 10.1177/10454411970080010101. PMID: 9063623.
6. Lesot H, Brook AH. Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch Oral Biol*. 2009 Dec;54 Suppl 1:S25-33. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.05.019. Epub 2008 Jul 26. PMID: 18656852.
7. Puthiyaveetil JS, Kota K, Chakkarayan R, Chakkarayan J, Thodiyil AK. Epithelial - Mesenchymal Interactions in Tooth Development and the Significant Role of Growth Factors and Genes with Emphasis on Mesenchyme - A Review. *J Clin Diagn Res*. 2016 Sep;10(9):ZE05-ZE09. doi: 10.7860/JCDR/2016/21719.8502. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27790596; PMCID: PMC5072096.

8. Balic A, Thesleff I. Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Curr Top Dev Biol.* 2015;115:157-86. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.006. Epub 2015 Oct 6. PMID: 26589925.
9. Liyanage S. *Essentials of oral histology and embryology: a clinical approach.* 4th edition. Elsevier, 2013.
10. Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, Hu JC. Regulation of dental enamel shape and hardness. *J Dent Res.* 2010 Oct;89(10):1024-38. doi: 10.1177/0022034510375829. Epub 2010 Jul 30. PMID: 20675598; PMCID: PMC3086535.
11. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 2003 May 1;116(Pt 9):1647-8. doi: 10.1242/jcs.00410. PMID: 12665545.
12. Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development.* 1988;103 Suppl:155-69. doi: 10.1242/dev.103.Supplement.155. PMID: 3250849.
13. Kollar EJ, Baird GR. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. I. Reorganization of the dental epithelium during tooth-germ reconstruction. *J Embryol Exp Morphol.* 1970 Aug;24(1):159-71. PMID: 5487154.
14. Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Aberg T. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res.* 1995;32(1-4):9-15. doi: 10.3109/03008209509013700. PMID: 7554939.
15. Stella A, Fuentes A. *Embriología e Histología Dentaria Humana.* Talleres Gráficos Universitarios. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 1969.
16. Heikinheimo K, Morgan PR, Happonen RP, Stenman G, Virtanen I. Distribution of extracellular matrix proteins in odontogenic tumours and developing teeth.

- Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1991;61(2):101-9. doi: 10.1007/BF02890411. PMID: 1720587.
17. Thesleff I, Stenman S, Vaheri A, Timpl R. Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Dev Biol.* 1979 May;70(1):116-26. doi: 10.1016/0012-1606(79)90011-3. PMID: 456738.
  18. Thesleff I, Ekblom P. Distribution of keratin and laminin in ameloblastoma. Comparison with developing tooth and epidermoid carcinoma. *J Oral Pathol.* 1984 Feb;13(1):85-96. doi: 10.1111/j.1600-0714.1984.tb01404.x. PMID: 6199491.
  19. Salmivirta K, Sorokin LM, Ekblom P. Differential expression of laminin alpha chains during murine tooth development. *Dev Dyn.* 1997 Nov;210(3):206-15. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199711)210:3<206::AID-AJA2>3.0.CO;2-K. PMID: 9389447.
  20. Thesleff I, Barrach HJ, Foidart JM, Vaheri A, Pratt RM, Martin GR. Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Dev Biol.* 1981 Jan 15;81(1):182-92. doi: 10.1016/0012-1606(81)90361-4. PMID: 7461285.
  21. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. 3rd edition. Lyon: IARC Press, 2005.
  22. Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruíz-Godoy Rivera LM, Meneses-García A. Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997 Dec;84(6):672-5. doi: 10.1016/s1079-2104(97)90371-1. PMID: 9431538.



23. Bilodeau EA, Collins BM. Odontogenic Cysts and Neoplasms. *Surg Pathol Clin*. 2017 Mar;10(1):177-222. doi: 10.1016/j.path.2016.10.006. Epub 2016 Dec 29. PMID: 28153133.
24. Jordan RC, Speight PM. Current concepts of odontogenic tumours. *Diagnostic Histopathol*. 2009; 15(6), 303-310.
25. Pereira Prado V. Clasificación de los tumores odontogénicos: evolución y cambios. *Salud Mil*. 29 de diciembre de 2017;36(2):41-6.
26. Ando T, Shrestha M, Nakamoto T, Uchisako K, Yamasaki S, Koizumi K, Ogawa I, Miyauchi M, Takata T. A case of primordial odontogenic tumor: A new entity in the latest WHO classification. *Pathol Int*. 2017 Jul;67(7):365-369. doi: 10.1111/pin.12543. Epub 2017 May 25. PMID: 28543986.
27. Slater LJ, Eftimie LF, Herford AS. Primordial Odontogenic Tumor: Report of a Case. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Mar;74(3):547-51. doi: 10.1016/j.joms.2015.08.019. Epub 2015 Sep 18. PMID: 26408843.
28. Mikami T, Ohashi Y, Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Fujiwara N, Tsunoda N, Yamada H, Takeda Y. Primordial Odontogenic Tumor: A case report with histopathological analyses. *Pathol Int*. 2017 Dec;67(12):638-643. doi: 10.1111/pin.12601. Epub 2017 Nov 1. PMID: 29090496.
29. Pardhe N, Bajpai M. Primordial Odontogenic Tumor of Mandible; A Case with Proposed Diagnostic Criteria. *Iran J Med Sci*. 2018 Jan;43(1):97-99. PMID: 29398760; PMCID: PMC5776003.
30. Amer H, Hafed L, Ibrahim S. Case Report: A Primordial odontogenic tumor. *F1000Res*. 2018 May 9;7:562. doi: 10.12688/f1000research.14735.1. PMID: 29904598; PMCID: PMC5989144.

31. Almazayad A, Li CC, Tapia ROC, Robertson JP, Collette D, Woo SB. Primordial odontogenic tumour: report of two cases. *Histopathology*. 2018 Jun;72(7):1221-1227. doi: 10.1111/his.13488. Epub 2018 Mar 15. PMID: 29457254.
32. Bomfim BB, Prado R, Sampaio RK, Conde DC, de Andrade BAB, Agostini M, Romañach MJ. Primordial Odontogenic Tumor: Report of a new case and literature review. *Head Neck Pathol*. 2019 Jun;13(2):125-130. doi: 10.1007/s12105-018-0913-7. Epub 2018 Mar 19. PMID: 29556916; PMCID: PMC6513949.
33. Delgado-Azañero WA, de Almeida OP, Pereira AAC, de Oliveira CE, Dias MA, Florez-Valderrama G, de Lima Morais TM, Mariz BALA, Mosqueda-Taylor A. Primordial odontogenic tumor: report of 2 new cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2021 Aug;132(2):e69-e77. doi: 10.1016/j.oooo.2020.08.004. Epub 2020 Aug 8. PMID: 32981867.
34. Kayamori K, Tsuchiya M, Michi Y, Kuribayashi A, Mikami T, Sakamoto K, Yoda T, Ikeda T. Primordial odontogenic tumor occurred in the maxilla with unique calcifications and its crucial points for differential diagnosis. *Pathol Int*. 2021 Jan;71(1):80-87. doi: 10.1111/pin.13036. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33079412.
35. Zeng M, Chen X, Guo X, Yang S. Report of a classic primordial odontogenic tumour and an unusual mixed odontogenic tumour with features of primordial odontogenic tumour: diagnostic implications. *Pathology*. 2020 Aug;52(5):596-599. doi: 10.1016/j.pathol.2020.04.007. Epub 2020 Jun 24. PMID: 32593436.
36. Naina S, Narwal A, Devi A, Kamboj M, Pandiar D. Primordial Odontogenic Tumor of anterior maxilla in a young male: A case report and an updated review of literature. *Pediatr Dev Pathol*. 2021 Jan-Feb;24(1):73-79. doi: 10.1177/1093526620972589. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33433252.

37. Bologna-Molina R, Pereira-Prado V, Sánchez-Romero C, González-González R, Mosqueda-Taylor A. Primordial odontogenic tumor: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020 May 1;25(3):e388-e394. doi: 10.4317/medoral.23432. PMID: 32040459; PMCID: PMC7211380.
38. Morimoto C, Tsujimoto M, Shimaoka S, Shirasu R, Takasu J. Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in the calcifying epithelial odontogenic tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983;56:409-14.
39. Amm HM, Rollins DL, Ren C, Dong J, DeVilliers P, Rivera H, MacDougall M. Establishment and characterization of a primary calcifying epithelial odontogenic tumor cell population. *J Oral Pathol Med*. 2014;43:183-90.
40. Poomsawat S, Ngamsom S, Nonpassopon N. Primordial odontogenic tumor with prominent calcifications: A rare case report. *J Clin Exp Dent*. 2019;11:e952-6.
41. Bologna-Molina R, Mikami T, Pereira-Prado V, Pires FR, Carlos-Bregni R, Mosqueda-Taylor A. Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017 May 1;22(3):e314-e323. doi: 10.4317/medoral.21859. PMID: 28390134; PMCID: PMC5432080.
42. Bologna-Molina R, Mikami T, Pereira-Prado V, Tapia-Repetto G, Pires FR, Carlos R, Mosqueda-Taylor A. Primordial odontogenic tumor: Subepithelial expression of Syndecan-1 and Ki-67 suggests origin during early odontogenesis. *Oral Dis*. 2018 Mar;24(1-2):72-77. doi: 10.1111/odi.12733. PMID: 29480622.
43. Mikami T, Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Ogawa I, Pereira-Prado V, Fujiwara N, Pires FR, Carlos R, Takata T, Takeda Y. Pathogenesis of primordial odontogenic tumour based on tumourigenesis and odontogenesis. *Oral Dis*. 2018 Oct;24(7):1226-1234. doi: 10.1111/odi.12914. Epub 2018 Jul 10. PMID: 29908099.

44. Buchner A, Vered M. Ameloblastic fibroma: a stage in the development of a hamartomatous odontoma or a true neoplasm? Critical analysis of 162 previously reported cases plus 10 new cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Nov;116(5):598-606. doi: 10.1016/j.oooo.2013.06.039. Epub 2013 Sep 20. PMID: 24055148.
45. Philipsen HP, Reichart PA, Praetorius F. Mixed odontogenic tumours and odontomas. Considerations on interrelationship. Review of the literature and presentation of 134 new cases of odontomas. *Oral Oncol*. 1997 Mar;33(2):86-99. doi: 10.1016/s0964-1955(96)00067-x. PMID: 9231165.
46. Brown NA, Rolland D, McHugh JB, Weigelin HC, Zhao L, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS, Betz BL. Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res*. 2014 Nov 1;20(21):5517-26. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1069. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24993163.
47. Al Shetawi AH, Alpert EH, Buchbinder D, Urken ML. Ameloblastic Fibrosarcoma of the Mandible: A Case Report and a Review of the Literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Aug;73(8):1661.e1-7. doi: 10.1016/j.joms.2015.03.066. Epub 2015 Apr 10. Erratum in: *J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Jun;74(6):1287. Al Shetawi, Haitham [corrected to Al Shetawi, Al Haitham]. PMID: 25921823.
48. Soluk Tekkesin M, Pehlivan S, Olgac V, Aksakallı N, Alatlı C. Clinical and histopathological investigation of odontomas: review of the literature and presentation of 160 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jun;70(6):1358-61. doi: 10.1016/j.joms.2011.05.024. Epub 2011 Aug 15. PMID: 21840103.
49. Sun L, Sun Z, Ma X. Multiple complex odontoma of the maxilla and the mandible. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2015 120(1), e11–e16. doi:10.1016/j.oooo.2015.02.488

50. Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Sep;64(9):1343-52. doi: 10.1016/j.joms.2006.05.019. PMID: 16916667.
51. 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 Jan 1;17(1):e76-82. doi: 10.4317/medoral.18006. PMID: 22157674; PMCID: PMC3448205.
52. Chae MP, Smoll NR, Hunter-Smith DJ, Rozen WM. Establishing the natural history and growth rate of ameloblastoma with implications for management: systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015 Feb 23;10(2):e0117241. doi: 10.1371/journal.pone.0117241. PMID: 25706407; PMCID: PMC4338260.
53. Vickers RA, Gorlin RJ. Ameloblastoma: Delineation of early histopathologic features of neoplasia. *Cancer.* 1970 Sep;26(3):699-710. doi: 10.1002/1097-0142(197009)26:3<699::aid-cnrcr2820260331>3.0.co;2-k. PMID: 5458275.
54. 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 Jul;37(5):455-60. doi: 10.1016/s1368-8375(00)00111-1. PMID: 11377234.
55. Heikinheimo K, Kurppa KJ, Laiho A, Peltonen S, Berdal A, Bouattour A, Ruhin B, Catón J, Thesleff I, Leivo I, Morgan PR. Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. *J Dent Res.* 2015 Jan;94(1):101-11. doi: 10.1177/0022034514556815. Epub 2014 Nov 14. PMID: 25398365.

56. Juuri E, Isaksson S, Jussila M, Heikinheimo K, Thesleff I. Expression of the stem cell marker, SOX2, in ameloblastoma and dental epithelium. *Eur J Oral Sci.* 2013 Dec;121(6):509-16. doi: 10.1111/eos.12095. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24148099.
57. Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BV, Castro WH, Lacerda JC, Cardoso SV, de Faria PR, Dias FL, Eisenberg AL, Loyola AM, Gomez RS. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol.* 2015 Jul;36(7):5649-53. doi: 10.1007/s13277-015-3238-0. Epub 2015 Feb 18. PMID: 25854168.
58. Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho J, Neahring L, Kwei KA, Qu K, Gong X, Ng T, Jones CD, Varma S, Odegaard JI, Sugiyama T, Koyota S, Rubin BP, Troxell ML, Pelham RJ, Zehnder JL, Beachy PA, Pollack JR, West RB. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat Genet.* 2014 Jul;46(7):722-5. doi: 10.1038/ng.2986. Epub 2014 May 25. Erratum in: *Nat Genet.* 2015 Jan;47(1):97. PMID: 24859340; PMCID: PMC4418232.
59. Pogrel MA, Montes DM. Is there a role for enucleation in the management of ameloblastoma? *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Aug;38(8):807-12. doi: 10.1016/j.ijom.2009.02.018. Epub 2009 Mar 17. PMID: 19297131.
60. Hertog D, van der Waal I. Ameloblastoma of the jaws: a critical reappraisal based on a 40-years single institution experience. *Oral Oncol.* 2010 Jan;46(1):61-4. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.11.002. Epub 2009 Dec 9. PMID: 20004134.
61. Philipsen HP, Reichart PA. Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. *Oral Oncol.* 1998 Sep;34(5):317-25. doi: 10.1016/s1368-8375(98)00012-8. PMID: 9861335.

62. Leider AS, Eversole LR, Barkin ME. Cystic ameloblastoma. A clinicopathologic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985 Dec;60(6):624-30. doi: 10.1016/0030-4220(85)90366-4. PMID: 3865134.
63. Rosenstein T, Pogrel MA, Smith RA, Regezi JA. Cystic ameloblastoma--behavior and treatment of 21 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Nov;59(11):1311-6; discussion 1316-8. doi: 10.1053/joms.2001.27522. PMID: 11688034.
64. Philipsen HP, Reichart PA, Nikai H, Takata T, Kudo Y. Peripheral ameloblastoma: biological profile based on 160 cases from the literature. *Oral Oncol.* 2001 Jan;37(1):17-27. doi: 10.1016/s1368-8375(00)00064-6. PMID: 11120479.
65. Johnson NR, Gannon OM, Savage NW, Batstone MD. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *J Investig Clin Dent.* 2014 Feb;5(1):9-14. doi: 10.1111/jicd.12044. Epub 2013 Jun 14. PMID: 23766099.
66. Jones AV, Craig GT, Franklin CD. Range and demographics of odontogenic cysts diagnosed in a UK population over a 30-year period. *J Oral Pathol Med.* 2006 Sep;35(8):500-7. doi: 10.1111/j.1600-0714.2006.00455.x. PMID: 16918602.
67. Shear M, Speight P. Cysts of the oral and maxillofacial regions. 4th Edition Blackwell. June 2007, chapter Odontogenic Keratocyst, 6-58.
68. Li TJ. The odontogenic keratocyst: a cyst, or a cystic neoplasm? *J Dent Res.* 2011 Feb;90(2):133-42. doi: 10.1177/0022034510379016. PMID: 21270459.
69. Vered M, Buchner A, Dayan D, Shteif M, Laurian A. Solid variant of odontogenic keratocyst. *J Oral Pathol Med.* 2004 Feb;33(2):125-8. doi: 10.1111/j.1600-0714.2004.00014.x. PMID: 14720200.
70. Shimura M, Nakashiro KI, Sawatani Y, Hasegawa T, Kamimura R, Izumi S, Komiyama Y, Fukumoto C, Yagisawa S, Yaguchi E, Hitomi-Koide M, Hyodo T, Uchida D, Kawamata H. Whole exome sequencing of SMO, BRAF, PTCH1 and

- GNAS in odontogenic diseases. *In Vivo*. 2020 Nov-Dec;34(6):3233-3240. doi: 10.21873/invivo.12159. PMID: 33144428; PMCID: PMC7811642.
71. Stojanov IJ, Schaefer IM, Menon RS, Wasman J, Gokozan HN, Garcia EP, Baur DA, Woo SB, Sholl LM. Biallelic *ptch1* inactivation is a dominant genomic change in sporadic keratocystic odontogenic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2020 Apr;44(4):553-560. doi: 10.1097/PAS.0000000000001407. PMID: 31725470; PMCID: PMC7071995.
72. Fernández LT, Ocampo-Garza SS, Elizondo-Riojas G, Ocampo-Candiani J. Basal cell nevus syndrome: an update on clinical findings. *Int J Dermatol*. 2022 Sep;61(9):1047-1055. doi: 10.1111/ijd.15884. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34494262.
73. Trujillo-González D, Villarroel-Dorrego M, Toro R, Vigil G, Pereira-Prado V, Bologna-Molina R. Decompression induces inflammation but do not modify cell proliferation and apoptosis in odontogenic keratocyst. *J Clin Exp Dent*. 2022 Jan 1;14(1):e100-e106. doi: 10.4317/jced.59096. PMID: 35070131; PMCID: PMC8760963.
74. Johnson NR, Batstone MD, Savage NW. Management and recurrence of keratocystic odontogenic tumor: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Oct;116(4):e271-6. doi: 10.1016/j.oooo.2011.12.028. Epub 2012 Jul 6. PMID: 22771402.
75. Taylor CR. Predictive biomarkers and companion diagnostics. The future of immunohistochemistry: "in situ proteomics," or just a "stain"? *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Sep;22(8):555-61. doi: 10.1097/PAI.000000000000126. PMID: 25203298; PMCID: PMC4215952.
76. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.



77. Wu Y, Ge G. Complexity of type IV collagens: from network assembly to function. *Biol Chem*. 2019 Apr 24;400(5):565-574. doi: 10.1515/hsz-2018-0317. PMID: 30864416.
78. Tanjore H, Kalluri R. The role of Type IV Collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *Am J Pathol*. 2006;168(3):715–77.
79. Grewal HK, Sethi S. Immunohistochemical expression of type IV collagen and autocrine motility factor receptor in odontogenic tumours. *J Clin Diagn Res*. 2014 Oct;8(10):ZC17-21. doi: 10.7860/JCDR/2014/9405.4951. Epub 2014 Oct 20. PMID: 25478440; PMCID: PMC4253258.
80. Nagatsuka H, Siar CH, Nakano K, Tsujigiwa H, Gunduz M, Choufuku H, Lee YJ, Naito I, Sado Y, Nagai N. Differential expression of collagen IV alpha1 to alpha6 chains in basement membranes of benign and malignant odontogenic tumors. *Virchows Arch*. 2002 Oct;441(4):392-9. doi: 10.1007/s00428-002-0658-1. Epub 2002 Jul 6. PMID: 12404065.
81. Henriques AC, Vasconcelos MG, Galvão HC, de Souza LB, de Almeida Freitas R. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Oct;112(4):468-75. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.05.033. PMID: 21911204.
82. Zhang B, Zhang J, Xu ZY, Xie HL. Expression of RECK and Matrix Metalloproteinase-2 in ameloblastoma. *BMC Cancer*. 2009;9(427):1–6
83. Poomsawat S, Punyasingh J, Weerapradist W. Expression of basement membrane components in odontogenic cysts. *Oral Dis*. 2006 May;12(3):290-6. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01193.x. PMID: 16700738.

84. Amorim RF, Godoy GP, Galvão HC, Souza LB, Freitas RA. Immunohistochemical assessment of extracellular matrix components in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Oral Dis.* 2004 Sep;10(5):265-70. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01023.x. PMID: 15315642.
85. Oliveira MD, Souza LB, Pinto LP, Freitas Rde A. Estudo imuno-histoquímico de componentes da membrana basal em cistos odontogênicos [Immunohistochemical study of components of the basement membrane in odontogenic cysts]. *Pesqui Odontol Bras.* 2002 Apr-Jun;16(2):157-62. Portuguese. doi: 10.1590/s1517-74912002000200011. PMID: 12131990.
86. Tzu J, Marinkovich MP. Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(2):199-214. doi: 10.1016/j.biocel.2007.07.015. Epub 2007 Aug 6. PMID: 17855154; PMCID: PMC2192629.
87. Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, Andreason GL, Frasier F, Plopper G, Quaranta V, Jones JC. Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J Cell Sci.* 1996 Oct;109 ( Pt 10):2509-20. doi: 10.1242/jcs.109.10.2509. PMID: 8923212.
88. Stahl S, Weitzman S, Jones JC. The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J Cell Sci.* 1997 Jan;110 ( Pt 1):55-63. doi: 10.1242/jcs.110.1.55. PMID: 9010784..
89. Timpl R, Brown JC. The laminins. *Matrix Biol.* 1994 Aug;14(4):275-81. doi: 10.1016/0945-053x(94)90192-9. PMID: 7827749.
90. Finlay D, Healy V, Furlong F, O'Connell FC, Keon NK, Martin F. MAP kinase pathway signalling is essential for extracellular matrix determined mammary

- epithelial cell survival. *Cell Death Differ.* 2000 Mar;7(3):302-13. doi: 10.1038/sj.cdd.4400652. PMID: 10745275.
91. Thesleff I, Vainio S, Jalkanen M. Cell-matrix interactions in tooth development. *Int J Dev Biol.* 1989 Mar;33(1):91-7. PMID: 2485706.
92. Salo T, Kainulainen T, Parikka M, Heikinheimo K. Expression of laminin-5 in ameloblastomas and human fetal teeth. *J Oral Pathol Med.* 1999 Sep;28(8):337-42. doi: 10.1111/j.1600-0714.1999.tb02050.x. PMID: 10478957.
93. Brannon RB. The odontogenic keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases. Part II. Histologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977 Feb;43(2):233-55. doi: 10.1016/0030-4220(77)90161-x. PMID: 264648.
94. Nasu Y, Itoh K, Tani C, Hisamitsu H. Diffusion of GM primer and dentin adhesive into EDTA-conditioned dentin. *Dent Mater J.* 2010 Oct;29(5):609-14. doi: 10.4012/dmj.2009-084. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20859060.
95. About I, Proust JP, Raffo S, Mitsiadis TA, Franquin JC. In vivo and in vitro expression of connexin 43 in human teeth. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):232-7. doi: 10.1080/03008200290000952. PMID: 12489165.
96. Zhang YW, Kaneda M, Morita I. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J. Biol. Chem.* 2003;278; 44852–44856.
97. Villares GJ, Dobroff AS, Wang H, Zigler M, Melnikova VO, Huang L, Bar-Eli M. Overexpression of protease-activated receptor-1 contributes to melanoma metastasis via regulation of connexin 43. *Cancer Res.* 2009 Aug 15;69(16):6730-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0300. PMID: 19679555; PMCID: PMC2727665.
98. Kawasaki Y, Omori Y, Li Q, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yoshida M, Ishikawa K, Enomoto K. Cytoplasmic accumulation of connexin32 expands cancer stem cell

- population in human HuH7 hepatoma cells by enhancing its self-renewal. *Int J Cancer*. 2011 Jan 1;128(1):51-62. doi: 10.1002/ijc.25308. PMID: 20209499.
99. Garant PR. The demonstration of complex gap junctions between the cells of the enamel organ with lanthanum nitrate. *J Ultrastruct Res*. 1972 Aug;40(3):333-48. doi: 10.1016/s0022-5320(72)90105-0. PMID: 4115216.
100. Sasaki T, Higashi S, Tachikawa T, Yoshiki S. Morphogenesis of gap junctions in rat amelogenesis. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 1981;30(3):191-7. PMID: 7310257.
101. Zhong WQ, Chen G, Zhang W, Xiong XP, Ren JG, Zhao Y, Liu B, Zhao YF. Down-regulation of connexin43 and connexin32 in keratocystic odontogenic tumours: potential association with clinical features. *Histopathology*. 2015 May;66(6):798-807. doi: 10.1111/his.12569. Epub 2015 Jan 28. PMID: 25270527.
102. Tamayo JG, Hernández C. Aplicación del anticuerpo CD34 en el diagnóstico diferencial de los tumores fusocelulares. *Academia Bioméd Dig*. 2002; 7(11), 2-32.
103. Lin CS, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*. 2012 Nov;14(10):1159-63. doi: 10.3109/14653249.2012.729817. PMID: 23066784; PMCID: PMC3846603.
104. Kishimoto T. Leucocyte typing VI: white cell differentiation antigens: Proceedings of the Sixth International Workshop and Conference Held in Kobe, Japan, 10-14 November 1996p. 974-76.
105. Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IM, Griffioen AW, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*. 2012 Mar;15(1):151-63. doi:

- 10.1007/s10456-011-9251-z. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22249946; PMCID: PMC3274677.
106. Sánchez-Romero C, Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, de Almeida OP. Immunohistochemical expression of podoplanin (D2-40), lymphangiogenesis, and neoangiogenesis in tooth germ, ameloblastomas, and ameloblastic carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2017 Sep;46(8):618-624. doi: 10.1111/jop.12524. Epub 2016 Nov 24. PMID: 27859616.
107. Chacham M, Almoznino G, Zlotogorski-Hurvitz A, Buchner A, Vered M. Expression of stem cell markers in stroma of odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med.* 2020 Nov;49(10):1068-1077. doi: 10.1111/jop.13102. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32840915.
108. Jamshidi S, Zargaran M, Baghaei F, Shojaei S, Zare Mahmoodabadi R, Dehghan A, Moghimbeigi A. An Immunohistochemical Survey to Evaluate the Expression of CD105 and CD34 in Ameloblastoma and Odontogenic Keratocyst. *J Dent (Shiraz).* 2014 Dec;15(4):192-8. PMID: 25469359; PMCID: PMC4247843.
109. Pereira T, Dodal S, Tamgadge A, Bhalerao S, Tamgadge S. Quantitative evaluation of microvessel density using CD34 in clinical variants of ameloblastoma: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016 Jan-Apr;20(1):51-8. doi: 10.4103/0973-029X.180929. PMID: 27194862; PMCID: PMC4860937.
110. Jamshidi S, Zargaran M, Roshanaei G, Hadadi F, Dehghani Nazhvani A. Immunohistochemical comparison of the expression of CD34 and CD105 in odontogenic keratocyst and dentigerous cyst. *J Dent (Shiraz).* 2017 Mar;18(1):43-46. PMID: 28280759; PMCID: PMC5338175.

111. Aydin S, Şahin F. Stem cells derived from dental tissues. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1144:123-132. doi: 10.1007/5584\_2018\_333. PMID: 30635857
112. Muica Nagy-Bota MC, Pap Z, Denes L, Ghizdavăț A, Brînzaniuc K, Lup Coșarcă AS, Chibelean Cireș-Mărginean M, Păcurar M, Pávai Z. Immunohistochemical study of Ki67, CD34 and p53 expression in human tooth buds. *Rom J Morphol Embryol.* 2014;55(1):43-8. PMID: 24715164.
113. Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol.* 2014;22:12-32.
114. Kistenev YV, Vrazhnov DA, Nikolaev VV, Sandykova EA, Krivova NA. Analysis of collagen spatial structure using multiphoton microscopy and machine learning methods. *Biochemistry (Mosc).* 2019 Jan;84(Suppl 1):S108-S123. doi: 10.1134/S0006297919140074. PMID: 31213198.
115. Abdulhamit S. *Practical Machine Learning for Data Analysis Using Python.* Chapter 3 – Machine learning techniques. Academic Press. 2020, 91-202. ISBN 9780128213797, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821379-7.00003-5>.
116. Khameneh FD, Razavi S, Kamasak M. Automated segmentation of cell membranes to evaluate HER2 status in whole slide images using a modified deep learning network. *Comput Biol Med.* 2019 Jul;110:164-174. doi: 10.1016/j.combiomed.2019.05.020. Epub 2019 May 30. PMID: 31163391.
117. Sezgin M, Sankur B. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *Journal of Electronic Imaging.* 2004, 13: 146-168. 10.1117/1.1631315.
118. Rasband WS, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2022.
119. Landini G. 2019. <https://imagej.net/plugins/auto-threshold>

120. Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G. Cell detection with star-convex polygons. International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, Granada, Spain, September 2018.
121. Vincent L, Soille P. Watersheds in digital spaces: An efficient algorithm based on immersion simulations. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence- 1991; 13 (6), 583–598. doi: <http://dx.doi.org/10.1109/34.87344>
122. Arganda-Carreras I, Kaynig V, Rueden C, Eliceiri KW, Schindelin J, Cardona A, Sebastian Seung H. Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. Bioinformatics. 2017 Aug 1;33(15):2424-2426. doi: 10.1093/bioinformatics/btx180. PMID: 28369169.
123. Arzt M, Deschamps J, Schmied C, Pietzsch T, Schmidt D, Tomancak P, Haase R, Jug F. LABKIT: Labeling and Segmentation Toolkit for Big Image Data. Frontiers in Computer Science. 2022, 4. doi:10.3389/fcomp.2022.777728
124. Pathomation, Antwerp, Belgium
125. Landini G, Martinelli G, Piccinini F. Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging. Bioinformatics. 2021; 37 (10), 1485-1487.
126. Landini G. at bham. ac. Uk BLOG. <https://blog.bham.ac.uk/intellimic/g-landini-software/>
127. Landini G, Othman IE. Architectural analysis of oral cancer, dysplastic, and normal epithelia. Cytometry A. 2004 Sep;61(1):45-55. doi: 10.1002/cyto.a.20082. PMID: 15351988.
128. Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. J R Stat Soc Ser B Stat Methodol. 1977; p. 1±38.
129. Hartigan JA, Wong MA. Algorithm AS 136: A k-means clustering algorithm. J R Stat Soc Ser C Appl Stat. 1979; 28(1):100±108.

130. Defays D. An efficient algorithm for a complete link method. *Comput. J. Br Computer Soc.* 1977; 20 (4):364±366.
131. Ester M, Kriegel HP, Sander J, Xu X. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. In: *Int'l Conference on Knowledge Discovery in Databases and Data Mining (KDD-96)*, Portland, Oregon. vol. 96. AAAI Press, Menlo Park, CA (United States); 1996. p. 226± 231.
132. Kohonen T. *Learning Vector Quantization*. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg; 1995. p.175±189.
133. Quintarelli G, Dellovo MC. Mucopolysaccharide histochemistry of rat tooth germs. *Z Zellforsch Microsk Anat Histochem.* 1963, 17;62:195-207. doi: 10.1007/BF00736437. PMID: 14076274.
134. Lau E, Arechaga J, Ruch JV. Glycosaminoglycans in embryonic mouse tooth germs. A histochemical analysis. *J Biol Buccale.* 1983 Mar;11(1):23-34. PMID: 6189820.
135. French JE, Benditt EP. The histochemistry of connective tissue. II. The effect of proteins on the selective staining of mucopolysaccharides by basic dyes. *J Histochem Cytochem.* 1953 Sep;1(5):321-5. doi: 10.1177/1.5.321. PMID: 13096733.
136. Kelly JW. Suppression of metachromasy by basic proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1955 Mar;55(1):130-7. doi: 10.1016/0003-9861(55)90550-6. PMID: 14362608.
137. Ogsto AG, Stanier JE. Composition and properties of hyaluronic acid complex of ox synovial fluid. *Faraday Soc. Discussion.* 1953: 13, 275-280.



138. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):771–785. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>.
139. Smith MM, Melrose J. Proteoglycans in normal and healing skin. *Adv Wound Care.* 2015;4(3):152–173. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0464>.
140. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804(7):1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>.
141. Kato N, Takeda J, Fukase M, Motoyama T. Hyalinized stroma in clear cell carcinoma of the ovary: how is it formed? *Hum Pathol.* 2012;43(11):2041–2046. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.02.012>. Epub 2012 May 18
142. Philipsen HP, Fejerskov O, Donatsky O, Hjorting-Hansen E. Ultrastructure of epithelial lining of keratocysts in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Int J Oral Surg.* 1976;5:71–81.
143. Cottom HE, Bshena FI, Speight PM, Craig GT, Jones AV. Histopathological features that predict the recurrence of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med.* 2012 May;41(5):408-14. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01113.x. Epub 2011 Nov 16. PMID: 22085015.
144. Al-Ansari S, Jalali R, Plotkin LI, Bronckers ALJJ, DenBesten P, Zhang Y, Raber-Durlacher JE, de Lange J, Rozema FR. The importance of connexin 43 in enamel development and mineralization. *Front Physiol.* 2018 Jun 26;9:750. doi: 10.3389/fphys.2018.00750. PMID: 30013481; PMCID: PMC6036266.
145. João SM, Arana-Chavez VE. Expression of connexin 43 and ZO-1 in differentiating ameloblasts and odontoblasts from rat molar tooth germs.

- Histochem Cell Biol. 2003 Jan;119(1):21-6. doi: 10.1007/s00418-002-0482-3.  
Epub 2002 Dec 20. PMID: 12548402.
146. Toth K, Shao Q, Lorentz R, Laird DW. Decreased levels of Cx43 gap junctions result in ameloblast dysregulation and enamel hypoplasia in Gja1Jrt/+ mice. *J Cell Physiol.* 2010 Jun;223(3):601-9. doi: 10.1002/jcp.22046. PMID: 20127707.
147. Blocker SJ, Cook J, Everitt JI, Austin WM, Watts TL, Mowery YM. Automated nuclear segmentation in head and neck squamous cell carcinoma pathology reveals relationships between cytometric features and ESTIMATE stromal and immune scores. *Am J Pathol.* 2022 Sep;192(9):1305-1320. doi: 10.1016/j.ajpath.2022.06.003. Epub 2022 Jun 17. PMID: 35718057.
148. Fazeli E, Roy NH, Follain G, Laine RF, von Chamier L, Hänninen PE, Eriksson JE, Tinevez JY, Jacquemet G. Automated cell tracking using StarDist and TrackMate. *F1000Res.* 2020 Oct 28;9:1279. doi: 10.12688/f1000research.27019.1. PMID: 33224481; PMCID: PMC7670479.
149. Landini G. Quantitative analysis of the epithelial lining architecture in radicular cysts and odontogenic keratocysts. *Head Face Med.* 2006 Feb 17;2:4. doi: 10.1186/1746-160X-2-4. PMID: 16503983; PMCID: PMC1386655.

## 1. ANEXOS

### Aprobación Comité de Ética



Montevideo, 02 de diciembre de 2019.-

Reunido el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Odontología, el día 21/11/19, resuelve:

(Exp. No. 091900-000319-19) – APROBAR el Proyecto de investigación titulado “Estratificación epitelial y estromal de imágenes histopatológicas del tumor odontogénico primordial utilizando segmentación basada en sistema de superpíxeles semi-supervisado y no supervisado”, presentado por la Dra. Vanesa Pereira.

Dr. Ernesto Borgia  
Comité de Ética en Investigación  
Facultad de Odontología

Acreditación del Comité de Ética en Investigación de la F.O.: **Resol. No. 983 del 07/11/2017** de la Dirección Gral. de la Salud.







ORIGINAL ARTICLE

# Spatial distribution of CD34 protein in primordial odontogenic tumour, ameloblastic fibroma and the tooth germ

Vanesa Pereira Prado<sup>1</sup>  | Gabriel Landini<sup>2</sup>  | Adalberto Mosqueda Taylor<sup>3</sup>  |  
Pablo Vargas<sup>4</sup>  | Ronell Bologna Molina<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Molecular Pathology Area, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>School of Dentistry, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, UK

<sup>3</sup>Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Brazil

Correspondence

Vanesa Pereira Prado, Molecular Pathology Area, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.  
Email: [vanesapereira91@hotmail.com](mailto:vanesapereira91@hotmail.com)

Funding information

Banco Santander; Comisión Sectorial de Investigación Científica

## Abstract

**Background:** Primordial odontogenic tumour is a benign mixed neoplasm of recent description, which has histological similarities with other odontogenic tumours such as the ameloblastic fibroma. In this article, we investigate the architecture of the sub-epithelial layer of mesenchymal cells expressing the marker CD34 in primordial odontogenic tumour.

**Objective:** Analyse the spatial patterns of CD34 expression in primordial odontogenic tumour and compare them with those in ameloblastic fibroma and the normal tooth germ by means of objective imaging approaches, to better characterise these lesions.

**Methods:** Two cases of primordial odontogenic tumour, four cases of ameloblastic fibroma and two cases of tooth germ in cap and bell stages were used for morphological, structural and immunohistochemical analyses.

**Results:** CD34 expression was found in vascular endothelium of primordial odontogenic tumour, ameloblastic fibroma and tooth germ. In addition, a characteristic sub-epithelial expression was observed only in primordial odontogenic tumour, corresponding to 84%–86% of the sample boundaries. Moreover, the zone expressing CD34 corresponded with a higher cellularity, which was absent in ameloblastic fibroma and tooth germ.

**Conclusion:** Image analysis of the primordial odontogenic tumour architecture revealed characteristics absent in other odontogenic tumours and tooth germs. This study provides additional information to support the idea that this neoplasm is a distinct entity from early stage AF or developing odontoma.

## KEYWORDS

ameloblastic fibroma, CD34, odontogenesis, primordial odontogenic tumour, tooth germ

## 1 | INTRODUCTION

Primordial odontogenic tumour (POT) is a rare benign odontogenic neoplasm firstly described by Mosqueda Taylor et al.<sup>1</sup> To date 22 cases have been reported worldwide.<sup>2–5</sup> Histologically, POT is a mixed tumour, composed of dental papilla-like tissue covered by a cuboidal to columnar epithelium resembling the inner enamel epithelium of the enamel organ, which often invaginates into the underlying connective tissue, but does not induce dental hard tissue formation.

The tumour is partly surrounded by a delicate fibrous capsule.<sup>1</sup> Our group studied the immunoeexpression of 23 different antigens in POT, which confirm its odontogenic origin from the primary stages of tooth development (cap-bell stages), and the presence of both epithelial and mesenchymal activity, with differential expression of certain markers in particular zones of both tissue components.<sup>6</sup> This suggested that POT might arise during the early stages of tooth development, from the mesenchyme of an abortive tooth germ (TG) that fails to differentiate and consequently is not able to induce the formation of hard

tissues. Some authors suggested POT to be an intermediate stage in the development of an odontoma<sup>7</sup>; however, our group defined a series of criteria explaining their differences<sup>8</sup>:

- POT is associated with a non-erupted tooth in an apparent pericoronal location.
- POT has absence of mineralized dental tissue and odontoblastic differentiation.
- POT presents increased cellularity at the interface between the epithelium surrounding the lesion and the underlying mesenchymal tissue.

The definitive diagnosis of odontogenic tumours is histopathological and because other mixed odontogenic neoplasms share some histological similarities with POT, such as ameloblastic fibroma (AF) and immature odontoma, it seems important to identify objective histomorphological characteristics and criteria that facilitate understanding their pathogenesis and facilitate diagnostic and prognostic decisions.

Our group previously reported CD34 expression in the mesenchymal component of POT in two locations: cells located close to the odontogenic epithelium (suggesting the presence of embryonic fibroblasts) and in the endothelium of blood vessels.<sup>6,9</sup> To our knowledge, that finding has not been described in other odontogenic tumours and appears to be a differential feature of POT. CD34 is a transmembrane protein highly expressed in immature haematopoietic stem cells, endothelium of blood capillaries, embryonic fibroblasts and a multitude of other non-haematopoietic cell types, progressively decreasing in expression with stages of cell maturation.<sup>10</sup> However, the significance of this morphological feature has not been systematically studied in POT. The aim of the present study is therefore to analyse the spatial patterns of CD34 expression in POT and compare these with those in AF and the normal TG by means of objective imaging approaches, in order to better characterise these lesions.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

Two cases of POT were retrieved from Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico, four cases of AF and two cases of TG in cap and bell stages from the Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Brazil, were included in the present study. Ethical Committee approval was received for the present study: Universidad de la República, Facultad de Odontología, Uruguay (21/11/19, Exp. No. 091900-000319-19).

### 2.1 | Immunohistochemistry

Three-micrometre sections of formalin fixed tissues embedded in paraffin blocks were set on glass slides previously treated with

poly-lysine. Sections were then deparaffinized, rehydrated and antigen retrieval was performed through treatment with 0.1 M sodium citrate (pH 6.2) and Tween 20 in a microwave oven for 7 min to unmask the epitopes. Endogenous peroxidases were blocked with 0.9% hydrogen peroxide. Primary antibody for CD34 (Biocare/QBEnd10, 1:50 dilution) was incubated for 45 min at room temperature. Afterwards, the slides were incubated with a biotinylated anti-mouse/anti-rabbit antibody and the streptavidin/peroxidase complex for 30 min each (LSAB+-labelled streptavidin-biotin, Dako) and the reaction was visualised with 3,3'-diaminobenzidine-H<sub>2</sub>O (Dako). Finally, the sections were counterstained with Mayer's haematoxylin solution. Blood vessels within the mesenchymal tissue were considered as internal positive control. For the negative control, the primary antibody was replaced with PBS. Results were visually assessed using an optical microscope (Eclipse Ci-L, Nikon, Japan) with a ×40 objective.

### 2.2 | Alcian blue + PAS stain

Alcian blue + PAS technique was also performed in POT cases to disclose any compositional tissue changes in the sub-epithelial regions. Deparaffinized and rehydrated slides were immersed in acetic acid solution 3% for 5 min. Afterwards the slides were stained with alcian blue 0.5% pH solution for 30 min at room temperature, periodic acid 0.5% for 10 min and Schiff reactive for 20 min. Finally, the sections were dehydrated in graded ethanol.

### 2.3 | Digitization

A Motic EasyScan© scanner was used for slide digitization with a ×40 objective in standard mode. Pathomation's PMA.start software<sup>11</sup> was used for visualisation and capture of regions of interest. Every area with the presence of odontogenic epithelium was considered a region of interest in the three entities studied. For POT and TG specimens, the upper border of the image frame was used as a reference to align the epithelial component so that all images could be comparably aligned. RGB images (representing regions of interest of which corresponded to a field of view of 315 × 638 μm) were saved in TIFF format for further analysis.

### 2.4 | CD34 analysis as a function of depth

POT boundaries were analysed in CD34 stained samples to estimate the proportion (%) of the tumour boundary length where the sub-epithelial zone was positive for this marker. To accomplish this, the ImageJ<sup>12</sup> freehand line tool was used and length measurements were determined in both POT tumours.

Images of CD34 stained samples of POT and TG were further analysed using an ImageJ macro that computed the presence of positive CD34 immunostain from the image upper border



(that corresponds to the tumour outer boundary epithelium) to the bottom border (which corresponds to a maximum depth of 638  $\mu\text{m}$ ), that is, to provide a measure of the presence of CD34 staining in function of tumour depth. The regions containing the IHC product were computed using stain unmixing (colour deconvolution),<sup>13</sup> then thresholded using Otsu's method.<sup>12</sup> Immunohistochemistry uses a chromogenic precipitation for visualisation of the immunoreactivity, which is difficult to control, and therefore the stained product is non-stoichiometric. Therefore, a binary (presence/absence) approach was used to detect the spatial distribution of staining across each sample rather than attempting to quantify staining intensities. The distance from the pixels in these regions to the border of the tissue were determined using the 'Euclidean distance transform' in ImageJ and a histogram of distances computed for the ensemble of POT samples.

The approach, however, needs to be modified when applied to AF samples because of a difference in geometry and topology of the epithelium in this neoplasm when compared with POT and TG: while POT and TG contain an outer epithelial layer, AF consists of multiple epithelial islands and the distance from these to other the mesenchymal components of interest is not a function of the depth from the outer tissue boundary and so the segmentation requires a different approach. To this end, Fiji's Labkit segmentation plugin<sup>14</sup> was used first to determine the epithelial component by 'training' a classifier to recognise image pixels belonging to three tissue classes of interest (which were annotated interactively by the operator): that is, mesenchymal tissue, CD34+ regions and epithelial islands. The result of the training is a three-phase segmented image and the classifier can be used to segment unseen images. Then, the Euclidean distance transform was applied to the pixels labelled as non-epithelial regions to compute their distance to the nearest segmented epithelium region. Subsequently, the CD34 labelled regions were queried to retrieve the value of the previously computed distance transform to the nearest epithelial component. The distance from the epithelial islands to the CD34 positive regions was also determined the 'Euclidean distance transform' as described earlier. These procedures were repeated in 99 POT images, 62 AF images and 8 TG images.

In addition, the epithelial thickness in POT and TG was measured interactively with using ImageJ's straight line tool to be able to compensate for the difference in position of the epithelial-connective tissue interface (ECTI) when comparing to AF images (discussed below).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Alcian blue + PAS stain

The alcian blue + PAS staining on the POT sections revealed sky-blue regions showing the presence of mucopolysaccharides notably in the sub-epithelial regions. This suggested a functionally distinct zone, which also coincided with a high cellular density when compared with the deeper parts of the neoplasm mesenchymal component (Figure 1).

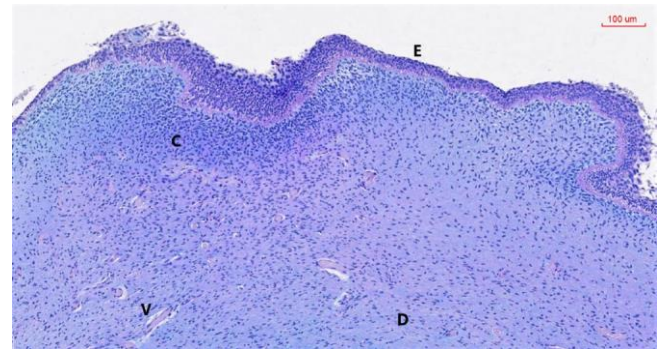


FIGURE 1 Alcian blue + PAS stained POT. C, condensed mesenchymal zone; D, deep mesenchymal zone; E, epithelium; V, vessels. The sky-blue staining in the sub-epithelial region indicated the presence of mucopolysaccharides, which appear to be less obvious deeper in the tumour mesenchymal component.

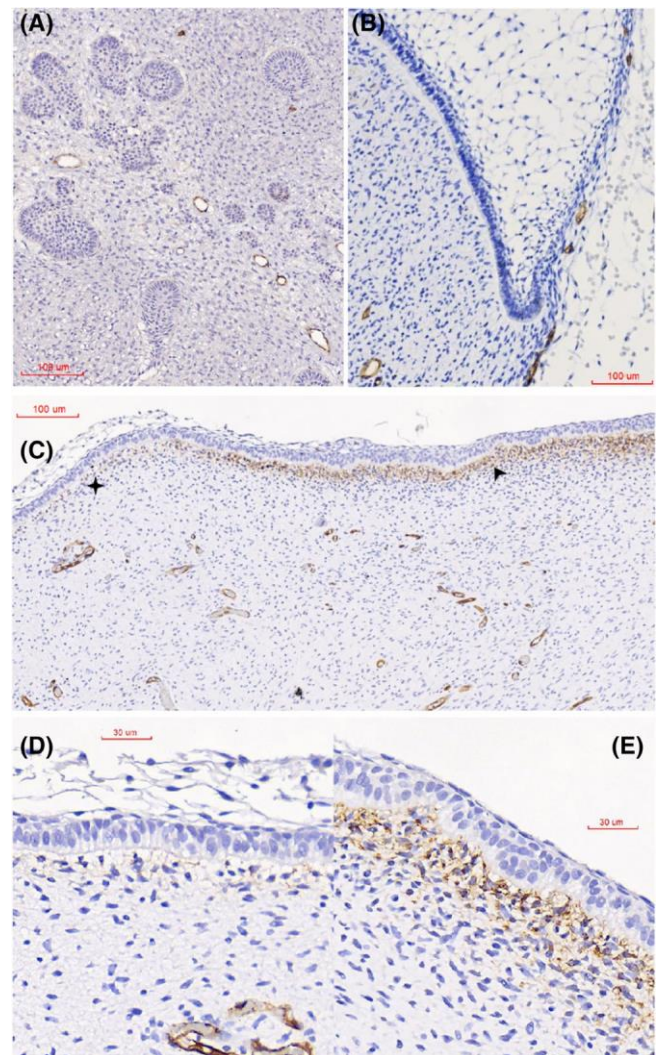
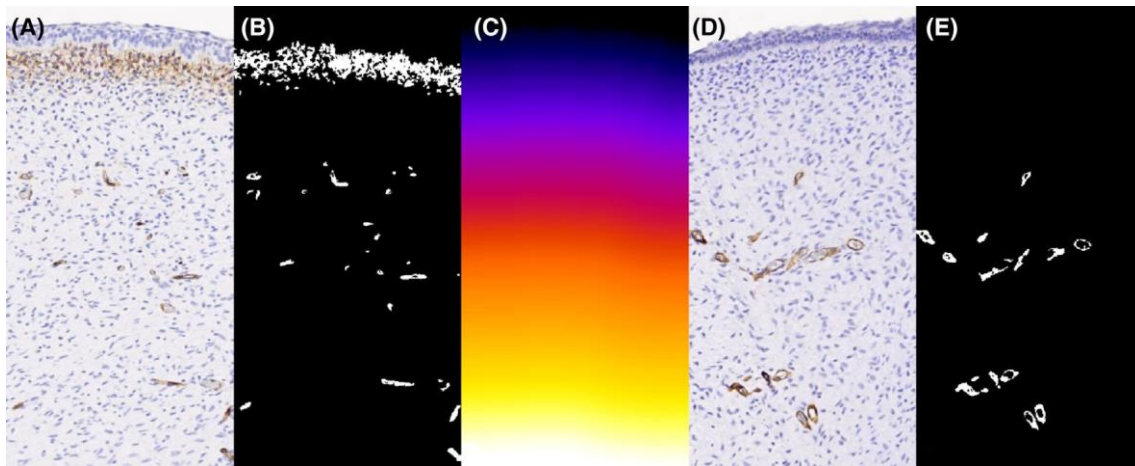
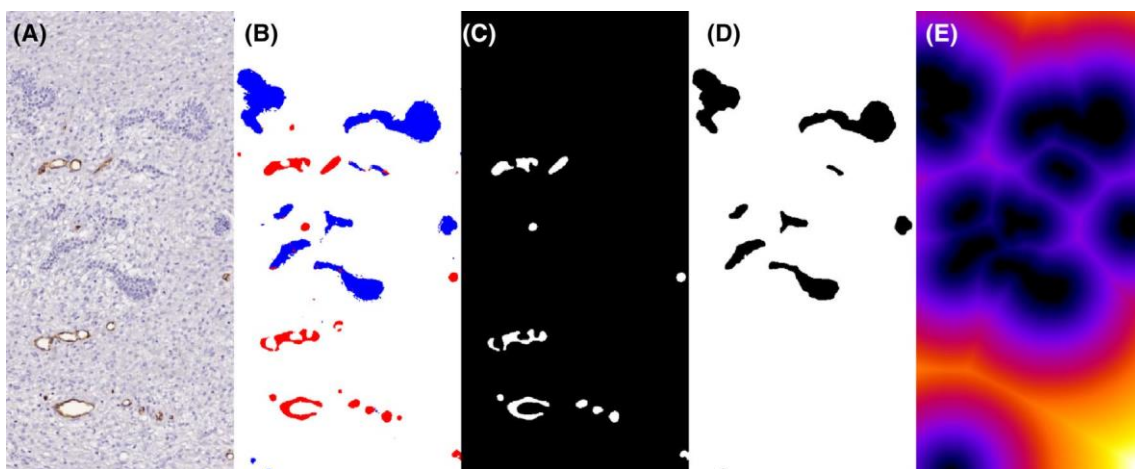


FIGURE 2 Immunorexpression of CD34 in (A) AF, (B) TG and (C) POT. Sub-epithelial expression in POT can be observed to vary from a CD34 negative region (black star, left, D) to a positive one (black arrowhead, right, E) which correlates with a decrease in sub-epithelial cell condensation.



**FIGURE 3** (A) POT immunohistochemical CD34 sub-epithelial positive expression. (B) Segmentation of A, showing a binary image. The white regions indicate the presence of CD34 in sub-epithelial mesenchymal cells and blood vessel endothelium. (C) The Euclidean distance transform was used to encode the image with values (shown in false colour) corresponding to the distance between each pixel belonging to the tissue in A, and the tissue boundary (given by the empty background). The depth from the boundary of each CD34+ pixel (shown in white in B) can therefore be determined by examining the corresponding pixel values in image C. (D) POT immunohistochemical CD34 sub-epithelial negative expression. (E) Segmentation of A, showing a binary image. The white colour indicates the presence of CD34 in blood vessels. The process was repeated for other 99 images.



**FIGURE 4** CD34 expression analysis of AF sections. (A) CD34 immunoexpression in AF. (B) Segmentation obtained with Labkit, blue: epithelial islands, red: vascular endothelium, white: mesenchyme. (C) Binary image of the boundaries of vessel segmentation after image cleaning of small regions. (D) Binary image of epithelial islands segmentation. (E) The Euclidean distance transform encodes as a pixel value the distance of each white pixel in D to the nearest black region (also in D). The distance of each white feature in C to the black features in D can be determined by examining image E. The process was repeated for other 62 images.

### 3.2 | Immunohistochemistry

CD34 expression was evident in the vascular endothelium of POT, AF and TG (Figure 2). In addition, positive expression was also observed in the sub-epithelial region of POT cases, approximately along 84%-86% of the tissue boundaries and which coincided with the zone of increased cellularity and more intense alcian-blue staining mentioned earlier. Interestingly, in some locations where CD34 expression was absent, the sub-epithelial cellularity condensation also decreased.

### 3.3 | CD34 analysis as a function of depth

The POT images of sections stained with CD34 antibodies showed a pattern of increasing cellularity when positive in the sub-epithelial area (Figure 3A-C). Moreover, negative CD34 sub-epithelial expression correlated with a reduction of nuclear density (Figure 3D,E).

CD34 positivity in AF was detected in the endothelium of blood vessels (Figure 4). These vessels could be seen near odontogenic epithelium islands, unlike in POT (Figure 6, black plot) where there is a vessel-free zone below the odontogenic epithelium. Figure 6 shows a



scan plot of the probability of stained CD34 regions in AF, TG and POT, revealing a peak that progressively decreases in AF and POT cases, without discrimination to which structure CD34 positivity corresponds. In some cases of AF, there were only few small calibre vessels close to the epithelium.

The contribution of CD34 positive expression in TG seems to be exclusively due to the presence of blood vessel endothelium and it

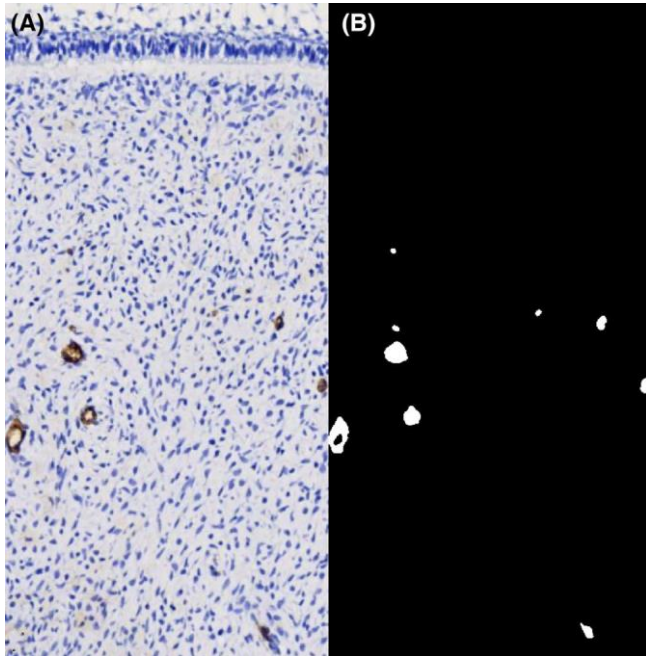
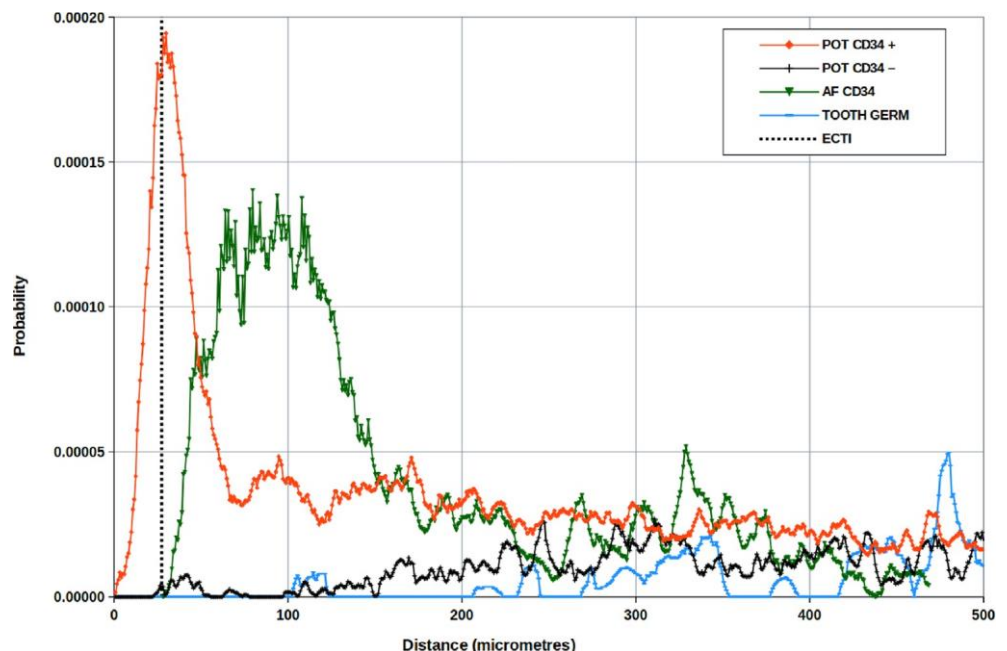


FIGURE 5 (A) TG CD34 expression analysis. (B) Segmentation of A, showing a binary image. The process was repeated for other eight images.

FIGURE 6 The graph shows the distribution of distances of CD34 positive pixels to the tissue boundary in all POT images for positive (red) and negative (black) sub-epithelial CD34 expression regions, as well as the distribution of distance from the epithelium between epithelial islands in AF (green) and TG (blue). The AF plot was offset by 27  $\mu\text{m}$ , while the TG plot was offset by 6  $\mu\text{m}$  to compensate the difference between POT and TG epithelium thickness and the AF plot (which describes the distances from the epithelium rather than from the tissue boundaries). The dotted line indicates the epithelial connective tissue interface (ECTI) in POT samples. Note the differences in distribution between sample types.



was similar to that of POT areas where no sub-epithelial CD34 expression was found (Figures 5 and 6, black and blue plot).

The average POT epithelium thickness ( $27 \mu\text{m} \pm 19$ ) and that of the TG ( $33 \mu\text{m} \pm 6$ ) were used to offset the plots in Figure 6, so the ECTI position was comparable across the different samples.

In Figure 6, the red plot (POT) reaches a maximum value of 31  $\mu\text{m}$  (after smoothing the plot with a running average of 15 data points, not shown) which corresponds with the CD34 sub-epithelial expression; from then on, CD34 expression is due to the presence of vessels which progressively decrease toward the deeper connective. The black and blue plots show a relatively constant presence of CD34 vessels.

The AF data shows a different distribution of CD34 staining when compared with POT and TG, with a broad peak revealing positive regions peaking at about 96  $\mu\text{m}$  from the epithelial islands (after smoothing the plot with a running average of 15 data points, not shown). In addition, some samples of POT and AF featured a zone of hyalinization next to the epithelium.

#### 4 | DISCUSSION

This systematic study of the architecture of POT, AF and TG based on the spatial distribution of the CD34 immunomarker suggests the presence of a distinct sub-epithelial area in regions of POT which are not from the vascular endothelium.

Our group previously noted this mesenchymal band of CD34 positive cells in POT beneath epithelial layers, suggesting these may represent embryonic fibroblasts.<sup>6,7,9</sup> CD34 expression was observed in two distinct compartments, namely in the endothelium of blood vessels and the mesenchymal cells adjacent to the epithelium.

However, lack of CD34 expression in the sub-epithelial zone was also occasionally seen in some parts of the tumours (14%-17%) which correlates also with less mesenchymal cell condensation. This could be interpreted as different stages of differentiation or early odontogenic induction, which might play an important role in tumorigenesis and appears to be a unique feature for this odontogenic tumour. Comparing this feature with that found in TG further suggests that the POT sub-epithelial nuclear condensation might be akin to the dental papilla condensation area observed in the stages preceding odontoblastic differentiation during odontogenesis. According to case reports of POT in the literature, several studies demonstrated CD34 positivity, while in nine cases no immunohistochemical analysis was mentioned.<sup>2-5</sup>

Comparing POT CD34 expression in histopathologically similar tissues and with a similar histogenesis (AF and TG) showed some interesting differences: only POT appears to feature the CD34 positive sub-epithelial zone while AF and TG were negative in that location.

AF positive expression of CD34 was only seen in relation to endothelium of vessels; some of those vessels were observed in the proximity of epithelial islands. However, in POT no vessels seem to be present in the zone adjacent to the epithelium, regardless of the presence of the CD34+ zone. This comparison could be done since AF presented dental epithelium in a similar architecture with POT, although comparing POT with partial biopsies of AF may be challenging.

Expression of CD34 in the stroma of odontogenic lesions has been used for the assessment of microvascular density, in an attempt to elucidate the biological behaviour of these lesions.<sup>15</sup> In this context, Chacham et al.<sup>15</sup> reported the presence of CD34 positive dendritic cells adjacent to the lining epithelium of recurrent odontogenic keratocysts, suggesting it could be a potential feature to differentiate from other, more mature cell types, such as myofibroblastic, adipogenic, osteoblastic and chondroblastic cells. Embryonic fibroblasts are often prominent in the reactive stroma associated with cancerous tissue and it has been hypothesised that they could be responsible for triggering effects on surrounding epithelial cells such as epithelial-mesenchymal transition, cell proliferation, angiogenesis, invasion and metastasis.<sup>16</sup>

In this study, immunohistochemical expression of CD34 in TG tissue was observed (as in AF) limited to the dental papilla endothelium but was negative in cells near the epithelium at both cap and bell stages. While the tooth germ tissue is known to be rich in mesenchymal stem cells, according to Aydin et al., those cells express a variety of mesenchymal stem cell markers including CD146, CD106, CD90, CD29 and CD13, but interestingly they do not express haematopoietic stem cell markers such as CD34.<sup>17</sup> In a previous study, our group reported the presence of CD90 and CD105 in POT only limited to vascular endothelium.<sup>6</sup> Therefore, in our study, CD34 sub-epithelial expression could represent a cell type different from the normal differentiation odontogenic process.

Moreover, alcian blue + PAS staining on POT revealed the presence of mucopolysaccharides in the sub-epithelial area. This finding differs from TG, where acid radicals seem to be present in the stellar reticulum, basal membrane and deeper areas of mesenchymal dental papilla, decreasing while progressing in odontogenesis.<sup>18</sup>

Notwithstanding that the POT histological features point to an origin from a primordial TG, the results reported here support the idea that POT is a distinct odontogenic neoplasm, morphologically different from the other established categories and furthermore, not a developing odontoma or an early stage AF as it has been proposed before.<sup>6,9</sup>

Histopathological image analysis through quantitative techniques provides novel approaches to structural analyses that can facilitate understanding tumour pathogenesis and facilitate diagnostic and prognostic decisions. Leaving aside the clinical considerations that can contribute to the diagnosis of these entities, it seems important to remark that POT does not induce odontoblastic differentiation or production of dentine proteins as observed in other odontogenic tumours such as odontoma. Furthermore, the absence of dense cellularity in the sub-epithelial regions of AF and TG emphasises architectural differences with POT. The CD34 expression pattern in the three tissues investigated suggests the presence of an immature cell type that could potentially induce epithelial-mesenchymal transition, proliferation and angiogenesis.

One limitation of the present study is the number of cases and images analysed due to the rarity of POT, but further studies based on the principles described may contribute to confirming the findings reported. The analysis of additional immunomarkers could also help to elucidate further details of the relation between architecture and behaviour of POT.

## 5 | CONCLUSION

Image analysis of the POT architecture revealed characteristics not observed in other odontogenic tumours and TG. This study provides additional information to support the idea that this neoplasm is a distinct entity from early stage AF or developing odontoma.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Vanesa Pereira Prado, Pablo Vargas, Adalberto Mosqueda Taylor, Gabriel Landini and Ronell Bologna Molina have made substantial contributions to conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data and have been involved in drafting the manuscript and revising it critically. All authors have given final approval of the version to be published. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

### CONFLICT OF INTEREST

COI forms for all authors Dr. PEREIRA reports grants from CSIC and from SANTANDER UDELAR, during the conduct of the study. The rest of the authors declare that they do not have a conflict of interest.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

## ORCID

Vanesa Pereira Prado  <https://orcid.org/0000-0001-7747-6718>

Gabriel Landini  <https://orcid.org/0000-0002-9689-0989>

Adalberto Mosqueda Taylor  <https://orcid.org/0000-0001-8956-6016>

Pablo Vargas  <https://orcid.org/0000-0003-1840-4911>

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

## REFERENCES

- Mosqueda-Taylor A, Pires FR, Aguirre-Urizar JM, et al. Primordial odontogenic tumour: clinicopathological analysis of six cases of a previously undescribed entity. *Histopathology*. 2014 Nov;65(5):606-612. doi:10.1111/his.12451
- Delgado-Azañero WA, de Almeida OP, Pereira AAC, et al. Primordial odontogenic tumor: report of 2 new cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2021;132(2):e69-e77. doi:10.1016/j.oooo.2020.08.004
- Kayamori K, Tsuchiya M, Michi Y, et al. Primordial odontogenic tumor occurred in the maxilla with unique calcifications and its crucial points for differential diagnosis. *Pathol Int*. 2021;71(1):80-87. doi:10.1111/pin.13036
- Zeng M, Chen X, Guo X, Yang S. Report of a classic primordial odontogenic tumour and an unusual mixed odontogenic tumour with features of primordial odontogenic tumour: diagnostic implications. *Pathology*. 2020;52(5):596-599. doi:10.1016/j.pathol.2020.04.007
- Naina S, Narwal A, Devi A, Kamboj M, Pandiar D. Primordial odontogenic tumor of anterior maxilla in a young male: a case report and an updated review of literature. *Pediatr Dev Pathol*. 2021;24(1):73-79. doi:10.1177/1093526620972589
- Bologna-Molina R, Mikami T, Pereira-Prado V, Pires FR, Carlos-Bregni R, Mosqueda-Taylor A. Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017; 22(3):e314-e323. doi:10.4317/medoral.21859
- Ide F, Kikuchi K, Kusama K, Muramatsu T. Primordial odontogenic tumour: is it truly novel? *Histopathology*. 2015;66(4):603-604. doi:10.1111/his.12595
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A. Primordial odontogenic tumour or developing odontoma? *Histopathology*. 2020;76(3):489-490. doi:10.1111/his.13999
- Mikami T, Ohashi Y, Bologna-Molina R, et al. Primordial odontogenic tumor: a case report with histopathological analyses. *Pathol Int*. 2017; 67(12):638-643. doi:10.1111/pin.12601
- Nishio H, Tada J, Hashiyama M, Hirn J, Ingles-Esteve J, Suda T. MC7. CD34 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, et al., eds. *Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference*; 1996. Garland Publishing Inc.; 1997:10, 974-14, 76.
- Pathomation. Antwerp, Belgium. <https://www.pathomation.com/>
- Rasband WS, Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; 1997-2022. <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- Landini G, Martinelli G, Piccinini F. Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging. *Bioinformatics*. 2021;37(10):1485-1487.
- Arzt M, Deschamps J, Schmied C, et al. LABKIT: labeling and segmentation toolkit for big image data. *Front Comput Sci*. 2022;4:1-12. doi:10.3389/fcomp.2022.777728
- Chacham M, Almozni G, Zlotogorski-Hurvitz A, Buchner A, Vered M. Expression of stem cell markers in stroma of odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*. 2020;2020:1-10. doi:10.1111/jop.13102
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
- Aydin S, Şahin F. Stem cells derived from dental tissues. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1144:123-132. doi:10.1007/5584\_2018\_333
- Quintarelli G, Dellovo MC. Mucopolysaccharide histochemistry of rat tooth germs. *Histochemie*. 1963;3(3):195-207. doi:10.1007/bf00736437

How to cite this article: Pereira Prado V, Landini G, Mosqueda Taylor A, Vargas P, Bologna Molina R. Spatial distribution of CD34 protein in primordial odontogenic tumour, ameloblastic fibroma and the tooth germ. *J Oral Pathol Med*. 2022;1-7. doi:10.1111/jop.13370

## Macro Label complete

```
// Paints each cell with the modal colour
a=getTitle();
thisSlice=getSliceNumber();
run("Duplicate...", "title=Mode duplicate");
setThreshold(1, 255, "raw");
run("Convert to Mask", "method=Default background=Dark black");
selectWindow("Mode");
run("Particles8 ", "white show=Particles minimum=0 maximum=9999999 display overwrite
redirect="+a);
for (i=0; i<nResults; i++) {
    s=getResult('Slice',i);
    xs =getResult('XStart', i);
    ys = getResult('YStart', i);
    gm= getResult('GrMode', i);
    if (thisSlice!=s) {
        setSlice(s);
        thisSlice=getSliceNumber();
    }
    setColor(gm);
    floodFill(xs, ys, 8);
}
run("glasbey");
selectWindow("Mode");
run("Duplicate...", "title=Label1 duplicate");
run("Duplicate...", "title=Label2 duplicate");
selectWindow("Label1");
setAutoThreshold("Default dark");
setThreshold(1, 1, "raw");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask", "method=Default background=Dark black");
run("BinaryFilterReconstruct ", "erosions=3 white");
run("Median...", "radius=3 stack");
selectWindow("Label2");
```

```

setThreshold(2, 2, "raw");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask", "method=Default background=Dark black");
run("BinaryFilterReconstruct ", "erosions=3 white");
run("Median...", "radius=3 stack");
selectWindow("Label2");
run("Duplicate...", "title=Erode duplicate");
run("Minimum...", "radius=2 stack"); //
imageCalculator("Subtract stack", "Label2", "Erode");
close("Erode");

```

### Macro DAB distance WEKA

```

// 0= background
// 1= epithelium = Label1
// 2= dab = Label2
close("Mode");
a="Label1"; //epi
selectWindow(a);
run("Invert", "stack");
run("Set Scale...", "distance=0 known=0 unit=pixel");
run("Options...", "iterations=1 count=1 black pad edm=16-bit do=Nothing");
run("Distance Map", "stack");
selectWindow("Label2");// DAB
run("Set Scale...", "distance=0 known=0 unit=pixel");
selectWindow("Label2");// DAB
run("16-bit");
run("Multiply...", "value=65536 stack");
imageCalculator("AND create stack", "Label2", "EDM of Label1");
selectWindow("Result of Label2");
ns=nSlices();
run("Make Montage...", "columns=1 rows=ns scale=1");
run("SixteenBit Histogram");

```

## Macro Stain distance

```
//create distance map
a=getTitle();
ns=nSlices();
b=getBoolean("Yes= DAB, No=Haematoxylin");
run("Duplicate...", "duplicate title=bin");
run("8-bit");

run("Enhance Local Contrast (CLAHE)", "blocksize=127 histogram=256 maximum=3
mask=*None*");

setAutoThreshold("Percentile stack dark");
setOption("BlackBackground", true);
//run("Convert to Mask");
run("Convert to Mask", "method=Percentile background=Light black");
run("Minimum...", "radius=3 stack");
run("BinaryFilterReconstruct ", "erosions=3 white");
run("Maximum...", "radius=3 stack");
run("Fill Holes", "stack");
run("Add Borders", "top white stack");
run("Duplicate...", "duplicate title=dup");
run("BinaryKillBorders ", "top white stack");
imageCalculator("Subtract stack", "bin", "dup");
selectWindow("bin");
run("Invert", "stack");
run("BinaryKillBorders ", "top white stack");
run("Options...", "iterations=1 count=1 black pad edm=16-bit do=Nothing");
run("Distance Map", "stack");
close("dup");

// binarise DAB image
selectWindow(a);

run("Colour Deconvolution2", "vectors=[H DAB] output=8bit_Transmittance simulated cross
hide");
close(a+"-(Colour_3)");
if (b==1) {
    c="-(Colour_2)";
```



```

    d="DAB";
}
else {
    c="-(Colour_1)";
    d="Haem";
}
selectWindow(a+c);
setAutoThreshold("Default ");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask", "method=Otsu background=Light black");
for (i=1;i<=ns;i++) {
selectWindow("bin");
    setSlice(i);
    run("Duplicate...", "title=x");
    selectWindow("x");
    run("Find Edges");
    run("Maximum...", "radius=2");
selectWindow(a+c);
    setSlice(i);
    run("Duplicate...", "title=y");
run("BinaryReconstruct ", "mask=y seed=x white");
imageCalculator("Subtract", a+c,"x");
close("x");
close("y");
}
run("BinaryFilterReconstruct ", "erosions=1 white");
//run("Median...", "radius=2 stack");
run("16-bit");
run("Multiply...", "value=65536 stack");
imageCalculator("AND stack create", a+c,"EDM of bin");
//selectWindow("Result of "+a+c);
//run("Histogram");
//rename("Histogram of "+d);
selectWindow("Result of "+a+c);

```

```

ns=nSlices();
run("Make Montage...", "columns=1 rows=ns scale=1");
run("SixteenBit Histogram");
close("Montage");
//close("bin");
//close(a+"-(Colour_1)");
//close(a+"-(Colour_2)");
//close("Result of " +a+c);
//close("EDM of bin");

```

### Macro Remover espacio superior

```

w=getWidth();
h=getHeight();
z=0;
en=newArray(nSlices);
for (i=1;i<=nSlices;i++){
setSlice(i);
run("Select None");
done=false;
y=0;
while (!done){
for (x=0;x<w;x++) {
if (getPixel(x,y) != 0) done= true;
}
y++;
}
en[i]=(y--);
if (en[i] > z) z=en[i];
print (z);
makeRectangle(0, en[i]-2, w, h);
setPasteMode("Copy");
run("Copy");
makeRectangle(0, 0, w, h);

```

```
run("Paste");
}
makeRectangle(0, 0, w, h-z);
run("Crop");
```

## Macro Separate labels

```
// Removes boundaries between touching labels, for example in a stardist generated image.
// Note:
// with radius = 0.5 it removes 4-connected boundaries
// with radius = 1 it removes 8-connected boundaries (default)
a=getTitle();
run("Duplicate...", "title=d");
run("Maximum...", "radius=1");// boundaries
imageCalculator("Subtract ", "d", a);
imageCalculator("Subtract create", a,"d");
imageCalculator("XOR ","Result of "+a, a);
close("d");
selectWindow("Result of "+a);
rename("bridges");
setThreshold(1, 65535);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("16-bit");
run("Multiply...", "value=65535");
imageCalculator("Subtract create", a,"bridges");
close("bridges");
selectWindow("Result of "+a);
```

*Per Ardua Ad Alta*