



Expresión y detección de mutaciones en los genes *BRAF*,
SMO, *PTCH1*, *CTNNB1*, *CAV1* y expresión de las
proteínas Ki-67, Caveolina 1, MOC-31 y Conexina 43 en
el Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico,
Fibro-odontoma ameloblástico y Odontoma

Dra. Natalia González MSc.

Doctorado en Ciencias Odontológicas

Escuela de Graduados – Facultad de Odontología
Universidad de la República
Montevideo – Uruguay
2026



Expresión y detección de mutaciones en los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CTNNB1*, *CAVI* y expresión de las proteínas Ki-67, Caveolina 1, MOC-31 y Conexina 43 en el Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico, Fibro-odontoma ameloblástico y Odontoma

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Posgrados Académicos en Ciencias Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctorando en Ciencias Odontológicas

Tutor de tesis:

Prof. PhD. Dr. Ronell Bologna

Co-tutora:

Profa. PhD. Dra. Verónica Beovide

Co-asistente:

Lic. PhD. Estefanía Sicco

Montevideo – Uruguay

2026

González, Natalia.

Expresión y detección de mutaciones en los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CTNNB1*, *CAVI* y expresión de las proteínas Ki-67, Caveolina 1, MOC-31 y Conexina 43 en el Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico, Fibro-odontoma ameloblástico y Odontoma / Natalia González.

Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de la República, 2026.

Montevideo: Facultad de Odontología, 2026

Dedicado a Marcelo, Manuela y Guillermina, quienes me apoyaron, impulsaron, acompañaron y supieron entender mis ausencias. Este trabajo fue posible gracias al esfuerzo de nuestra familia.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a quienes hicieron posible este camino. A mi familia, Marcelo, Guillermina y Manuela, por su apoyo incondicional en el día a día, por estar siempre presentes y sostenerme en cada etapa de este proceso. Su acompañamiento ha sido fundamental para llegar hasta aquí.

A mi tutor, Ronell Bologna, por su guía constante, su compromiso y su apoyo académico, que orientaron este trabajo con dedicación y generosidad.

A mi cotutora, Verónica Beovide, por su acompañamiento cercano, por su disposición permanente y por su guía en todo lo referido a la Facultad, facilitando cada instancia de este proceso.

A Estefanía Sicco, mi coasistente, con quien compartí gran parte de este recorrido y de quien aprendí muchísimo. Gracias por tu ayuda, tu tiempo y tu compromiso en cada etapa del trabajo.

A todas mis compañeras del laboratorio, por su paciencia ante mis ausencias y, sobre todo, por estar siempre dispuestas a escucharme, acompañarme y hacer más llevadero este camino.

Finalmente, a la Facultad de Odontología de la Udelar y a todas aquellas personas que, de una u otra forma, contribuyeron a la realización de esta tesis, mi más sincero agradecimiento.

Lista de figuras, tablas y gráficas

Figuras

FIGURA 1. Desarrollo de un diente temporal. Sección parasagital de la mandíbula inferior de un embrión humano de 14 semanas que muestra ubicación del primordio (izquierda). Primordio en la etapa de yema en un embrión de 9 semanas (derecha). Imagen obtenida de *“Development of the teeth”* (Yoshimoto, 2014)

FIGURA 2. Etapa de capuchón dental en un embrión de 11 semanas que muestra el órgano del esmalte (izquierda). Primordio del incisivo central en la etapa de campana en un embrión de 14 semanas antes del depósito de esmalte o dentina (derecha). Imagen obtenida de *“Development of the teeth”* (Yoshimoto, 2014)

FIGURA 3. Incisivo no erupcionado en un feto a término (izquierda). Incisivo parcialmente erupcionado que muestra el primordio de un diente permanente cerca de su raíz (derecha). Imagen obtenida de *“Development of the teeth”* (Yoshimoto, 2014)

FIGURA 4. Aspecto celular del órgano del esmalte y la pulpa adyacente de los dientes en formación antes del comienzo de la deposición de esmalte y dentina. Imagen obtenida de *“Development of the teeth”* (Yoshimoto, 2014)

FIGURA 5. Aspecto celular del órgano del esmalte y la pulpa adyacente de los dientes en formación luego del comienzo de la deposición de esmalte y dentina. Imagen obtenida de *“Development of the teeth”* (Yoshimoto, 2014)

FIGURA 6. Clasificación de los Tumores odontogénicos, OMS 2005 (Barnes y col., 2005)

FIGURA 7. Clasificación de Tumores odontogénicos y óseos maxilofaciales, OMS 2017 (Speight y Takata, 2017)

FIGURA 8. Clasificación de Tumores odontogénicos y óseos maxilofaciales, OMS 2022 (Vered y Wright, 2022)

FIGURA 9. Señalización mediada por *BRAF* en células normales y cancerosas. Adaptado de *Cancers Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. Cancers* (Zaman y col., 2019)

FIGURA 10. Modelos de activación de la vía Sonic Hedgehog que contribuyen al cáncer. A. Activación independiente del ligando. B. Activación autócrina. C. Activación parácrina. D. Activación parácrina inversa. Adaptado de *The controversial role of the Hedgehog pathway in normal and malignant hematopoiesis. Leukemia* (Mar y col., 2011)

FIGURA 11. Línea de tiempo que resume la evolución de la función de *CAV1*. Obtenido de *Mecanismos celulares intrínsecos y extrínsecos de la metástasis mejorada de Caveolin-1. Biomoléculas* (Campos y col., 2019)

FIGURA 12. Modelo de red para el gen *CTNNB1*. Obtenido de *Gene expression and pathway analysis of CTNNB1 in cancer and stem cells. World Journal of Stem Cells* (Tanabe y col., 2016)

FIGURA 13. Lámina digitalizada de un Fibroma ameloblástico teñido con Hematoxilina-Eosina, visualizado con el software *Motic DS Assistant*. El software *Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant* permite evaluar las láminas histológicas que han sido escaneadas de forma muy similar a la visualización obtenida con el uso del microscopio óptico. Magnificación de la imagen es de 0.86x

FIGURA 14. Inmunoexpresión de Caveolina 1 en el Fibroma Ameloblástico, Fibro-dentinoma Ameloblástico, Fibro-odontoma Ameloblástico y Odontoma. (A) Fibroma ameloblástico que muestra positividad (++) en islas epiteliales ameloblásticas y células mesenquimales odontogénicas. (B) Fibro-dentinoma ameloblástico con positividad (++) solo en el componente epitelial ameloblástico. (C) Fibro-odontoma Ameloblástico con positividad (++) en el componente epitelial ameloblástico, mostrando además su relación con la formación de tejidos dentales mineralizados (dentina). (D) Odontoma con positividad (++) en el componente epitelial. Inmunohistoquímica, Caveolina 1, A, B, C, D: 20x.

FIGURA 15. Inmunoexpresión de MOC-31 en el Fibrodentinoma Ameloblástico, Fibroma Ameloblástico, Fibro-odontoma Ameloblástico, Odontoma y Capuchón pericoronario. (A) Fibrodentinoma ameloblástico con positividad (++) en retículo estrellado. (B) Fibroma ameloblástico con positividad (+) en el retículo estrellado. (C) Fibro-odontoma ameloblástico que muestra positividad (++) en zonas de retículo estrellado y ameloblastos. (D) Fibro-odontoma Ameloblástico donde se observa positividad en islas epiteliales continuas con la formación de estructuras mineralizadas. (E) Odontoma, que resultó negativo para inmunoexpresión de proteínas. (F) Capuchón pericoronario con positividad (+) en tejidos epiteliales odontogénicos. Inmunohistoquímica, MOC-31, A, B, C, D, E, F: 20x.

FIGURA 16. Inmunoexpresión de Conexina 43 en el Fibroma Ameloblástico, Fibro-odontoma Ameloblástico y Odontoma. (A) Fibroma Ameloblástico con positividad (++) en células mesenquimales odontogénicas. (B) Fibro-odontoma ameloblástico con tinción positiva (++) en ameloblastos y células mesenquimales odontogénicas. (C) Odontoma, que resultó negativo para inmunoexpresión de proteínas. Inmunohistoquímica, Cx-43, A: 9x, B, C: 20x.

FIGURA 17. Inmunoexpresión de Ki-67 en el Fibroma Ameloblástico, Fibro-odontoma Ameloblástico y Odontoma. (A) Fibroma ameloblástico con positividad nuclear en el 5% de las células, con tinción en células ameloblásticas. (B) Fibroodontoma ameloblástico con inmunoexpresión del 4,5%, involucrando tanto ameloblastos como células mesenquimales odontogénicas. (C) Odontoma, que resultó negativo para inmunoexpresión de proteínas. Inmunohistoquímica, Ki-67, A, B, C: 20x.

Tablas

TABLA 1. Características generales de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCHI*, *CAVI* y *CTNNB1*. Se detalla el tipo de gen, la localización cromosómica, la vía de señalización junto con la proteína y sus funciones (Williams y Terence, 2005; Koike y col., 2010; Farias y Gomes, 2012; Brown y col., 2014; Sweeney y col., 2014; Diniz y col., 2015; Twigg y col., 2016; Kim S, 2019; You y col., 2019)

TABLA 2. Características de los biomarcadores. Información extraída de los kits inmunohistoquímicos de cada biomarcador utilizado

TABLA 3. Escala semicuantitativa utilizada para el conteo inmunohistoquímico de Cav-1, MOC-31 y Cx-43 (Bologna-Molina y col., 2017)

TABLA 4. Mutaciones reportadas de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en patologías de la esfera bucomaxilar (Williams y Terence, 2005; Koike y col., 2010; Farias y Gomes, 2012; Brown y col., 2014; Sweeney y col., 2014; Diniz y col., 2015; Twigg y col., 2016; Kim S, 2019; You y col., 2019)

TABLA 5. Operacionalización de las variables

TABLA 6. Características clínico-patológicas de los tumores odontogénicos. Datos obtenidos de los archivos del Laboratorio de Anatomía Patológica del Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología de la UdelaR

TABLA 7. Resumen de las características clínico-patológicas de los tumores odontogénicos. Datos obtenidos de los archivos del Laboratorio de Anatomía Patológica del Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología de la UdelaR

TABLA 8. Expresión inmunohistoquímica. Localización y cuantificación tisular de la expresión de Cav-1, MOC-31, Cx-43 y Ki-67 en el Fibrodentinoma ameloblástico, Fibro-odontoma ameloblástico, Fibroma ameloblástico, Odontoma y Capuchón pericoronario

TABLA 9. Resultados globales e individuales de inmunoexpresión. Porcentaje global e individual de la expresión para Cav-1, MOC-31, Cx-43 y Ki-67 en los Fibromas ameloblásticos, Fibro-odontomas ameloblásticos/Fibrodentinomas ameloblásticos, Odontomas y Capuchones pericoronarios

TABLA 10. Modelo de regresión logística con efectos mixtos. Modelo utilizado para comparar el comportamiento de los marcadores según la variable: muestra (Fibrodentinoma ameloblástico / Fibro-odontoma ameloblástico, Fibroma ameloblástico, Odontoma, Capuchones pericoronarios), género y edad Se muestran únicamente los factores que inciden sobre la expresión de los biomarcadores

TABLA 11. Comparaciones múltiples post-hoc y pruebas de Mann-Whitney. Comparaciones múltiples post-hoc de las expresiones inmunohistoquímicas en las muestras de Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico / Fibro-odontoma ameloblástico, Odontoma y Capuchón pericoronario, considerando las variables edad, sexo y localización. Se describe el grado de semejanza en la expresión inmunohistoquímica y se muestran los p-valor significativos de las pruebas

TABLA 12. Características de los primers diseñados para las secuenciaciones de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1*. Diseño realizado considerando las mutaciones reportadas en la bibliografía para cada gen (Williams y Terence, 2005; Koike y col., 2010; Farias y Gomes, 2012; Brown y col., 2014; Sweeney y col., 2014; Diniz y col., 2015; Twigg y col., 2016; Kim S, 2019; You y col., 2019)

TABLA 13 Análisis de las secuencias de los primers utilizados para PCR y los parámetros de diseño. Se detalla el análisis de las horquillas (ΔG , T_m , ΔH y ΔS), el ΔG de los homodímeros y el ΔG de los heterodímeros, obtenidos mediante *Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies, USA)

TABLA 14 Análisis de las secuencias de los primers utilizados para PCR y los parámetros de diseño. Se detalla el análisis de las horquillas (ΔG , T_m , ΔH y ΔS), el ΔG de los homodímeros y el ΔG de los heterodímeros, obtenidos mediante *Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies, USA)

TABLA 15. Características de los primers diseñados para las RT-qPCR de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI*, *CTNNB1* y *GAPDH*. Utilizando el programa de libre acceso *Primer-BLAST NCBI*

TABLA 16. Concentración de ARN (ng/ μ L) y ADN copia (ng/ μ L) en cada una de las muestras correspondientes a tumores odontogénicos analizados y a mucosa bucal, esta última empleada como control endógeno

TABLA 17. Niveles de expresión de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en las muestras de Fibro-odontoma ameloblástico, Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico y Odontoma

TABLA 18. Calidad y concentración de ADN (ng/ μ L) obtenida posteriormente al proceso de extracción en cada una de las muestras correspondientes a tumores odontogénicos analizados y a mucosa bucal, esta última empleada como control endógeno

TABLA 19. Resultados de las secuenciaciones de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1*, considerando las mutaciones reportadas en la bibliografía para cada gen, en el Fibro-odontoma ameloblástico, Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico y Odontoma (Williams y col., 2005; Koike y col., 2010; Farias y col., 2012; Brown y col. 2014; Sweeney y col. 2014; Diniz y col. 2015; Twigg y col. 2016; Kim y Jeong, 2019; You y col. 2019)

Gráficos

GRÁFICO 1. Nivel de expresión génica relativa del ARNm de *SMO*, *PTCH1*, *CTNNB1* y *CAVI* en FA, FDA, FOA y O

GRÁFICO 2. Expresión génica de *BRAF wild tipe* y mutado en FA, FDA, FOA y O (Huang y col., 2024)

GRÁFICO 3. Cromatogramas representativos de las secuenciación de los genes *SMO*, *PTCH1*, *CTNNB1* y *CAVI*, en los que se observan secuencias *wild tipe* en FA, FDA, FOA y O. (A) *PTCH1 wild tipe*. (B) *SMO wild tipe*. (C) *CTNNB1 wild tipe*. (D) *CAVI wild tipe*.

GRÁFICO 4. Cromatogramas representativos de las secuenciación de *BRAF*, en los que se observan secuencias *wild tipe* o mutada en FA, FDA, FOA y O. (A) *BRAF mutado*. (B) *BRAF wild tipe*

Lista de abreviaciones

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

CAV Caveolina

CAV-1 Caveolina 1

CP Capuchón pericoronario

CX Conexina

CX-43 Conexina 43

FA Fibroma ameloblástico

FDA Fibrodentinoma ameloblástico

FOA Fibro-odontoma ameloblástico

GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

MAPK proteínas quinasas activadas por mitógenos

MB Mucosa bucal

O Odontoma

OMS Organización Mundial de la Salud

PCR Por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*. Traducido al español, Reacción en cadena de la polimerasa

PTCH1 Patched 1

RT-QPCR Por sus siglas en inglés, *Quantitative reverse transcription PCR*. Traducido al español, Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa.

SHH Sonic Hedgehog

SMO Por sus siglas en inglés, *Smoothened*

SNV Por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Variant*. Variante de nucleótido único.

TO Tumor odontogénico

UDELAR Universidad de la República

Resumen

El estudio de los tumores odontogénicos (TO), como el fibroma ameloblástico (FA), el fibrodentinoma ameloblástico (FDA), el fibro-odontoma ameloblástico (FOA) y el odontoma (O), resulta de particular interés debido a su localización exclusiva en la región maxilofacial y a las implicancias terapéuticas que pueden derivar en tratamientos radicales. En este contexto, el odontólogo cumple un rol clave en la detección temprana de estas lesiones. Sin embargo, la falta de una clasificación homogénea y las modificaciones introducidas por la Organización Mundial de la Salud en 2017 y 2022 dificultan la comprensión epidemiológica y biológica de estos tumores, especialmente en lo que respecta a la naturaleza de entidades como el FOA y el FDA, cuya independencia como neoplasias continúa siendo motivo de debate, debido a que fueron eliminadas como entidades independientes e incluidas como estadios evolutivos del O.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal analizar la inmunoeexpresión de las proteínas Ki-67, Cav-1, MOC-31 y Cx-43, así como la expresión génica y la presencia de mutaciones en los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAV1* y *CTNNB1* en FA, FDA, FOA y O. Se realizó un estudio observacional, analítico, transversal y retrospectivo sobre una muestra de 20 casos (8 FA, 5 FOA, 1 FDA y 6 O) provenientes del archivo del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología (UdelaR) del Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral. Se emplearon técnicas inmunohistoquímicas y de biología molecular, junto con análisis estadísticos apropiados, para evaluar asociaciones entre variables clínico-patológicas y los perfiles de expresión observados.

Los resultados evidenciaron que los TO se presentaron con mayor frecuencia en mandíbula, en pacientes jóvenes y predominantemente en hombres. A nivel inmunohistoquímico, se observaron diferencias significativas en la expresión de biomarcadores entre los distintos tipos tumorales, destacándose que los FA, FDA y FOA compartieron perfiles de expresión similares entre sí, mientras que los O mostraron niveles de expresión menores. Este patrón sugiere un comportamiento biológico diferencial entre estas entidades. Asimismo, se observó una tendencia a la disminución de la expresión de los biomarcadores con la edad, particularmente para MOC-31 y Cav-1.

En relación con el análisis genético, los resultados mostraron patrones heterogéneos de expresión génica, con ausencia, niveles basales y leves variaciones de sobreexpresión o subexpresión según el tipo tumoral. Aunque no se alcanzó significación estadística, se identificaron tendencias que diferencian a los FA, FDA y FOA de los O. En

cuanto al análisis mutacional, no se detectaron mutaciones previamente reportadas en los genes *PTCH1*, *SMO*, *CTNNB1* y *CAVI*. Sin embargo, el gen *BRAF* presentó la mutación V600E en todos los casos de FA, FDA y FOA, mientras que los O mostraron exclusivamente la variante wild-type, lo que refuerza la existencia de diferencias moleculares entre estos grupos.

En conjunto, estos hallazgos aportarían evidencia que sugiere que, si bien no se identificaron mutaciones en algunos genes clave, existen patrones de expresión e immunoexpresión compartidos entre algunos de los FA, FDA y FOA que los diferencian de los O. Estas similitudes, aunque sin significación estadística, podrían constituyen hallazgos exploratorios que podrían orientar futuras investigaciones destinadas a esclarecer su relevancia biológica. La ausencia de resultados estadísticamente significativos podría atribuirse, al menos en parte, al tamaño muestral limitado, lo cual constituye una de las principales limitaciones. No obstante, este estudio sienta las bases para futuras investigaciones con mayor número de casos, orientadas a profundizar en los mecanismos moleculares implicados y a contribuir a una clasificación más precisa de los TO.

Palabras claves

Tumor odontogénico, Ki-67, Caveolina 1, MOC-31, Conexina 43, *BRAF*, *SMO*, *CAVI*, *CTNNB1*, *PATCHED1*.

Abstract

The study of odontogenic tumors (OT), such as ameloblastic fibroma (AF), ameloblastic fibrodentinoma (AFD), ameloblastic fibro-odontoma (AFO), and odontoma (O), is of particular interest due to their exclusive location in the maxillofacial region and the therapeutic implications that can lead to radical treatments. In this context, dentists play a key role in the early detection of these lesions. However, the lack of a standardized classification and the modifications introduced by the World Health Organization in 2017 and 2022 hinder the epidemiological and biological understanding of these tumors, especially regarding the nature of entities such as AFO and AFD, whose independent status as neoplasms remains a subject of debate.

The main objective of this work was to analyze the immunoexpression of the Ki-67, Cav-1, MOC-31 and Cx-43 proteins, as well as gene expression and the presence of

mutations in the *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* and *CTNNB1* genes in FA, FDA, FOA and O. An observational, analytical, cross-sectional, and retrospective study was conducted on a sample of 20 cases from the archives of the Pathology Laboratory of the Faculty of Dentistry (UdelaR). Immunohistochemical and molecular biology techniques, along with appropriate statistical analyses, were used to evaluate associations between clinicopathological variables and the observed expression profiles.

The results showed that odontogenic tumors OT was more frequently found in the mandible, in young patients, and predominantly in men. At the immunohistochemical level, significant differences in biomarker expression were observed among the different tumor types. Notably, FA, FDA, and FOA tumors shared similar expression profiles, while O tumors showed lower expression levels. This pattern suggests differential biological behavior among these entities. A trend toward decreased biomarker expression with age was also observed, particularly for MOC-31 and Cav-1.

Regarding the genetic analysis, the results showed heterogeneous gene expression patterns, with absence, basal levels, and slight variations of overexpression or under expression depending on the tumor type. Although statistical significance was not reached, trends were identified that differentiate FA, FDA, and FOA tumors from O tumors. As for the mutational analysis, no mutations were detected in the *PTCH1*, *SMO*, *CTNNB1*, and *CAVI* genes. Regarding mutational analysis, no previously reported mutations were detected in the *PTCH1*, *SMO*, *CTNNB1*, and *CAV1* genes. However, the *BRAF* gene presented the V600E mutation in all cases of FA, FDA, and FOA, while the O group exclusively showed the wild-type variant, reinforcing the existence of molecular differences between these groups.

Taken together, these findings provide evidence suggesting that, although mutations were not identified in some key genes, there are shared expression and immunoexpression patterns among some of the FA, FDA, and FOA groups that differentiate them from the O group. These similarities, although not statistically significant, could have predictive value and contribute to a better understanding of their biological behavior. The lack of statistically significant results could be partly explained by the limited sample size. Nevertheless, this study lays the groundwork for future research with a larger number of cases, aimed at further investigating the molecular mechanisms involved and contributing to a more precise classification of TO.

Keywords

Tabla de contenido

<i>Capítulo 1 / Introducción</i>	<i>1</i>
1.1. Justificación y planteamiento del problema de investigación	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Metodología.....	3
1.4. Principales resultados obtenidos.....	4
<i>Capítulo 2 / Estado de la cuestión: consideraciones teóricas y antecedentes</i>	<i>5</i>
2.1. Tumores Odontogénicos, odontogénesis.....	5
2.2. Clasificación de los Tumores Odontogénicos	13
2.3. Epidemiología, clínica e imagenología de los Tumores Odontogénicos.....	19
2.3.1. Epidemiología de los Tumores odontogénicos	19
2.3.2. Clínica de los Tumores odontogénicos.....	20
2.3.3 Imagenología de los Tumores odontogénicos	21
2.4. Tumores odontogénicos benignos mixtos	22
2.4.1. Fibroma ameloblástico	22
2.4.2. Fibrodentinoma ameloblástico	24
2.4.3. Fibro-odontoma ameloblástico	25
2.4.4. Odontoma	27
2.5. Generalidades de los Biomarcadores moleculares	28
2.5.1. Caveolina 1	29
2.5.2. MOC-31	31
2.5.3. Connexina 43	32
2.5.4. Ki-67	35
2.6. Generalidades del estudio genético en neoplasias	38
2.6.1. <i>BRAF</i>	38
2.6.2. <i>PTCH1</i> Y <i>SMO</i>	42
2.6.3. <i>CAVI</i>	46

2.6.4. <i>CTNNB1</i>	49
Capítulo 3 / Metodología	54
3.1. Consideraciones éticas.....	54
3.2. Diseño del estudio	55
3.3. Obtención de la muestra	55
3.4. Criterios de inclusión y exclusión	56
3.4.1. <i>Criterios de inclusión</i>	56
3.4.2. <i>Criterios de exclusión</i>	56
3.5. Calibración.....	56
3.6. Estudio inmunohistoquímico	57
3.6.1. <i>Procesamiento inmunohistoquímico</i>	57
3.6.2 <i>Procedimiento de Evaluación de la inmunomarcación</i>	58
3.6.3. <i>Análisis estadístico del estudio inmunohistoquímico</i>	60
3.7. Estudio genético	61
3.7.1. <i>Diseño de primers para PCR convencional y RT-qPCR</i>	61
3.7.2. <i>Procesamiento genético</i>	62
3.7.3. <i>Análisis estadístico de los resultados de la secuenciación y expresión genética</i>	63
3.8. Operacionalización de las variables	64
3.8.1. <i>Variables dependientes</i>	64
3.8.2. <i>Variables independientes</i>	64
3.9. Recursos y financiación.....	65
4.0. Declaración de conflictos de intereses.....	66
Capítulo 4 / Presentación y análisis de los resultados	66
4.1. Análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas de los tumores odontogénicos.....	66
4.2. Patrones de expresión de los biomarcadores en los tumores odontogénicos y su asociación con las variables clínico-patológicas	69
4.3. Diseño de primers para los genes <i>BRAF</i> , <i>SMO</i> , <i>PTCH1</i> , <i>CAVI</i> y <i>CTNNB1</i>	78

4.4. Cuantificación de la expresión génica para los genes <i>BRAF</i> , <i>SMO</i> , <i>PTCH1</i> , <i>CAVI</i> y <i>CTNNB1</i>	82
4.5. Determinación de mutaciones para los genes <i>BRAF</i> , <i>SMO</i> , <i>PTCH1</i> , <i>CAVI</i> y <i>CTNNB1</i>	86
<i>Capítulo 5 / Discusión</i>	89
5.1. Variables clínico-patológicas de los tumores odontogénicos.....	89
5.2. Expresión inmunohistoquímica	91
5.2.1. Expresión inmunohistoquímica de Cav-1.....	91
5.2.2. Expresión inmunohistoquímica de MOC-31	93
5.2.3. Expresión inmunohistoquímica de Cx-43	95
5.2.4. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67	96
5.3. Detección de mutaciones y determinación de la expresión genética.....	98
5.3.1. Gen <i>BRAF</i>	100
5.3.2. Gen <i>PTCH1</i> y <i>SMO</i>	104
5.3.3. Gen <i>CAVI</i>	107
5.3.4. Gen <i>CTNNB1</i>	109
5.4. Limitaciones del estudio.....	112
<i>Capítulo 6 / Consideraciones finales</i>	113
<i>Referencias bibliográficas</i>	116
<i>Apéndices</i>	141
<i>Anexos</i>	145

Capítulo 1 | Introducción

En el siguiente capítulo se introduce a la temática de la investigación. En primer lugar, se detalla la relevancia del estudio y se realiza el planteamiento del problema (§ 1.1). En segundo lugar, se describen los objetivos a cumplir (§ 1.2). Seguidamente, se resume la metodología de investigación utilizada para el cumplimiento de los objetivos (§ 1.3) y por último se muestran los principales resultados obtenidos (§ 1.4).

1.1. Justificación y planteamiento del problema de investigación

El interés por el estudio a nivel molecular y genético de los tumores odontogénicos (TO), como el fibroma ameloblástico (FA), fibrodentinoma ameloblástico (FDA), , fibro-odontoma ameloblástico (FOA) y odontoma (O), radica en que son neoplasias exclusivas de la región maxilofacial, donde el tratamiento en ocasiones suele ser radical. Debido a la localización exclusiva en la región maxilofacial, el odontólogo puede ser el primero en entrar en contacto con estas lesiones (las siglas léase en singular o plural dependiendo del contenido), (Bilodeau y Collins, 2017; Gomes y col., 2023).

La falta de una clasificación homogénea, de unificación de criterios, así como las modificaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en las clasificaciones de 2017 y 2022, impide tener un panorama epidemiológico real y actual de dichas lesiones (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022). De ahí la importancia que cobra este estudio en su fase inicial, donde se incorpora una casuística compuesta por FA, FDA, FOA y O, almacenados en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología, Universidad de la República (UdelaR).

El FOA y el FDA fueron eliminados de la clasificación de la OMS en 2017, justificando que, en la mayoría de los casos, representan estadios de desarrollo de O complejos o compuestos y, por lo tanto, retenerlos como neoplasias separadas sería ilógico (Speight y Takata, 2017). Anteriormente, en la clasificación de la OMS 2005, si se observaba dentina, las lesiones se denominaban FDA y si se observaba dentina y esmalte, la lesión se denominaba FOA (Barnes y col., 2005). Actualmente, aseguran que estas características son indistinguibles de un O en desarrollo y consideran que si las lesiones se dejaran crecer, continuarían madurando hasta convertirse en lesiones completamente calcificadas (Speight y Takata, 2017). Esto último, sigue siendo controversial y se reconoce que algunas de las lesiones pueden alcanzar grandes tamaños y aparecer en

grupos de edad que no siempre son compatibles con un hamartoma, además de poseer mutaciones *BRAF* V600E que no fueron detectadas en los O (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

Con el objetivo de determinar la inmunoeexpresión de las proteínas Ki-67, Caveolina 1 (Cav-1), MOC-31 y Conexina 43 (Cx-43), así como establecer patrones de expresión génica y mutaciones génicas para *BRAF*, *PATCHED1* (*PTCH1*), *SMOOTHENED* (*SMO*), *CAVI* y *CTNNB1*, este estudio se propone profundizar en el conocimiento de eventos moleculares y genéticos implicados en el desarrollo de los TO, con la finalidad de contribuir a futuras revisiones en la clasificación de estas neoplasias de origen odontogénico.

1.2. Objetivos

Objetivo general

Determinar el perfil inmunohistoquímico y molecular del FA, FDA, FOA y O, mediante la evaluación de la expresión de las proteínas Ki-67, Cav-1, MOC-31 y Cx-43, así como, la expresión génica y la detección de mutaciones en los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1*, utilizando como controles muestras de muestras de capuchón pericoronario (CP) y mucosa bucal (MB), respectivamente.

Objetivos específicos

Estudio inmunohistoquímico

- Cuantificar el nivel de expresión y determinar la localización de Ki-67, Cav-1, MOC-31 y Cx-43 en el FA, FDA, FOA y O.
- Comparar la expresión de Ki-67, Cav-1, MOC-31 y Cx-43 entre los FA, FDA, FOA y O; y la expresión con las variables clínico-patológicas.

Estudio genético

- Analizar los niveles de expresión génica de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en el FA, FDA, FOA y O; correlacionarlos con los niveles de expresión de los genes encontrados en las muestras de MB.
- Determinar la presencia de cambios a nivel de la secuencia de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en el FA, FDA, FOA y O.

1.3. Metodología

Se realizó un estudio analítico, observacional, transversal y retrospectivo con un muestreo no probabilístico, por conveniencia. La muestra constituida por 20 casos estuvo representada por todos los diagnósticos histopatológicos de 8 FA , 1 FDA y 5 FOA incluyendo seis con diagnóstico de O. Todas las muestras, incluyendo los controles (5 MB y 5 CP) se encontraban conservados en bloques de parafina y almacenados en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología Udelar, previo a enero de 2023.

Las variables independientes consideradas fueron edad, sexo y localización; mientras que las variables dependientes fueron la expresión de los biomarcadores Ki-67, Cav-1, MOC-31 y Cx-43; la expresión génica y los cambios en la secuencia de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en el FA, FDA, FOA y O. Se realizó el procesamiento inmunohistoquímico y genético de todas muestras en el Laboratorio de Patología Molecular Estomatológica de la Facultad de Odontología, Udelar, con el análisis estadístico correspondiente.

El análisis estadístico consistió en la comparación de la inmunoexpresión mediante estadísticas descriptivas (medias y desvío estándar), para las variables continuas y distribución de frecuencias para las variables categóricas.

Para evaluar el patrón de expresión de Ki-67, Cav-1, MOC-31 y Cx-43 se aplicó un modelo de regresión logística de efectos mixtos. Para comparar la expresión y establecer el grado de similitud se realizó un modelo de comparación múltiple post-hoc y la prueba de Mann-Whitney. Adicionalmente, se utilizaron tablas de contingencia con pruebas chi-cuadrado para evaluar la expresión y las variables clínico-patológicas. Se utilizó el paquete estadístico Stata y los resultados se consideraron significativos con un $p\text{-valor} \leq 0.05$.

El análisis de la expresión génica se determinó mediante el estudio de las variaciones en los niveles de transcripción utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Para la significación estadística se utilizó una prueba t para muestras no paramétricas. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizarán en el software GraphPad prism v.8.0.0. Para los datos obtenidos de la secuenciación se realizó el análisis del perfil alélico con el Programa de acceso libre Chromas Technelysium DNA Sequencing (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane QLD, Australia) y la base de datos NCBI.

1.4. Principales resultados obtenidos

En este estudio, los TO se localizaron 13 (65 %) en la mandíbula y 13 (65 %) en hombres, con una edad media de 23 años (rango de 4 a 68 años). Se observaron diferencias significativas en la expresión en función del tipo de tumor ($p=0,002$) y edad de paciente ($p=0,01$). Los valores de la expresión de los biomarcadores en todas las muestras (FDA/FOA, FA, O y CP), considerando las variables sexo, edad y localización, destaca diferencias significativas entre los FDA/FOA y O ($p=0,025$), y entre los FA y O ($p=0,008$). La expresión de los biomarcadores en los FDA/FOA se asemeja a la observada en los FA, mientras que la expresión inmunohistoquímica en los O fue menor que la de los FDA/FOA y FA. Para Cx-43, se encontró una diferencia significativa en la expresión entre O y FDA/FOA ($p=0,0022$) y entre O y FA ($p=0,0310$). También se observaron tendencias similares, sin significancia estadística, para MOC-31 al comparar O con FA ($p=0,0310$). En contraste, Cav-1 solo mostró diferencias significativas en la expresión entre CP y FDA/FOA ($p=0,0087$). Adicionalmente, se observó una tendencia a la disminución en la expresión de los biomarcadores a medida que aumentaba la edad, siendo esta relación más marcada para MOC-31 ($p=0,076$) y Cav-1 ($p=0,077$).

El análisis de la expresión génica se realizó en 14/20 TO y evidenció patrones heterogéneos entre las distintas lesiones, incluyendo ausencia de expresión, expresión basal y leves variaciones (sobrexpresión o subexpresión). Los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* mostraron perfiles diferenciales de expresión según el tipo tumoral, destacándose un patrón distinto entre algunos de los FA, FDA y FOA en comparación con los O. Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas, se identificaron tendencias relevantes entre los grupos analizados.

En relación con el análisis mutacional, realizado en 11/20 TO, el principal hallazgo del estudio fue la detección de la mutación *BRAF* V600E en la totalidad de los casos de FOA, FA y FDA, mientras que en el O se identificó exclusivamente la variante de tipo salvaje (wild-type), evidenciando un patrón diferencial según el tipo tumoral. En contraste, los resultados de la secuenciación mostraron un perfil homogéneo para los genes *PTCH1*, *SMO*, *CTNNB1* y *CAVI*, sin detección de las mutaciones previamente reportadas en ninguna de las muestras analizadas, observándose en todos los casos la variante de tipo salvaje. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la existencia de diferencias moleculares entre los FOA, FA y FDA en comparación con los O, destacando a *BRAF* como el principal marcador molecular diferencial identificado en este estudio.

Este trabajo está organizado en seis capítulos. Primeramente, capítulo 1, la presente Introducción. En el capítulo 2, Estado de la cuestión: consideraciones teóricas y antecedentes, se fundamenta la importancia sobre la falta de una clasificación homogénea y clara, así como lo relevante del estudio a nivel molecular y genético de las neoplasias odontogénicas. También se define al FA, FDA, FOA, O y se describen sus rasgos principales en cuanto a etiología, epidemiología, características clínico-patológicas e histológicas. Además, se detallan las características y roles, tanto en el desarrollo dentario como en los procesos neoplásicos, de las proteínas y genes en estudio. En el capítulo 3, Metodología, se describe el diseño metodológico empleado para la realización de la investigación. El capítulo 4, Presentación y análisis de los resultados, expone las principales observaciones y asociaciones encontradas. En el capítulo 5, Discusión, se analizan los resultados obtenidos a la luz de investigaciones previamente publicadas y de los fundamentos teóricos planteados. Finalmente, en el capítulo 6, Consideraciones finales, se destacan los principales hallazgos y conclusiones del estudio.

Capítulo 2 | Estado de la cuestión: consideraciones teóricas y antecedentes

Este capítulo describe el marco conceptual que fundamenta el estudio de los biomarcadores y genes en el FA, FDA, FOA y O. En primer lugar, se realizan algunas consideraciones sobre la odontogénesis (§ 2.1). Seguidamente, se muestran las clasificaciones de la OMS con el detalle de las sucesivas modificaciones (§ 2.2), las características epidemiológicas, clínicas e imagenológicas de los TO (§ 2.3) y la descripción de cada neoplasia odontogénica de forma individual (§ 2.4). Por último, se exponen las características fundamentales de cada biomarcador (§ 2.5) y gen (§ 2.6) utilizados en el estudio, resaltando su rol en el desarrollo dentario y en las patologías odontogénicas.

2.1. Tumores Odontogénicos, odontogénesis

Los TO son lesiones exclusivas de los huesos maxilares y se originan a partir de los tejidos asociados al desarrollo dentario o sus remanentes luego de finalizada la odontogénesis. El tejido anormal de estas neoplasias puede correlacionarse a menudo con el tejido normal similar presente en la odontogénesis, desde el origen a la erupción del diente. En los componentes ectodérmicos y mesenquimáticos de estos tumores se observa una elaborada proliferación celular y mutua estimulación, de igual forma que en las etapas

de la formación dentaria (Speight y Takata, 2017; Rajendra Santosh y Ogle, 2020; Escobar y col., 2023).

El desarrollo del diente incluye los procesos de formación, erupción dentaria y su integración con el soporte, los tejidos periodontales, los huesos maxilares, el sistema circulatorio y nervioso. Los gérmenes dentales son órganos compuestos por tejidos epiteliales y conectivos que derivan del ectodermo oral embrionario temprano y la cresta neural, respectivamente (Kwon y Jiang, 2018; Abramyan y col., 2021).

Una vez iniciado el desarrollo, los gérmenes dentales experimentan morfogénesis seguida de diferenciación en distintos tipos de células funcionales que formarán los principales tejidos duros de los dientes, esmalte y dentina. Además, una vez finalizada la formación de la corona se continúa formando la raíz, constituida por dentina y una capa externa de cemento. En esta etapa, los dientes también establecen la unión a los huesos maxilares a través del cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Durante este proceso, un tejido blando de origen ectomesenquimal permanece en el centro de los gérmenes, constituyendo el tejido pulpar (Kolenc, 2004; Kwon y Jiang, 2018).

El primer signo morfológico del desarrollo dentario es la aparición de un engrosamiento epitelial primario que ocurre en los procesos faciales en la quinta semana del desarrollo embrionario en humanos. Dicha banda epitelial da lugar primero a la lámina dental en el interior del arco dentario y poco después a la lámina vestibular en el exterior del arco dental que crecen hacia el ectomesénquima subyacente. Luego surgen los placodes dentales, estos son engrosamientos localizados en la lámina dental que inician la formación de los gérmenes. En humanos, toda la dentición decidua se inicia entre las 6 y 8 semanas de desarrollo embrionario (Kolenc, 2004; Kwon y Jiang, 2018).

En la etapa de inicio, los factores de transcripción, como Pitx 2, Foxi 3, Dlx 2, Lef 1 y p 63 (Mucchielli y col., 1997; Shirokova y col., 2013), así como las moléculas de señalización que pertenecen a la proteína morfogenética ósea, el factor de crecimiento de fibroblastos, las familias de Wnt y la vía de señalización Sonic Hedgehog (Shh), se expresan en el epitelio oral en los sitios de formación de dientes (Neubüser y col., 1997; Lena Sarkar y col., 1999). Los científicos han descubierto que, al inhibir experimentalmente cualquiera de estas vías de señalización en el embrión de ratón en la etapa de iniciación, el desarrollo de los dientes podría detenerse en la lámina o en la etapa de yema temprana. Por lo tanto, se cree que el ectodermo oral embrionario temprano proporciona las señales iniciales para el desarrollo de los dientes (Jussila y Thesleff, 2012).

Los gérmenes dentales experimentan morfogénesis a través de las etapas de yema o brote, casquete y campana. Estas etapas se denominan de acuerdo con la forma del germen dentario visto desde las secciones frontales (Kwon y Jiang, 2018).

Etapas de brote

La etapa de brote o yema se caracteriza por la gemación del epitelio dental desde la lámina dental hacia el ectomesénquima subyacente, con las células ectomesenquimales condensándose alrededor de la yema epitelial. Los gérmenes dentales en etapa de yema de los dientes deciduos son observados por primera vez en la octava semana intrauterina (figura 1) (Yoshimoto, 2014). Amplios estudios que utilizan modelos de ratón han demostrado que los factores de transcripción conservados evolutivamente en el mesénquima, como *Msx 1/2*, son esenciales para el desarrollo de los dientes alrededor de la etapa de yema (Satokata y Maas, 1994).

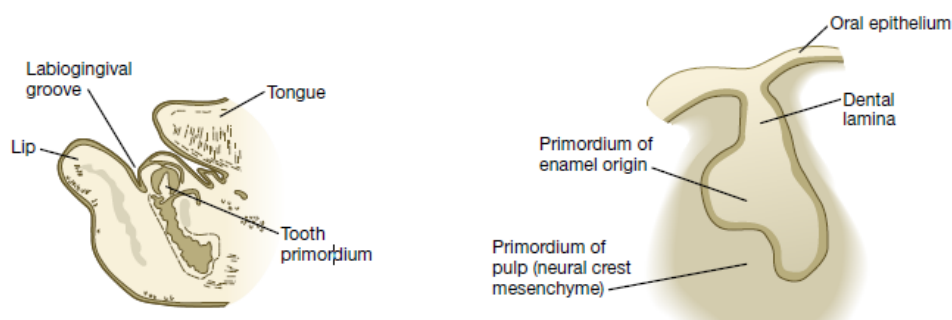


FIGURA 1. Desarrollo de un diente temporal. Sección parasagital de la mandíbula de un embrión humano de 14 semanas que muestra ubicación del primordio (izquierda). Primordio en la etapa de yema en un embrión de 9 semanas (derecha). Imagen obtenida de “Development of the teeth” (Yoshimoto, 2014)

El desarrollo del mesénquima dental está regulado por las vías de señalización de la proteína morfogenética ósea y el factor de crecimiento de fibroblastos, necesarias para la activación de señales mesenquimales claves para la morfogénesis de los gérmenes dentarios (Kwon y Jiang, 2018).

La señalización canónica de Wnt también es esencial para la morfogénesis temprana de los gérmenes dentales. Simultáneamente, con el cambio del potencial odontogénico del epitelio oral en el mesénquima dental, la expresión de *Lef 1*, un objetivo directo de la señalización Wnt canónica, es inicialmente activada en las placas dentales y posteriormente también activados en el mesénquima dental en la etapa de yema. La

inactivación específica de β -catenina, el transductor intracelular de la señalización Wnt canónica, ya sea en el epitelio o mesénquima resultó en la detención del desarrollo de los dientes en la etapa de brote (Liu y Millar, 2010).

A través de un análisis extenso de perfiles de expresión génica del transcriptoma completo del epitelio dental temprano y los tejidos mesenquimáticos junto con las interacciones epitelio-mesenquimales recíprocas, O'Connell y col. (2012) identificaron un circuito de retroalimentación Wnt Bmp como el principal regulador de la expresión de las moléculas de señalización que controlan la morfogénesis de los gérmenes dentales tempranos, incluidas la proteína morfogénica ósea, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de fibroblastos y Activina-A (O'Connell y col., 2012).

Etapa de Casquete

La etapa de casquete debe su nombre a la forma del componente epitelial del germen que se asemeja a una tapa colocada sobre una agregación redondeada ectomesenquimática. Este componente epitelial se denomina órgano del esmalte y se diferenciará en ameloblastos productores del esmalte dental. La agregación esférica ectomesenquimática se denomina papila dental y dará origen a la dentina y pulpa. Otro grupo de células ectomesenquimales, denominado folículo o saco dentario, encapsula el órgano del esmalte y el tejido de la papila dental (Kwon y Jiang, 2018). Por lo tanto, en la etapa de capuchón (figura 2), el germen dentario está compuesto por el órgano del esmalte, la papila dental y el folículo dental. Los vasos sanguíneos se encuentran alrededor del germen (en el folículo dentario) y entran en la papila dental en la etapa de capuchón (Yoshimoto, 2014). Las fibras nerviosas se encuentran en el mismo sitio que los elementos vasculares, pero no entran a la papila dental hasta la etapa de campana cuando la dentinogénesis comienza (Kwon y Jiang, 2018).

Una estructura importante presente en el órgano del esmalte en la etapa de casquete es el nudo del esmalte, grupo de células que no se dividen y que expresan p21, también conocido como inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1. El nudo de esmalte primario se forma justo antes de la transición de la etapa de yema a la de casquete en la punta distal de la yema del diente y sirve como un centro de señalización, donde Wnts y las señales Shh se secretan localmente. Actualmente se cree que el nudo de esmalte promueve el crecimiento de las células epiteliales dentales circundantes y, por lo tanto, regula el plegado del órgano del esmalte para formar el "casquete" y posteriormente la forma de "campana", finalmente organizando el patrón cuspal de la corona. La vía de

señalización Shh juega un papel crucial en la morfogénesis dental durante la transición de casquete a campana (Wang y col., 2007; Kwon y Jiang, 2018).

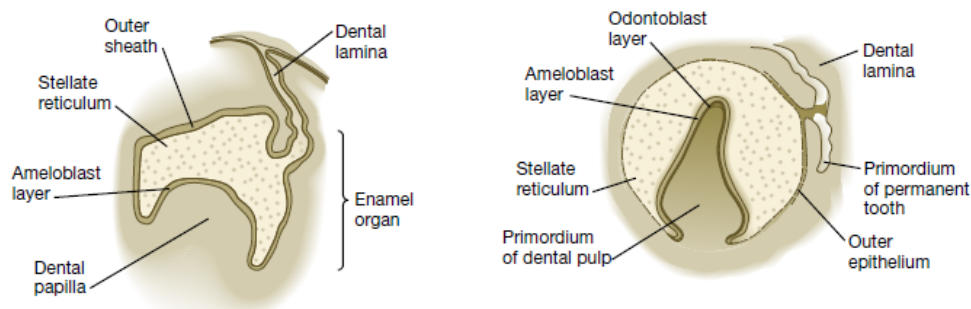


FIGURA 2. Etapa de capuchón dental en un embrión de 11 semanas que muestra el órgano del esmalte (izquierda). Primordio del incisivo central en la etapa de campana en un embrión de 14 semanas antes del depósito de esmalte o dentina (derecha). Imagen obtenida de “Development of the teeth” (Yoshimoto, 2014)

Etapa de campana

La etapa de campana se caracteriza por el crecimiento del órgano del esmalte en forma de campana a medida que la parte inferior se profundiza y recubre la papila dental, mientras que, el saco dental permanece encapsulando tanto el órgano del esmalte como la papila dental como se observa en la figura 2. En esta etapa ocurren dos eventos importantes, la histodiferenciación y la morfodiferenciación. La histodiferenciación se refiere a la diferenciación de las células del órgano del esmalte en cuatro grupos celulares según su morfología y función: el epitelio interno del órgano del esmalte, el estrato intermedio, el retículo estrellado y el epitelio externo del órgano del esmalte. Las células del epitelio interno tienen forma columnar y las células epiteliales que componen la superficie inferior del órgano del esmalte se colocan adyacentes a la papila dental (Kwon y Jiang, 2018).

Las células del retículo son células de forma estrellada situadas en el centro del órgano del esmalte que sintetizan y secretan glicosaminoglicanos en el espacio intercelular que atraen agua hacia el espacio intercelular. El agua intercelular separa las células, mientras que las adherencias intercelulares permanecen a través de los desmosomas, lo que da como resultado una apariencia en forma de estrella de las células del retículo estrellado (Peterkova y col., 2014; Kwon y Jiang, 2018).

El estrato intermedio es una capa estratificada de células situada entre el epitelio interno y el retículo estrellado. Las células del estrato intermedio muestran una alta

actividad fosfatasa alcalina y actúan, junto con las células del epitelio interno del esmalte, como una unidad funcional única en la formación del esmalte. Las células intermedias son células epiteliales en forma de cubo en la periferia del órgano del esmalte. Las células del asa cervical continúan proliferando a través de la etapa de la corona y juegan un papel crucial en la formación de la raíz (Peterkova y col., 2014; Kwon y Jiang, 2018).

La morfodiferenciación se refiere a la morfogénesis del órgano del esmalte, a través del plegado de la capa de epitelio interno, en una estructura tridimensional que se asemeja a la futura corona del diente. Durante la transición de la etapa de casquete a la etapa de campana, el nudo de esmalte primario desaparece por apoptosis y los nudos secundarios de esmalte comienzan a formarse dentro del órgano del esmalte en las ubicaciones futuras de las cúspides. Al igual que el nudo de esmalte primario, los nudos secundarios de esmalte consisten en células no proliferativas y actúan como centros de señalización que regulan las tasas diferenciales de proliferación en el epitelio interno del esmalte y el plegamiento del órgano del esmalte, determinando así las posiciones y el tamaño de las cúspides de los dientes molares (Vaahtokari y col., 1996).

Formación de la corona

La etapa de formación de la corona (figura 3) se caracteriza por la deposición de los dos tejidos mineralizados principales, el esmalte y la dentina producidos por los ameloblastos y los odontoblastos, respectivamente (Yoshimoto, 2014).

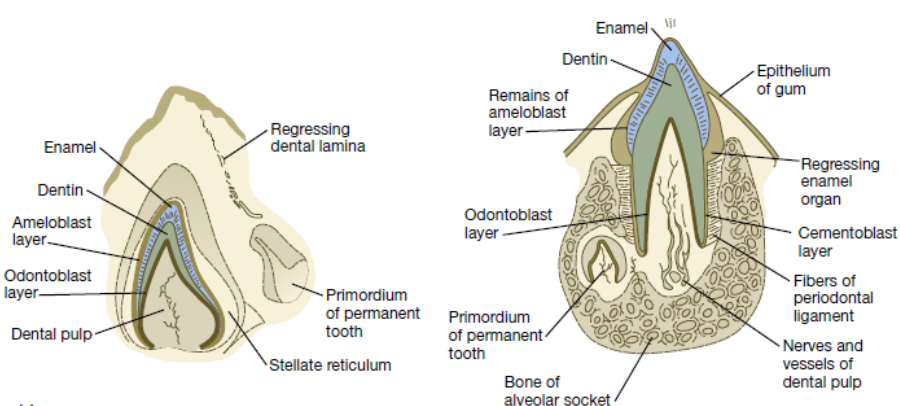


FIGURA 3. Incisivo no erupcionado en un feto a término (izquierda). Incisivo parcialmente erupcionado que muestra el primordio de un diente permanente cerca de su raíz (derecha). Imagen obtenida de “*Development of the teeth*” (Yoshimoto, 2014)

Estos eventos requieren histodiferenciación terminal del epitelio interno del esmalte y de la papila dental en ameloblastos y odontoblastos, respectivamente, a través del progreso a través de la etapa presecretora, etapa secretora y etapa de maduración

(figura 4) (Yoshimoto, 2014). Por lo tanto, esta etapa también se denomina etapa de campana avanzada tardía o etapa de maduración. La histodiferenciación y la formación de esmalte / dentina comienzan en la interfaz entre el epitelio interno del esmalte y la papila dental (figura 5) (Yoshimoto, 2014). Comenzando en los puntos donde se desarrollarán las cúspides futuras, las células del epitelio interno se diferencian en preameloblastos, mostrando polarización y cese de la proliferación celular. Sus núcleos se ubican lejos de la papila dental, mientras que el complejo de Golgi se ubica más cerca de la papila dental. Estos cambios inducen la diferenciación de células ectomesenquimales indiferenciadas adyacentes en la papila dental que se convierten en preodontoblastos en forma de columna. Los preodontoblastos se diferencian aún más en odontoblastos y sintetizan y secretan una matriz orgánica basada en colágeno tipo I denominada predentina, y comienzan a migrar lejos de los preameloblastos adyacentes dejando detrás de sus procesos de odontoblastos, extensiones citoplasmáticas, en la matriz de dentina. Esto da como resultado la formación de los túbulos dentinarios. Una vez que los odontoblastos están completamente diferenciados, secretan la primera capa de matriz de predentina que desencadena la diferenciación terminal de los preameloblastos en ameloblastos. Los ameloblastos secretan una matriz orgánica en la capa de dentina recién formada que casi inmediatamente se mineraliza en la capa inicial del esmalte. Los ameloblastos migran lejos de la dentina y continúan depositando el esmalte en su camino. Además, de la predentina, los odontoblastos secretan proteínas no colágenas, como la dentina (Peterkova y col., 2014; Yoshimoto, 2014; Kwon y Jiang, 2018).

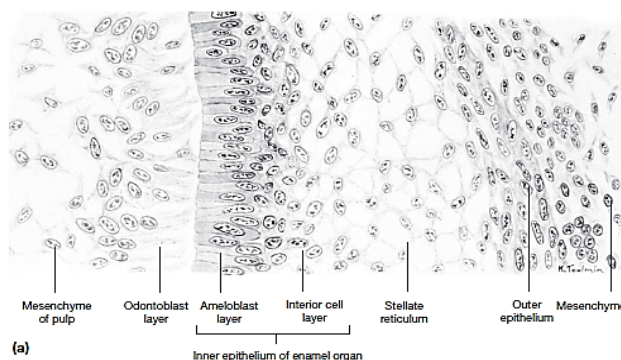


FIGURA 4. Aspecto celular del órgano del esmalte y la pulpa adyacente de los dientes en formación antes del comienzo de la deposición de esmalte y dentina. Imagen obtenida de *“Development of the teeth”* (Yoshimoto, 2014)

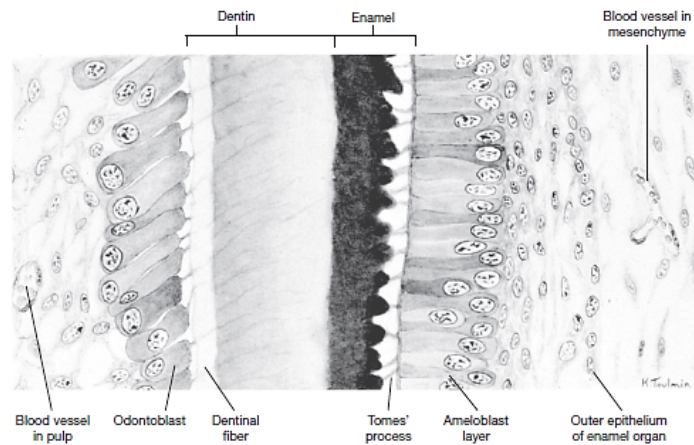


FIGURA 5. Aspecto celular del órgano del esmalte y la pulpa adyacente de los dientes en formación luego del comienzo de la deposición de esmalte y dentina. Imagen obtenida de “*Development of the teeth*” (Yoshimoto, 2014)

Formación de la raíz

La raíz consiste en dentina radicular y conductos radiculares que contienen la pulpa dental, constituida por células mesenquimales indiferenciadas, vasos sanguíneos y filetes nerviosos. Por fuera, la raíz es cubierta por cemento que proporciona unión al hueso alveolar a través de estructuras de tejido conectivo fibroso denominado ligamento periodontal. Los principales tejidos que contribuyen a la formación de la raíz son la vaina epitelial de Hertwig, la papila dental y el folículo dental (Li y col., 2017).

Una vez completada la formación de la corona, las células del asa cervical continúan proliferando y se convierten en la vaina que se extiende hacia el vértice de la futura raíz que encierra la papila dental, mientras interactúa continuamente con las células ectomesenquimales circundantes. Las células ectomesenquimales de la papila dental adyacentes a la capa interna de la vaina se diferencian en odontoblastos y forman la dentina de la raíz (Kwon y Jiang, 2018).

La vaina de Hertwig también es importante para la formación del cemento y el ligamento periodontal. A medida que avanza la formación de la raíz, las células del folículo dentario entran en contacto con la vaina, mientras que la misma se perfora en una estructura de red de malla. Esto permite que las células del folículo dental entren en contacto con la superficie de la dentina de la raíz e inducir a los cementoblastos a diferenciarse (Huang y col., 2009).

Más adelante, la vaina de Hertwig se desintegra rápidamente y se convierte en pequeños grupos de células epiteliales, conocidos como restos epiteliales de Malassez

que en el adulto persisten en el espacio del ligamento periodontal alrededor de la superficie de la raíz. De manera similar, otros remanentes del epitelio odontogénico, como los restos de Serres —derivados de la lámina dental— y el epitelio reducido del esmalte —remanente del órgano del esmalte—, pueden persistir en los tejidos maxilofaciales (Kwon y Jiang, 2018).

Estudios genéticos han identificado mutaciones asociadas a diversos trastornos del desarrollo dentario en humanos, que en ocasiones, se asocia con otros defectos del nacimiento. Mediante el uso de varios modelos experimentales genéticos, los científicos han descubierto mecanismos moleculares subyacentes que controlan el desarrollo de los dientes. Estos han demostrado que el desarrollo dentario implica interacciones entre los tejidos epiteliales y ectomesenquimales, mediados por múltiples vías de señalización y factores de transcripción que se comparten con el desarrollo y/o mantenimiento de otros órganos. La aberración en las complejas redes de señalización que regulan el desarrollo de los dientes puede resultar en diversos defectos y anomalías dentales (Kwon y Jiang, 2018).

2.2. Clasificación de los Tumores Odontogénicos

Los TO han sido objeto de frecuentes estudios en la literatura científica. Sin embargo, debido principalmente a las discusiones en las clasificaciones de los mismos y las guías utilizadas, es que algunas decisiones terapéuticas pueden ser discutidas. Con este fin, la OMS en 1952 decidió crear un método de clasificación para estas lesiones. Así, tras un acuerdo internacional común, en 1971, se lanzó la primera tabla relativa a esta clasificación (Kramer, 1972). A lo largo de los años, tras los avances tecnológicos en términos de investigación científica, se realizaron nuevos descubrimientos que tuvieron un impacto directo en la clasificación de 1971, publicando posteriormente las clasificaciones de 1992 y 2005 (Le Charpentier, 1994; Barnes y col., 2005). Seguidamente, en relación a los nuevos consensos y descubrimientos, se propusieron cambios con respecto a los métodos utilizados en estas dos últimas las clasificaciones, para finalmente llegar a las más recientes, publicadas en 2017 en la cuarta edición de la revista y en el 2022 (Philipsen y Reichart, 2002; Johnson y col., 2014; Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

Los TO pueden clasificarse de acuerdo al tejido de origen en epiteliales, mesenquimáticos y mixtos, pero también es importante su clasificación de acuerdo al comportamiento biológico, donde las diferentes patologías se tipifican como benignas y malignas; mientras que, en los TO se incorpora el término “localmente agresivo”,

característica propia de neoplasias benignas como el ameloblastoma y mixoma que poseen la capacidad de infiltrar los tejidos vecinos, sobrepasando los aparentes límites imagenológicos (Mosqueda-Taylor y col., 1997; Barnes y col., 2005; Speight y Takata, 2017).

Como ya fue descrito, durante la odontogénesis ocurren influencias ejercidas por parte del mesénquima hacia el epitelio; de los odontoblastos al epitelio interno del órgano del esmalte y en el inicio de la formación de los tejidos duros dentarios; fenómeno que se conoce como inducción y ha sido observado en los TO, dando origen a la clasificación de tumores epiteliales con mínimo poder inductor como el ameloblastoma o con gran poder inductor como el O. De acuerdo a estos criterios de benignidad, malignidad y actividad inductiva, es que se establecen las clasificaciones más recientes propuestas por la OMS (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

En 2017 la OMS y la Agencia Internacional de investigación del cáncer, como resultado de un consenso de expertos con una amplia experiencia en patología odontogénica publica la cuarta edición de la clasificación. El objetivo perseguido fue simplificar las clasificaciones y utilizar criterios de definición que puedan ser utilizados globalmente en todas las situaciones (Speight y Takata, 2017). El cambio más significativo fue incluir en una misma clasificación los TO, los tumores no odontogénicos, las lesiones fibroósas y los quistes, con la finalidad de que esta clasificación sea el único texto que clasifique y defina la gama completa de lesiones que pueden afectar los huesos maxilares (Speight y Takata, 2017).

El grupo de la OMS en consenso consideró cuidadosamente la terminología de las lesiones, para asegurar que los nombres utilizados reflejaran la verdadera naturaleza de las entidades. Por esta razón, esta edición introduce al queratoquiste odontogénico y al quiste odontogénico calcificante (Gorlin) a la clasificación de quistes odontogénicos, rechazando su denominación como verdaderas neoplasias (Barnes y col., 2005; Speight y Takata, 2017). Incluyen nuevas entidades como el carcinoma odontogénico esclerosante y el tumor odontogénico primordial, mientras que se han eliminado otras lesiones como el FDA, el FOA y el Odontoameloblastoma. También se ha restaurado al fibroma cemento-osificante como lesión de origen odontogénico, dado que se encuentra en zonas donde se alojan los dientes (Speight y Takata, 2017).

La clasificación de la OMS de 2005 (Barnes y col., 2005) reconocía para los TO malignos a los sarcomas y carcinomas odontogénicos, mientras que identificaba tres grupos para los TO benignos (figura 6):

- tumores con epitelio odontogénico y estroma fibroso, sin ectomesénquima odontogénico.
- tumores con epitelio odontogénico y ectomesénquima odontogénico con o sin formación de tejidos duros dentarios.
- tumores con ectomesénquima odontogénico o mesénquima con o sin inclusión de epitelio odontogénico.

La clasificación mencionada anteriormente se consideró como demasiado compleja y por lo tanto en 2017, se reconoce la tradicional subdivisión de TO epiteliales, mesenquimáticos y mixtos, cambio que se mantiene en la última edición del 2022 (figura 7) (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022)

En la clasificación de 2017 el ameloblastoma tuvo modificaciones de terminología, mientras que en 2005 se clasificaban en sólido/multiquístico, extraóseo/periférico, desmoplásico y unquístico, en 2017 se simplificó y establecieron los siguientes subtipos: ameloblastoma, ameloblastoma unquístico y ameloblastoma extraóseo/periférico. El adjetivo "sólido/multiquístico" para el ameloblastoma convencional se descartó en esta edición al considerar que no tenía significación biológica y podía conducir a confusión con el ameloblastoma unquístico. El ameloblastoma desmoplásico se reconoció como un subtipo histológico y no como una entidad clínico-patológica independiente, porque a pesar de sus características clínicas únicas y a veces radiográficas, se comportaba como cualquier ameloblastoma convencional (Barnes y col., 2005; Speight y Takata, 2017).

A su vez, el Odontoameloblastoma que fue incluido en la clasificación de 2005, es eliminado como entidad aparte, ya que si bien la asociación de un ameloblastoma con un O está bien establecida y aceptada, el grupo de consenso estableció que no se justificaba denominarla como una entidad separada. El Odontoameloblastoma también se ha eliminado debido a que los datos disponibles sobre esta condición se consideraron insuficientes para justificar su reconocimiento como entidad genuina, las lesiones informadas con esta denominación probablemente sean una mezcla coincidente de un ameloblastoma con otro tumor odontogénico epitelial, con un O u otro tumor en desarrollo (Barnes y col., 2005; Speight y Takata, 2017).

El FOA y el FDA fueron descartados por los expertos como entidades bien definidas, justificando que en la mayoría de los casos, representan estadios de desarrollo de O y, por lo tanto, retenerlos como entidades separadas sería ilógico (Barnes y col., 2005; Speight y Takata, 2017).

El TO queratoquístico se traslada a la categoría de quistes como Queratoquiste Odontogénico. Se concluyó que la mayoría de los casos de tumor odontogénico queratoquístico y tumor odontogénico quístico calcificante se comportan clínicamente como lesiones no neoplásicas y se tratan como quistes (Barnes y col., 2005; Speight y Takata, 2017).

Se han incorporado nuevas entidades como el Carcinoma odontogénico esclerosante, el carcinosarcoma odontogénico y el tumor odontogénico primordial. En cuanto a las lesiones óseas, dentro del grupo de fibromas osificantes, se agregó el prefijo “cemento” a la variante que se limita a los maxilares (Speight y Takata, 2017).

En el 2022 la OMS incorpora nuevas modificaciones (figura 8), reconociendo en el tumor odontogénico epitelial calcificante tres subtipos histopatológicos (células claras, quístico/microquístico y no calcificado/rico en células de Langerhans). Luego de ser omitido en la edición de 2017 como término descriptivo de ameloblastoma, el término "convencional" se reintrodujo en esta clasificación; se reconoce una nueva entidad separada de esta neoplasia denominada ameloblastoma adenoide, definida como una neoplasia epitelial caracterizada por una arquitectura cribosa y estructuras similares a ductos, con presencia frecuente de dentinoide (Vered y Wright, 2022).

Actualmente continúa la discusión sobre las modificaciones establecidas para el grupo de TO mixtos. Como en la clasificación de 2017, aún está en controversia el estado del FDA y FOA, ya que se presentan como lesiones intermedias entre el FA y el O. La OMS en el 2022, las sigue definiendo como O en desarrollo, aunque el FDA y FOA presentan mutaciones *BRAF* V600E similares al FA, mutación no detectada en los O. Además, varios casos de FDA y FOA muestran comportamiento biológico localmente agresivo, gran tamaño y recurrencia, elementos que se corresponden más con un comportamiento neoplásico más que tipo hamartoma. Se espera que un estudio molecular adicional aclare si el FDA y FOA son entidades separadas, lesiones intermedias con un espectro de comportamiento que finalmente resulta en la formación del O, o si son una mezcla de O en desarrollo y FA (Vered y Wright, 2022).

La única modificación incorporada para los TO mesenquimáticos benignos fue denominar al mixoma odontogénico con mayor cantidad de colágeno fibromixoma, previamente conocido como mixofibroma en la clasificación de 2017 (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

Dentro de las modificaciones para las neoplasias malignas odontogénicas, se define al carcinoma ameloblástico como un carcinoma odontogénico primario que histológicamente se asemeja al ameloblastoma y no como la contraparte maligna del ameloblastoma, como lo era en la clasificación de 2017 (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

Clasificación de los Tumores odontogénicos, OMS 2005

TUMORES BENIGNOS

Derivados del epitelio odontogénico con estroma fibroso maduro, sin ectomesénquima odontogénico:

- Ameloblastoma sólido multiquistico
- Ameloblastoma extraóseo, periférico
- Ameloblastoma desmoplásico
- Ameloblastoma unquistico
- Tumor odontogénico escamoso
- Tumor odontogénico epitelial calcificante
- Tumor odontogénico adenomatoide
- Tumor odontogénico queratoquistico

Derivado del epitelio odontogénico con ectomesénquima odontogénico, con/sin formación de tejido duro:

- Fibroma ameloblástico
- Fibrodentinoma ameloblástico
- Fibro odontoma ameloblástico
- Odontoma Compuesto o Complejo
- Odontoameloblastoma
- Tumor odontogénico quístico calcificante
- Tumor dentinogénico de células fantasmas

Derivado del mesénquima y/o ectomesénquima odontogénico con/sin epitelio odontogénico:

- Fibroma odontogénico
- Mixoma odontogénico/mixofibroma
- Cementoblastoma

TUMORES MALIGNOS

Carcinomas odontogénicos:

- Ameloblastoma metastásico maligno
- Carcinoma ameloblástico primario
- Carcinoma ameloblástico secundario, intraóseo
- Carcinoma ameloblástico secundario, periférico
- Carcinoma de células escamosas primario intraóseo, de tipo sólido
- Carcinoma de células escamosas primario intraóseo, derivado del tumor odontogénico queratoquistico.
- Carcinoma de células escamosas primario intraóseo, derivado de quistes odontogénicos
- Carcinoma odontogénico de células claras
- Carcinoma odontogénico de células fantasmas

Sarcomas odontogénicos:

- Fibrosarcoma ameloblástico
- Fibrodentinosarcoma ameloblástico
- Fibroodontosarcoma ameloblástico

FIGURA 6. Clasificación de los Tumores odontogénicos, OMS 2005 (Barnes y col., 2005)

Tumores odontogénicos y maxilofaciales óseos, OMS 2017

Carcinomas Odontogénicos

- Carcinoma ameloblástico
- Carcinoma intraóseo primario, NOS
- Carcinoma odontogénico esclerosante
- Carcinoma odontogénico de células claras
- Carcinoma odontogénico de células fantasmas

Carcinosarcoma odontogénico

Tumores odontogénicos epiteliales benignos

- Ameloblastoma
 - Ameloblastoma tipo uniuístico
 - Ameloblastoma tipo periférico/extraóseo
 - Ameloblastoma metastatizante
- Tumor odontogénico escamoso
- Tumor odontogénico epitelial calcificante
- Tumor odontogénico adenomatoide

Tumores odontogénicos epiteliales y mesenquimáticos mixtos benignos

- Fibroma ameloblástico
- Tumor odontogénico primordial
- Odontoma
 - Odontoma, tipo compuesto
 - Odontoma, tipo complejo
- Tumor dentinogénico de células fantasmas

Tumores odontogénicos mesenquimáticos benignos

- Fibroma odontogénico
- Mixoma/mixofibroma odontogénico
- Cementoblastoma
- Fibroma cemento-osificante

FIGURA 7. Clasificación de Tumores odontogénicos y óseos maxilofaciales, OMS 2017 (Speight y Takata, 2017)

Tumores odontogénicos y maxilofaciales óseos, OMS 2022

Tumores odontogénicos epiteliales benignos

- Tumor odontogénico adenomatoide
- Tumor odontogénico escamoso
- Tumor odontogénico epitelial calcificante
- Ameloblastoma
 - o Ameloblastoma extraóseo/periférico
 - o Ameloblastoma, unquístico
 - o Ameloblastoma, convencional
 - o Ameloblastoma adenoide
 - o Ameloblastoma metastásico

Tumores odontogénicos epiteliales y mesenquimáticos mixtos benignos.

- Odontoma
- Tumor odontogénico primordial
- Fibroma ameloblástico
- Tumor dentinogénico de células fantasmas

Tumores odontogénicos mesenquimales benignos

- Fibroma odontogénico
- cementoblastoma
- Fibroma cemento-osificante
- Mixoma odontogénico
-

Tumores odontogénicos malignos

- Carcinoma odontogénico esclerosante
- Carcinoma ameloblástico
- Carcinoma odontogénico de células claras
- Carcinoma odontogénico de células fantasma
- Carcinoma intraóseo primario
- Carcinosarcoma odontogénico
- Sarcomas odontogénicos

FIGURA 8. Clasificación de Tumores odontogénicos y óseos maxilofaciales, OMS 2022 (Vered y Wright, 2022)

2.3. Epidemiología, clínica e imagenología de los Tumores Odontogénicos

2.3.1. Epidemiología de los Tumores odontogénicos

Se desconoce la etiología de los TO benignos y malignos, la mayoría parecen surgir de novo, sin un factor causal aparente. Son lesiones raras que constituyen menos del 1 % de todas las neoplasias orales, la mayoría de estas son benignas, pero algunas muestran cierta recurrencia. Las neoplasias malignas odontogénicas a su vez, constituyen un porcentaje mínimo, ya que en las diversas series publicadas a nivel mundial su frecuencia varía entre 0,1 % y 6.1 % de todos los TO (Speight y Takata, 2017; Feria y col., 2019; Bianco y col., 2020). Se reporta que más del 95 % de todas las neoplasias odontogénicas son benignas, y que aproximadamente el 75 % de éstas estarían representadas por O,

ameloblastomas y mixomas, las cuales pueden considerarse como relativamente más frecuentes (Aregbesola y col., 2018; Tolentino, 2018).

Los estudios epidemiológicos sobre TO realizados en diferentes partes del mundo enfatizan la variación de la incidencia y el patrón de distribución. Se describe al ameloblastoma como el segundo tumor benigno más frecuente, mientras que el primero estaría representado por el O, con una incidencia anual estimada de 0,5 casos por un millón de habitantes según la OMS en 2017 (Speight y Takata, 2017), con incidencias más altas en África, China e India en comparación con el mundo occidental (Soluk-Tekkeşi y Wright, 2018).

En un estudio multicéntrico reciente que incluyó 4.399 TO provenientes de 20 centros de patología oral de diez países sudamericanos —entre ellos, el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Udelar—, se analizó de manera retrospectiva su frecuencia, características clínicas y distribución histopatológica. Sobre un total de 207.434 biopsias revisadas, los TO representaron el 2,1% de las muestras. La serie mostró un ligero predominio femenino (54,3 %) y una edad media al diagnóstico de 27,8 años, con mayor concentración de casos en la segunda década de la vida. La mayoría de los pacientes se encontraban asintomáticos (87,8 %), y casi todas las lesiones fueron intraóseas (97,3 %), afectando preferentemente la mandíbula, en particular su región posterior. Los tumores benignos fueron marcadamente predominantes (99,1 %), y tres entidades —O (38,5 %), ameloblastoma (34%) y mixoma odontogénico (8%)— concentraron más de las tres cuartas partes de los diagnósticos en la región (Schuch y col., 2025).

Conocer la epidemiología de los TO es importante, porque permite establecer su expresión en diversas poblaciones, identificar los grupos de riesgo y reconocer los posibles factores asociados a su desarrollo, así como establecer sistemas de diagnóstico diferencial. Con la identificación temprana de las características clínicas e imagenológicas de estas lesiones se contribuye a mejorar el pronóstico pues, a mayor tiempo de evolución, mayores son las destrucciones y afectaciones como deformidades faciales, parestesias, pérdida dental e incluso, la muerte (Alberto y col., 2018).

2.3.2. Clínica de los Tumores odontogénicos

Los TO constituyen un grupo heterogéneo de lesiones con gran variabilidad desde el punto de vista clínico e histopatológico, existiendo un subgrupo de tumores benignos con comportamiento biológico agresivo que debe ser considerado para su abordaje terapéutico (Feria y col., 2019).

La gran mayoría de los TO se presentan de forma intraósea dentro del esqueleto maxilofacial, mientras que los extra óseos ocurren casi siempre en la mucosa portadora de dientes. Las características clínicas de la mayoría de los TO benignos son inespecíficas, mostrando un crecimiento expansivo lento sin sintomatología evidente. Por el contrario, en los TO malignos el dolor comúnmente es el primer síntoma, seguido de una hinchazón que se desarrolla, pudiendo, incluso erosionar o atravesar la cortical de los huesos maxilares. Los tumores benignos centrales tienen un comienzo insidioso, lento, asintomático, mínima alteración funcional y sin repercusión sobre el estado general del paciente; pudiendo en su evolución llegar a tener grandes dimensiones y presentar deformación facial importante. Por lo cual el motivo de consulta más frecuente es la deformación maxilar o facial, ausencia de piezas dentarias o mal posiciones adquiridas (Johnson y col., 2014; Feria y col., 2019; Schuch y col., 2025).

Existen algunos de estos tumores que tienen mayor agresividad local, como el ameloblastoma o el mixoma, que si bien son tumores benignos, tienen un crecimiento rápido, agresivo, invasivo, penetrando en el tejido esponjoso de los huesos maxilares provocando una invasión ósea importante y este comportamiento no coincide con las características típicas de benignidad (Barnes y col., 2005; Johnson y col., 2014).

En general se presentan con mayor frecuencia en la mandíbula, en adultos jóvenes, sin predilección por el sexo, con una ligera tendencia al sexo masculino descrita por algunos autores, variaciones que se podrían corresponder a diferencias en los factores de riesgo y los determinantes sociales en cada población (Alberto y col., 2018).

2.3.3 Imagenología de los Tumores odontogénicos

Debido a que los TO pueden estar compuestos de tejidos duros y blandos, su aspecto imagenológico varía desde imágenes radiolúcidas, radiomixtas o radiodensas según las características histopatológicas de los tejidos, que pueden variar desde esmalte, dentina, cemento, hueso, tejido pulpar, etc. Las radiografías dentales intraorales suelen ser el primer medio para identificar la presencia de una lesión intraósea, la radiografía panorámica es obligatoria como componente del protocolo de diagnóstico, mientras que para definir el diagnóstico definitivo y orientación terapéutica de los TO en muchos casos se debe realizar tomografías computarizadas que abarquen tanto la topografía general como la estructura fina de la lesión, brindando así información valiosa sobre la extensión de la neoplasia, la tridimensionalidad y la relación con las estructuras vecinas y elementos nobles (Barnes y col., 2005; Alberto y col., 2018).

2.4. Tumores odontogénicos benignos mixtos

Los TO benignos mixtos, según la OMS en 2005, contienen una combinación de elementos epiteliales y mesenquimáticos odontogénicos que se encuentran en las diferentes etapas de la odontogénesis, con o sin poder inductivo y formación de tejidos mineralizados (dentina, esmalte y/o cemento). En el FA, los dos componentes tisulares representan una etapa precoz de la odontogénesis, previa a la formación de estructuras calcificadas como el esmalte y la dentina. Mientras que, el O representa la etapa final de la odontogénesis y contiene principalmente esmalte maduro, dentina y pulpa (Barnes y col., 2005).

2.4.1. Fibroma ameloblástico

El FA es un tumor benigno, raro, mixto, compuesto por mesénquima odontogénico que se asemeja a la papila dental y un tejido epitelial parecido al epitelio odontogénico, en el que no hay presentes tejidos duros dentales (Speight y Takata, 2017).

Fue descrito por primera vez por Kruse en 1891 (Kruse A., 1891) y representa del 1,5 % al 6,5 % de todos los TO. La mayoría de los casos se diagnostica en pacientes jóvenes, con una media de 15 años y un rango etario de 7 semanas a 57 años. Es ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres, con una relación masculino: femenino de 1.4:1. Se localiza con mayor frecuencia en la mandíbula (relación mandíbula:maxilar de 3.3:1), fundamentalmente en la región posterior (82 % de los casos). A menudo se asocia a un diente no erupcionado, generalmente de crecimiento lento e indoloro. Puede causar expansión mandibular y rara vez, alcanza un tamaño notable, con deformidad facial (Barnes y col., 2005; Verma y Neha, 2016; Speight y Takata, 2017).

Radiográficamente, es un hallazgo incidental en el 12 % de los casos, presentándose en la mayoría (56 %) como una radiolucidez unilocular bien definida, corticalizada y generalmente pequeña. Los tumores multiloculares se asocian frecuentemente con lesiones más grandes. La asociación con un diente impactado (generalmente un primer o segundo molar permanente) se observa en el 80 % de los casos, mientras que la reabsorción radicular y la perforación cortical son poco comunes (Barnes y col., 2005; Kulkarni y col., 2013; Speight y Takata, 2017).

Histopatológicamente se caracteriza por presentar un componente mesenquimal mixtoide rico en células que contiene fibroblastos orientados al azar y ampliamente separados que se asemejan a la papila dental. El componente epitelial puede mostrar un patrón de hebras alargadas y estrechas de dos capas apretadas y paralelas de células cuboidales a columnares, similares a la lámina dental y a los periodos de casquete y

campana tempranos de la odontogénesis. Hacia los bordes, hay engrosamientos ocasionales, con un área simil retículo estrellado entre las células cuboidales periféricas. A menudo rodeando el componente epitelial de la lesión, se encuentra una zona de hialinización que ocasionalmente tiene asociadas áreas de calcificación focal. El componente epitelial también puede mostrar un patrón que se asemeja al estadio folicular del órgano del esmalte. Se puede observar una cápsula de colágeno (Speight y Takata, 2017). El epitelio odontogénico muestra una bicapa de células de aspecto ameloblástico, los bordes se engrosan y redondean, impartiendo una apariencia de casquete. El componente epitelial se asemeja al órgano del esmalte en que las células periféricas son columnares, tienen núcleos hipercromáticos con polaridad inversa y tienen un patrón de empalizada. Las células periféricas encierran un núcleo central que se asemeja al retículo estrellado (Speight y Takata, 2017).

Sobre la base de las características histopatológicas, no es posible distinguir entre el FA y el O en etapa temprana antes que madure. Sin embargo, son raros los FA que muestran la formación de tejidos duros dentales y alcanzan un tamaño excepcional. Estas lesiones se conocen como FDA o FOA, pero es muy probable que desarrollen O en su evolución (Fabris y col., 1991; Grätz y col., 1991; Chen y col., 2005; Speight y Takata, 2017).

Debemos considerar como diagnósticos diferenciales varias neoplasias de origen odontogénico. Por ejemplo, se establece que, si en el FOA no se aprecia el componente de tejido duros, puede ser difícil distinguirlo del FA. Mientras que, la diferenciación del FA de un ameloblastoma es una distinción importante, las islas epiteliales son más grandes y más prominentes en un ameloblastoma, mientras que las islas en el FA son cordones y hebras más atenuados. Además, el ameloblastoma carece del estroma mesenquimático mixoide primitivo característico del FA y el FOA. Distinguir un FOA de un O en desarrollo es una posible falla diagnóstica (Linard y col., 2009).

Anteriormente, si se observaba dentina, las lesiones se denominaban FDA y si se observaba dentina y esmalte, la lesión se denominaba FOA. Sin embargo, estas características son indistinguibles de un O en desarrollo, y se considera que si se dejaran las lesiones, continuarían madurando hasta convertirse en lesiones completamente calcificadas. Por lo tanto, el grupo de consenso en 2017 acordó eliminarlos de la clasificación, ya que “lo más probable es que desarrollen O”. Sin embargo, esto sigue siendo controvertido y se reconoce que algunas de estas lesiones pueden alcanzar tamaños grandes y aparecer en grupos de edad que no siempre son compatibles con un hamartoma.

Las características clínico-patológicas de estas lesiones no siempre apoyan la idea de una maduración progresiva a O y al menos alguno puede ser una verdadera neoplasia (Barnes y col., 2005; Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

En cuanto al tratamiento es importante destacar que la lesión está bien encapsulada y se separa fácilmente de la cripta ósea que lo rodea. Se ha observado un número de recidivas relativamente alto para ser una lesión benigna. Los tumores pequeños y asintomáticos, especialmente en niños pequeños, se extirpan de forma conservadora con enucleación simple, sin embargo, el tratamiento ultraconservador puede dar como resultado la recurrencia que ocurre en aproximadamente el 16 % de los casos. Los tumores extensos y destructivos se deben tratar radicalmente, con resecciones en bloque de maxilares y márgenes de seguridad quirúrgicos. La transformación sarcomatosa es rara, aunque se informa que alrededor del 50 % de estos casos se desarrollaron en el contexto de un FA recurrente (Speight y Takata, 2017).

El fibrosarcoma ameloblástico es una rara neoplasia odontogénica, considerada la contraparte maligna del FA. Histológicamente, la porción mesenquimal muestra la malignidad característica del sarcoma y el componente epitelial ameloblástico muestra histología benigna. Este es un tumor localmente agresivo que se puede presentar de novo o surgir de una FA preexistente; con predilección por los hombres entre 26 y 27 años, la región mandibular posterior (Pillay y col., 2016).

Una revisión sistemática sobre el FDA y FOA realizada por Chrcanovic y Gomez (2017), constató que de los 42 casos de FDA solo se reportaron dos recurrencias diagnosticadas como fibrosarcoma ameloblástico tras múltiples recidivas, sugiriendo que la recurrencia es inusual; mientras que, los FOA mostraron una tasa similar del 10 %. El 40 % de los casos de FOA recurrieron como O complejos, diagnóstico que plantea la posibilidad de que las lesiones primarias en estos casos particulares en realidad eran O en desarrollo (Chrcanovic y Gomez, 2017). Estos autores en su revisión concluyeron que, tomados en conjunto todos los datos analizados, no se apoya el concepto de maduración progresiva de los FOA y FDA a lesiones como los O (Chrcanovic y Gomez, 2017).

2.4.2. Fibrodentinoma ameloblástico

El FDA fue definido por la OMS en 2005 como un TO mixto que consiste en un ectomesénquima odontogénico que se asemeja a la papila dental, hebras epiteliales y nidos que se asemejan a la lámina dental y al órgano del esmalte, con formación de dentina. Las características epidemiológicas, clínicas e histológicas se describen en

conjunto con las características del FA, con las diferencia de la formación de dentina en su histología (Barnes y col., 2005).

Es considerado por algunos autores como una neoplasia que estaría entre el FA y el FOA, en el que se ha formado dentina, aunque el mecanismo exacto de la histogénesis es incierto. Es un TO de frecuencia rara, existen pocos casos reportados en la literatura; generalmente ocurre en personas menores de 20 años de edad, con una media de 8 años, se manifiesta clínicamente como una lesión asintomática y de crecimiento lento. Presenta predilección por la zona mandibular posterior en región de premolares y molares. Frecuentemente el crecimiento provoca expansión ósea de la región involucrada y perturbaciones en la erupción dentaria (López y Téllez, 2009).

Radiográficamente, se muestra como una zona radiolúcida uni o multilocular, con bordes bien definidos, en ocasiones se observa la presencia de material radiopaco amorfo y la mayoría de las veces se encuentra asociado con una pieza dentaria no erupcionada (López y Téllez, 2009; Alberto y col., 2018).

Desde el punto de vista histológico esta compuesto por cordones e islas de epitelio odontogénico sobre un componente ectomesenquimal primitivo, ricamente celular, semejante a la papila dental, donde se destaca la formación de dentina displásica (Barnes y col., 2005).

El tratamiento consiste en la enucleación simple y curetaje de la lesión. La recurrencia puede ocurrir y en raras ocasiones puede malignizarse a un fibrosarcoma ameloblástico (López y Téllez, 2009).

2.4.3. Fibro-odontoma ameloblástico

El FOA fue definido por la OMS en su clasificación de 2005 como un tumor con las características histológicas de la conjunción del FA junto con la presencia de dentina y esmalte (Barnes y col., 2005).

Fue descrito por primera vez en 1967 por Hooker, distinguiéndolo como uno de los O ameloblásticos más agresivos (Kramer, 1972). Es un TO benigno extremadamente raro en frecuencia, considerado en las últimas actualizaciones de la OMS de 2017 y 2022, como una variante inusual del FA, al igual que el FDA, debido a que presentan características histológicas similares asociadas a la producción de tejidos duros dentarios (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

Es comunmente diagnosticado en radiografías de rutina en pacientes con ausencia de erupción dental o con aumento de volumen asintomático. Afecta principalmente a

pacientes jóvenes entre la primera y segunda década de la vida, sin predilección por el sexo (Grätz y col., 1991; Barnes y col., 2005; Cruz y col., 2020).

Clínicamente se presenta con mayor frecuencia en la región mandibular posterior y se caracteriza por ser una lesión asintomática, de tamaño variable y crecimiento lento que genera expansión ósea. La mucosa que lo recubre es normal y usualmente se encuentra asociado a dientes no erupcionados (Barnes y col., 2005).

En la revisión sistemática de Chrcanovic y Gomez (2017) se concluyó que ambas entidades (FDA y FOA) mostraban similitudes, como una mayor prevalencia en hombres y en mandíbula, edad media similar de los pacientes, tasa de perforación del hueso cortical, tasa de asociación con dientes desplazados y/o no erupcionados y reabsorción de la raíz dental, así como el tamaño medio de las lesiones. Pero difieren con respecto a la presencia de radiopacidades visibles en la radiografía, los FOA mostraron mayor prevalencia de radiopacidades visibles en los exámenes radiológicos en comparación con los FDA, asociando mayor multilocularidad en el FDA (Chrcanovic y Gomez, 2017).

Radiográficamente el FOA, exhibe una radiolucidez unilocular o multilocular bien delimitada con niveles variables de radiopacidad según el grado de mineralización. Se puede observar un patrón radiolúcido expansivo que generalmente contiene focos radiopacos pequeños, ya sean solitarios o múltiples de tamaño irregular. Varía de pocos milímetros a centímetros generando expansión de tablas óseas y desplazamiento de estructuras anatómicas (Barnes y col., 2005; Cruz y col., 2020).

Histopatológicamente se compone de tejidos blandos y duros. El componente de tejido blando es idéntico al del FA, mientras que el componente de tejido duro consiste en estructuras dentales mineralizadas. Estos dos componentes pueden estar presentes en diferentes proporciones. Se caracteriza por presentar islotes y cordones de epitelio odontogénico inmerso en un tejido conectivo embrionario que imita la pulpa dental primitiva. La formación de osteodentina y esmalte también puede observarse microscópicamente, el tejido conectivo es moderadamente celular, con fibroblastos en forma de huso (Barnes y col., 2005; Loreto y col., 2013).

El tratamiento de elección es la enucleación o escisión local conservadora con extracción de dientes retenidos asociados, para otorgar un excelente pronóstico y mínima recurrencia. Su potencial de transformación por sí solo no justifica un tratamiento radical, considerando al tratamiento radical aquel que implica resección maxilar o mandibular con márgenes de seguridad (Loreto y col., 2013). Sin embargo, se ha descrito su recurrencia en distintos períodos luego de su enucleación con o sin conservación de sus

dientes asociados, incluso reportan la existencia de recurrencia luego de 12 años de seguimiento postquirúrgico con transformación maligna a fibrosarcoma ameloblástico y metástasis (Howell y Burkes, 1977).

2.4.4. Odontoma

El O es una lesión hamartomatosa mixta con epitelio y mesénquima odontogénico que contiene además esmalte, dentina, pulpa y cemento en formas reconocibles de diente, denominado O compuesto o bien como una masa nudosa sólida, O complejo; ambas variantes suelen encontrarse sobre dientes no erupcionados (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

Dado que la mayoría se presentan durante el período de desarrollo dentario y que a menudo alcanzan un tamaño fijo, no se consideran neoplasias verdaderas, sino hamartomas (Barba y col., 2016; Speight y Takata, 2017). La etiología es desconocida, pero la mutación genética en un germen dental es un posible factor (Barnes y col., 2005). Los O son, con algunas diferencias, las lesiones odontogénicas no quísticas más frecuentes. Comúnmente se diagnostican en la primera y segunda década, sin predilección por algún sexo (Speight y Takata, 2017). Pueden aparecer en cualquier área de los maxilares, los O compuestos se localizan principalmente en la región maxilar anterior y los complejos en la zonas posteriores mandibulares, seguidos de cerca por el maxilar anterior (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

Las lesiones suelen descubrirse porque un diente no hace erupción en el tiempo previsto. Cuando el diente asociado logra hacer erupción alrededor del O, una tumefacción asintomática puede ser la única evidencia clínica de que existe una lesión (Martinovic-Guzmán y col., 2017).

Imagenológicamente los O compuestos suelen estar localizados ya sea sobre las coronas de dientes no erupcionados o bien entre las raíces de los erupcionados. Las lesiones suelen ser uniloculares y contienen estructuras radiopacas múltiples que se parecen a dientes en miniatura; pueden contener pocas o muchas estructuras análogas a dientes en miniatura. Los O complejos suelen encontrarse sobre dientes retenidos y pueden alcanzar un tamaño de hasta varios centímetros. Tienen el aspecto de una masa radiopaca sólida que presenta alguna nodularidad y están rodeados por una fina zona radiolúcida. Las lesiones son uniloculares y están separadas del hueso normal por una línea nítida de corticalización (Palacios y col., 2016; Speight y Takata, 2017).

Histopatológicamente en el O compuesto se observan múltiples dientes rudimentarios que exhiben dentina, cemento, matriz de esmalte y pulpa; a menudo con

tejido conjuntivo fibroso adyacente consistente con el folículo dental. Los O en etapa temprana muestran tejido que se asemeja a un germen dental en desarrollo, con poco producto mineralizado. Mientras que los maduros consisten principalmente en dentina tubular que encierra zonas de matriz de esmalte, el epitelio reducido del órgano del esmalte con células fantasmas dispersas que ocasionalmente pueden rodear hendiduras o estructuras circulares huecas que representan el esmalte maduro eliminado durante la desmineralización del procesamiento histológico. Una delgada capa de cemento a menudo está presente en la periferia de la masa. La cápsula de tejido blando, si está presente, a menudo incluye tejido conectivo inmaduro con cordones o islotes de epitelio ameloblástico, con un patrón similar al que se observa en el FA (Barba y col., 2016; Martinovic-Guzmán y col., 2017; Speight y Takata, 2017).

EL O complejo se diferencia del compuesto porque está constituido por una sola masa nudosa y desorganizada de esmalte, dentina y pulpa, sin formación de diente reconocible. Ambas formas, compuesta y compleja, pueden contener también epitelio reducido del esmalte, ameloblastos secretores y odontoblastos funcionales. En el tejido conjuntivo circundante abundan los islotes de residuos odontogénicos y calcificaciones esféricas. Ambas formas de O están bien encapsuladas y se enuclean fácilmente del hueso circundante (Speight y Takata, 2017).

Estas neoplasias se eliminan mediante cirugía conservadora, debido a su bajo potencial de crecimiento, la recurrencia después de la eliminación completa es inusual, por lo que el pronóstico es excelente (Barnes y col., 2005).

2.5. Generalidades de los Biomarcadores moleculares

Los Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés, *National Institutes of Health*) establecieron la definición de biomarcador como aquellas características biológicas, bioquímicas, antropométricas y fisiológicas, objetivamente mensurables, capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Torres y Pérez, 2016; Wettersten y Maisel, 2016). Las denominadas biomoléculas son todas de naturaleza orgánica con diferentes grados de complejidad, estructura y distribución. Sin embargo, no todas las biomoléculas son utilizadas como biomarcadores moleculares. Un biomarcador molecular es una biomolécula que ha sido estudiada y caracterizada con el potencial de permitir la identificación de un fenómeno particular a nivel de espacio y tiempo en un organismo (Clive, 2014; Wettersten y Maisel, 2016). Según los NIH existen diferentes tipos de biomarcadores que según la finalidad pueden ser de diagnóstico, pronóstico,

predicción o investigación. A su vez, según su función a nivel tisular pueden diferenciarse en proteínas que forman parte de mecanismos biológicos asociados al comportamiento tumoral como, proliferación celular, angiogénesis, apoptosis, adhesión celular, invasión y supresión tumoral (Clive, 2014).

Los tratamientos de las patologías neoplásicas son cada día más individualizados gracias al análisis de los biomarcadores, moléculas que se pueden encontrar en las células tumorales. En los últimos años, el descubrimiento de determinados biomarcadores específicos en las neoplasias, permitieron conocer el comportamiento biológico, clave para individualizar los tratamientos (Arango, 2012).

2.5.1. Caveolina 1

Las Cav son proteínas integrales de la membrana plasmática presentes en estructuras celulares denominadas Caveolas. Las Caveolas son pequeñas invaginaciones de 50-100 nm de diámetro en la membrana plasmática, con una cubierta estriada que le confieren los oligómeros de Cav que la constituyen, altamente enriquecidas en colesterol, fosfolípidos y esfingolípidos, y son abundantes en diversos tipos de células (Rothberg y col., 1992).

Cav-1, una proteína de andamiaje de 21-24 kDa, es un componente estructural importante de las Caveolas (Rothberg y col., 1992). Cav-1 está altamente expresado en células terminalmente diferenciadas o quiescentes que incluyen células musculares, adipocitos, células endoteliales, monocitos, macrófagos, células dendríticas, microglia y astrocitos, mientras que, los linfocitos T humanas parecen carecer de la proteína Cav-1 (Fernow y col., 2007).

Entre las proteínas de Cav, Cav-1 se expresa altamente en células epiteliales que incluyen queratinocitos, glándulas salivales y epitelio del tracto respiratorio, así como osteoblastos, células endoteliales y músculos esqueléticos. Se explica que algunas moléculas de señalización relacionadas con Cav-1, determinan funciones como la detención de la progresión del ciclo celular mediante el ahorro en la etapa G_0 / G_1 , en la transformación celular, programación de la muerte celular activando la vía de la proteína quinasa β y actuando como un oncogén o gen supresor de tumores según el tipo de tumor y el estadio (Williams y col., 2005; Jaafari-Ashkavandi y col., 2014).

Junto con Cav-1, la estructura de las Caveolas está compuesta por Cav-2 y Cav-3, además, de cuatro proteínas adicionales conocidas como Cavin 1-4. Cav-1 y Cav-2 se encuentran en abundancia en la mayoría de las células del sistema cardiovascular, mientras que, Cav-3 se limita al músculo esquelético y algunas células de músculo liso.

Para la integridad estructural de las Caveolas, Cav-1 o Cav-3 son importantes, pero Cav-2 es prescindible, su rol está menos definido (Rothberg y col., 1992; Stan, 2005; Ariotti y Parton, 2013).

Los mecanismos de las múltiples funciones descritas para las Caveolas no se comprenden completamente y siguen siendo controversiales. Esto se complica aún más debido a la evidencia emergente de que las Caveolas sirven como organelos de detección mecánica y pueden jugar un papel en la protección de las células frente al estrés mecánico, mediante el estiramiento o la internalización de la estructura de las Caveolas (Stan, 2005; Parton y Del Pozo, 2013; Kovtun y col., 2014; Lamaze y col., 2017).

Cav-1 también está presente en células independientes de la estructura de las Caveolas, lo que sugiere funciones celulares adicionales. Además, de ser un componente de las Caveolas, Cav-1 está involucrado en varios procesos celulares que incluyen la regulación del ciclo celular, la endocitosis, la transcitosis, la transducción de señales complejas, el transporte de sustratos, la homeostasis lipídica, la angiogénesis y la apoptosis (Zou y col., 2011).

Se las asocia, asimismo, con el desarrollo de patologías como el cáncer, la transformación celular, resistencia insulínica, cardiopatías, anormalidad en el desarrollo pulmonar y distrofia muscular, entre otras (Lee y col., 1998; Goetz y col., 2008).

En la actualidad, si Cav-1 funciona como un oncogén o un supresor tumoral en la progresión del cáncer sigue siendo controvertido. Ciertos estudios informaron que Cav-1 se podría comportar como supresor tumoral en el cáncer de páncreas, cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas laríngeo, adenocarcinoma de pulmón y adenocarcinoma esofágico (Lee y col., 1998; Wiechen y col., 2001; Kato y col., 2004; Gu y col., 2007; Han y col., 2009). Por el contrario, la expresión de Cav-1 aumentó en cáncer de próstata, de vejiga, renal, esofágico y en el carcinoma escamocelular de cabeza y cuello (Prade y col., 2012; Yang y col., 2012; Liang y col., 2014). Curiosamente, la expresión alta del marcador se ha asociado con un estadio tumoral avanzado, metástasis a ganglios linfáticos y pobre pronóstico de pacientes con cáncer, lo que puede implicar que Cav-1 puede funcionar como un promotor tumoral. En las etapas iniciales de la progresión tumoral, las células de los tejidos pueden sufrir una transformación oncogénica a través de varios mecanismos. La expresión disminuida de Cav-1 puede promover la rápida expansión de estas células anormales. En las etapas posteriores, con el tumor de mayor tamaño y la progresión maligna, las células cancerosas tienen que adaptarse a un microambiente complejo. La sobreexpresión de Cav-1 puede suprimir la apoptosis celular y adquirir

resistencia a múltiples fármacos. Como consecuencia, la expresión elevada de Cav-1 puede mejorar la capacidad de supervivencia de las células cancerosas (Xue y col., 2010).

Asimismo, estudios han encontrado que Cav-1 y Cav-2 promueven colectivamente el progreso maligno del carcinoma. Recientemente, se ha identificado el papel oncogénico de Cav-1 y Cav-2 en el cáncer de mama, cáncer de próstata y carcinoma escamoso esofágico (Van den Eynden y col., 2006; Sugie y col., 2015).

Por otra parte, Schwab y col. (2007) informaron de la expresión de Cav-1 en células epiteliales y mesenquimales del germen dentario en diversas etapas del desarrollo. Ese estudio determinó que Cav-1 podría participar en la odontogénesis. La expresión de la misma se ha demostrado previamente en el órgano del esmalte, especialmente en el epitelio interno del órgano del esmalte y en las células ameloblásticas del germen dental en desarrollo (Schwab y col., 2007).

Jaafari-ashkavandi y col. (2014) encontraron expresión de Cav-1 en todos los quistes odontogénicos analizados y en el 58 % de los ameloblastomas en estudio, sugiriendo que esta proteína podría funcionar como supresor de tumores en lesiones odontogénicas, disminuyendo su agresividad (Jaafari-Ashkavandi y col., 2014).

2.5.2. MOC-31

La molécula de adhesión de células epiteliales MOC-31 es una glicoproteína transmembrana que se expresa en la membrana de la mayoría tejidos epiteliales normales y se sobreexpresa en tumores de origen epitelial, es una molécula de adhesión celular que permite la formación de uniones estrechas entre las células el epitelio (Litvinov y col., 1997; Balzar y col., 1999).

El gen correspondiente a dicha molécula, codifica una proteína de 40 kDa que consiste en un dominio extracelular de 289 aminoácidos de largo EpEX y un dominio intracelular corto EpICD de 26 aminoácidos (Balzar y col., 1999), tiene la capacidad de anular la adhesión celular mediada por e-cadherina una vez interrumpida la conexión entre α -catenina y F-actina. La adhesión intercelular deteriorada es un parámetro importante en la determinación del impacto pronóstico en la patología tumoral (Andriescu y col., 2019).

El anticuerpo contra la adhesión molecular de células epiteliales MOC-31 es de uso generalizado, la tinción positiva para este marcador es citoplasmática con acentuación membranosa, aunque una tinción fuerte puede parecer simplemente citoplasmática. En general, se informa que tiene una sensibilidad del 85 % al 100 % para el adenocarcinoma, el carcinoma de células escamosas de pulmón, el adenocarcinoma de mama y el

carcinoma seroso de ovario (Chapel y col., 2020). Se han descrito varias funciones biológicas de las moléculas de adhesión de células epiteliales que se asocian al carcinoma, incluida la adhesión celular y la señalización mitogénica (Litvinov y col., 1997; Balzar y col., 1999); además de haber sido identificado como un marcador de células madre iniciadoras del cáncer, por lo que sería un objetivo interesante para la terapia (Maetzel y col., 2009).

Además, fue identificada en la mayoría de los epitelios glandulares y los tumores originados en esos epitelios. No está presente en el epitelio escamoso, los hepatocitos, las células tubulares proximales renales, las células parietales gástricas y células mioepiteliales. Los estudios han demostrado que MOC-31 se presenta en alta tasa en colangiocarcinomas (Ryu y col., 2012).

El uso de este anticuerpo está indicado, después de un diagnóstico diferencial clínico, como complemento para la identificación de células epiteliales. Se ha demostrado su utilidad en la diferenciación del adenocarcinoma, mesotelioma y células mesoteliales del líquido pleural, mostrando mayor expresividad en el primero y escasa o nula en los dos últimos. Dicho biomarcador es altamente sensible y específico para la detección de adenocarcinomas (Hyun y Barnes, 2012).

Un trabajo publicado por Bologna y col. (2017) sobre el perfil inmunohistoquímico del tumor odontogénico primordial, reportó que las células epiteliales que rodean la periferia del tumor fueron positivas para MOC-31. Por tal motivo, sugieren que existiría un grado variable de diferenciación y maduración de las células que componen el compartimento epitelial en dicha neoplasia odontogénica (Bologna-Molina y col., 2017).

Conociendo que esta molécula de adhesión celular permite la formación de uniones estrechas entre las células epiteliales y que puede afectar negativamente la formación del complejo cadherina/catenina, se ha demostrado que MOC-31 es un marcador ventajoso para señalar la diferenciación de células epiteliales. La expresión reducida se ha correlacionado con una supervivencia deficiente en condiciones cancerosas, hecho que podría estar relacionado con la diferenciación, proliferación e invasión tumoral (Litvinov y col., 1997).

2.5.3. *Conexina 43*

Para garantizar la adecuada función en los tejidos, se requiere una comunicación intercelular rápida entre las células y su microambiente. En condiciones fisiológicas normales, las células responden a una serie de estímulos externos que incluyen

mediadores solubles, la matriz extracelular circundante y su estroma vecino. Como tal, las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular son mecanismos de comunicación integrales mediante los cuales se mantiene la homeostasis, para permitir una señalización precisa en respuesta a estímulos tanto externos como internos. A nivel celular, las moléculas de adhesión juegan un papel fenotípico crítico, como lo demuestra su multifuncionalidad al proporcionar soporte estructural y mediar en la organización citoesquelética. Además, los complejos de adhesión, incluidas las uniones adherentes, las uniones estrechas y las uniones gap, son necesarios para el inicio y la integración de las cascadas de señalización que pueden parecer no relacionadas con su función canónica (Sinyuk y col., 2018).

Las uniones gap son canales intercelulares que conectan el citoplasma de las células vecinas. Estos canales permiten la interacción entre células regulando el intercambio directo de mensajeros secundarios, metabolitos pequeños o iones inorgánicos. Estas uniones gap están ubicadas en la membrana plasmática celular y están compuestas por dos hemicanales llamados conexonas que se ensamblan a partir de seis subunidades proteicas oligomerizadas llamadas Cx. Las proteínas que componen las subunidades de los hemicanales pueden ser homoméricas y constan de un solo tipo de proteína de la familia de las Cx o heteroméricas / hetero-multimérico que consta de dos o más familias de Cx. Cuando los hemicanales de dos células opuestas se unen forman una unión gap (Phillips y col., 2017).

En general, las Cx y uniones gap se encuentran en numerosos tipos de células en todo el cuerpo, la expresión de estas proteínas varía según el tipo de célula y a menudo una misma célula expresa más de una Cx (Aasen y col., 2016). Además, muchos tipos de células co-expresan dos o más Cx que pueden tener funciones superpuestas o distintas. Por ejemplo, se ha demostrado que los queratinocitos expresan Cx-26, Cx-43, Cx-31 y Cx-30 (Wiszniewski y col., 2000).

El estudio de las uniones gap, la función de las Cx y el papel que juegan en el desarrollo del cáncer ha sido investigado en varias neoplasias; gran parte de estas investigaciones se han centrado en torno a la hipótesis de que la pérdida de la comunicación intercelular es característica de las células cancerosas, siendo un impulsor de la tumorigénesis (Aasen y col., 2016; Phillips y col., 2017). Es importante destacar que las Cx realizan tres funciones celulares principales. Permiten la comunicación intercelular de unión gap entre células a través de los hemicanales, permiten además, la comunicación celular con el entorno extracelular y sirven como un sitio de interacción

proteína-proteína para regular las vías de señalización. Se ha descubierto que las propias Cx promueven el crecimiento y la invasividad de las células tumorales, y han surgido como dianas antitumorales atractivas debido a su diversidad funcional. Sin embargo, las Cx también pueden servir como supresores de tumor y, por lo tanto, se necesita una comprensión completa de las funciones de las Cx y las uniones gap en condiciones fisiológicas y patológicas antes de aplicar las estrategias terapéuticas (Sinyuk y col., 2018).

Cx-43 es una proteína que se ha estudiado en una variedad de cánceres humanos que incluyen próstata, pulmón, hígado, cerebro y mama. La evidencia indica que las Cx, incluida Cx-43, tienen papel supresor tumoral en tumores primarios, pero su papel en la progresión del cáncer y la metástasis es bastante controvertido (Phillips y col., 2017). Estudios relacionados al cáncer de mama humano sugieren que los niveles de Cx-43 aumentan o disminuyen con el estadio del cáncer, de la misma manera que la localización de Cx-43 en las uniones gap podría desempeñar un papel en la determinación de la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, la evidencia apoya tanto roles pro como anti-metastásicos para Cx-43 y muchos informes indican que los niveles de Cx-43 son tanto elevados como reducidos en cáncer de mama (Phillips y col., 2017).

El estudio de las Cx en el cáncer ha aumentado considerablemente y ha demostrado ser más compleja de lo que se había hipotetizado originalmente. Actualmente se acepta que las Cx tienen una amplia gama de funciones y no sólo funciones supresoras de tumores. Por ejemplo, en células de melanoma de ratón, se informó que la expresión de Cx-26 desempeñaba un papel crítico en la intravasación y extravasación de células tumorales a través de la comunicación gap heteróloga con células endoteliales, vinculando la expresión de Cx con la invasión (Ito y col., 2000; Sinyuk y col., 2018). Además, en múltiples líneas celulares de cáncer de próstata, la expresión de Cx-43 se correlacionó con la migración de células tumorales. Por tanto, lejos de actuar simplemente como un represor del crecimiento tumoral, la alta expresión de Cx también puede asociarse con un mal pronóstico (Zhang y col., 2015).

Si bien se ha descubierto que la expresión de Cx se correlaciona con un aumento o una disminución del crecimiento de las células cancerosas, dependiendo tanto de la neoplasia como de la subunidad de Cx, todavía se desconoce exactamente qué moléculas se intercambian entre las células tumorales. Dado el tamaño de la familia de Cx, es difícil precisar sus funciones exactas en la biología del cáncer, ya que existen más de 20 subunidades de Cx en los seres humanos y cada una puede tener funciones diferenciales

en la iniciación, progresión y/o metástasis del tumor. Por tanto, es imperativo considerar a cada miembro de la familia en el contexto del tipo de cáncer específico y su papel funcional particular en lo que se refiere al fenotipo de la célula tumoral. Además, es importante recordar que los estudios epidemiológicos que comparan el estado funcional de Cx con la aparición del cáncer y su progresión están en gran parte ausentes. Como tal, si bien la expresión de Cx se puede vincular al pronóstico del paciente, es un desafío estudiar la distribución temporal de la señalización mediada por Cx a lo largo del curso del desarrollo y crecimiento del cáncer (Delmar y col., 2018).

Se describe su importancia en el desarrollo de osteoblastos y osteoclastos (Lecanda y col., 2000) y se sugiere que esta proteína contribuye a la diferenciación de los ameloblastos, con participación en procesos patológicos dentales, pero es escaso el conocimiento en el rol que desempeña durante el desarrollo de los TO (Al-Ansari y col., 2018).

Al-Ansari y col. (2018) informaron que la expresión de Cx-43 está asociada con la formación de uniones comunicantes durante el desarrollo dentario, participando en la amelogénesis, la dentinogénesis, la citodiferenciación, así como la deposición y mineralización de la matriz (Al-Ansari y col., 2018). Por otro lado, Silveira y col. (2023) en base a los resultados obtenidos sobre la inmunomarcación de Cx-43 en los FOA y FDA, sugirieron que la proteína expresada de forma conjunta en el epitelio ameloblástico y el mesénquima odontogénico, podrían resultar en la producción de los tejidos mineralizados (Silveira y col., 2023).

Zhong y col. (2015) encontraron sobreexpresión de Cx-43 y Cx-32 en muestras de queratoquiste en comparación con las de MB. Este estudio reveló por primera vez que Cx-43 y Cx-32 están regulados a la baja en los queratoquistes, sugiriendo una posible asociación con la regulación del crecimiento, la antiapoptosis y la autofagia en esta patología odontogénica (Zhong y col., 2015).

2.5.4. Ki-67

El antígeno Ki-67, codificado por el gen MKI67 (10q26.2), es una proteína nuclear no histonal que se presenta unida al ácido desoxirribonucleico (ADN) (Cuylen y col., 2016). Asimismo, se encuentra conformado por 3256 aminoácidos que en función de su disposición, se reconocen dos isoformas, de 345 y 395 kDa (Li y col., 2015; Cuylen y col., 2016; Sales Gil y Vagnarelli, 2018; Takkem y col., 2018; Jing y col., 2019; Dias y col., 2021; Gadbail y col., 2021). Además, este antígeno, se destaca por el hecho de encontrarse presente en todas las fases activas del ciclo celular (G₁, S, G₂ y M), estando

ausente solamente en las células en reposo (G_0) (Watanabe y col., 2010; Li y col., 2015; Bhuyan y col., 2018; Kintawati y Pramesti, 2019).

La proteína Ki-67 es sintetizada de forma continua desde el inicio de la fase S hasta las primeras etapas de la fase M, disminuyendo su concentración fuertemente en las instancias finales de la misma (Li y col., 2015; Dias y col., 2021). De hecho, se le adjudica a esta proteína funciones importantes para la integridad celular, tanto en la interfase como en la mitosis (Cuylen y col., 2016; Sun y Kaufman, 2018; Sales Gil y Vagnarelli, 2018; Dias y col., 2021). En este sentido, juega un rol clave en la conformación de la capa pericromosómica (estructura que previene la agregación de los cromosomas condensados) en las primeras instancias de la fase M, mientras que, en la interfase es responsable del mantenimiento de la integridad de la heterocromatina (Cuylen y col., 2016; Sun y Kaufman, 2018; Sales Gil y Vagnarelli, 2018; Dias y col., 2021).

Aunque Ki-67 contiene varias regiones funcionales conservadas, la conservación de la secuencia primaria fuera de estas regiones es baja. Regiones principales de la proteína Ki-67 incluyen un dominio asociado a la cabeza de horquilla N-terminal, una proteína Dominio de unión de fosfatasa 1, una gran región central que comprende repeticiones en tándem, y un dominio de unión a cromatina LR C-terminal (rico en leucina/arginina) (Schluter y col., 1993). Además, el transcrito primario de MKI67 experimenta empalme alternativo, dando lugar a distintas isoformas proteicas. Inicialmente se describieron dos variantes principales, con pesos moleculares aproximados de 320 kDa y 350 kDa, que difieren entre sí por la inclusión alternativa del exón 7 (Gerdes y col., 1991).

Estudios sugieren que las isoformas de Ki-67 pueden impactar diferencialmente en la proliferación celular y la progresión del ciclo celular. En particular, el inicio de la mitosis requiere la importación activa de ciclina β al núcleo durante la transición G_2/M , y la localización mitótica de Ki-67 está regulada por el equilibrio de la fosforilación de CDK/ciclina y la desfosforilación de la proteína Dominio de unión de fosfatasa 1. Por lo tanto, Ki-67 está implicado en las principales transiciones estructurales nucleares durante la entrada mitótica y salida del ciclo celular (Schmidt y col., 2003).

Con la ayuda del anticuerpo para Ki-67 se puede establecer una determinación exacta y rápida de la fracción de crecimiento de una determinada población de células humanas, independientemente de si es normal o maligna. Hasta ahora, se ha informado de una correlación significativa entre los valores medios de la fracción de crecimiento determinada con Ki-67 y la evaluación histopatológica de malignidad en algunas

entidades tumorales. Sugiriendo en algunos estudios que la evaluación de la fracción de crecimiento con Ki-67 podría ser un marcador pronóstico independiente (Gerdes y col., 1991).

Desde su identificación, el anticuerpo Ki-67 es reconocido por la mayor parte de la comunidad científica como el biomarcador prototipo de proliferación celular, debido a que permite reconocer la fracción total de células en proliferación, es decir, la proporción de células tumorales que se encuentran en ciclo celular. De hecho, es utilizado de forma rutinaria en el estudio de la agresividad tumoral, en la determinación del potencial maligno de las lesiones epiteliales, como parámetro de clasificación tumoral y como indicador pronóstico (Gonzalez-Moles y col., 2010; González-González y col., 2016; Cortegoso y col., 2017; Marangon Junior y col., 2018; Takkem y col., 2018; Sales Gil y Vagnarelli, 2018; Jing y col., 2019; Nazar y col., 2020; Dias y col., 2021; Gadbail y col., 2021).

Estudios plantearon la posibilidad de que las contribuciones de Ki-67 a la progresión del ciclo celular pudieran ser específicas del tipo celular, al menos en células humanas. De hecho, estudios recientes han demostrado que los diferentes efectos del agotamiento de Ki-67 sobre la progresión del ciclo celular humano están correlacionados con el estado de los puntos de control de G₁/S. Fibroblastos primarios humanos, así como líneas celulares diploides no derivadas de tumores son capaces de inducir el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina proteína de punto de control p21 tras el agotamiento de Ki-67. Por lo tanto, estas células se han denominado "Ki-67- sensibles". p21 es necesaria para la represión transcripcional por el Rb/E2F y complejos DREAM, los cuales reprimen los genes necesarios para la progresión del ciclo celular durante las fases G₁/S. En líneas celulares competentes en puntos de control de p21, el agotamiento de Ki-67 mediado por ARNip (ácido ribonucleico) retrasa la entrada a la fase S y regula a la baja de forma coordinada los niveles de ARNm relacionados con la replicación del ADN (Sun y Kaufman, 2018).

Investigadores describen expresión de Ki-67 en TO epiteliales como el ameloblastoma, TO epitelial calcificante, TO adenomatoide y en el queratoquistes odontogénico, encontrando diferencias significativas en la expresión de Ki-67 en las neoplasias con respecto a los gérmenes dentales de control; concluyendo que podría tener relación con la promoción del crecimiento tumoral, desempeñar un papel en la oncogénesis, invasión y proliferación de los TO epiteliales (Zhon y col., 2010).

En cuanto al comportamiento de este biomarcador en patología buco-maxilofacial, se han publicado trabajos que evalúan su inmunoexpresión en lesiones odontogénicas como Jaafari-Ashkavandi y col. (2019) que demostraron la expresión de MCM3 y Ki-67 en quistes y TO frecuentes como el ameloblastoma, especialmente en lesiones más agresivas; estableciendo que podrían tener un papel en la patogénesis de estas lesiones y podrían ser marcadores confiables para evaluar la actividad proliferativa (Jaafari-Ashkavandi y col., 2019).

2.6. Generalidades del estudio genético en neoplasias

Las neoplasias en general son enfermedades genéticas, causadas por cambios en ciertos genes que controlan la función celular, especialmente la proliferación. Las mutaciones de la línea germinal pueden predisponer al riesgo de desarrollar cáncer e influir en la respuesta del huésped a la neoplasia. Las características patológicas de prácticamente todos los tumores están impulsadas por la adquisición de mutaciones somáticas que alteran los procesos que controlan la proliferación celular, la movilidad y la apoptosis (Morlan y col., 2009). Ciertos cambios génicos pueden causar la evasión celular de los controles normales de crecimiento, permitiendo así la transformación y el crecimiento neoplásico. La detección de mutaciones somáticas o de línea germinal tiene el potencial de influir en la toma de decisiones en oncología. Cada vez más, las mutaciones somáticas se han propuesto como biomarcadores para el pronóstico del cáncer y la predicción de la eficacia terapéutica (Morlan y col., 2009). Por tal motivo, cobra importancia la realización de pruebas génicas en este tipo de pacientes a través de una adecuada implementación del asesoramiento genético para lograr un abordaje más integral y completo que permita a los pacientes tomar mejores decisiones entorno a sus padecimientos. Al comparar la secuencia del ADN en las células neoplásicas con el de las células normales, los científicos pueden identificar los cambios genéticos específicos en las células cancerosas que pueden estar impulsando el crecimiento del cáncer de un individuo. Esta información es relevante en el momento de la toma de decisiones terapéuticas, seleccionando las terapias más eficaces con blancos terapéuticos obtenidos del estudio genético (Monge y Herra, 2020).

2.6.1. *BRAF*

El gen *BRAF* localizado en el cromosoma 7q34, codifica una proteína perteneciente a la familia raf de quinasas de proteína serina/treonina. Esta proteína desempeña un papel en la regulación de la vía de señalización MAP kinasa/ERK que afecta

la división celular, la diferenciación y la secreción. Las mutaciones en este gen, más comúnmente la mutación V600E, son las mutaciones causantes de cáncer más frecuentemente identificadas en el melanoma y en varios otros tipos de cáncer, incluyendo linfoma no Hodgkin, cáncer colorrectal, carcinoma tiroideo, carcinoma pulmonar no de células pequeñas, leucemia de células pilosas y adenocarcinoma de pulmón (Marranci y col., 2017).

Las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son vías de señalización claves que regulan una amplia variedad de procesos celulares, incluida la proliferación, diferenciación, apoptosis y respuestas al estrés. La vía MAPK incluye tres quinasas principales, MAPK quinasa quinasa, MAPK quinasa y MAPK que activan y fosforilan proteínas posteriores. Las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK1 y ERK2 son serina-treonina quinasas ubicuas conservadas evolutivamente que regulan la señalización celular tanto en condiciones normales como patológicas. La expresión de ERK es fundamental para el desarrollo y su hiperactivación juega un papel importante en el desarrollo y la progresión del cáncer. La vía Ras / Raf / MAPK / ERK es la cascada de señalización más importante entre todas las vías de transducción de señales MAPK y juega un papel crucial en la supervivencia y el desarrollo de las células tumorales (Zaman y col., 2019; Yan-Jun y col., 2020).

La cascada de quinasas de tres niveles que constituye la vía de señalización de MAPK / ERK es una de las vías de señalización oncogénicas mejor estudiadas. La activación de esta vía da como resultado una amplia gama de efectos que conducen a la activación transcripcional y la señalización del crecimiento celular. Es importante destacar que, en condiciones normales, una serie de reguladores negativos de la señalización de ERK son objetivos directos de la salida de ERK, estos circuitos de retroalimentación negativa aseguran que la duración y la magnitud de la señalización de la vía sean apropiadas para los estados fisiológicos normales (Yan-Jun y col., 2020). El ajuste fino de esta regulación de señalización es crucial para mantener la homeostasis normal y del crecimiento. La regulación fisiológica de la señalización de MAPK se desregula en muchos contextos de enfermedades, incluido el cáncer (Downward, 2003).

En las células de mamíferos, hay tres proteínas RAF que son: ARAF, BRAF y CRAF (también conocidas como RAF1). Los miembros de la familia RAF están compuestos por los siguientes tres dominios conservados: 1, 2 y 3 (CR1, CR2, CR3), respectivamente. CR1 es un dominio autorregulador de unión a RAS GTP, CR2 es una región rica en serina y CR3 es un dominio catalítico de proteína quinasa de serina / treonina que fosforila la secuencia

consensuada en sustratos proteicos (McKay y col., 2011). Aunque las tres RAF quinasas juegan un papel importante en la fisiología normal, BRAF es la RAF quinasa principalmente alterada en muchos tipos de cánceres; por ejemplo, casi el 60 % de los melanomas, el 60 % de los cánceres de tiroides, el 15 % de los cánceres colorrectales y el 5-8 % de los cánceres de pulmón (Leicht y col., 2007). La especificidad biológica de *BRAF* (y no otros RAF) como oncogén no se comprende completamente. Las posibles explicaciones son la naturaleza específica del tejido y del contexto de *BRAF*, de los niveles de regulación y/o expresión y/o su capacidad para activar MEK, en comparación con *craf* y *araf* que pueden funcionar de manera más amplia como genes "domésticos" (Downward, 2003).

La proteína BRAF contiene 766 aminoácidos; su región CR1 abarca el rango del aminoácido 120 al 280. CR1 autoinhibe el dominio de quinasa CR3 para proteger a las células de la cinética de reacción inapropiada del sustrato de quinasa. Los aminoácidos 155-227 constituyen el dominio de unión a RAS. Tras la unión de RAS-GTP, esta región libera la interacción autoinhibidora CR1- CR3 para liberar CR1 y cesa la inhibición de la quinasa. Los aminoácidos 234-280 constituyen un motivo de dedo de zinc que se une a un éster de forbol (diacilglicerol) que participa en el acoplamiento de la membrana RAF después de la unión de RAS-GTP. CR2, por otro lado, funciona como una bisagra para CR1 y CR3. CR3, una estructura de doble lóbulo, contiene el dominio quinasa y abarca el rango del aminoácido 457 al 717 (Avruch y col., 2001; Brennan y col., 2011). El lóbulo N-terminal más pequeño se une al ATP, mientras que, el lóbulo C-terminal se une a las proteínas del sustrato. El lóbulo N-terminal también contiene el lazo P que estabiliza la unión de ATP a través de la interacción electrostática con el grupo fosfato cargado negativamente. Las interacciones hidrofóbicas estabilizan la interacción con el nucleósido ATP (Brennan y col., 2011).

El gen *BRAF* mutado actúa como gen impulsor en cánceres de origen tisular múltiple, se han identificado aproximadamente 200 alelos mutantes de *BRAF* en tumores humanos. Hasta ahora, se han caracterizado funcionalmente casi 30 mutaciones distintas de *BRAF* (Jones y col., 2008), estas se pueden clasificar en tres clases según su efecto sobre la actividad del gen. Las mutaciones de clase 1 son independientes de RAS y funcionan como un monómero activo. Por el contrario, el *BRAF* mutante de Clase 2 funciona como un dímero activo. Tanto las proteínas BRAF mutantes de Clase 1 como de Clase 2 se vuelven en gran medida independientes de sus reguladoras RAS GTPasas. Este desacoplamiento da como resultado la activación constitutiva de *BRAF* que es independiente de los estímulos para el crecimiento y la proliferación en el cáncer. Por el

contrario, las proteínas BRAF mutantes de Clase 3 dependen de la señalización RAS para una activación óptima (Bivona, 2019). Por tanto, la actividad de *BRAF* mutante de Clase 3 depende de los niveles de RAS-GTP. Es así, que el bloqueo de la señalización RAS es una estrategia terapéutica potencial para los tumores con mutaciones clase 3 en *BRAF*, en contraste con las mutaciones de clase 1 o 2 (Jones y col., 2008; Zaman y col., 2019),

La vía de señalización de *BRAF* detallada en la figura 9 muestra que en las células normales, el estímulo del crecimiento externo activa el receptor tirosina quinasa y RAS que transmite señales de crecimiento a la cascada de la ruta quinasa de MAPK. En los cánceres impulsados por *BRAF* el *BRAF* mutante (*braf*^{*}) puede actuar en RAS independientemente como monómero (Clase 1) y como dímero (Clase 2) o actuar de manera dependiente en RAS (Clase 3) para hiperactivar el crecimiento celular. Los tumores de clase 1 y clase 2 responden a la terapia dirigida a inhibidores de *BRAF* (Zaman y col., 2019).

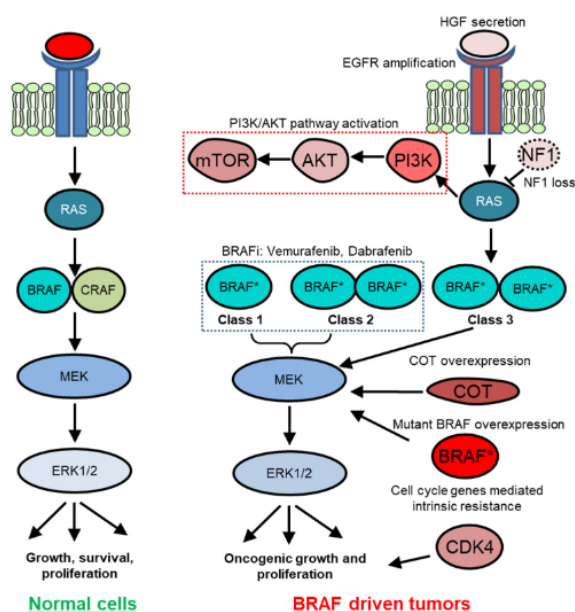


FIGURA 9. Señalización mediada por *BRAF* en células normales y cancerosas. Adaptado de *Cancers Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. Cancers* (Zaman y col., 2019)

Se identificaron mutaciones *BRAF* V600E en TO como ameloblastoma, carcinomas ameloblásticos, FA y FOA. Tanto las neoplasias malignas odontogénicas como los TO mixtos tienen mutaciones *BRAF* V600E en común, pero con menor frecuencia que la observada en el ameloblastoma (Oh y col., 2021). Se identificaron mutaciones somáticas, activantes y mutuamente excluyentes en RAS-*BRAF* y FGFR2. También se

identificaron mutaciones somáticas en *SMO*, *CTNNB1*, *PIK3CA* y *SMARCB1*. *BRAF* V600E fue la mutación más común, encontrada en el 62 % de los ameloblastomas, en los FA y FDA, pero no en otros TO. Esta mutación se asoció con una edad de inicio más joven, en tanto que, los casos de *BRAF* tipo salvaje surgieron con mayor frecuencia en el maxilar y mostraron recurrencias más tempranas. Las células del ameloblastoma demostraron una activación constitutiva de la vía MAPK *in vitro*. La proliferación y la activación de MAPK fueron inhibidas de forma potente por el inhibidor de *BRAF* vemurafenib. Se sugiere que la activación de mutaciones de *FGFR2-RAS-BRAF* juega un papel crítico en la patogénesis de la mayoría de los casos de ameloblastoma. Las mutaciones somáticas en *SMO*, *CTNNB1*, *PIK3CA* y *SMARCB1* pueden funcionar como mutaciones secundarias. Las mutaciones de *BRAF* V600E tienen implicaciones tanto de diagnóstico como de pronóstico. La respuesta *in vitro* del ameloblastoma a un inhibidor de *BRAF* sugiere un papel potencial para la terapia dirigida (Brown y col., 2014).

You y col. (2019) encontraron la mutación del gen *BRAF* en todas las muestras analizadas de FA, dicha mutación *BRAF* fue una mutación puntual con una transversión de timina-adenina en el nucleótido 1799 del exon 15, lo que resultó en un cambio en el residuo 600 que sustituyó la glutamina por valina. Esta mutación fue el activador más fuerte de la vía de señalización RAS / RAF / MEK / ERK-MAPK. Esto ayudó a provocar una mutación de ganancia de función debido a una sustitución de V600E. Muchos estudios identificaron que *BRAF* regulaba la supervivencia, la apoptosis y la proliferación de células induciendo la activación de las vías MAPK. Para los casos en estudio, ninguna de las variables como edad, sexo, ubicación, recurrencia y tratamientos tuvo una correlación estadísticamente significativa con la mutación *BRAF* (You y col., 2019).

2.6.2. *PTCH1* Y *SMO*

El gen *PTCH1* codifica un miembro de la familia de proteínas *ptch* y un componente de la vía de señalización erizo. La señalización erizo es importante en el desarrollo embrionario y la tumorigénesis. La proteína codificada es el receptor de los ligandos erizos que incluyen erizo sónico, erizo indio y erizo del desierto. Después de la unión por uno de los ligandos de erizo, la proteína codificada se trafica lejos del cilio primario, aliviando la inhibición del receptor acoplado a proteínas G, lo que resulta en la activación de la señalización (Hoyos y col., 2019).

La proteína codificada por el gen *SMO* es un receptor acoplado a proteínas G que interactúa con la proteína *ptch*. La proteína codificada traduce señales a otras proteínas

después de la activación por un complejo de proteínas erizo / proteína *ptch* (Hoyos y col., 2019).

El gen *hedgehog* (erizo) original se halló en *Drosophila* y su nombre se debe a la apariencia del fenotipo mutante que daba origen a un embrión cubierto de dentículos puntiagudos con aspecto de un erizo. Presenta las siguientes tres formas o ligandos homólogos en los mamíferos: Sonic Hedgehog (*Shh*), Indian Hedgehog y Desert Hedgehog. La vía de señalización *Shh* es un sistema altamente conservado cuyo gen es el más ampliamente estudiado entre los de la familia *hedgehog* de los vertebrados. Participa en la regulación de la formación y supervivencia de las células progenitoras en el desarrollo embrionario animal orquestando la comunicación entre diferentes tipos celulares, su proliferación, diferenciación y especialización (Ingham y McMahon, 2001).

Los diferentes tejidos y órganos requieren distintos niveles de expresión de *Shh* en diversos estadios para el desarrollo normal y su funcionalidad, por lo que cualquier alteración de la actividad de la vía puede derivar en alteraciones de los mismos a nivel de control del desarrollo (Ingham y McMahon, 2001). La vía también tiene funciones en el adulto, las enfermedades asociadas con el mal funcionamiento de esta vía incluyen al carcinoma de células basales (Hoyos y col., 2019). Los componentes de la vía de señalización *Shh* son *PTCH1*, *SMO*, *GLI 1*, *GLI 2*, *GLI 3* y *SUFU* (Hoyos y col., 2019; Ingham y McMahon, 2001).

PTCH1 es un receptor que presenta 12 dominios transmembrana y se une a cualquiera de los tres ligandos *Hedgehog* con igual afinidad en mamíferos. Su gen correspondiente se localiza en el locus 9q22.3. Su función es inhibir a *SMO* por medio de un mecanismo que no es conocido con exactitud, si bien se sugiere que se produce algún tipo de cambio conformacional (Wilson y Chen, 2009).

PTCH1 actúa como un gen supresor tumoral de esta vía, siendo también uno de los genes diana regulados por *gli 1* (Tukachinsky y col., 2016). En ratones se ha visto que los heterocigotos *ptch1* mutantes presentan anomalías similares a los pacientes con síndrome de Gorlin, enfermedad hereditaria de carácter autosómico dominante que se caracteriza por presentar una tríada clásica de múltiples nevus, queratoquistes odontogénicos e hiperqueratosis palmoplantar (Gorlin, 2004).

SMO es un receptor con 7 dominios transmembrana, del tipo “receptor acoplado a proteínas G”, esencial para la activación de la vía *Shh* y conservado desde las moscas a los humanos, localizándose en el cromosoma 7p32.3. Antes de ser activada la vía *Shh*, *SMO* se encuentra inhibido por *PTCH1*. Tras la unión de *Shh* a *PTCH1* y a otros co-

receptores, se produce la translocación de *SMO* al cilio primario, posiblemente en vesículas, donde se inicia la transducción de señal. Se discute cómo es dicha transducción, pero se plantea la cuestión de que existen varias vías que puede depender del tipo celular o tejido, del momento del estado de diferenciación de la célula o del organismo, así como de una serie de otros factores (incluidas las diferencias entre especies). Una de esas vías conduce a la no fosforilación de *GLI*, el cual se estabiliza y es capaz de iniciar la transcripción. *SMO* puede, además, funcionar como un oncogén y su activación no regulada conduce al desarrollo del cáncer (Wilson y Chen, 2009).

Se han propuesto tres modelos, detallados en la figura 10, para explicar la implicación de la señalización aberrante en el desarrollo y/o mantenimiento de la vía Shh dependiente del cáncer, una de ellas ligando-independiente y otras dos ligando-dependientes con distinto carácter, autócrino o parácrino (Rubin y Sauvage, 2006).

- Ligando-independiente: la vía se activa de forma intrínseca mediante mutaciones que implican pérdida de función en componentes inhibidores de la vía, como *PTCH1* y *SUFU*, o por medio de mutaciones que implican ganancia de función de componentes activadores como *SMO*. Es la forma de activación aberrante de la vía Shh que se reconoció en pacientes con carcinoma basocelular. Se presentan alteraciones genéticas de la vía, afectando a componentes que promueven el crecimiento celular intrínseco y/o a propiedades de supervivencia de los tumores (Teglund y Toftgård, 2010).
- Ligando-dependiente, autócrina: Las células tumorales producen una activación autónoma de la vía Shh. Aquellos tumores con elevada expresión de ligandos Hedgehog en los que, sin embargo, no se identifican alteraciones genéticas de los componentes de la vía, como los de colon, mama, pulmón, páncreas, próstata, glioblastomas o melanomas, sugieren que estos ligandos podrían ser la base de una señalización autócrina o yuxtacrina de la vía Shh ligando dependiente (Teglund y Toftgård, 2010).
- Ligando-dependiente, parácrina: las células de tumores de próstata, páncreas o colorrectal, producen ligando Hedgehog, y las células estromales cercanas responden mediante la producción adicional de factores de crecimiento para apoyar el crecimiento tumoral o su supervivencia, como el factor de crecimiento insulínico y el factor de crecimiento endotelial vascular (Rubin y de Sauvage, 2006).

Existe una variante de este modelo, el paracrino reverso, en el que las células estromales secretan ligando Hedgehog afectando a la activación de la vía Shh en las células tumorales, las cuales a su vez inducen la producción de factores que mantienen la secreción de Hedgehog o inducen a otros factores promotores tumorales, como se ha observado en linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple (Mar y col., 2011).

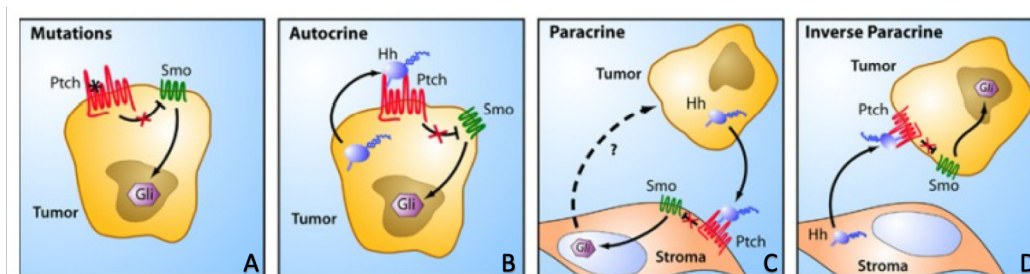


FIGURA 10. Modelos de activación de la vía Sonic Hedgehog que contribuyen al cáncer. A. Activación independiente del ligando. B. Activación autócrina. C. Activación parácrina. D. Activación parácrina inversa. Adaptado de *The controversial role of the Hedgehog pathway in normal and malignant hematopoiesis. Leukemia* (Mar y col., 2011)

La proteína Shh se expresa en el epitelio dental e induce la expresión de *gli 1* y *PTCH1* en el mesénquima (Malčić y col., 2008). La actividad aberrante de la vía Shh ligada al cáncer, se estableció a partir del descubrimiento de que las mutaciones causantes de la pérdida de función en el gen *PTCH1* subyacían al síndrome del carcinoma basocelular nevoide o síndrome de Gorlin, enfermedad caracterizada por desarrollar carcinomas basocelulares en la piel a edad temprana que muestran, además, una elevada incidencia de otras neoplasias como el meningioma, fibroma ovárico y rhabdomioma (Gorlin, 2004). Del mismo modo, se ha comprobado que las formas esporádicas de carcinoma basocelular presentan frecuentemente mutaciones inactivadoras de *PTCH1*, o menos habitualmente, mutaciones activadoras de *SMO* (Corcoran y Scott, 2001). Asimismo, también se produce en varias neoplasias como el tumor neuroectodérmico primitivo, algunos tumores de pulmón, intestino, próstata, ovario, estómago o melanoma (Berman y col., 2003; Karhadkar y col., 2004; Chen y col., 2007; Stecca y col., 2007).

Sweeney y col. (2014) a partir de un estudio con ameloblastomas, identificaron mutaciones somáticas altamente recurrentes en dos vías clave de señalización del factor de crecimiento o desarrollo, las vías Shh y MAPK. En total, el 39 % de los tumores tenían mutaciones en *SMO* y el 46 % tenían mutaciones *BRAF*. Las mutaciones de *SMO* y *BRAF*

tendían a ser mutuamente excluyentes, lo que sugiere que estas alteraciones podrían definir dos etiologías genéticas independientes para el ameloblastoma. Hubo cierta correlación entre el estado de la mutación y los subtipos morfológicos previamente establecidos. Sorprendentemente, las mutaciones *SMO* exhibieron una marcada preponderancia en ameloblastomas maxilares en comparación con los casos mandibulares, en cambio, las mutaciones *BRAF* exhibieron el patrón inverso, con una frecuencia más alta en mandibulares en comparación con casos maxilares. Utilizando la información disponible sobre el resultado clínico, observaron tendencia hacia una recurrencia más temprana para los tumores con mutaciones *SMO*, a diferencia de los que poseían mutaciones *BRAF* que recurrieron dentro de los 3 años posteriores al tratamiento inicial (Sweeney y col., 2014).

Shimura y col. (2020) analizaron los exones completos de *SMO*, *BRAF*, *PTCH1* y *GNAS* mediante secuenciación de nueva generación en 18 pacientes con enfermedades odontogénicas. Obtuvieron como resultado que de los seis pacientes con ameloblastoma, dos tenían la misma mutación sin sentido en *BRAF* y un paciente con ameloblastoma periférico tenía una mutación sin sentido en *PTCH1*. De los siete pacientes con queratoquiste odontogénico tenían algunos una mutación sin sentido en *PTCH1*, *BRAF* y *SMO*. El paciente con O tenía mutaciones sin sentido en *SMO*, *BRAF* y *PTCH1*; en cambio, la displasia cemento-ósea tenía mutaciones sin sentido en *SMO* y *PTCH1*, y el tumor odontogénico adenomatoide tenía en *SMO* (Shimura y col., 2020).

2.6.3. *CAVI*

El gen *CAVI* localizado en el cromosoma 7q31.2 codifica para la formación de la proteína Cav-1 ya descrita anteriormente, como el componente principal de las Caveola ubicadas en la membrana plasmática de la mayoría de los tipos celulares. El gen *CAVI* es un candidato a ser un gen supresor de tumores y un regulador negativo de la cascada Ras-p42/44 MAPK. Los genes *CAVI* y *CAV2* se encuentran próximos en el genoma, concretamente en el cromosoma 7 y expresan proteínas que co-localizan formando complejos heterooligoméricos estables. Mediante el uso de codones de iniciación alternativos en el mismo marco de lectura, se codifican dos isoformas (alfa y beta) de la proteína a partir de un único transcrito del gen (Fra y col., 1999).

Dado que Cav-1 es necesaria para la formación de Caveolas, se expresa en la mayoría de los tipos de células y tiene una amplia variabilidad de funciones e interacciones moleculares, principalmente entre receptores de integrina y moléculas de señalización intracelular, para las cuales los microdominios (uno transmembrana y dos

citoplasmáticos) de la Caveolas son cruciales (Shimizu y col., 2017). Juega un papel importante en varias funciones biológicas, como endocitosis, adhesión celular y señalización celular (Sánchez-Romero y col., 2021).

Campos y col. (2019) realizaron una revisión basada en el análisis de la dualidad de funciones de *CAVI* detallando su implicancia en el cáncer, tanto como promotor o como supresor de tumor. En esta revisión, discutieron los mecanismos relevantes para el desarrollo de la enfermedad metastásica con un enfoque hacia los mecanismos intrínsecos y/o extrínsecos asociados con la progresión de la enfermedad. En la figura 11 se muestra la línea de tiempo que resume la evolución según la comprensión de los autores acerca de la función *CAVI*. Los primeros estudios indicaron que al inicio de la línea de tiempo se centraron en el papel estructural de la proteína y su función en el transporte de colesterol. Luego, surgieron varios estudios relacionados con la presencia de *CAVI* con la supresión de la señalización oncogénica y la transformación celular correlacionada con la pérdida de expresión del gen. En las etapas posteriores del cáncer, a menudo se detectan niveles elevados de proteína Cav-1 y se asocian con un fenotipo celular más maligno (metastático), lo que indica que en este contexto, *CAVI* regula diferentes rasgos celulares. Los mecanismos considerados hasta este punto están vinculados a la función Cav-1 dentro de la célula (intrínseco). Más adelante, se identificó que Cav-1 era una proteína secretada con funciones extracelulares, dentro de ellas la más relevante sería su colaboración para el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Campos y col., 2019).

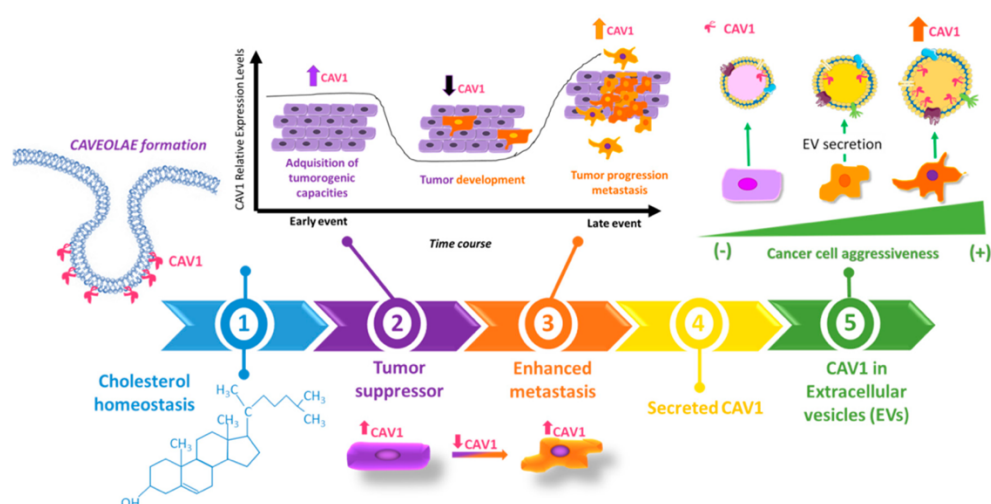


FIGURA 11. Línea de tiempo que resume la evolución de la función de *CAVI*. Obtenido de *Mecanismos celulares intrínsecos y extrínsecos de la metástasis mejorada de Caveolin-1. Biomoléculas* (Campos y col., 2019)

En el contexto del cáncer, *CAVI* es la isoforma que se asocia principalmente a mecanismos tumorales, como transformación maligna, angiogénesis, estadio tumoral, metástasis, respuesta quimioterapéutica y pronóstico (Sánchez-Romero y col., 2021).

Se ha informado que *CAVI* estaría subexpresado en diferentes tipos de tumores humanos, lo que sugiere una correlación negativa entre su nivel de expresión y la formación y progresión del tumor, por lo que actuaría en estos casos como un supresor de tumores. Sin embargo, se ha descubierto que *CAVI* está regulado positivamente en la etapa tumoral avanzada de diferentes tipos de cánceres, lo que demuestra su asociación con la invasión y la metástasis. Los diferentes roles de *CAVI* en el cáncer pueden depender de la etapa del cáncer y su interacción con múltiples moléculas de señalización diferentes y tipos de células específicos, por lo que sigue siendo controvertido si *CAVI* actúa como promotor o supresor de tumores (Gong y col., 2019).

Engelman y col. (1997) estudiaron la activación de *CAVI* por parte de oncogenes en células NIH 3T3 (línea celular NIH3T3 obtenida a partir de fibroblastos embrionarios de ratón) con una forma activa de H-Ras, observando una regulación negativa del nivel transcripcional de *cav1*, mientras que, el tratamiento de estas células con un inhibidor de la cascada de la quinasa Ras-p42/44 MAPK restituyó la expresión de *CAVI* hasta alcanzar los niveles normales (Engelman y col., 1997). Hay más oncogenes implicados en la regulación negativa de *CAVI* a nivel transcripcional como HPV E6. En casi todos los casos, el mecanismo de esta inhibición no se ha descrito, las excepciones incluyen la represión por c-Myc y por la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano. La activación de c-Myc reprime la expresión de *CAVI* a nivel transcripcional, y la oncoproteína E6 disminuye la expresión de *CAVI* a través de la inhibición de p53, porque en la secuencia del promotor de *CAVI* hay elementos de respuesta a p53 (Williams y col., 2003).

La decisión de sobrevivir y proliferar o ir a la muerte celular programada, o apoptosis, es esencial para el desarrollo, para mantener la homeostasis tisular y para proteger de un daño celular o genómico. Las Caveolas/Caveolinas pueden estar implicadas en la modificación del balance entre señales anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. Debido a la capacidad de unión y modulación de Cav a diferentes proteínas de vías de señalización, también podría regular, de manera similar, la acción de ciertos oncogenes. Basándose en la capacidad de *CAVI* de inhibir la actividad de varios oncogenes, se la ha propuesto como una proteína supresora de tumores (Mayoral y col., 2007). Los experimentos de sobreexpresión de *CAVI* indican que es un potente inhibidor de vías proliferativas, puede interaccionar e inhibir moléculas implicadas en la

supervivencia y proliferación, puede suprimir la función del receptor de Factor de crecimiento epidérmico, de varios miembros de la cascada de quinasas Ras-p42/MAPK, del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y de la fosfatidilinositol-3-quinasa. Además, *CAVI* es capaz de sensibilizar a las células hacia estímulos apoptóticos y muerte celular inducida por acumulación de ceramida, a través de un mecanismo dependiente de la fosfatidilinositol-3-quinasa (Zundel y col., 2000).

Entre las funciones fisiológicas y de desarrollo de *CAVI*, se ha informado de su expresión durante la odontogénesis en ratón, particularmente en las etapas iniciales del desarrollo dentario. Además, se observó un aumento gradual de *CAVI* en el epitelio interno del esmalte, asa cervical y ameloblastos, al avanzar en los estadios. Esto sugiere que *CAVI* tiene un papel en el desarrollo de los dientes del ratón, especialmente en la diferenciación y organización de los tejidos odontogénicos (Shi y col., 2016).

Sánchez y col. (2021) reportaron recientemente positividad para la proteína Cav-1 en ameloblastomas y carcinomas ameloblásticos, así como el aumento en la expresión de la transcripción del gen *CAVI* (Sánchez-Romero y col., 2021).

2.6.4. *CTNGB1*

La proteína codificada por el gen *CTNGB1* ubicado en el cromosoma 3p22, forma parte de un complejo de proteínas que constituyen uniones adherentes, necesarias para la creación y mantenimiento de las capas celulares epiteliales mediante la regulación del crecimiento y la adherencia entre las células. La proteína codificada también ancla el citoesqueleto y puede ser responsable de transmitir la señal de inhibición de contacto que hace que las células dejen de dividirse una vez que la capa epitelial está completa (Dong y col., 2016).

El gen *CTNGB1* proporciona instrucciones para producir una proteína llamada β -catenina, proteína presente en muchos tipos de células y tejidos, ubicada como ya mencionamos, principalmente en las uniones adherentes que conectan las células vecinas (Fodde y Brabletz, 2007). Juega un papel importante en la unión y comunicación celular, además, de participar como elemento esencial en la vía de señalización Wnt. Ciertas proteínas en esta vía se unen a β -catenina, lo que desencadena un proceso de varios pasos que permite que la proteína se mueva hacia el núcleo celular. Una vez en el núcleo, β -catenina interactúa con otras proteínas para controlar la expresión de varios genes (Mantilla y col., 2015).

La vía de señalización Wnt promueve el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular. Se sabe que la señalización Wnt está involucrada en muchos

aspectos del desarrollo antes del nacimiento. En los tejidos adultos, esta vía juega un papel en el mantenimiento y renovación de las células madre, células que ayudan a reparar el daño tisular y pueden dar lugar a otros tipos de células (Fodde y Brabletz, 2007; Katanaev, 2010; Mantilla y col., 2015).

β -catenina es una proteína de 92 kDa, con 781 aminoácidos que consta de tres dominios, amino-terminal, carboxi-terminal y central. El dominio amino-terminal (N-terminal), de aproximadamente 150 aminoácidos, es la región de unión a α -catenina, clave en la interacción célula-célula. En este dominio se localizan los sitios de fosforilación de las quinasas en la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la glicógeno sintasa quinasa 3 β y la caseína quinasa 1 α (Piedra y col., 2001). El dominio carboxi-terminal (C-terminal), de 100 aminoácidos aproximadamente, permite la interacción con proteínas celulares para su papel como factor de transcripción de genes dependientes del factor de crecimiento de células T/factor potenciador linfóide; genes como Cyclin D1, c-Myc y metaloproteinasas de matriz celular MMP2, 3, 7, 9, 13. El dominio central de 550 aminoácidos, está formado por una secuencia de 42 aminoácidos que se repite 12 veces, dominio conocido como “repeticiones armadillo”; esta región que presenta una estructura en hélice, tiene como función la interacción con proteínas como e-cadherina, axina, APC y Tcf/Lef (Huber y col., 1997).

La proteína β -catenina, codificada por el gen *CTNNB1*, es el principal componente de la vía Wnt/ β -catenina. La regulación de esta vía de señalización está basada en la presencia del ligando Wnt que produce la activación; cuando la vía está activa se impide la degradación de la proteína β -catenina por acción de un complejo de proteínas conocido como complejo de destrucción, conformado por quinasas, la proteína adenomatosis poliposis Coli y la proteína axina. En ausencia del ligando Wnt la vía no se activa y, como consecuencia, la proteína β -catenina es fosforilada y posteriormente degradada en el proteosoma, impidiendo sus funciones como factor de transcripción y en la interacción célula-célula. Esta proteína participa también en la adhesión celular mediada por cadherina, cuya desregulación se ha asociado también con procesos oncogénicos debido a la pérdida de la adhesión celular y al aumento de la capacidad de invasión de las células tumorales (Mantilla y col., 2015).

β -catenina fue originalmente identificada por su asociación con el dominio citoplasmático de las cadherinas y su papel en la adhesión celular dependiente de calcio. Esta proteína es un componente principal en la adhesión célula-célula por interacción con la proteína cadherina (proteínas de adhesión intercelular); adicionalmente, β -catenina

regula la expresión génica a través de la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Fu y col., 2011).

β -catenina se encuentra en dos complejos moleculares que corresponden a estas dos funciones: la el primera corresponde a β -catenina como parte de complejos de alto peso molecular implicados en la adhesión celular mediada por e-cadherina; mientras que en la segunda función de β -catenina se encuentra en estado monomérico participando en la señalización de la vía Wnt/ β -catenina. La coordinación de estas dos vías es fundamental para el control de los procesos como la formación del eje y mesodermo en el embrión, la diferenciación de células madre y en procesos de patogénesis como la carcinogénesis (Katanaev, 2010).

En la figura 12 se muestra el modelo de red molecular para la señalización de *CTNNB1* con las redes extraídas para las vías del cáncer, la vía de señalización de Hippo y la vía de señalización de Wnt que se fusionan y muestran un modelo de red molecular. Las moléculas de unión de señalización Wnt y adherentes se cruzan a través de *CTNNB1*, por lo que *CTNNB1* activado induce la transcripción de genes anti-apoptosis y genes pro-proliferación (Tanabe y col., 2016).

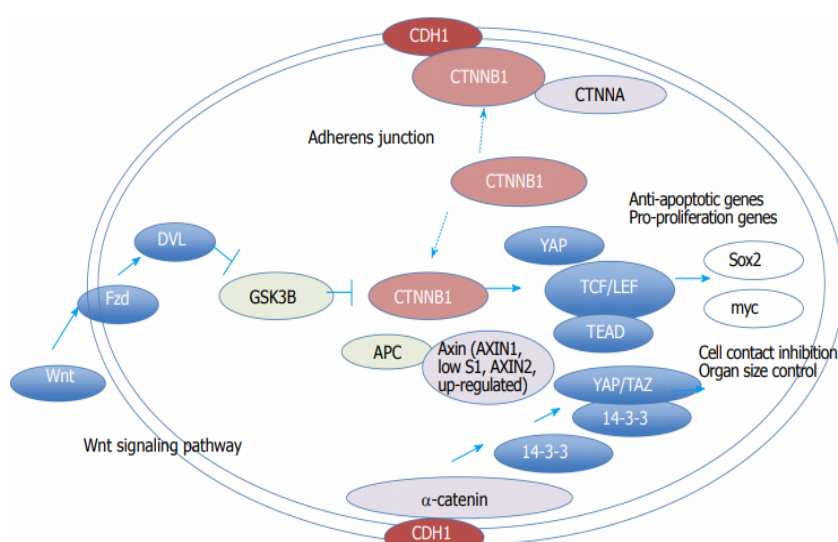


FIGURA 12. Modelo de red para el gen *CTNNB1*. Obtenido de *Gene expression and pathway analysis of CTNNB1 in cancer and stem cells. World Journal of Stem Cells* (Tanabe y col., 2016)

La alteración de la vía de señalización Wnt/ β -catenina se describe en diversas neoplasias como el cáncer de colon, cáncer primario de hígado, cáncer de ovario y

melanoma, entre otros (Mantilla y col., 2015). En neoplasias caracterizadas por alteración de la vía de señalización Wnt/ β -catenina son frecuentes las mutaciones en el gen *CTNNB1*. Los cambios en la secuencia de este gen más reportados se localizan en el exón 3 que codifica parte del dominio N-terminal de la proteína β -catenina en el cual se ubican los residuos de serina y treonina, S45, T41, S37 y S33, blanco de las quinasas GSK3 β y CK1 α (Lee y col., 2007). Estas mutaciones producen cambios conformacionales en la proteína que impiden su fosforilación, lo cual resulta en la estabilización de β -catenina y en su acumulación citoplasmática, posterior traslocación al núcleo y en consecuencia, transcripción de los genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina. Estas mutaciones en el exón 3 se han descrito en diferentes tipos de cáncer incluyendo cáncer de colon, de hígado, de ovario, en melanoma y en tumores desmoides (Fodde y Brabletz, 2007). El hepatoblastoma, cáncer primario de hígado, que se presenta principalmente en niños, es una neoplasia con alta frecuencia de mutaciones en el gen *CTNNB1* (Laurent-Puig y col., 2001).

Pentheroudakis y col. (2014) demostraron que el 20.7 % de muestras de tumores primarios de origen desconocido presentaban mutaciones en los exones 3, 4 y 5 del gen *CTNNB1*; y que en el 19.5 % de los casos estas mutaciones estaban relacionadas con la activación de la vía Wnt y asociadas con el mal pronóstico de los pacientes (Pentheroudakis y col., 2014). Las mutaciones S45A, T41A, S37A, S33A aumentan la capacidad de transformación de las células; pudiendo también afectar la proliferación y migración celular. En ensayos in vitro con células MDCK, una línea celular no transformada de células epiteliales con expresión de cadherina y componentes de la vía de señalización Wnt “wild type”, se observó que las mutaciones S37A y S33A generan disminución en la densidad celular, mientras que, las mutaciones T41A y S45A aumentan el número de células en la fase G₀ del ciclo celular. Adicionalmente, en este modelo se demostró que la mutación S45A aumenta la migración celular y los niveles de ARNm de ciclina D1, un gen blanco de la activación transcripcional por β -catenina (Provost y col., 2005).

Gondak y col. (2020) reportaron mutaciones patogénicas en los genes *CTNNB1* y *apc*, que forman parte de la vía de señalización de Wnt, en áreas sólidas del tumor odontogénico maligno con gran cantidad de material dentinoide. De acuerdo con la activación de la señalización de Wnt, los tumores mostraron una fuerte acumulación de β -catenina en el citoplasma y en los núcleos (Gondak y col., 2020).

Ohata y col. (2018) identificaron mutaciones del gen *CTNNB1* en el carcinoma odontogénico de células fantasma, destacando la mutación S33C, este hallazgo permitió sugerir que *CTNNB1* podría ser un objetivo común para la patogénesis de tumores acompañados de células fantasma (Ohata y col., 2018).

Miyake y col. (2006) examinaron la importancia de la expresión nuclear/citoplasmática de β -catenina y la mutación del gen *CTNNB1* en varios TO, reportándose mutación en el codón 40 del exón 3 solo en un ameloblastoma, pero no en el resto de los ameloblastomas y TO malignos. Estos hallazgos confirmaron que la mutación *CTNNB1* no es frecuente en el ameloblastoma y los TO malignos, aunque la anomalía de la señalización de Wnt puede estar asociada con algunos de estos tumores (Miyake y col., 2006). En la tabla 1 se resumen las características generales de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1*.

TABLA 1. Características generales de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1*. Se detalla el tipo de gen, la localización cromosómica, la vía de señalización junto con la proteína y sus funciones (Williams y Terence, 2005; Koike y col., 2010; Farias y Gomes, 2012; Brown y col., 2014; Sweeney y col., 2014; Diniz y col., 2015; Twigg y col., 2016; Kim S, 2019; You y col., 2019)

Gen	Tipo	Cromosoma	Proteína codificada	Funciones	Vía señalización
<i>BRAF</i>	Oncogén	7q34	B-Raf (familia RAF)	Crecimiento, división y diferenciación	MAPK/ERK
<i>PTCH1</i>	Supresor tumoral	9q22.32	Patched 1	Formación de estructuras embrionarias	Sonic Hedgehog
<i>CAVI</i>	Oncogén o Supresor	7q31.2	Caveolin-1	Endocitosis, adhesión y señalización	Ras-ERK
<i>CTNNB1</i>	Oncogén o Supresor	3p22.1	β -catenina	Regulación y coordinación de la adhesión célula-célula	Wnt
<i>SMO</i>	Oncogén	7q32.1	Smoothened	Desarrollo embrionario y homeostasis	Sonic Hedgehog

Capítulo 3 | Metodología

En este capítulo se describe la metodología utilizada para llevar a cabo el trabajo de investigación planteado y las etapas para el cumplimiento de los objetivos propuestos. En primer lugar, se muestran las aprobaciones necesarias para la realización del trabajo, incluyendo la aprobación del comité de ética, entre otras (§ 3.1). Además se detalla el diseño del estudio (§ 3.2), la obtención de la muestra (§ 3.3), los criterios de inclusión y exclusión propuestos (§ 3.4), así como también los mecanismos de calibración realizados previo al inicio del trabajo de campo inmunohistoquímico (§ 3.5). En segundo lugar, se separa la metodología aplicada para el trabajo inmunohistoquímico y genético. Para el estudio inmunohistoquímico se describe el procesamiento, el procedimiento de conteo y el análisis estadístico utilizado (§ 3.6). Mientras que, para el estudio genético se detalla el diseño de primers, el procesamiento y el análisis estadístico (§ 3.7). En tercer lugar, se presenta la operacionalización de las variables utilizadas en el estudio (§ 3.8). Finalmente, se exponen los recursos y financiación (§ 3.9), además de la declaración de conflictos de interés (§ 4.0).

3.1. Consideraciones éticas

El proyecto fue registrado en la Unidad de Investigación de la Facultad de Odontología con el número 21-002, registrado en el Ministerio de Salud Pública con el número 3948745 (anexo 1), aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República en agosto del 2021 con el Exp. No. 091900-000084-21 (anexo 2) y aprobado por la Comisión honoraria asesora del Instituto Nacional de Donación y Trasplante de Células, Tejidos y Órganos (Indt), en setiembre del 2021 (anexo 3).

El estudio se rigió por las consideraciones éticas respectivas a la investigación con seres humanos regulada a nivel nacional por el decreto del Poder Ejecutivo N° 379/008 del 4 de agosto de 2008.

Para asegurar la confidencialidad de cada individuo se utilizó un ID de identificación (n° de caso), no utilizando en ninguna de las instancias del proyecto el nombre y apellidos reales de los pacientes seleccionados, asignándoles con este fin, un código para su identificación. Además, se limitó a la persona responsable del proyecto, el acceso a toda información que pueda identificar a los pacientes seleccionados.

3.2. Diseño del estudio

Se realizó un estudio analítico, observacional, transversal y retrospectivo, basado en el análisis de muestras histopatológicas de archivo.

3.3. Obtención de la muestra

La población de estudio con 13.874 casos estuvo constituida por todos los diagnósticos histopatológicos realizados y archivados en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología UdelaR, para el período comprendido entre 1958 y 2022, inclusive. A partir de la misma, se obtuvo una muestra representada por 20 casos con diagnóstico histopatológico de ocho FA, un FDA y cinco FOA (incluyendo seis diagnósticos de O), todos conservados en bloques de parafina. Los O seleccionados fueron complejos y se incluyeron aquellos más recientes y representativos, considerando que las muestras en la evaluación histológica contaran con tejidos blandos y duros representativos de la lesión para el procesamiento inmunohistoquímico. El tipo de muestreo fue no probabilístico, por conveniencia. Las muestras para control (5 CP y 5 MB) también estaban incluidas en bloques de parafina. Las muestras de MB se correspondieron a biopsias donde estaba presente la MB sin patologías.

Los casos seleccionados que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión planteados a continuación, fueron sujetos a revisión histológica, donde se rectificó el diagnóstico histopatológico de acuerdo a lo establecido por la OMS en 2005 (Barnes y col., 2005). Dicha evaluación se hizo en conjunto con la Profa. Dra. Verónica Beovide, experiente en el diagnóstico histopatológico.

Según los criterios establecidos por la OMS en 2005, histopatológicamente el FA consiste en hebras epiteliales ramificadas y anastomosadas que forman nidos de diferentes tamaños, con un borde periférico de células columnares similar al epitelio interno del esmalte y una zona central laxa, idéntica al retículo estrellado. Las hebras epiteliales se encuentran en un estroma rico en células mixoides con fibroblastos que se asemejan a la papila dental. Cuando en los FA se observa dentina displásica se denominan FDA, a diferencia de los FOA que presentan la histología del FA con formaciones de tejidos duros dentarios. Finalmente consideramos O aquellos casos donde la histología se presenta como una cápsula de tejido conectivo laxo que contiene hebras o islas de epitelio odontogénico, con formación de dentina tubular o displásica y esmalte, con cemento que puede ser escaso (Barnes y col., 2005).

En el Laboratorio de Patología Molecular Estomatológica de la Facultad de Odontología, UdelaR se realizó todo el procesamiento y análisis inmunohistoquímico, así como el estudio genético, a excepción de la secuenciación que se realizó con la empresa MacroGen, Inc. (Corea del Sur), pero el análisis informático de las secuencias se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular Estomatológica.

Se revisaron las fichas clínico-patológicas de cada uno de los casos seleccionados, ingresando en la planilla electrónica diseñada para la ejecución del proyecto (apéndice 1), las variables correspondientes a sexo, edad, localización del tumor y diagnóstico histopatológico.

3.4. Criterios de inclusión y exclusión

3.4.1. Criterios de inclusión

Se incluyeron aquellos especímenes con diagnóstico histopatológico de FA, FDA, FOA y O, conservados en bloques de parafina en condiciones óptimas de preservación y representatividad para el análisis inmunohistoquímico y genético.

Se incluyeron los diagnósticos con fichas clínicas completas, donde se detallara la edad, sexo y localización de la lesión.

Se incluyeron como control para el análisis inmunohistoquímico muestras con diagnóstico de CP, en tanto que, para el análisis genético, mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR, por sus siglas en inglés, *Quantitative reverse transcription PCR*), se incluyeron muestras de MB. Para inmunohistoquímica los CP se seleccionaron por ser tejidos odontogénicos normales con epitelio y mesénquima odontogénicos, esto permite comparar la expresión de biomarcadores en un tejido asociado al desarrollo dentario. No se utilizaron gérmenes dentarios debido a las limitaciones éticas. Para el estudio genético el uso de MB como control en teoría proporciona ADN y ARN de calidad permitiendo obtener un nivel basal de expresión génica.

3.4.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos especímenes que al ser revalorados no fueron diagnosticados histopatológicamente como FA, FDA, FOA y O.

Se excluyeron aquellos especímenes no representativos de la lesión en estudio.

3.5. Calibración

Se determinó la reproducibilidad intra e interobservador (McHugh, 2012; Witte y Witte, 2017). En el conteo inmunohistoquímico la concordancia intraexaminador se

realizó mediante el análisis de diez muestras en dos momentos y para dos biomarcadores, T1 (evaluación inicial) y T2 (15 días después). El intervalo de 15 días entre T1 y T2 se consideró adecuado para disminuir el sesgo del análisis previo de las muestras en T1. La calibración interobservador siguiendo los mismos criterios, fue realizada conjuntamente con la Dra. Natalia Tancredi (Profesora Adjunta de la Subunidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la UdelAR). Si bien las observadoras, González y Tancredi, realizamos cuantificaciones de manera independiente, sin conocimiento de las cifras establecidas por la otra, previo al conteo y con el fin de establecer el grado de concordancia interobservador, ambas analizamos y acordamos los criterios morfológicos necesarios para el reconocimiento de las células positivas a los biomarcadores estudiados en las láminas de inmunohistoquímica. Se utilizó el coeficiente de correlación interclase para el cálculo del grado de concordancia inter e intraobservador para dos biomarcadores (B1 y B2), obteniendo un coeficiente de correlación interclase interobservador para B1 = 0,85 y B2 = 0,86 e intraobservador B1= 0,96 y B2 = 0,82. (Cortés-Reyes y col., 2010; McHugh, 2012).

3.6. Estudio inmunohistoquímico

3.6.1. Procesamiento inmunohistoquímico

Se realizó el procesamiento inmunohistoquímico con pautas similares a otros trabajos de investigación publicados anteriormente por el equipo del Laboratorio de Patología Molecular de la Facultad de Odontología de la UdelAR (Bologna-Molina y col., 2013, Bologna-Molina y col., 2017; Sánchez-Romero y col., 2021). Se obtuvieron cortes de 3 μm de espesor, posteriormente montados en laminillas tratadas con poly-L-lisina. Los cortes fueron desparafinados en la estufa a 45° C por 30 minutos y posteriormente colocados en xilol por 5 minutos. Se hidrataron a continuación en un tren de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 96 %, 80 %, 70 % y 50 %) y lavados con agua destilada. Para el desenmascaramiento de los epítopes se realizó la recuperación antigénica con solución de citrato de sodio 10mM (pH 6.2) en olla a presión en microondas a potencia máxima (750 W) por 5 minutos, dejando enfriar a temperatura ambiente y posteriormente lavando con agua destilada. Las peroxidasas endógenas se bloquearon con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0.9%, seguido por lavados con agua destilada y solución salina amortiguada con solución salina de fosfatos pH 7.4 (PBS). Se montaron las laminillas en placas cubiertas y colocadas en bastidores para la realización de inmunohistoquímica por capilaridad. Se incubaron con los siguientes anticuerpos

primarios: anti-Ki-67 (MIB-1; dilución 1:100, Dako Corporation, EE. UU.), anti-Cav-1 (Caveolin 1; dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), anti-MOC-31 (Ep-CAM; dilución 1:100, Dako Corporation, EE. UU.) o anti-Cx-43 (CX-1 B1; dilución 1:100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), por un período de 60 minutos a temperatura ambiente (tabla 2). Posteriormente, las secciones se incubaron con anticuerpo anti-ratón/anti-conejo biotinilado y con el complejo estreptavidina/peroxidasa (LSA-B + Estreptavidina-biotina marcada, Dako Corporation, Carpinteria CA, EE. UU.) durante 30 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Los productos de la reacción se visualizaron con sustrato de 3,3'diaminobenzidina-H₂O₂ (Dako Corporation, Carpintería, CA, USA). Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer (Bologna-Molina y col., 2013, 2017; Sánchez-Romero y col., 2021). Como control interno negativo, se omitió el anticuerpo primario y como control externo positivo, se utilizaron muestras de cáncer de mama para MOC-31, Cav-1 y Ki-67, osteoblastos y osteocitos para Cx-43.

TABLA 2. Características de los biomarcadores. Información extraída de los kits inmunohistoquímicos de cada biomarcador utilizado

Anticuerpo	Clona	Dilución	Expresión	Empresa
Anti-MOC-31 Ep-CAM	Monoclonal	1:100	Membrana Citoplasma	Dako Corporation, EE. UU.
Anti-Cav 1 Caveolin 1	Polyclonal	1:100	Membrana Citoplasma	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX
Anti-Cx-43 CX-1 B1 UU	Monoclonal	1:100	Membrana	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.
Anti-Ki-67 MIB-1	Monoclonal	1:100	Nuclear	Dako Corporation, EE. UU.

3.6.2 Procedimiento de Evaluación de la inmunomarcación

Todas las láminas histológicas objeto de estudio, tanto las teñidas con Hematoxilina-Eosina como las obtenidas por técnica de inmunohistoquímica, fueron pasadas a formato digital con el sistema de adquisición y procesamiento de imágenes *Motic VM 3.0 Digital Slide Scanning System*. En la figura 13 se muestra, a modo de ejemplo, como se observa con este software una zona de la lámina digitalizada de un FA teñido con Hematoxilina-Eosina.

En primera instancia, se visualizó la sección teñida con Hematoxilina-Eosina de cada muestra de TO, confirmando el diagnóstico histopatológico. En cada caso, con el

software *Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant* (versión 1.0.7.46, Copyright Motic China Group Co., Ltd.2017) a 10x de magnificación, se seleccionaron las áreas con mayor representación de la lesión, evitando zonas con alteraciones o con pliegues tisulares. Posteriormente, a 20x de magnificación se eligieron los cuatro campos más representativos y a 40x de magnificación, se realizó la micrografía para su posterior análisis con el software *Image J* (1.52v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

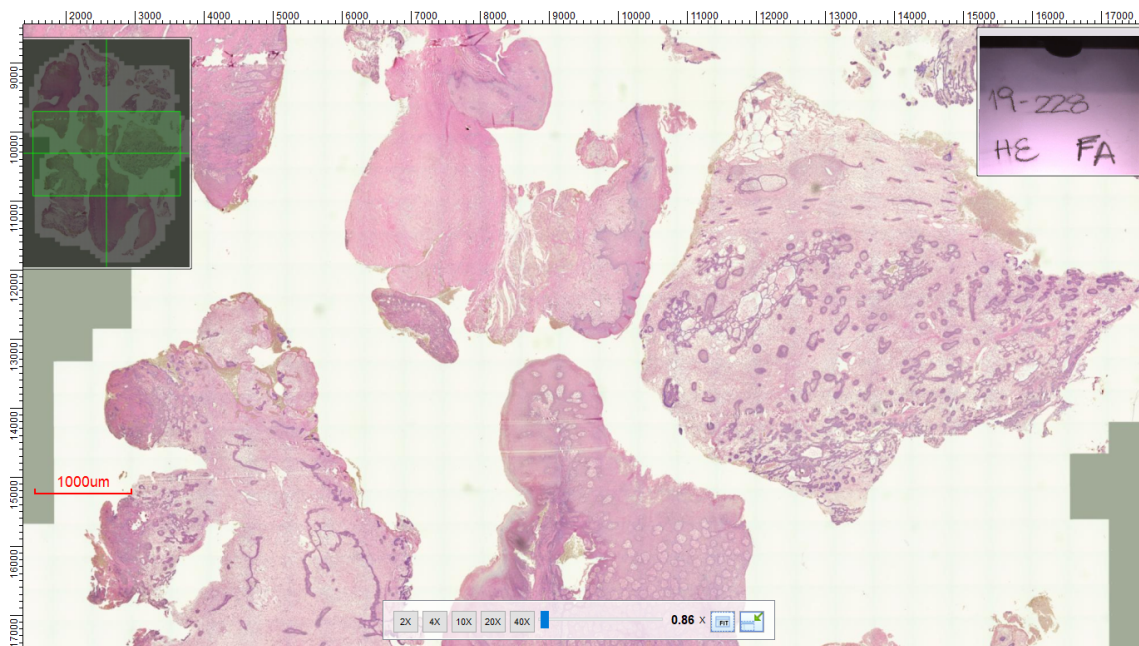


FIGURA 13. Lámina digitalizada de un Fibroma ameloblástico teñido con Hematoxilina-Eosina, visualizado con el software *Motic DS Assistant*. El software *Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant* permite evaluar las láminas histológicas que han sido escaneadas de forma muy similar a la visualización obtenida con el uso del microscopio óptico. Magnificación de la imagen es de 0.86x

Para la positividad citoplasmática y/o membranosa de Cav-1, MOC-31 y Cx-43, la cuantificación se realizó de acuerdo con la escala semicuantitativa de la tabla 3 (Bologna-Molina y col., 2017). Evaluamos el porcentaje de expresión, sin considerar la intensidad de coloración, usando una escala aplicada en trabajos anteriores de investigación realizados en el Laboratorio de Patología Molecular (Bologna-Molina y col., 2017). Se consideró una puntuación de 0 ("esencialmente sin tinción") para la tinción inmunohistoquímica negativa o positiva de < 5 % de las células, + ("Débil-moderado") para tinción de 5 % a 50 % de las células y ++ ("fuerte positivo") para tinción positiva >

50 %. Las reacciones se consideraron positivas al observar marcación celular con un patrón de tinción membrana y/o citoplasma para MOC-31 y Cav-1; membranoso para Cx-43 (Bologna-Molina y col., 2017).

TABLA 3. Escala semicuantitativa utilizada para el conteo inmunohistoquímico de Cav-1, MOC-31 y Cx-43 (Bologna-Molina y col., 2017)

Puntuación	Escala semicuantitativa	Tinción
0	Esencialmente sin tinción	Negativa o < 5 %
+	Débil-moderada	> 5 % y < 50 %
++	Fuerte positivo	> 50 %

La cuantificación de Ki-67 se llevó a cabo considerando como células positivas aquellas cuyo núcleo se tiñó de marrón, independientemente de la intensidad de la tinción. Los núcleos positivos podían mostrar una tinción uniforme o con zonas de mayor marcación (grumos). Se consideraron negativas, aquellas células que no presentan el núcleo marrón (Jing y col., 2019; Bismah y col., 2020). Se contabilizaron en un aumento al 40x, 1000 células neoplásicas y el número de células positivas para Ki-67. El grado de positividad para cada caso se determinó como el índice de proliferación denominado en la bibliografía como Índice de etiquetado, estableciendo el porcentaje de células positivas en el número total de células evaluadas. El índice de proliferación para Ki-67 se determinó de la siguiente forma: (Número de células positivas para inmunohistoquímica / Número total de células observadas) x100 (Jing y col., 2019; Bismah y col., 2020; Días y col., 2021).

3.6.3. Análisis estadístico del estudio inmunohistoquímico

Todos los datos clínico-patológicos y la inmunoexpresión de los biomarcadores se registraron en una planilla electrónica Excel. Se realizó estadística descriptiva de los datos a través de medias y desviaciones estándar para las variables continuas, y distribución de frecuencias para las variables categóricas. Se presentan los datos en tablas para organizar y resumir la variabilidad en las observaciones realizadas.

Para evaluar el patrón de expresión inmunohistoquímica se aplicó un modelo de regresión logística de efectos mixtos. Para comparar la expresión y establecer el grado de similitud se realizó un modelo de comparación múltiple post-hoc y la prueba de Mann-Whitney. Adicionalmente, se utilizaron tablas de contingencia con pruebas de chi-cuadrado para evaluar la relación entre la expresión y las variables clínicas. Se utilizó el

paquete estadístico Stata y los resultados se consideraron significativos con un valor $p \leq 0,05$ (Witte y Witte, 2017). Los gráficos se realizaron con el software *GraphPad prism* v. 8.0.0.

3.7. Estudio genético

3.7.1. Diseño de primers para PCR convencional y RT-qPCR

Para determinar la presencia de posibles cambios a nivel de la secuencia de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* Y *CTNNB1* en el FA, FDA, FOA y O se diseñaron primers específicos para PCR convencional para los genes mencionados y el gen *GAPDH* (gen normalizador) utilizando el programa de libre acceso *Primer-BLAST NCBI*. Se verificó la especificidad de los primers frente al genoma humano, utilizando la herramienta de acceso libre *Basic Local Alignment Search Tool*.

Previo al diseño, se realizó una búsqueda bibliográfica con la finalidad de incluir en las secuencias de los primers las mutaciones genéticas ya reportadas en patologías de la esfera bucomaxilar, principalmente en aquellas de origen odontogénico (tabla 4) (Williams y col., 2005; Koike y col., 2010; Farias y col., 2012; Brown y col. 2014; Sweeney y col. 2014; Diniz y col. 2015; Twigg y col. 2016; Kim y Jeong, 2019; You y col. 2019).

Se realizó el análisis termodinámico de los primers que se diseñaron para evitar la complementariedad, tanto dentro del primer como entre los primers, evitando la formación de homodímeros, horquillas (*hair pin* en inglés) y heterodímeros. Considerando como parámetros de selección o rechazo, la ubicación y número de horquillas, un ΔS menor a 30 y ΔG menor a 3. Para los dímeros de primers estudiamos la probabilidad de unión, el número, ubicación y el ΔG al cual se generarían esos dímeros.

Por otro lado, para establecer cambios en los niveles de expresión de los genes en estudio mediante RT-qPCR en las muestras de FA, FOA, FDA y O, se realizó el diseño de primers específicos para los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI*, *CTNNB1* y el gen *GAPDH* (gen normalizador), utilizando los mismos programas y realizando el mismo análisis.

Debido a la heterogeneidad celular de la mayoría de los tumores sólidos, las mutaciones somáticas en un gen pueden estar presentes en baja cantidad dentro de un fondo muy alto de secuencia del gen tipo salvaje, que puede diferir del mutante en un solo nucleótido, por tal motivo para el diseño de los primers del gen *BRAF* utilizamos lo establecido por Morlan y col. (2009), que basado en la tecnología de PCR en tiempo real

TaqManH, combina la PCR específica de alelo con un reactivo de bloqueo para suprimir la amplificación del alelo salvaje (Morlan y col., 2009).

TABLA 4. Mutaciones reportadas de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en patologías de la esfera bucomaxilar (Williams y Terence, 2005; Koike y col., 2010; Farias y Gomes, 2012; Brown y col., 2014; Sweeney y col., 2014; Diniz y col., 2015; Twigg y col., 2016; Kim S, 2019; You y col., 2019)

Genes	Mutaciones reportadas
<i>BRAF</i>	V600E
<i>PTCH1</i>	P1164L / P1164H / P1164R
<i>CAVI</i>	P132L
<i>CTNNB1</i>	S33P / S33C / S33Y / S33F / S33L / S45F / S45C / S45P
<i>SMO</i>	L412F

3.7.2. Procesamiento genético

Primeramente, para determinar la presencia de posibles cambios a nivel de la secuencia de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en el FA, FDA, FOA y O, se extrajo el ADN utilizando el kit Quick-DNA FFPE Miniprep (Zymo Research, USA), ajustando la temperatura para mejorar el crosslinking. Se realizaron las PCR convencionales, utilizando el kit Ranger Mix DNA Polymerase (Bioline Meridian LifeScience, EEUU) y los primers diseñados con sus respectivas temperaturas de annealing en el termociclador Mastercycler Nexus (Eppendorff). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Se purificaron los productos utilizando el kit Universal DNA Purification (PCR y Gel, Tiangen, Beijing) y se realizó la secuenciación bidireccional con la empresa MacroGen, Inc. (Corea del Sur).

Por otro lado, se analizaron las muestras de FA, FOA, FDA y O para determinar cambios en los niveles de expresión de los *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* mediante el análisis de RT-qPCR. Se extrajo el ARN total de las muestras utilizando el kit de extracción Quick-RNA FFPE Kit (Zymo Research, USA). Se utilizó como grupo control tejido proveniente de MB, por lo que también se le extrajo el ARN total.

Las transcripciones inversas se realizaron utilizando el SuperScript® III First-Strand Synthesis para RT-PCR (Life Technologies, EEUU) con primers oligo-dT, de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando el termociclador Mastercycler

Nexus (Eppendorff). El ARN y el ADNc obtenidos se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop DS-11 (Denovix, EE. UU.).

Las RTq-PCR se amplificaron usando el termociclador del sistema de PCR en tiempo real DTLite (DNA Technology, Rusia), se llevó a cabo utilizando Brilliant® SYBR® Green (Bioline Meridian Life Science, EEUU) y los primers diseñados con una temperatura de annealing de 60 °C. Además, de la fase de amplificación donde se cuantificó el producto obtenido, se realizó una curva de disociación para observar la formación de un único producto y corroborar la ausencia de dímeros de primers. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.7.3. Análisis estadístico de los resultados de la secuenciación y expresión genética

Una vez obtenidas las secuencias, se analizó el perfil alélico de cada muestra mediante la alineación independiente de ambas secuencias de genes utilizando el programa de acceso libre Chromas Technelysium DNA Sequencing (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane QLD, Australia).

Por otro lado, las variaciones en los niveles de transcripción se analizaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los valores de Ct proporcionados por la instrumentación de PCR en tiempo real se importaron a una hoja de cálculo del Software Microsoft Excel. Se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, tratando cada muestra por separado y promediando los resultados después de los cálculos para cada gen.

Usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, los datos se presentan como el cambio de veces en la expresión génica de los genes de interés en los tejidos tumorales con relación a los niveles de expresión en los tejidos de control (MB); normalizados con la expresión del gen de referencia endógeno.

Los niveles de expresión fueron categorizados de la siguiente manera: Sin expresión (ausencia de amplificación detectable del gen de interés), Expresión basal (niveles de expresión génica comparables a los observados en tejidos control, representando la expresión constitutiva del gen), sobreexpresión o subexpresión (niveles superiores o inferiores con respecto a la expresión basal, evidenciando una mayor o menor actividad transcripcional del gen analizado, respectivamente). Para la determinación de la expresión del gen *BRAF*, se evaluó la presencia de su forma mutada y de tipo salvaje (wild-type)

Para la significación estadística se utilizó un test t de Student no paramétricos y se consideraron significativos con un p-valor <0,05. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron en el software GraphPad prisma v.8.0.0.

3.8. Operacionalización de las variables

3.8.1. Variables dependientes

- Expresión de MOC-31 y Cav-1 en el FA, FOA, FDA y O (cuantitativa ordinal): se considera positiva la tinción inmunohistoquímica membranosa y/o citoplasmática mayor al 5 % de las células.
- Expresión de Cx-43 en el FA, FOA, FDA y O (cuantitativa ordinal): se considera positiva la tinción inmunohistoquímica membranosa mayor al 5 % de las células.
- Expresión de Ki-67 en el FA, FOA, FDA y O (cuantitativa ordinal): porcentaje de células positivas: Número de células positivas x 100 / Número total de células observadas.
- Expresión de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en el FA, FOA, FDA y O (cuantitativa de intervalo): se cuantifica y reporta como cuantas veces más o menos se expresa el gen en el tejido tumoral con respecto al tejido de control.
- Cambios a nivel de la secuencia en los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en el FA, FOA, FDA y O (categórica nominal): se reporta si tiene SNV (Single Nucleotide Variant, por sus siglas en inglés) y si es en homogénea o heterogénea (tabla 5).

3.8.2. Variables independientes

- Sexo: masculino y femenino, según lo establecido en la ficha histológica.
- Edad: en años, según lo establecido en la ficha histológica.
- Localización: mandibular o maxilar, topografía de acuerdo a lo informado en la ficha biopsica (tabla 5).

TABLA 5.Operacionalización de las variables

Variable	Tipo de variable	Operacionalización
Expresión de MOC-31 en FA, FDA, FOA y O	Dependiente Cuantitativa ordinal (+ o -)	Se considera positiva la tinción membranosa y/o citoplasmática mayor al 5 % de las células
Expresión de Cav-1 en FA, FDA, FOA y O	Dependiente Cuantitativa ordinal (+ o -)	Se considera positiva la tinción membranosa y/o citoplasmática mayor al 5 % de las células
Expresión de Cx-43 en FA, FDA y FOA	Dependiente Cuantitativa ordinal (+ o -)	Se considera positiva la tinción membranosa mayor al 5 % de las células
Expresión de Ki-67 en FA, FDA, FOA y O	Dependiente Cuantitativa ordinal (%)	IP: Número de células positivas para x 100 / Número total de células observadas
Expresión de los genes <i>BRAF</i> , <i>SMO</i> , <i>PTCH1</i> , <i>CAVI</i> y <i>CTNNB1</i> en el FA, FDA, FOA y O	Dependiente Cuantitativa de intervalo	Se cuantifica y se reporta cuantas veces más o menos se expresa el gen en el tejido tumoral con respecto a la mucosa bucal (tejido sano). Sin expresión (ausencia de amplificación), basal (nivel de referencia), ↑ (expresión aumentada) y ↓ (expresión disminuida).
Cambios a nivel de la secuencia en los genes <i>BRAF</i> , <i>SMO</i> , <i>PTCH1</i> , <i>CAVI</i> y <i>CTNNB1</i> en el FA, FOA, FDA y O	Dependiente Categórica nominal	Se reporta si tiene SNV en una o dos hebras.
Edad	Independiente	Años
Sexo	Independiente	masculino y femenino
Localización	Independiente	mandibular o maxilar

NOTA: FA (Fibroma ameloblástico). FDA (Fibro-dentinoma ameloblástico). FOA (Fibro-odontoma ameloblástico). O (Odontoma). SNV (*Single Nucleotide Variant*, por sus siglas en inglés).

3.9. Recursos y financiación

Se utilizaron las instalaciones, equipamientos, insumos, muestras y recursos humanos de los Servicios de Anatomía Patológica y Patología Molecular Estomatológica, del Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, de la Facultad de Odontología, Udelar.

La financiación fue obtenida mediante “CSIC iniciación a la investigación 2021”, siendo la responsable la Dra. Natalia González y “Grupos CSIC 2018”, siendo el responsable el Dr. Ronell Bologna.

Equipamiento existente para el procesamiento inmunohistoquímico: Kits de inmunohistoquímica para los cuatro biomarcadores del estudio, horno de microondas, freezer -20 °C, plancha con agitación y calor, microscopios, tren de tinciones horizontal, olla a presión para recuperación antigénica, coverpaletes y racks para

inmunohistoquímica por capilaridad, vasos de coplin, micrótopo, incluidor de parafina, horno de incubación y desparafinización, kit de micropipetas.

Equipamiento y reactivos existente para el estudio genético:

- Reactivos: kit de extracción Quick-RNA FFPE Kit (Zymo Research, USA), kit Quick-DNA FFPE Miniprep (Zymo Research, USA), sistema SuperScript® III First-Strand Synthesis para RT-PCR (Life Technologies, EE. UU.), oligo-dT, Brilliant® SYBR® Green q-PCR (BioLineMeridian LifeScience, EE.UU.), electroforesis en gel de agarosa al 3%, kit Universal DNA Purification (PCR y Gel, Tiangen, Beijing).
- Equipos: cámaras de electroforesis (horizontal y vertical), pHmetro portátil, fuente de poder, balanza estándar, microcentrífuga, vórtex, micropipetas, Cabina de PCR (JS 997868. BLASOR, Uruguay), espectrofotómetro NanoDrop DS-11 (Denovix, EE. UU.), termociclador para PCR convencional (Mastercycler® nexus gradiente, Eppendorf Research, Alemania) y para PCR en tiempo real (DTlite, DNA Technology, Rusia).

4.0. Declaración de conflictos de intereses

Los responsables y participantes de este trabajo de investigación declaran no tener conflicto de intereses durante su desarrollo y ejecución.

Capítulo 4 | Presentación y análisis de los resultados

En el siguiente capítulo se muestran los resultados obtenidos del proceso de investigación. En primer lugar, se realiza un análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas de los TO en estudio (§ 4.1). En segundo lugar, se describen los patrones de expresión (cuantificación y localización) de los anticuerpos estudiados, detallando las asociaciones encontradas entre la inmunoexpresión de Cav-1, MOC-31, Cx-43 y Ki-67 en las diferentes neoplasias y las variables clínico-patológicas (§ 4.2). Por último, se presentan los resultados del procesamiento y análisis genético. Donde se muestra el diseño de los primers para *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI*, *CTNGB1* y *GAPDH* (§ 4.3), seguido de los resultados obtenidos para la cuantificación de la expresión genética (§ 4.4) y la determinación de mutaciones (§ 4.5).

4.1. Análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas de los tumores odontogénicos

En el presente trabajo se incluyeron cinco pacientes con FOA, uno con FDA, ocho con FA, seis con diagnóstico de O complejo y cinco CP, conformando una muestra de 20 casos (más cinco controles).

Si analizamos la muestra de TO sin incluir los CP, trece fueron hombres (65 %) y siete mujeres (35 %), con un rango etario de 4 a 68 años y una media de 23 años. Del total, trece se ubicaron en la mandíbula (65 %) y siete en el maxilar (35 %). Adicionalmente los CP, que fueron seleccionados al azar, se presentaron en mujeres y en la mandíbula, con una media de edad de 28 años, datos que se muestran en las tablas 6 y 7.

Si analizamos cada patología de forma individual, podemos ver que los FOA se localizaron todos en la mandíbula, el 60 % en hombres con una media de 12 años y un rango etario de 4 a 16 años, en tanto que, los FA se ubicaron de igual manera en maxilar o mandíbula, un 62,5 % fueron masculinos con un rango etario de 5 a 68 años y una media de 27 años. El FDA se localizó en la mandíbula, en un masculino de 24 años. Los O seleccionados al azar para el estudio se localizaron el 50 % en la mandíbula, 67 % en el sexo masculino, con una media de 23 años en un rango etario de 8 a 53 años.

TABLA 6. Características clínico-patológicas de los tumores odontogénicos. Datos obtenidos de los archivos del Laboratorio de Anatomía Patológica del Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología de la Udelar

Nº caso	Diagnóstico HP	Edad (años)	Sexo	localización
1	FDA	24	M	Mandíbula
2	FOA	15	M	Mandíbula
3	FOA	15	F	Mandíbula
4	FOA	16	F	Mandíbula
5	FOA	14	M	Mandíbula
6	FOA	4	M	Mandíbula
7	FA	20	F	Mandíbula
8	FA	33	M	Maxilar
9	FA	20	F	Mandíbula
10	FA	5	M	Mandíbula
11	FA	31	M	Maxilar
12	FA	23	F	Maxilar
13	FA	68	M	Maxilar
14	FA	19	M	Mandíbula
15	O	53	F	Mandíbula
16	O	20	M	Mandíbula
17	O	14	M	Maxilar
18	O	8	F	Maxilar
19	O	27	M	Mandíbula
20	O	16	M	Maxilar
21	CP	9	F	Mandíbula
22	CP	38	F	Mandíbula
23	CP	26	F	Mandíbula
24	CP	55	F	Mandíbula
25	CP	12	F	Mandíbula

Nota: HP (histopatológico). FA (fibroma ameloblástico), FDA (fibrodentinoma ameloblástico), FOA (fibro-odontoma ameloblástico), O (odontoma) y CP (capuchón pericoronario). F (femenino) y M (masculino)

TABLA 7. Resumen de las características clínico-patológicas de los tumores odontogénicos. Datos obtenidos de los archivos del Laboratorio de Anatomía Patológica del Departamento de Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología de la Udelar

Parámetros clínico-patológicos	Pacientes
Sexo	n (%)
Femenino	7 (35.0)
Masculino	13 (65.0)
Edad en años. Media (rango)	23 (4-68)
Localización	n (%)
Mandíbula	13 (65.0)
Maxilar superior	7 (35.0)

4.2. Patrones de expresión de los biomarcadores en los tumores odontogénicos y su asociación con las variables clínico-patológicas

Los anticuerpos utilizados se seleccionaron en base a los reportes de la literatura, considerando la expresión de las proteínas en patologías de origen odontogénico. Se determinó la localización y el porcentaje de expresión de los biomarcadores empleados (Cav-1, MOC-31, Cx-43 y Ki-67) tanto en globalidad como para cada neoplasia odontogénica de forma individual. Se agruparon para el análisis estadístico los FOA y FDA, debido a la presencia de un solo caso de FDA y la consideración de que son, según la OMS, neoplasias con similar comportamiento biológico (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

Cav-1 se expresó en 17 neoplasias odontogénicas (85 %) con una tinción membrana-citoplasma de moderada (+) a intensa (++) a nivel de los ameloblastos, zonas de retículo estrellado, mesénquima odontogénico y zonas de papila dental en los O (figura 14). Se observó expresión en el 100 % de los FOA/FDA, 83.3 % de los O y 75 % de los FA, con menor tinción en los controles CP (20 %). No se observó tinción en dos de los ocho FA y en cuatro de los cinco CP, ya que uno mostró tinción moderada en el epitelio reducido del órgano del esmalte (tabla 8 y 9).

En cuanto a la expresión tisular de MOC-31, se evidenció tinción de membrana-citoplasma moderada (+) a intensa (++) en los ameloblastos y zonas de retículo estrellado de los FDA, FOA y FA de forma variable. Mostrando expresión en el 50 % de los FOA/FDA, 62.5 % de los FA y 20 % de los CP. Mostrando negatividad en el 100 % de los O (figura 15, tabla 8 y 9).

Para la expresión de Cx-43, se observa una tinción de membrana moderada (+) a intensa (++), principalmente en el mesénquima de la mayoría de las muestras analizadas, pero con negatividad en el 100 % de los O (figura 16). La positividad mesenquimática se observó en el 100 % de los FOA/FDA y el 62.5 % de los FA, conjuntamente con la positividad del 60 % de los CP. Además de la positividad mesenquimática mencionada, en el FDA, un FOA y un FA se observó marcación mixta con inmunoexpresión de membrana intensa (++) en los ameloblastos además de la tinción mesenquimática (tabla 8 y 9).

Finalmente, se determinó el Índice de proliferación en todas las muestras mediante la tinción nuclear con el anticuerpo Ki-67. Se observó inmunomarcación en el 50 % de los FOA/FDA, 50 % de los FA y 20 % de los CP, con un grado de proliferación bajo (del 0,5 % al 5 % de las células neoplásicas). En contraste, el 50 % restante de FOA/FDA, el 50 % de los FA, 80 % de los CP y la totalidad de los O no mostraron inmunomarcación para este biomarcador. La positividad observada fue de localización epitelial y/o mesenquimática. En las células ameloblásticas, se registró inmunomarcación en un FDA (1,2 %), un FOA (4,5 %) y dos FA (1,7 % y 0,6 %). Por su parte, el único CP positivo (0,4 %) presentó marcación en el epitelio reducido del órgano del esmalte. En cuanto al componente mesenquimático, un FOA (2,8 %) mostró marcación exclusivamente en este tejido, mientras que en un FA (5 %) la inmunoexpresión fue mixta, evidenciándose tinción tanto de las células odontogénicas epiteliales como mesenquimáticas (figura 17, tabla 8 y 9).

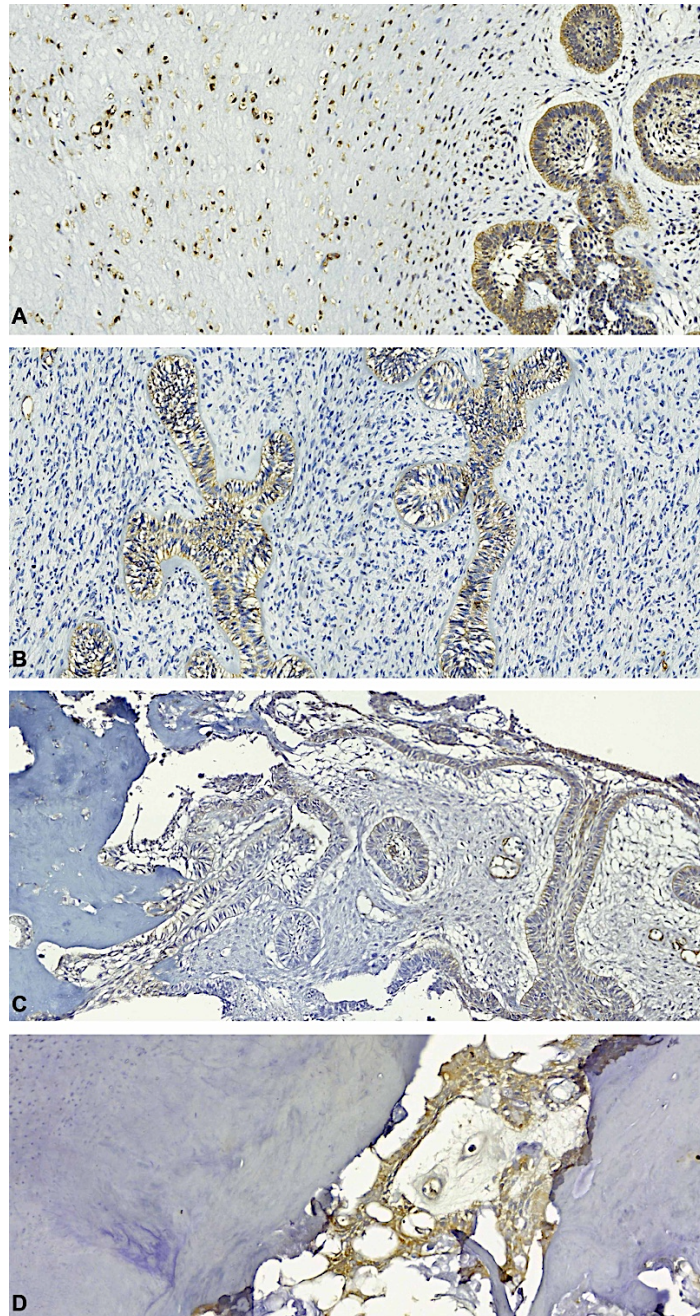


FIGURA 14. Inmunoexpresión de Caveolina 1 en el Fibroma Ameloblástico, Fibro-dentinoma Ameloblástico, Fibro-odontoma Ameloblástico y Odontoma. (A) Fibroma ameloblástico que muestra positividad (++) en islas epiteliales ameloblásticas y células mesenquimales odontogénicas. (B) Fibro-dentinoma ameloblástico con positividad (++) solo en el componente epitelial ameloblástico. (C) Fibro-odontoma Ameloblástico con positividad (++) en el componente epitelial ameloblástico, mostrando además su relación con la formación de tejidos dentales mineralizados (dentina). (D) Odontoma con positividad (++) en el componente epitelial. Inmunohistoquímica, Caveolina 1, A, B, C, D: 20x.

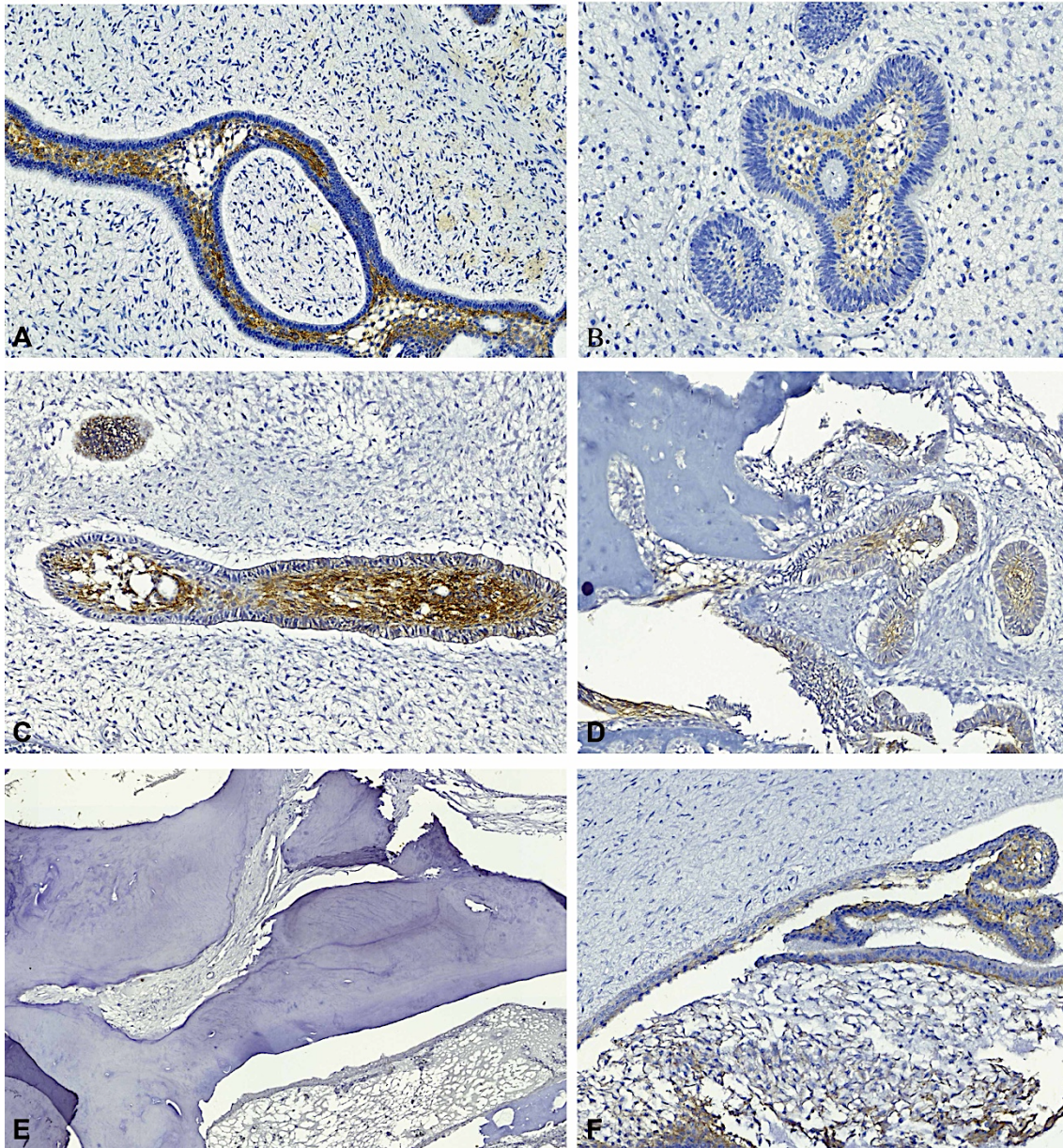


FIGURA 15. Inmunoeexpresión de MOC-31 en el Fibro-dentinoma Ameloblástico, Fibroma Ameloblástico, Fibro-odontoma Ameloblástico, Odontoma y Capuchón pericoronario. (A) Fibro-dentinoma ameloblástico con positividad (++) en retículo estrellado. (B) Fibroma ameloblástico con positividad (+) en el retículo estrellado. (C) Fibro-odontoma ameloblástico que muestra positividad (++) en zonas de retículo estrellado y ameloblastos. (D) Fibro-odontoma Ameloblástico donde se observa positividad en islas epiteliales continuas con la formación de estructuras mineralizadas. (E) Odontoma, que resultó negativo para inmunoeexpresión de proteínas. (F) Capuchón pericoronario con positividad (+) en tejidos epiteliales odontogénicos. Inmunohistoquímica, MOC-31, A, B, C, D, E, F: 20x.

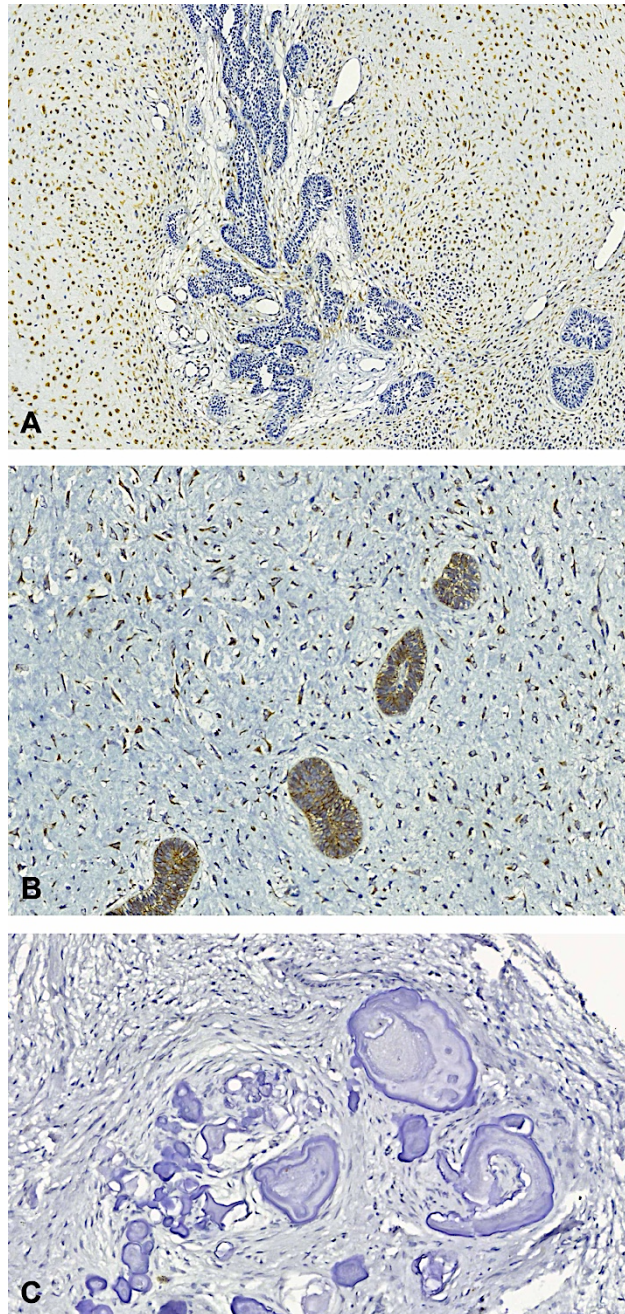


FIGURA 16. Inmunoexpresión de Conexina 43 en el Fibroma Ameloblástico, Fibro-odontoma Ameloblástico y Odontoma. (A) Fibroma Ameloblástico con positividad (++) en células mesenquimales odontogénicas. (B) Fibro-odontoma ameloblástico con tinción positiva (++) en ameloblastos y células mesenquimales odontogénicas. (C) Odontoma, que resultó negativo para la inmunoexpresión con la proteína. Inmunohistoquímica, Cx-43, A: 9x, B, C: 20x.

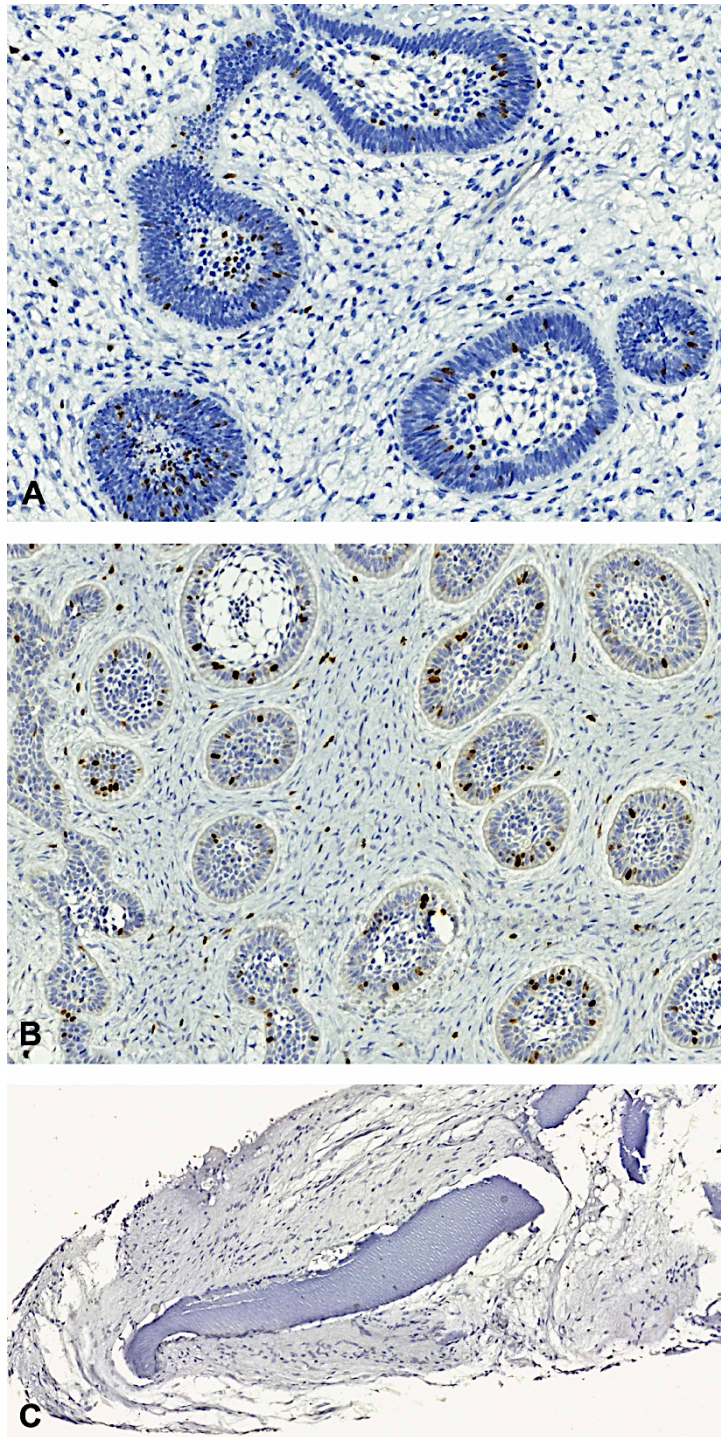


FIGURA 17. Inmunoeexpresión de Ki-67 en el Fibroma Ameloblástico, Fibro-odontoma Ameloblástico y Odontoma. (A) Fibroma ameloblástico con positividad nuclear en el 5 % de las células, con tinción en células ameloblásticas. (B) Fibroodontoma ameloblástico con inmunoeexpresión del 4.5 %, involucrando tanto ameloblastos como células mesenquimales odontogénicas. (C) Odontoma, que resultó negativo para la inmunoeexpresión. Inmunohistoquímica, Ki-67, A, B, C: 20x.

TABLA 8. Expresión inmunohistoquímica. Localización y cuantificación tisular de la expresión de Cav-1, MOC-31, Cx-43 y Ki-67 en el Fibrodentinoma ameloblástico, Fibro-odontoma ameloblástico, Fibroma ameloblástico, Odontoma y Capuchón pericoronario

Nº caso	Diagnóstico HP	Expresión Cav-1	Expresión MOC-31	Expresión Cx-43	Expresión Ki-67
1	FDA	A/R ++	R +	A/M +	A 1,2 %
2	FOA	A/M +	0	M +	M 2,8 %
3	FOA	A ++	R ++	M+	A 4,5 %
4	FOA	M +	0	M+	0
5	FOA	A/M +	0	A/M ++	0
6	FOA	A/R ++	A/R ++	M+	0
7	FA	A/R ++	A/R ++	M++	0
8	FA	R +	R +	M+	A 1,7 %
9	FA	A/R ++	0	A/M++	A 0,6 %
10	FA	A/R/M++	R +	M++	A-M 5 %
11	FA	R +	R +	0	0
12	FA	0	0	M+	0
13	FA	0	0	0	0
14	FA	A/R ++	R +	0	A 0,5 %
15	O	P +	0	0	0
16	O	P +	0	0	0
17	O	E/P ++	0	0	0
18	O	E/P +	0	0	0
19	O	0	0	0	0
20	O	E/P ++	0	0	0
21	CP	0	0	M+	0
22	CP	0	0	E+	0
23	CP	0	0	0	0
24	CP	0	0	0	0
25	CP	E +	R +	M+	E 0,4 %

Nota: HP (histopatológico), FA (fibroma ameloblástico), FDA (fibrodentinoma ameloblástico), FOA (fibro-odontoma ameloblástico), O (odontoma) y CP (capuchón pericoronario). A (ameloblastos), R (retículo estrellado), M (mesénquima odontogénico), P (papila dental), E (epitelio reducido del órgano del esmalte). Para la cuantificación semicuantitativa: 0 (esencialmente sin tinción), + (tinción débil moderada) y ++ (fuerte positivo). Para la cuantificación del Índice de proliferación: (Número de células positivas para inmunohistoquímica / Número total de células observadas) x100

Los resultados de la inmunomarcación global de la tabla 9 muestran que Cav-1 se expresó en el 72 % de las muestras, con fuerte expresión en todas las neoplasias si se las compara con los CP, mientras que, MOC-31 y Ki-67 se expresaron en el 36 % y 32 % respectivamente del total muestral, con similar expresión entre los FDA/FOA y FA, no expresándose en los O y el 80 % de los CP. La inmunomarcación de Cx-43 se observó en el 56 % de los casos, con negatividad total en el grupo de O.

TABLA 9. Resultados globales e individuales de inmunoexpresión. Porcentaje global e individual de la expresión para Cav-1, MOC-31, Cx-43 y Ki-67 en los Fibromas ameloblásticos, Fibro-odontomas ameloblásticos/Fibro-dentinomas ameloblásticos, Odontomas y Capuchones pericoronarios

Muestra (n)	Cav-1 n (%)	MOC-31 n (%)	Cx-43 n (%)	Ki-67 n (%)
FOA/FDA (6)	6 (100.0)	3 (50.0)	6 (100.0)	3 (50.0)
FA (8)	6 (75.0)	5 (62.5)	5 (62.5)	4 (50.0)
O (6)	5 (83.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
CP (5)	1 (20.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	1 (20.0)
TO (20)	17 (85.0)	8 (40.0)	11 (55.0)	7 (35.0)
Global (25)	18 (72.0)	9 (36.0)	14 (56.0)	8 (32.0)

NOTA: FA (Fibroma ameloblástico), FDA (Fibro-dentinoma ameloblástico), FOA (Fibro-odontoma ameloblástico), O (Odontoma), CP (Capuchón pericoronario), TO (Tumores Odontogénicos)

Para determinar el comportamiento de la expresión de los biomarcadores según el tipo de muestra (FOA/FDA, FA, O, CP), considerando el sexo, la edad y localización se ajustó un modelo de regresión logística con efectos mixtos. Se detectó un efecto significativo según el tipo de muestra ($p=0,002$) y también se detectó un comportamiento diferencial entre biomarcadores, ajustando por las demás variables ($p=0,001$). Adicionalmente, se observó que a medida que aumentaba la edad, la expresión de los biomarcadores en conjunto disminuía ($p=0,011$) (tabla 10). Se confeccionaron tablas de contingencia con pruebas de Chi-cuadrado para evaluar la relación entre la expresión y las variables clínico-patológicas, pero principalmente para determinar en que biomarcadores se evidenciaba mejor la disminución de la expresión con el aumento de la edad; donde se observó una mayor tendencia a disminuir para MOC-31 ($p=0.076$) y Cav-1 ($p=0.077$).

TABLA 10. Modelo de regresión logística con efectos mixtos. Modelo utilizado para comparar el comportamiento de los marcadores según la variable: muestra (Fibroidentinoma ameloblástico/Fibro-odontoma ameloblástico, Fibroma ameloblástico, Odontoma, Capuchones pericoronarios), sexo y edad. Se muestran únicamente los factores que inciden sobre la expresión de los biomarcadores

Variable	LRT	g.l.	p-valor	OR
TO	14,567	3	0,002**	
Biomarcador	16,875	3	<0,001***	
Sexo	0,001	1	0,972	
Edad	6,374	1	0,011*	0,93

NOTA: TO (Tumores odontogénicos), LRT (valor del estadístico de cociente de verosimilitud, Likelihood Ratio Test por sus siglas en inglés), g.l. (grados de libertad)

Para comparar la expresión de los biomarcadores y establecer el grado de similitud considerando las variables clínico-patológicas, se realizó un modelo de comparación múltiple post-hoc y la prueba de Mann-Whitney. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de los biomarcadores en conjunto para los FOA/FDA (72 %) se asemeja a la expresión observada en los FA (78 %), mientras que, la expresión inmunohistoquímica en los O (12 %) fue menor a la observada en los FOA/FDA y FA. Finalmente, la expresión en los CP (19 %) se aproximó a la observada en los O. Destacan las diferencias en la expresión entre los FDA/FOA y O ($p=0,025$), y entre FA y O ($p=0,008$) (tabla 11).

Mediante las pruebas de Mann-Whitney se pudo establecer que biomarcadores estaban relacionados con las semejanzas de expresión mencionadas anteriormente, determinando que Cx-43 mostró diferencia en la expresión entre O y FDA/FOA ($p=0,0022$) y entre O y FA ($p=0,0310$). También se observaron tendencias similares para MOC-31 al comparar O con FA ($p=0,0310$). En contraste, Cav-1 solo mostró diferencias en la expresión entre CP y FDA/FOA ($p=0,0087$) (tabla 11).

TABLA 11. Comparaciones múltiples post-hoc y pruebas de Mann-Whitney. Comparaciones múltiples post-hoc de las expresiones inmunohistoquímicas en las muestras de Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico / Fibro-odontoma ameloblástico, Odontoma y Capuchón pericoronario, considerando las variables edad, sexo y localización. Se describe el grado de semejanza en la expresión inmunohistoquímica y se muestran los *p-valor* significativos de las pruebas

Tumor odontogénico	Expresión	IC 95%	<i>p-valor</i> comparación con los O	<i>p-valor</i> comparación con los FA
O	12 %	(2,9 % - 37,9 %)	-	0.008**
CP	19 %	(3,6 % - 57,7 %)	0.973	0.092
FOA/FDA	72 %	(38,5 % - 91,5 %)	0.025*	0.984
FA	78 %	(51,5 % - 92,5 %)	0.008**	-

NOTA: FA (Fibroma ameloblástico), FDA (Fibrodentinoma ameloblástico), FOA (Fibro-odontoma ameloblástico), O (Odontoma) y CP (Capuchón pericoronario)

4.3. Diseño de primers para los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1*

Como se describió en la metodología, para determinar la presencia de posibles cambios a nivel de la secuencia de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI*, *CTNNB1* se diseñaron los primers para PCR convencional, mediante el programa de libre acceso *Primer-BLAST NCBI*. Previo al diseño, se realizó una búsqueda bibliográfica con la finalidad de incluir en las secuencias de los primers las mutaciones genéticas ya reportadas en patologías de la esfera bucomaxilar, principalmente en aquellas de origen odontogénico (tabla 4) (Williams y col., 2005; Koike y col., 2010; Farias y col., 2012; Brown y col. 2014; Sweeney y col. 2014; Diniz y col. 2015; Twigg y col. 2016; Kim y Jeong, 2019; You y col. 2019).

Los primers finalmente obtenidos fueron de una longitud de entre 20 y 25 bases, con un % GC menor a 61. Las Tm elegidas fueron próximas a los 60 °C, sin diferencias mayores a 2 o 3 °C entre la Tm del primer forward y reverse (tabla 12). El largo del producto a levantar por los primers fue diseñado próximo a las 400 bases y con la consideración que las posibles mutaciones se encontraran cercana a la región central del producto, con el objetivo de mejorar el posterior análisis de la secuenciación. Estos primers diseñados fueron analizados utilizando el programa *Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies, USA), verificándose la ausencia de formación de dímeros de primers y estructuras secundarias tipo horquilla bajo las condiciones de temperatura de trabajo. Asimismo, se realizó un análisis BLAST de las secuencias obtenidas con la base

de datos del NCBI, confirmándose su especificidad, ya que únicamente mostraron complementariedad con el gen de interés (tabla 13). En el anexo 4 se muestran las imágenes de las horquillas obtenidas mediante el *Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies, USA) de las secuencias de los primers utilizados para PCR de los genes en estudio.

TABLA 12. Características de los primers diseñados para las secuenciaciones de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1*. Diseño realizado considerando las mutaciones reportadas en la bibliografía para cada gen (Williams y col., 2005; Koike y col., 2010; Farias y col., 2012; Brown y col. 2014; Sweeney y col. 2014; Diniz y col. 2015; Twigg y col. 2016; Kim y Jeong, 2019; You y col. 2019)

Gen	Long. Producto	Secuencia PForward (5' -> 3')	Secuencia PReverse (5' -> 3')	Largo PF	Largo PR	Tm PF	Tm PR	GC % PF	GC% PR
PTCH1	353	GGATACCACTTCTAACCCA	AAGCCGTCACAGTGGTGATG	21	20	58,52	60,6	52	55
CTNNB1	374	AACCTGGCTATCATTCTGCT	ACTGTCTCTGAGTGAAGGACTGA	21	24	59,15	59,84	47	41
SMO	379	CTGGTAGGAACGGGAGACCT	TGCTCACGGTGTTCGTCTG	20	20	60,32	60,87	60	55
CAV 1	387	GAAGGGACACAGTTTGACG	CTTGGAACCTGAAATTGGCACCAG	22	24	59,97	61,03	50	45,83
BRAF	397	TTGACTCTAAGAGAAAGATGAAGT	ACACTGATTTTGTGAATACTGGGA	25	25	57,45	58,93	36	36

NOTA: Long (longitud), P (primers), F (forward), R (reverse), Tm (temperatura de fusión)

TABLA 13 Análisis de las secuencias de los primers utilizados para PCR y los parámetros de diseño. Se detalla el análisis de las horquillas (ΔG , T_m , ΔH y ΔS), el ΔG de los homodímeros y el ΔG de los heterodímeros, obtenidos mediante *Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies, USA)

Primers	ΔG Horquilla (kcal.mole-1)	T_m (°C)	ΔH Horquilla (kcal.mole-1)	ΔS Horquilla (cal.K-1mole-1)	Heterodímero ΔG max. (cal.K-1mole-1)	Homodímero ΔG max. (cal.K-1mole-1)
<i>PTCHI</i>	0.67	13.5	-16.6	-57.91	-39.98	-39.98
Fower	0.76	9.5	-13.9	-49.18		
<i>PTCHI</i>	-2.12	42.1	-39.1	-124.03	-39.98	-37.79
Reverse						
<i>CTNNB1</i>	-0.2	27.5	-24.2	-80.49	-40.03	-40.03
Fower	0.8	9.5	-14.5	-51.3		
<i>CTNNB1</i>	-0.8	32.3	-33.7	-110.33	-40.03	-39.9
Reverse	-0.57	34.7	-18.2	-59.12		
<i>SMO</i>	-1.46	45.8	-22.3	-69.91	-38.96	-38.96
Fower	0.67	32.7	-26.5	-86.65		
<i>SMO</i>	-0.7	35.9	-19.9	-64.4	-38.96	-38.43
Reverse	0.07	23.3	-12.9	-43.51		
<i>CAVI</i>	-0.43	31.6	-19.8	-64.98	-45.89	-39.97
Fower	0.31	19.9	-18.1	-61.75		
<i>CAVI</i>	0.11	23.7	-24.8	-83.55	-45.89	-45.89
Reverse	0.31	21.3	-24.4	-82.88		
<i>BRAF</i>	-0.64	33.1	-24	-78.36	-42.83	-40.86
Fower	-0.49	30.7	-26.2	-86.23		
<i>BRAF</i>	-1.52	40.5	-30.6	-97.55	-42.83	-42.83
Reverse						

Para determinar los niveles de expresión de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCHI*, *CAVI*, *CTNNB1* y *GAPDH* mediante el análisis de RT-qPCR, se realizó el diseño de primers específicos utilizando el mismo programa que para el diseño de los primers anteriores. Con la finalidad de obtener primers eficientes, se realizó un análisis cuidadoso de la región de interés, utilizando la base de datos del NCBI para evitar la complementariedad inespecífica y también, evitar la formación de dímeros de primers y de estructuras secundarias que podrían resultar en la amplificación de fragmentos no deseados fuera de la región de interés. Este análisis se realizó con el programa *Oligo*

Analyzer Tool (Integrated DNA Technologies, USA) (tabla 14). En el anexo 5 se muestran las imágenes de las horquillas obtenidas mediante el *Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies, USA) de las secuencias de los primers utilizados para PCR de los genes en estudio. Las secuencias de los primers obtenidos tuvieron un tamaño de entre 20 y 24 bases, con un % GC cercano a 60 % y el largo del producto de PCR se diseñó entre 70 y 110 bases. Las Tm fueron próximas a los 60 °C, sin diferencias mayores a 2 o 3 °C entre la Tm del primer forward y reverse (tabla 15).

TABLA 14 Análisis de las secuencias de los primers utilizados para qPCR y los parámetros de diseño. Se detalla el análisis de las horquillas (ΔG , Tm, ΔH y ΔS), el ΔG de los homodímeros y el ΔG de los heterodímeros, obtenidos mediante *Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies, USA)

Primers	ΔG Horquilla (kcal.mole ⁻¹)	Tm (°C)	ΔH Horquilla (kcal.mole ⁻¹)	ΔS Horquilla (cal.K-1mole ⁻¹)	Heterodimero ΔG max. (cal.K-1mole ⁻¹)	Homodímero ΔG max. (cal.K-1mole ⁻¹)
<i>PTCH1</i>	-0.15	27.1	-21.3	-70.93	-40.05	-39.52
Fower	-0.1	25.8	-34.8	-116.4		
<i>PTCH1</i>	-1.08	38.2	-25.4	-81.57	-40.05	-40.05
Reverse						
<i>CTNNB1</i>	-3.67	45.3	-57.7	-181.2	-39.93	-39.93
Fower	-3.38	59.3	-32.8	-98.66		
<i>CTNNB1</i>	-5.98	67.8	-47.6	-139.61	-39.93	-38.58
Reverse	-3.22	45.1	-51	-160.25		
<i>SMO</i>	-1.34	44.2	-22.1	-69.64	-39.2	-36.36
Fower	-0.93	37	-24.1	-77.7		
<i>SMO</i>	-0.44	31.3	-21.4	-70.29	-39.2	-39.2
Reverse	0.3	19	-14.6	-49.98		
<i>CAVI</i>	-1.09	42.1	-20.1	-63.76	-38.7	-37.14
Fower	-3.11	54.5	-34.5	-105.29	-38.7	-38.7
Reverse	-2.86	52.1	-34.4	-105.77		
<i>BRAF</i> Wt	-1.45	41.7	-27.3	-86.71	-40.87	-40.87
Fower						
<i>BRAF</i> Wt	-1.58	43.8	-26.6	-83.93	-40.87	-39.73
Reverse						
<i>BRAF</i> Mut	-1.45	41.7	-27.3	-86.71	-41.94	-41.94
Fower	-1.36	51	-17	-52.45		
<i>BRAF</i> Mut	-1.58	43.8	-26.6	-83.93	-41.94	-40.49
Reverse						
<i>GAPDH</i>	-0.83	38.4	-19.2	-61.63	-39.27	-39.27
Fower						
<i>GAPDH</i>	0.22	21.6	-18.6	-63.11	-39.27	-36.11
Reverse	1.06	-0.9	-11.1	-40.77		

TABLA 15. Características de los primers diseñados para las RT-qPCR de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAV1*, *CTNNB1* y *GAPDH*. Utilizando el programa de libre acceso *Primer-BLAST* *NCBI* (Morlan y col., 2009)

Gen	Long. Producto	Secuencia PForward (5'→3')	Secuencia PReverse (5'→3')	Secuencia Primer bloqueador (3' Phosphorylation)	Largo PF	Largo PR	Tm PF	Tm PR	GC % PF	GC% PR
<i>Ptch1</i>	86	TCCTCCCCGTCATTAGTGCT	CTGCCCTGCCTACATCTTT		20	20	60,33	59,74	55	55
<i>Cttnb1</i>	91	GCGTTTGGCTGAACCATCAC	GATTGCACGTGTGGCAAGTT		20	20	60,39	59,97	55	50
<i>Smo</i>	77	ACCAGGACATGCACAGCTAC	GAATGTGGCCAGGGTGAAGA		20	20	60,04	59,96	55	55
<i>Cav1</i>	103	CAGTGCATCAGCCGTGTCTA	TCTGCAAGTTGATGCGGACA		20	20	60,11	60,25	55	50
<i>Brafwt</i>	86	AGTGAAATCTCGATGGAGTGGG	GCATTCTGATGACTTCTGGTGC	AGT GAAATC TCG ATG GAG TGG G	22	22	59,83	59,9	50	50
<i>Brafmut</i>	91	TACAGAGAAATCTCGATGGAGTGG	TTGCATTCTGATGACTTCTGGTG	TTG CAT TCT GAT GAC TTC TGG TG	24	23	59,66	59,25	45,83	43,48
<i>Gapdh</i>	72	CACCATCTCCAGGAGCGAG	GACTCCACGACGACTACGAC		20	20	60,18	60,18	60	60

NOTA: Long (longitud), P (primers), F (forward), R (reverse), Tm (temperatura de fusión), *mut* (mutado), *wt* (wild tipe)

4.4. Cuantificación de la expresión génica para los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAV1* y *CTNNB1*

A continuación se presentan los resultados correspondientes a la obtención de ARN total, así como los hallazgos derivados del análisis de la expresión génica en las muestras que cumplieron con los criterios de calidad establecidos.

Se realizó la extracción de ARN total en un total de 26 muestras correspondientes a TO y MB (control endógeno). Se obtuvo ARN total cuantificable en 19 de las 26 muestras analizadas (73,1%), mientras que en siete muestras no se logró obtener material genético detectable. Las concentraciones de ARN total obtenidas mostraron una amplia variabilidad, con valores que oscilaron entre 1,29 ng/μL y 399 ng/μL.

En las muestras correspondientes a FA, todas presentaron ARN total cuantificable, con concentraciones entre 10,07 y 399 ng/μL, siendo este último el valor más alto registrado en toda la serie. En los casos de FOA, tres de las cinco muestras presentaron ARN total detectable, con concentraciones de 3,68 a 71,47 ng/μL, mientras que en dos casos no se obtuvo material. En las muestras clasificadas como O, solo una de las seis presentó ARN total cuantificable (1,29 ng/μL), siendo el grupo con menor rendimiento en la extracción. Mientras que, el único caso de FDA mostró una concentración de ARN total de 117,68 ng/μL. Por último, todas las muestras de MB presentaron ARN total cuantificable, con valores entre 13 y 75,35 ng/μL. En la tabla 16 se muestran los resultados de la extracción de ARN total para cada muestra de TO, incluyendo los controles endógenos de MB, así como, la cantidad de ADN copia obtenido para cada una.

TABLA 16. Concentración de ARN total (ng/μL) y ADN copia (ng/μL) en cada una de las muestras correspondientes a tumores odontogénicos analizados y a mucosa bucal, esta última empleada como control endógeno

Muestra	ARN total (ng/μL)	ADN copia (ng/μL)
FOA 1	71,47	789,07
FOA 2	57,07	805,87
FOA 3	—	—
FOA 4	—	—
FOA 5	3,68	1187,26
FA 6	117,19	788,77
FA 7	72,91	1164,27
FA 8	83,4	751,89
FA 9	399	971,33
FA 10	120,45	867,25
FA 11	10,07	1094,02
FA 12	84,79	1245,56
FA 13	62,61	799,8
FA 14	143,75	790,65
O 15	1,29	1105,12
O 16	—	—
O 17	—	—
O 18	—	—
O 19	—	—
O 20	—	—
FDA 21	117,68	1113,6
MB 22	13	810,99
MB 23	62,83	1090,67
MB 24	61,44	911,16
MB 25	75,35	758,68
MB 26	25,83	970,68

NOTA: FA (Fibroma ameloblástico), FDA (Fibrodentinoma ameloblástico), FOA (Fibro-odontoma ameloblástico), O (Odontoma), MB (Mucosa bucal) y — (ausencia de ARN detectable)

El análisis de la expresión génica evidenció variaciones en los niveles de expresión entre los distintos tipos de tejido. En todas las muestras evaluadas, el gen normalizador *GAPDH* presentó amplificación adecuada (100 %), confirmando la calidad del material genético y su validez como control endógeno. Las diferencias observadas

incluyeron casos sin expresión, así como expresión basal, leve sobreexpresión y leve subexpresión de los genes analizados. No obstante, si bien se evidenciaron variaciones en el patrón de expresión génica, las diferencias entre los grupos analizados no alcanzaron significación estadística.

Para los genes *SMO*, *PTCH1*, *CTNNB1* y *CAVI*, se confeccionó un gráfico convencional en el que se representan los niveles de expresión génica relativos del ARNm, normalizados frente al gen de referencia *GAPDH*. En cambio, para *BRAF*, dado que se empleó la metodología descrita por Morlan y col. (2009), se evaluó la cantidad de casos que expresan la variante mutada o de tipo salvaje (wild-type), y el gráfico se elaboró siguiendo el enfoque reportado por Huang y col. (2024). En el Gráfico 1 se presentan los niveles de expresión del ARNm de *SMO*, *PTCH1*, *CTNNB1* y *CAVI*, mientras que en el Gráfico 2 se muestra la expresión de *BRAF* tipo salvaje y mutado (Huang y col., 2024).

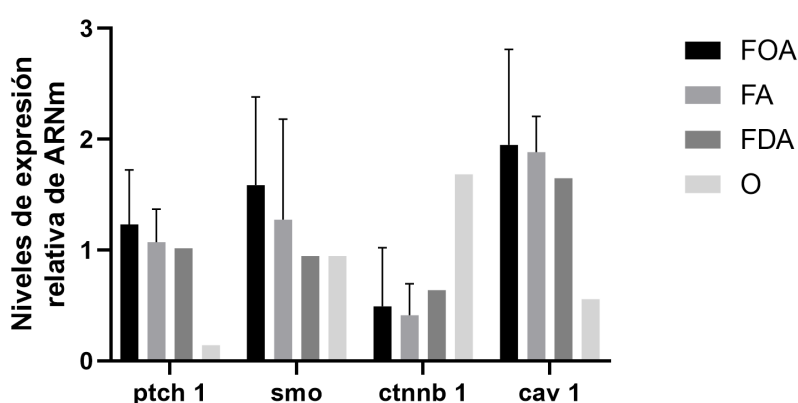


GRÁFICO 1. Nivel de expresión génica relativa del ARNm de *SMO*, *PTCH1*, *CTNNB1* y *CAVI* en Fibroma ameloblástico, Fibro-dentinoma ameloblástico, Fibro-odontoma ameloblástico y Odontoma. NOTA: Fibroma ameloblástico (FA), Fibro-dentinoma ameloblástico (FDA), Fibro-odontoma ameloblástico (FOA) y Odontoma (O)

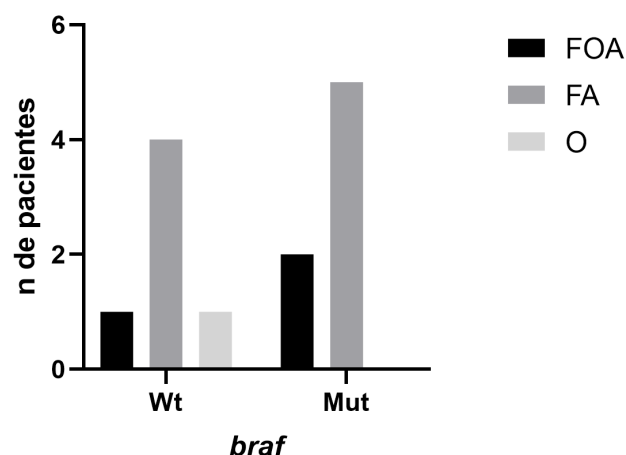


GRÁFICO 2. Expresión génica de *BRAF* *wild type* (Wt) y mutado (Mut) en Fibroma ameloblástico, Fibro-odontoma ameloblástico y Odontoma (Huang y col., 2024). NOTA: *wild type* (Wt), mutado (Mut), Fibroma ameloblástico (FA), Fibro-odontoma ameloblástico (FOA) y Odontoma (O)

Como se muestra en la tabla 17 para el gen *PTCH1*, se observó expresión basal en la totalidad de los casos de FOA (3/3), FA (9/9) y FDA (1/1), mientras que en la muestra de O no se detectó expresión (1/1). Para el gen *SMO*, en los FOA se evidenciaron variaciones en la expresión, con un caso de leve sobreexpresión (1/3) y dos de expresión basal (2/3). En los FA, cuatro de los nueve casos presentaron leve sobreexpresión, mientras que los restantes mostraron expresión basal (5/9). Tanto en el FDA como en el O se observó expresión basal (1/1 en cada caso). En cuanto al gen *CTNNB1*, en los FOA se registró expresión basal en un caso (1/3) y leve subexpresión en dos de tres (2/3). En los FA Y FDA, todos los casos presentaron leve subexpresión. Por su parte, en el O se observó leve sobreexpresión (1/1). Respecto al gen *CAVI*, se evidenció leve sobreexpresión en la totalidad de los casos de FOA (3/3), FA (9/9) y FDA (1/1). En el caso del O, se observó leve subexpresión (1/1). Finalmente, en relación con el gen *BRAF* se detectó expresión de la variante mutada en dos de los tres casos de FOA y en cinco de los nueve casos de FA. En el FDA no se detectó expresión, mientras que en el O se evidenció expresión de la variante de tipo salvaje (*wild-type*) (1/1).

TABLA 17. Niveles de expresión génica de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* en las muestras de Fibro-odontoma ameloblástico, Fibroma ameloblástico, Fibro-dentinoma ameloblástico y Odontoma

Muestra (n)	<i>PTCH1</i> (n/n total)	<i>SMO</i> (n/n total)	<i>CTNNB1</i> (n/n total)	<i>CAVI</i> (n/n total)	<i>BRAF</i> (n/n total)
FOA (3)	Basal 3/3	↑ leve 1/3 Basal 2/3	↓ leve 2/3 Basal 1/3	↑ leve 3/3	Mut 2/3
FA (9)	Basal 9/9	↑ leve 4/9 Basal 5/9	↓ leve 9/9	↑ leve 9/9	Mut 5/9
FDA (1)	Basal 1/1	Basal 1/1	↓ leve 1/1	↑ leve 1/1	-
O (1)	Sin expresión	Basal 1/1	↑ leve 1/1	↓ leve 1/1	Wt 1/1

NOTA: FA (Fibroma ameloblástico), FDA (Fibro-dentinoma ameloblástico), FOA (Fibro-odontoma ameloblástico), O (Odontoma), ↑ (sobreexpresión), ↓ (subexpresión), Mut (expresión del gen mutado), Wt (expresión del gen “Wild tipe”, por sus siglas en inglés), - (no levanto ni gen Wt ni Mut)

4.5. Determinación de mutaciones para los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1*

Con el objetivo de caracterizar el perfil molecular de los TO incluidos en este estudio, se llevó a cabo el análisis de mutaciones en un panel de genes seleccionados por su participación en vías de señalización clave en la odontogénesis y en la tumorigénesis. A continuación, se presentan los resultados obtenidos del análisis mutacional.

Se realizó la extracción de ADN en un total de 26 muestras correspondientes a TO y MB. Se obtuvo ADN cuantificable en todas las muestras analizadas, con excepción de una; no obstante, la calidad del material genético presentó variabilidad entre los casos. Considerando como muestras aptas aquellas con calidad buena o intermedia ($\pm$), se obtuvieron 13 de 26 muestras utilizables (50 %), mientras que las restantes presentaron calidad no apta para su análisis.

Como se muestra en la tabla 18, las concentraciones de ADN mostraron una amplia variabilidad, con valores que oscilaron entre 0 y 79,31 ng/ μ L. En las muestras correspondientes a FA, la mayoría presentó ADN de calidad adecuada, con concentraciones entre 4,78 y 55,31 ng/ μ L, destacándose este grupo por presentar el mayor número de muestras aptas. En los casos de FOA solo dos de las cinco muestras fueron consideradas aptas, con concentraciones de 4,1 y 13,39 ng/ μ L, mientras que las restantes presentaron baja concentración o calidad no apta. En todas las muestras de O se pudo extraer ADN, con

concentraciones entre 2,24 y 2,48 ng/μL, pero sólo una fue apta en calidad, evidenciando en general bajos rendimientos de ADN. Mientras que, el único caso de FDA, presentó una concentración de 9,67 ng/μL y calidad intermedia, considerándose apto para análisis genético. Por último, para las muestras de MB, dos de las cinco fueron consideradas aptas, con concentraciones de 10,19 y 79,31 ng/μL.

TABLA 18. Calidad y concentración de ADN (ng/μL) obtenida posteriormente al proceso de extracción en cada una de las muestras correspondientes a tumores odontogénicos analizados y a mucosa bucal, esta última empleada como control endógeno

Muestras	ADN ng/μL	Calidad
FOA 1	4,1	±
FOA 2	13,39	Buena
FOA 3	0,89	No apta
FOA 4	0,39	No apta
FOA 5	0	No apta
FA 6	10,02	No apta
FA 7	7,83	Buena
FA 8	9,27	Buena
FA 9	55,31	Buena
FA 10	10,21	Buena
FA 11	4,78	No apta
FA 12	5,31	Buena
FA 13	6,01	Buena
FA 14	26,36	Buena
O 15	2,24	Buena
O 16	2,4	No apta
O 17	2,1	No apta
O 18	2,48	No apta
O 19	1,47	No apta
O 20	1,01	No apta
FDA 21	9,67	±
MB 22	8,51	No apta
MB 23	2,99	No apta
MB 24	79,31	Buena
MB 25	8,17	No apta
MB 26	10,19	Buena

NOTA: FA (Fibroma ameloblástico), FDA (Fibro-dentinoma ameloblástico), FOA (Fibro-odontoma ameloblástico), O (Odontoma), MB (Mucosa bucal) y ± (calidad de ADN intermedia)

Los resultados de la secuenciación de los genes *PTCH1*, *SMO*, *CTNNB1* y *CAVI* no evidenciaron la presencia de mutaciones reportadas en ninguna de las muestras analizadas correspondientes a FA, FDA, FOA y O, observándose en todos los casos la

presencia de la variante de tipo salvaje (wild-type) (Gráfico 3). En relación con el gen *BRAF*, se detectó la mutación V600E en la totalidad de los casos de FOA (2/2), FA (7/7) y FDA (1/1), mientras que en el único caso de O se observó la variante de tipo salvaje (Tabla 19 y Gráfico 4).

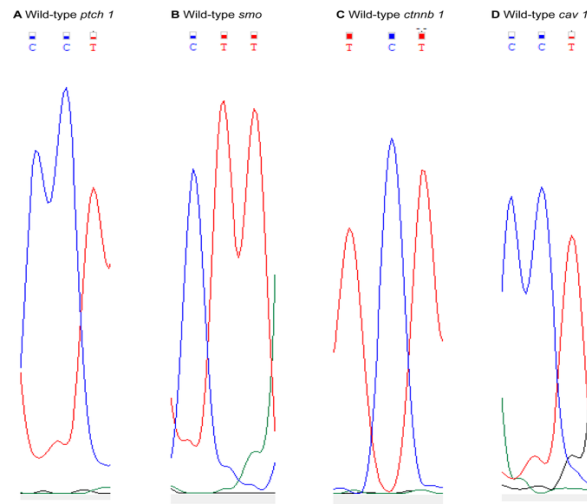


Gráfico 3. Cromatogramas representativos de la secuenciación de los genes *SMO*, *PTCH1*, *CTNNB1* y *CAVI*, en los que se observan secuencias *wild type* en Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico, Fibro-odontoma ameloblástico y Odontoma. (A) *PTCH1 wild type*. (B) *SMO wild type*. (C) *CTNNB1 wild type*. (D) *CAVI wild type*.

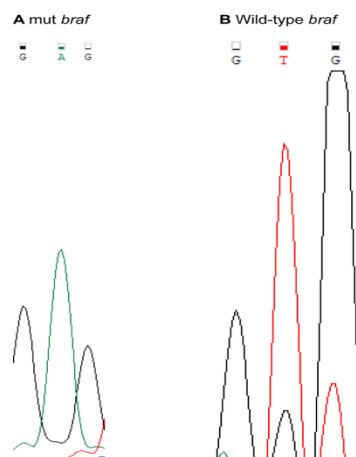


GRÁFICO 4. Cromatogramas representativos de la secuenciación de *BRAF*, en los que se observan secuencias *wild type* o mutada en Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico, Fibro-odontoma ameloblástico y Odontoma. (A) *BRAF* mutado. (B) *BRAF wild type*

TABLA 19. Resultados de las secuenciaciones de los genes *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1*, considerando las mutaciones reportadas en la bibliografía para cada gen, en el Fibro-odontoma ameloblástico, Fibroma ameloblástico, Fibro-dentinoma ameloblástico y Odontoma (Williams y col., 2005; Koike y col., 2010; Farias y col., 2012; Brown y col. 2014; Sweeney y col. 2014; Diniz y col. 2015; Twigg y col. 2016; Kim y Jeong, 2019; You y col. 2019)

Gen	Mutaciones reportadas	FOA (n=2)	FA (n=7)	FDA (n=1)	O (n=1)
<i>PTCH1</i>	P1164L P1164H P1164R	Wt	Wt	Wt	Wt
<i>SMO</i>	L412F	Wt	Wt	Wt	Wt
<i>CTNNB1</i>	S33P S33C S33F S33Y S33L S45F S45C S45P	Wt	Wt	Wt	Wt
<i>CAVI</i>	P132L	Wt	Wt	Wt	Wt
<i>BRAF</i>	V600E	Mut	Mut	Mut	Wt

NOTA: FA (Fibroma ameloblástico), FDA (Fibro-dentinoma ameloblástico), FOA (Fibro-odontoma ameloblástico), O (Odontoma), Mut (detección de la mutación reportada), Wt (no detección de la mutación reportada, detección del gen “Wild-tipe”)

Capítulo 5 | Discusión

En el siguiente capítulo se analizan los resultados obtenidos del trabajo de investigación propuesto, contrastándolos con investigaciones previas y evaluando sus implicaciones en la patología odontogénica en estudio. En primer lugar, se realiza la discusión de los resultados obtenidos del estudio de las variables clínico-patológicas (§ 5.1). Seguidamente, realizamos el análisis de los resultados inmunohistoquímicos (§ 5.2), evaluando de forma independiente la inmunoexpresión de Cav-1 (§ 5.2.1), MOC-31 (§ 5.2.2), Cx-43 (§ 5.2.3) y Ki-67 (§ 5.2.4), además de la correlación de las mismas con las variables clínico-patológicas. Por último, se realiza el análisis y la discusión de los resultados relacionados con la detección de mutaciones y la determinación de la expresión génica de *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNNB1* (§ 5.3.)

5.1. Variables clínico-patológicas de los tumores odontogénicos

Analizando las características clínico-patológicas de las neoplasias en estudio y comparando las mismas con los datos epidemiológicos reportados, se pueden observar algunas similitudes y/o diferencias. Según la OMS (2005), el FA se localiza en la zona posterior de la mandíbula, con una edad media de presentación de 14,8 años y sin

predilección por el sexo (Barnes y col., 2005). Sin embargo, nuestros resultados no coincidieron con estos reportes, ya que la media de edad de los pacientes con FA fue de 27 años, con mayor proporción en el sexo masculino, pero sin una localización predominante.

Por otro lado, una revisión sistemática realizada por Chrcanovic y col. (2018) sobre el FA y el fibrosarcoma ameloblástico también evidenció una mayor incidencia en el sexo masculino. No obstante, los autores reportaron que los FA se localizaron principalmente en la mandíbula y en pacientes menores de 20 años (Chrcanovic y col., 2018). De manera similar, Atarbashi-Moghadam y col. (2019) señalaron una mayor incidencia a edades tempranas, predominantemente en el sexo masculino, con una localización frecuente en la región posterior de la mandíbula (Atarbashi-Moghadam y col., 2019).

Analizando los datos que hacen referencia al FDA cabe resaltar que nuestra muestra estaba constituida por un solo caso que se localizó en la mandíbula, en un hombre de 24 años. Cuando la OMS en 2005 hace referencia a dicha patología, la describe de forma conjunta con las características epidemiológicas del FA ya mencionadas, diferenciandolas únicamente en la histología (Barnes y col., 2005). A diferencia de esto, una revisión sistemática realizada por Chrcanovic y Gomez (2017) sobre los FDA y FOA mostró que como se observó en nuestro caso los FDA se localizan preferentemente en la mandíbula y en hombres, con la diferencia de que los casos se presentaban en las dos primeras década de vida (Chrcanovic y Gomez, 2017).

Como se describe anteriormente, los datos de nuestro estudio que hacen referencia a la edad de presentación del FA y FDA, mostraron diferencias con lo que reportan varios autores. Esto podría explicarse por la influencia de varios factores, como: el tamaño muestral pequeño donde es posible que no refleje completamente la distribución etaria general observada en estudios más amplios, como los de la OMS (Barnes y col., 2005).

Los resultados epidemiológicos obtenidos para los FOA muestran similitudes con los reportes de la OMS, especialmente en la edad de presentación, que es de aproximadamente 12 años. Sin embargo, mientras que la OMS no reportó predilección por localización o sexo, en nuestras muestras todas las lesiones se encontraron en la mandíbula y el 60 % de los casos correspondieron a hombres (Barnes y col., 2005). Como mencionamos anteriormente, la revisión sistemática realizada por Chrcanovic y Gomez (2017) mostró, al igual que nuestro estudio, una predilección por el sexo masculino y la mandíbula. Sin embargo, la edad de presentación fue mayor, ubicándose en la segunda

década de vida (Chrcanovic y Gomez, 2017). Al igual que en los FA y FDA, algunas de las diferencias encontradas en los FOA podrían atribuirse a las características de la población estudiada, el tamaño de la muestra o incluso a variaciones en las metodologías utilizadas, tanto en la recopilación de datos como en su análisis.

Para finalizar, evaluamos los resultados obtenidos en los O, los cuales se presentaron mayoritariamente en hombres con una edad media de 23 años y sin predilección por la localización. Según la OMS (2005), esta patología suele manifestarse entre los 10 y 20 años, sin diferencias por sexo. En cuanto a la localización, los O complejos se presentan en la región posterior de la mandíbula, mientras que los compuestos se encuentran en la zona anterior maxilar (Barnes y col., 2005). Las diferencias observadas podrían deberse a que el grupo de O fue seleccionado al azar y no representa la totalidad de los casos diagnosticados en el Laboratorio de Anatomía Patológica.

5.2. Expresión inmunohistoquímica

A continuación, se analizan los resultados de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas Cav-1, MOC-31, Cx-43 y Ki-67 en cada una de las patologías en estudio, comparándolos con los reportes disponibles en la literatura. En general, los ensayos inmunohistoquímicos revelaron que los TO bajo investigación mostraron expresión epitelial y mesenquimática variable, con patrones de expresión similares entre los FA, FDA y FOA, así como bajas tasas de proliferación consistentes con lesiones de comportamiento clínico benigno. Mediante un modelo de regresión logística, al comparar la expresión de los biomarcadores con diferentes variables, se observó una tendencia a la disminución en la expresión de las proteínas a medida que aumentaba la edad, especialmente para MOC-31 y Cav-1 (tabla 11). Estos resultados son coherentes con la naturaleza pediátrica de estos tumores, así como con el posible comportamiento hamartomatoso de algunos casos. Tal como propuso la OMS en 2017, algunas de estas lesiones podrían presentar un comportamiento clínico tipo hamartoma, con una disminución en la expresión de ciertas proteínas a medida que avanza la edad (Speight y Takata, 2017). En las siguientes subsecciones analizamos en particular la expresión de cada biomarcador y su correlación con las variables clínico-patológicas.

5.2.1. Expresión inmunohistoquímica de Cav-1

Cav-1 es una proteína integral de la membrana plasmática que participa en varios procesos biológicos y se expresa tanto en células epiteliales como mesenquimáticas, constatándose su expresión en varias etapas del desarrollo dentario (Schwab y col., 2007).

Asimismo, su expresión ha sido descrita en lesiones quísticas odontogénicas y lesiones neoplásicas con comportamiento clínico localmente agresivo, como los ameloblastomas (Jaafari-Ashkavandi y col., 2014).

En este estudio, Cav-1 se expresó en la mayoría de las neoplasias, localizándose en el componente epitelial y mesenquimático, con preferencia por el retículo estrellado y los ameloblastos. No se observaron diferencias en la expresión de esta proteína entre las muestras estudiadas; sin embargo, se determinaron diferencias en su expresión entre los CP (tejidos de control) y los FDA/FOA ($p=0,0087$).

Este resultado es similar a lo reportado por Sánchez-Romero y col. (2021), quienes describieron la expresión de Cav-1 tanto en TO benignos como malignos, con menor expresión en el tejido gingival de control, lo que podría estar relacionado con eventos protumorales (Sánchez-Romero y col., 2021). En algunos tipos de cáncer, la expresión de Cav-1 se asocia con una mayor migración celular, invasión y metástasis, ya que puede facilitar la reorganización del citoesqueleto y mejorar la motilidad de las células cancerosas (Arpaia y col, 2012; Yang y col, 2018). Además, Cav-1 puede activar vías de señalización pro-supervivencia, como la vía PI3K/AKT, favoreciendo el crecimiento y la supervivencia del tumor en condiciones de estrés (Matthews y col, 2008).

En este estudio, se encontró una expresión amplia y variable de Cav-1 en los TO, mientras que su expresión estuvo ausente en 4 de 5 tejidos de control odontogénicos no neoplásicos. Sin embargo, Shi y col. (2016) demostraron que Cav-1 se expresa durante la etapa embrionaria de los gérmenes dentales de ratón, tanto a nivel epitelial como mesenquimal, durante las etapas de diferenciación y organización de los tejidos, principalmente en el órgano del esmalte (Shi y col., 2016).

Este resultado podría explicarse considerando que la expresión de Cav-1 está asociada a procesos dinámicos de diferenciación y proliferación celular. Durante el desarrollo embrionario, los gérmenes dentales presentan una intensa actividad proliferativa y organizativa, lo que justificaría la expresión de Cav-1 en las etapas tempranas de formación dental, como lo reportó Shi y col. (2016). Sin embargo, en los tejidos odontogénicos adultos y en homeostasis, la ausencia de Cav-1 podría indicar que esta proteína no es necesaria una vez que la diferenciación y maduración de los tejidos ha concluido.

Por otro lado, la amplia y variable expresión de Cav-1 en los TO sugiere que esta proteína podría estar involucrada en la biología tumoral, posiblemente regulando la adhesión celular, la señalización proliferativa y la interacción entre el epitelio y el estroma

en contextos neoplásicos (Sánchez-Romero y col., 2021). Su presencia en los TO, pero no en los tejidos de control, podría reflejar un estado de plasticidad celular o remodelación tisular característico de los procesos neoplásicos.

En este sentido, la expresión de Cav-1 en los TO podría representar un rasgo compartido con los tejidos en desarrollo, indicando que ciertas características del epitelio odontogénico embrionario podrían reactivarse en el contexto tumoral, favoreciendo la proliferación y la remodelación del microambiente (Sánchez-Romero y col., 2021).

Los hallazgos obtenidos para Cav-1 evidencian un comportamiento variable según la metodología empleada. A nivel inmunohistoquímico, se observó una elevada expresión en FA, FDA/FOA y O, con diferencias significativas únicamente entre los FDA/FOA y los CP. Estos resultados sugieren que la participación de Cav-1 estaría más relacionada con procesos biológicos comunes del desarrollo y la diferenciación odontogénica que con mecanismos específicos de cada entidad tumoral. En consecuencia, aunque Cav-1 podría contribuir a la comprensión de la biología de estos tumores, su elevada inmunoexpresión compartida entre FA, FDA/FOA y O indica que presenta una capacidad limitada como biomarcador diagnóstico para discriminar entre estas lesiones cuando se utiliza de forma aislada. Su mayor utilidad probablemente radique en la integración con otros biomarcadores, como MOC-31, Cx-43 y el estado mutacional de *BRAF*, que demostraron un mayor poder discriminativo entre las entidades estudiadas.

5.2.2. Expresión inmunohistoquímica de MOC-31

MOC-31 es una glicoproteína transmembrana que participa como molécula de adhesión en las uniones estrechas de los epitelios, se describe su sobreexpresión en neoplasias de origen epitelial como los ameloblastomas y su evidencia en lesiones odontogénicas mixtas como el Tumor odontogénico primordial (Bologna-Molina y col., 2017; Derderian y col., 2022). La odontogénesis es un proceso embriológico donde el tejido está en constante crecimiento y modificación estructural; los TO imitan estas etapas del desarrollo dentario que se evidencia en su morfología histológica (Barnes y col., 2005; Kwon y Rulang, 2018).

Ben Rejeb y col. (2021) observaron que MOC-31 se expresaba de forma variable tanto en tumores benignos como malignos, en neoplasias no invasivas y carcinomas de tiroides, lo que respalda la idea de que podría ser una molécula pronóstica (Ben Rejeb y col., 2021). MOC-31 desempeña un papel multifacético en el cáncer, influyendo en la adhesión celular, la proliferación, la invasión, la evasión inmunitaria y la resistencia a la terapia. Su expresión y función lo convierten en un biomarcador valioso y un objetivo

potencial para intervenciones terapéuticas en el tratamiento del cáncer (Maetzel y col., 2009; Chapel y col., 2020). Existe poca información sobre la inmunoexpresión de esta proteína en TO. En un estudio de Derderian y col. (2022), mostraron una expresión disminuida de MOC-31 en ameloblastomas en comparación con la variante maligna de esta lesión (carcinoma ameloblástico) que mostró una fuerte positividad epitelial (Derderian y col., 2022).

Los resultados de nuestra investigación mostraron fuerte expresión de MOC-31 en el epitelio odontogénico (ameloblastos y áreas de retículo estrellado) de los FDA, FOA y FA, con negatividad en los O y el 80 % de los CP. Como se mencionó en el capítulo 2, la OMS definió en 2005 a los FA, FOA y FDA como TO mixtos, caracterizados por la presencia de un epitelio odontogénico neoplásico y un componente mesenquimático similar a la papila dental, con o sin formación de tejidos duros dentarios. La marcada expresión de MOC-31 en estas patologías podría estar relacionada con la presencia de células epiteliales neoplásicas en activa proliferación, las cuales requieren una mayor adhesión celular y comunicación para su crecimiento y mantenimiento (Barnes y col., 2005; Derderian y col., 2022).

Por otro lado, los O se definen como hamartomas odontogénicos bien organizados, con una diferenciación completa de tejidos duros (esmalte, dentina y cemento). Debido a la maduración completa de su epitelio odontogénico y la ausencia de actividad proliferativa significativa, la falta de expresión de MOC-31 en esta patología podría reflejar la ausencia de necesidad de sus funciones en cohesión celular y proliferación (Barnes y col., 2005; Speight & Takata, 2017; Vered & Wright, 2022).

De manera similar, la no expresión de MOC-31 en los CP, tejidos de control sin transformación neoplásica, sugiere que su presencia podría estar asociada a cambios neoplásicos o a un fenotipo más activo del epitelio odontogénico, en lugar de estar relacionada con estructuras odontogénicas en desarrollo o en estado de homeostasis (Speight & Takata, 2017; Vered & Wright, 2022; Bologna-Molina y col., 2017; Derderian y col., 2022).

Estos hallazgos sugieren que la expresión de MOC-31 podría desempeñar un papel en la evolución neoplásica de los TO con componente mixtos, permitiendo diferenciar lesiones como el FA, FDA y FOA de los O. Además, la positividad a este biomarcador en determinadas lesiones podría indicar la presencia de características proliferativas que requieren una cohesión epitelial activa, a diferencia de los O, donde el epitelio ya ha completado su función en la formación de los tejidos duros.

En síntesis, la marcada expresión de MOC-31 en FA, FDA y FOA, en contraste con la ausencia en O y CP, sugiere que esta proteína podría vincularse principalmente con procesos neoplásicos y con la regulación de la adhesión celular en los TO, más que con la diferenciación odontogénica fisiológica o con lesiones de tipo hamartomatoso.

5.2.3. Expresión inmunohistoquímica de Cx-43

Uno de los sistemas clave de comunicación intercelular son las uniones comunicantes, caracterizadas por su alta capacidad de intercambio de iones y moléculas a través de canales en la membrana intercelular. Estas uniones están formadas por proteínas estructurales llamadas conexinas, entre las cuales se destaca Cx-43 (Sinyuk y col., 2018).

Se ha descrito su importancia en el desarrollo de osteoblastos y osteoclastos (Lecanda y col., 2000) y se ha sugerido su participación en la diferenciación de los ameloblastos, así como en diversos procesos patológicos dentales. Sin embargo, el conocimiento sobre su papel en el desarrollo de los TO sigue siendo limitado (Al-Ansari y col., 2018). Asimismo, Cx-43 cumple un papel dual en el cáncer, actuando tanto como supresor como promotor tumoral, dependiendo del contexto celular, el tipo de cáncer y el estadio de la enfermedad. Su participación en la comunicación intercelular, la apoptosis, la metástasis y la quimiorresistencia la convierte en un elemento clave en la biología del cáncer, así como en un posible objetivo para intervenciones terapéuticas (Bonacquisti y Nguyen, 2019).

Los resultados obtenidos para Cx-43 muestran una expresión predominantemente mesenquimal, con diferencias significativas entre O y FDA/FOA ($p = 0,0022$) y entre O y FA ($p = 0,0310$). Estos hallazgos coinciden con la propuesta de que Cx-43 es una proteína asociada a células mesenquimales en los tejidos neoplásicos odontogénicos analizados (Silveira y col., 2023).

Estudios previos han demostrado que Cx-43 desempeña un papel clave en la formación de uniones gap durante el desarrollo dental, participando en la amelogénesis, dentinogénesis, diferenciación celular y en la deposición y mineralización de la matriz (Silveira y col., 2023). En este estudio, la expresión de Cx-43 se detectó en todos los casos de FDA y FOA, lo que sugiere un posible papel en la inducción de la odontogénesis, facilitando la producción de matriz dentinaria en FDA y de esmalte/dentina en FOA.

La diferencia en la expresión de Cx-43 podría explicarse en función del papel de esta proteína en la inducción y maduración de los tejidos odontogénicos. En el caso de los FA, donde la expresión de Cx-43 es predominantemente mesenquimática, la ausencia

de material mineralizado podría estar relacionada con una menor capacidad inductiva en estas neoplasias. Sin embargo, en aquellos FA que muestran positividad ameloblástica para Cx-43, podría existir un potencial para la formación de tejidos mineralizados, lo que podría ser de interés a demostrar por futuras investigaciones.

Por otro lado, la ausencia de expresión de Cx-43 en los O puede explicarse por la naturaleza hamartomatosa de estas lesiones. Dado que los O presentan un crecimiento autolimitado y representan un estadio más avanzado en la diferenciación odontogénica, la expresión de Cx-43 podría disminuir al haber culminado las fases tempranas del desarrollo dentario, donde su función en la comunicación intercelular y la mineralización de la matriz es más activa. Esto sugiere que la expresión de Cx-43 podría estar más relacionada con procesos de inducción y remodelación de tejidos en formación que con estructuras odontogénicas ya diferenciadas.

La expresión diferencial de Cx-43 en los TO estudiados y en la similitud observada entre los FDA/FOA y FA es compatible con la hipótesis de que estas lesiones comparten mecanismos biológicos; sin embargo, por sí solos no permiten establecer que los FDA y FOA constituyan variantes histológicas del FA (Siwach y col., 2017; Speight & Takata, 2017; Sánchez-Romero y col., 2021; Vered & Wright, 2022).

5.2.4. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67

Desde su identificación, el anticuerpo Ki-67 es reconocido por la mayor parte de la comunidad científica como el biomarcador prototipo de proliferación celular, debido a que permite reconocer la fracción total de células en proliferación, es decir, la proporción de células tumorales que se encuentran en ciclo celular. De hecho, es utilizado de forma rutinaria en el estudio de la agresividad tumoral, en la determinación del potencial maligno de las lesiones epiteliales, como parámetro de clasificación tumoral y como indicador pronóstico (Gonzalez-Moles y col., 2010; González-González y col., 2016; Cortegoso y col., 2017; Dias y col., 2021; Gadbail y col., 2021).

Los resultados de nuestro estudio mostraron en general un grado de proliferación bajo (del 0,5 % al 5 % de las células neoplásicas), observándose positividad en el 50 % de los FOA/FDA, 50 % de los FA y 20 % de los CP. Los O fueron negativos para el biomarcador. La positividad que se observó fue epitelial y/o mesenquimática. Mostraron positividad en las células ameloblásticas un FDA (1,2 %), un FOA (4,5 %) y dos FA (1,7 % y 0,6 %); por otro lado, el único CP positivo (0,4 %) mostró inmunomarcación en el epitelio reducido del órgano del esmalte. En cambio, en un FOA (2,8 %) se observó

marcación exclusivamente mesenquimática y en un FA (5 %) la inmunoeexpresión fue mixta, con tinción de las células odontogénicas tanto mesenquimáticas como epiteliales.

Comparando estos resultados con los reportados por Jabbarzadeh y col. (2021) podemos observar grandes similitudes. Estos autores llevaron a cabo una revisión sistemática para evaluar los niveles de Ki-67 en quistes y TO. Los mismos sugirieron que los niveles de Ki-67 eran más elevados en los TO en comparación con los quistes, y que las neoplasias malignas mostraron una mayor expresión de este marcador en comparación con las lesiones benignas (Jabbarzadeh y col., 2021). Dichos autores observaron una baja expresión de Ki-67 en la mayoría de los casos de FA, FDA y FOA, lo que sugiere un crecimiento lento y una naturaleza menos agresiva. Sin embargo, algunos estudios han reportado un aumento en la expresión en casos con mayor celularidad mesenquimatosas. Mientras que, para los O la expresión de Ki-67 fue prácticamente nula, lo que refleja su naturaleza no proliferativa o lesión tipo hamartoma odontogénico (Jabbarzadeh y col., 2021).

Podemos sugerir que las diferencias en la positividad del biomarcador pueden explicarse por la variabilidad en la composición celular y la actividad biológica de los distintos tipos de TO. La baja proliferación general, indicaría que la mayoría de las células neoplásicas presentan una tasa de división reducida, lo que sugiere un crecimiento lento en estos tumores.

Si analizamos las diferencias en la positividad entre las patologías, podemos concluir que los FOA/FDA y FA (50 % positivos) son tumores con una combinación de células epiteliales y mesenquimáticas, lo que indica un potencial proliferativo bajo. En cambio, los CP (20 % positivos) presentan un menor porcentaje de positividad, posiblemente debido a una menor actividad proliferativa en su tejido. Las variaciones en la distribución según el tipo celular reflejan la heterogeneidad tumoral y la interacción entre células epiteliales y mesenquimáticas, lo que podría influir en el comportamiento biológico de estos tumores.

En resumen, debido a la baja frecuencia de estos TO, el análisis estadístico realizado fue descriptivo, basado en la formulación de similitudes en la expresión inmunohistoquímica y comparaciones múltiples post-hoc. Este enfoque permitió identificar características inmunofenotípicas similares entre FDA, FOA y FA, mientras que resaltó diferencias con O y CP, los cuales presentaron una menor inmunotinción tisular. Estas diferencias fueron más evidentes al analizar la expresión de MOC-31 y Cx-43.

MOC-31 mostró variaciones significativas entre O y FA ($p=0,0310$), mientras que Cx-43 presentó diferencias entre O y FDA/FOA ($p=0,0022$) y entre O y FA ($p=0,0310$). Además, las diferencias observadas en la expresión proteica entre O y los otros tipos de tejidos, junto con las similitudes en la expresión de MOC-31 y Cx-43 entre FDA, FOA y FA, sugieren la proximidad biológica entre los FDA, FOA y FA a nivel inmunohistoquímico, a diferencia de los O. Además, la ausencia de expresión de MOC-31 y Cx-43 en los O refuerza la distinción entre estos tejidos y los demás examinados.

Por otro lado, en este estudio, al analizar la relación entre la inmunoexpresión de diversas proteínas y la edad del paciente, se observó una disminución de la expresión de MOC-31 ($p=0.076$) y Cav-1 ($p=0.077$) a medida que aumentaba la edad. Este hallazgo subraya el carácter pediátrico de estos TO, hecho que se justifica plenamente por la prevalencia etaria de estas neoplasias odontogénicas, aunque también se han descrito algunos casos en pacientes adultos mayores (Speight & Takata, 2017; Vered & Wright, 2022; Silveira y col., 2023).

Finalmente, los resultados obtenidos del estudio inmunohistoquímico en conjunto nos dan herramientas que apoyan la hipótesis de que algunos FOA y FDA pueden compartir características neoplásicas más que hamartomatosas.

Sin embargo, la metodología utilizada solo describe la inmunolocalización y presencia de estas proteínas en las muestras estudiadas, lo que solo permite plantear hipótesis sobre posibles funciones de las mismas dentro de la biología tumoral de estas lesiones odontogénicas.

5.3. Detección de mutaciones y determinación de la expresión genética

A continuación, se discuten los hallazgos obtenidos en relación con la detección de mutaciones y la expresión génica de *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNGB1* en el FA, FDA, FOA y O. La elección de estos genes responde a su implicancia en vías de señalización claves para el desarrollo y la tumorigénesis odontogénica, como las vías MAPK/ERK, Hedgehog, caveolina y Wnt/ β -catenina mencionadas en el Capítulo 2 (ver 2.6).

El análisis mutacional permite identificar alteraciones genéticas estructurales que pueden conducir a la activación constitutiva o a la inactivación de componentes claves de las vías de señalización implicadas en la odontogénesis normal y patológica. A diferencia del estudio de la expresión génica, la detección de mutaciones refleja eventos genómicos relativamente estables, potencialmente tempranos en el proceso de tumorigénesis, que pueden actuar como impulsores del desarrollo y la progresión de estas lesiones (Kurppa y col., 2014). En este sentido, la identificación de mutaciones activadoras o inactivadoras

en genes como *BRAF*, *SMO*, *PTCH1*, *CAVI* y *CTNGB1* permite explorar mecanismos moleculares subyacentes que podrían explicar diferencias en el comportamiento biológico de los TO analizados. Mientras que, el estudio de la expresión genética permite evaluar el nivel de expresión transcripcional de genes claves en las vías de señalización estudiadas, y aporta información complementaria al análisis mutacional. A diferencia de la detección de mutaciones, el análisis de expresión refleja no solo alteraciones estructurales en el ADN, sino también regulaciones epigenéticas, ambientales o microambientales que pueden modular el comportamiento del tumor. Por tanto, este abordaje permite identificar patrones de activación o represión génica que podrían correlacionarse con el grado de diferenciación, actividad proliferativa y características histológicas de las lesiones (Kumamoto y col., 2006).

La evaluación conjunta del perfil mutacional y de la expresión génica permite realizar un abordaje integral de estas entidades, que tradicionalmente han sido clasificadas en base a criterios histológicos, pero que cada vez más requieren el respaldo de herramientas moleculares para su adecuada caracterización (Speight y Takata, 2017). En esta discusión se analizan comparativamente los resultados obtenidos, se contrastan con la bibliografía actual y se discuten sus posibles implicancias biológicas, especialmente en lo que respecta a la hipótesis de que algunas de estas lesiones podrían representar diferentes etapas de desarrollo de una misma lesión odontogénica.

Si observamos los resultados de las tablas 14 y 16, la variabilidad en la extracción de ARN total y ADN, así como el menor rendimiento y calidad del ADN en algunas muestras, puede atribuirse a factores relacionados con la conservación del tejido, particularmente en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, que favorecen la degradación y fragmentación de los ácidos nucleicos. Asimismo, las características histológicas de los TO, especialmente la presencia de componentes mineralizados, podrían haber limitado la eficiencia de la extracción y contribuido a la heterogeneidad en los resultados obtenidos.

De todas maneras, se logró obtener material genético de calidad adecuada en un número considerable de muestras, lo que permitió llevar a cabo los análisis moleculares previstos y cumplir con los objetivos del estudio. Esto fue posible gracias a la optimización de las condiciones de procesamiento y a la implementación de procedimientos orientados a maximizar la recuperación de ácidos nucleicos en las muestras analizadas, como ser: desparafinización adecuada, optimización de los protocolos de lisis y digestión enzimática, así como el control de las condiciones de extracción.

El análisis conjunto de los genes evaluados evidenció patrones heterogéneos de expresión, constatándose distintos niveles de sobreexpresión, expresión basal, disminución e incluso ausencia de expresión génica según la lesión estudiada. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados. Este resultado podría atribuirse a diversos factores, entre ellos el tamaño muestral limitado, la heterogeneidad biológica propia de las lesiones estudiadas y la variabilidad intrínseca en los niveles de expresión génica. Asimismo, la naturaleza mixta de estos tumores, con distintos grados de diferenciación y proporciones variables de sus componentes tisulares, podría contribuir a la dispersión de los resultados. No obstante, el análisis descriptivo permitió identificar algunos patrones de expresión recurrentes entre las entidades estudiadas. Dado que estos hallazgos no alcanzaron significación estadística, deben interpretarse con cautela y no permiten establecer asociaciones concluyentes. Sin embargo, constituyen observaciones de interés biológico que podrían orientar futuras investigaciones con un mayor tamaño muestral, un diseño específico o metodologías complementarias que permitan confirmar su relevancia.

En relación con el estudio mutacional, el único gen que mostró hallazgos relevantes fue *BRAF*, mientras que en el resto de los genes analizados no se detectaron mutaciones en las regiones estudiadas. Esta ausencia de alteraciones genéticas debe interpretarse con cautela, ya que el análisis se centró en fragmentos específicos de aproximadamente 200 pb, seleccionados en base a reportes previos de mutaciones en otras patologías odontogénicas (Williams y col., 2005; Koike y col., 2010; Farias y col., 2012; Brown y col. 2014; Sweeney y col. 2014; Diniz y col. 2015; Twigg y col. 2016; Kim y Jeong, 2019; You y col. 2019). En este sentido, no puede descartarse la presencia de mutaciones en otras regiones de los genes no evaluadas en este estudio. Asimismo, los cambios observados en los niveles de expresión podrían estar mediados por mecanismos alternativos, tales como modificaciones epigenéticas, regulación postranscripcional o la influencia del microambiente tumoral, lo que refuerza la complejidad de la regulación molecular en estas lesiones (Hanahan y Weinberg, 2011).

5.3.1. Gen *BRAF*

El gen *BRAF* codifica una serina/treonina quinasa perteneciente a la familia RAF, clave en la vía de señalización MAPK/ERK, que regula procesos como la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis (Wellbrock y col., 2004). En condiciones fisiológicas, esta vía se activa mediante señales extracelulares y su control es esencial durante la odontogénesis. En TO, la mutación *BRAF* V600E —una sustitución de valina

por ácido glutámico en la posición 600— induce una activación constitutiva de la vía, generando una señalización proliferativa independiente. Esta alteración es frecuente en el ameloblastoma (60–80 % de los casos) (Kurppa y col., 2014; Brown y col., 2014).

Si bien la mayoría de los estudios iniciales se han centrado en el ameloblastoma, investigaciones más recientes han identificado la presencia de *BRAF* V600E en otros TO, como el FA, FDA y FOA, lo que sugiere una implicancia de *BRAF* en etapas tempranas del desarrollo tumoral en distintos subtipos odontogénicos (Shimura y col., 2020; De Villiers y col., 2021). Estos hallazgos han llevado a proponer que ciertas lesiones podrían compartir una vía oncogénica común, posicionando a *BRAF* como un marcador molecular relevante para el diagnóstico, la clasificación y, en casos seleccionados, como potencial blanco terapéutico en tumores de comportamiento agresivo (Kaye y col., 2015).

En este contexto, y en concordancia con lo planteado por estos autores, en el presente estudio nos propusimos evaluar la presencia de la mutación *BRAF* V600E en TO con histología mixta, así como analizar su patrón de expresión génica, con el objetivo de aportar evidencia local que permita profundizar en su rol en la patogénesis de estas lesiones. En este sentido, nuestros resultados detectaron la mutación *BRAF* V600E en la totalidad de los casos de FOA, FA y FDA, mientras que el O analizado presentó la variante de tipo salvaje (wild-type). Estos hallazgos se alinean con lo reportado en la literatura, reforzando la asociación de esta mutación con las lesiones como FA, FDA, FOA y su ausencia en los O.

Desde el punto de vista metodológico, la mayoría de los estudios en TO — especialmente en ameloblastomas y lesiones afines— se han enfocado predominantemente en la detección de mutaciones, siendo *BRAF* V600E la alteración más frecuentemente identificada (Brown y col., 2014), mientras que los análisis de expresión génica y proteica han sido menos explorados. En muchos casos, la presencia de la mutación se asocia con sobreexpresión proteica evaluada por inmunohistoquímica; sin embargo, esta correlación no es constante y puede verse influenciada por variables técnicas, como el tipo de anticuerpo empleado. Asimismo, se ha observado que algunos tumores sin mutaciones detectables presentan niveles basales o levemente aumentados de expresión de *BRAF*, lo que sugiere la participación de mecanismos de regulación transcripcional o epigenética modulados por el microambiente tumoral. Tal como señala Kumamoto (2006), la expresión de genes de la vía MAPK, incluido *BRAF*, puede estar presente aun en ausencia de mutaciones activadoras, aunque con una relevancia funcional incierta, lo que refuerza la necesidad de abordajes integrados que combinen el análisis

mutacional y de expresión, particularmente en TO como FA, FDA, FOA y O (Kumamoto y col., 2006).

En concordancia con estos planteos, en el presente estudio, si bien la mutación se encontró de manera consistente en las lesiones de FA, FDA y FOA, el análisis de la expresión génica evidenció un patrón diferente, observándose expresión de la variante mutada en dos de los tres casos de FOA y en cinco de los nueve casos de FA. En conjunto, estos resultados indican que la expresión de *BRAF* no se manifiesta de forma uniforme en todos los casos, lo que podría reflejar una regulación diferencial a nivel transcripcional. Este comportamiento resulta concordante con lo descrito en la literatura, donde se ha señalado que la presencia de mutaciones no siempre se correlaciona de manera directa con los niveles de expresión génica o proteica, sugiriendo la participación de mecanismos regulatorios adicionales que modulan la actividad de la vía MAPK en estos tumores (Kumamoto y col., 2006).

En este marco, resulta relevante considerar que, además de la mutación clásica V600E, Shimura y col. (2020) identificaron en *BRAF* variantes activadoras no clásicas, como T440P, T263P, K51N y Y647D, localizadas próximas al dominio de activación de la proteína, con potencial impacto funcional aun en ausencia de la mutación V600E. Estos hallazgos amplían el espectro de alteraciones posibles en este gen y refuerzan la hipótesis de que la activación de la vía MAPK en TO podría depender no solo de mutaciones puntuales específicas, sino también de otras variantes menos frecuentes o de mecanismos regulatorios adicionales que influyen en su expresión y actividad (Shimura y col., 2020).

En este contexto, la clasificación de los TO —especialmente FA, FDA y FOA— continúa siendo motivo de controversia, en particular en relación con su distinción respecto de los O y su verdadero carácter neoplásico o hamartomatoso. Si bien la OMS (2017) consideró a los FDA y FOA como lesiones intermedias en la evolución hacia los O, evidencia reciente, como los hallazgos de este estudio, sugieren que estas entidades comprenden un espectro biológico más complejo que no necesariamente responde a una progresión lineal de maduración (Speight y Takata, 2017).

Estudios como los de Guo y col. (2024) y Ver Berne y col. (2025) han demostrado que los FA y sus variantes presentan características moleculares e histológicas que los diferencian claramente de los O. En particular, la alta prevalencia de mutaciones *BRAF* V600E, coincidentes con las de nuestro estudio, y la presencia de alteraciones en el número de copias en el componente mesenquimal —ausentes en los O— apoyan la

hipótesis de una naturaleza neoplásica verdadera en estas lesiones mixtas (Guo y col., 2024; Ver Berne y col., 2025).

Si comparamos nuestros resultados con los reportados por Guo y col. (2024), quienes identificaron mutaciones *BRAF* V600E en el 68,4 % de los FA, 50 % de los FDA y 53,3 % de los FOA, mientras que todos los O analizados fueron de tipo salvaje, se observa una tendencia concordante en cuanto a la ausencia de mutaciones en los O. Sin embargo, a diferencia de lo reportado, en nuestro estudio la mutación se detectó en el 100 % de FA, FDA y FOA analizados, lo que representa una frecuencia superior a la reportada por dichos autores para *BRAF* (Guo y col., 2024). De forma concordante, el estudio multicéntrico de Roza y col. (2025) informó que *BRAF* V600E mostró positividad citoplasmática del mesénquima en el 81 % de los FA y el 54 % de los FDA/FOA, asociada además a un comportamiento clínico más agresivo, caracterizado por expansión ósea, mayor tamaño tumoral y asociación con otras lesiones. Estos hallazgos contrastan con la visión tradicional que consideraba a estas entidades como lesiones hamartomatosas en desarrollo (Roza y col., 2025).

Asimismo, la revisión sistemática de Severino-Lazo y col. (2023) mostró una prevalencia relevante de *BRAF* V600E tanto en tumores mixtos benignos como malignos, sugiriendo su participación en la proliferación tumoral, la invasividad y la progresión, aunque subrayó la necesidad de estudios con cohortes más amplias para validar su utilidad diagnóstica y terapéutica (Severino-Lazo y col., 2023). Los avances en técnicas como la microdissección por captura láser han permitido además confirmar que la mutación *BRAF* V600E se localiza predominantemente en el componente mesenquimal de los tumores mixtos, apoyando la hipótesis de que este compartimento podría actuar como principal impulsor del crecimiento tumoral (Coura y col., 2020; Oh y col., 2022).

La falta de sobreexpresión del gen *BRAF* en algunos casos con mutación V600E observada en este estudio indica que no existe una correlación directa entre el estado mutacional y los niveles de expresión génica. En este sentido, la mutación podría ejercer su efecto a través de la activación funcional de la vía MAPK sin requerir un aumento en la cantidad de ARN mensajero. Asimismo, factores como la regulación epigenética, la estabilidad del ARN o la eficiencia de la transcripción podrían contribuir a la variabilidad en los niveles de expresión observados entre las muestras.

En conjunto, la evidencia encontrada en el gen *BRAF* podría indicar que los FDA y FOA quizás no todos deben considerarse meras variantes inmaduras de los O, sino entidades biológicamente activas con un potencial neoplásico diferenciado, similar al de

los FA. La incorporación de criterios moleculares, particularmente la detección de *BRAF* V600E, resulta fundamental para el diagnóstico diferencial, la comprensión de su patogénesis y la eventual estratificación.

5.3.2. Gen *PTCH1* y *SMO*

En condiciones fisiológicas, la vía de señalización Hedgehog se regula a través de la interacción entre sus componentes principales, donde *PTCH1* actúa como un inhibidor de *SMO*. En ausencia de ligando, *PTCH1* mantiene reprimida la actividad de *SMO*; en cambio, cuando la vía se activa, esta inhibición se libera, permitiendo la transducción de la señal (Wilson y Chen, 2009; Hoyos y col., 2019).

PTCH1 actúa como receptor de los ligandos Hedgehog y como inhibidor de *SMO* en ausencia de señal, funcionando además como un gen supresor tumoral regulado por los factores de transcripción *GLI* (Tukachinsky y col., 2016). La relevancia oncogénica de esta vía quedó establecida a partir del descubrimiento de mutaciones inactivadoras de *PTCH1* en el síndrome de Gorlin y en carcinomas basocelulares esporádicos, así como de mutaciones activadoras de *SMO* en diversas neoplasias humanas (Corcoran y Scott, 2001; Berman y col., 2003; Gorlin, 2004). Estos hallazgos dieron origen a distintos modelos de activación aberrante de la vía Shh —ligando-independiente y ligando-dependiente, tanto autócrina como parácrina— que explican su participación en el inicio y mantenimiento del crecimiento tumoral (Rubin y Sauvage, 2006; Teglund y Toftgård, 2010; Mar y col., 2011). En este contexto, los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian diferencias en el patrón de expresión de ambos genes entre las distintas lesiones odontogénicas analizadas.

En el O, se observó ausencia de expresión génica de *PTCH1* junto con una expresión basal de *SMO*, lo que podría indicar una participación limitada de la vía Hedgehog en este tipo de lesión. Este hallazgo resulta coherente, como lo describe la OMS, con el carácter hamartomatoso y el alto grado de diferenciación de los O, donde los mecanismos de señalización asociados a proliferación activa tendrían un rol menos relevante (Speight y Takata, 2017; Vered y Wright, 2022).

Por su parte, en el FDA, la expresión basal tanto de *PTCH1* como de *SMO* sugiere un estado de equilibrio o baja actividad de la vía, sin evidencia de una activación significativa. Aunque el FDA comparte características con el FOA, particularmente en la presencia de tejidos duros en formación, los resultados muestran que en el FDA la expresión tanto de *PTCH1* como de *SMO* se mantiene en niveles basales, a diferencia del FOA donde puede observarse una leve sobreexpresión de *SMO*. Esta diferencia podría

explicarse por variaciones en el grado y tipo de diferenciación tisular entre ambas entidades.

El FDA se caracteriza por la formación predominante de dentina (o dentinoide), mientras que el FOA presenta además formación de esmalte, lo que implica un proceso de diferenciación más complejo y coordinado, similar al desarrollo odontogénico más avanzado (Barnes y col., 2005). En este sentido, el FOA podría requerir una mayor participación de vías de señalización como Hedgehog, lo que justificaría la leve sobreexpresión de *SMO* observada en algunos casos. Por el contrario, en el FDA, la diferenciación estaría más limitada o dirigida principalmente hacia el componente dentinario, lo que podría asociarse a una menor activación de la vía Hedgehog, reflejada en la expresión basal de ambos marcadores. Esto sugiere que, aunque ambas lesiones están relacionadas, no necesariamente comparten el mismo nivel de activación molecular.

En contraste con los resultados descriptos para el O, algunos FA y FOA mostraron una expresión basal de *PTCH1* acompañada de una leve sobreexpresión de *SMO*, lo que podría interpretarse como una activación parcial de la vía Hedgehog. Este patrón podría estar relacionado con un mayor potencial proliferativo, como se describe en los queratoquistes recidivantes, sugiriendo que la vía podría desempeñar un papel más activo en estas entidades (Gurgel y col., 2014).

Un aspecto relevante de este estudio fue la ausencia de mutaciones en ambos genes, a diferencia de lo reportado en el queratoquiste odontogénico, donde las mutaciones en *PTCH1* conducen a una activación constitutiva de *SMO*, independiente de la presencia de ligando (Shimura y col., 2020). En este sentido, los hallazgos del presente trabajo sugieren que, en las lesiones odontogénicas analizadas, la posible activación de la vía Hedgehog —particularmente en el FA y FOA— podría depender de mecanismos regulatorios alternativos, como modificaciones epigenéticas o regulación postranscripcional. Asimismo, no puede descartarse que existan mutaciones en otras regiones del gen que no fueron evaluadas en esta oportunidad. En concordancia con esta hipótesis, Shimura y col. (2020) describieron la presencia de múltiples mutaciones en *PTCH1*, tales como V582G, T456P, D461N y Y1316S, así como en *SMO*, incluyendo variantes como Y394S, Y399S y N396T. Estas mutaciones se distribuyen a lo largo de los genes sin la identificación de un “punto caliente” definido; en particular, algunas de las variantes descritas en *SMO* no habían sido previamente reportadas como SNPs, lo que sugiere la posible presencia de mutaciones somáticas con relevancia biológica en lesiones odontogénicas. Este patrón es consistente tanto con el gran tamaño de estos genes como

con lo previamente descrito en el queratoquiste odontogénico y en el síndrome basocelular, lo que refuerza la posibilidad de que alteraciones no detectadas en las regiones analizadas puedan contribuir a la regulación de la vía en las lesiones estudiadas (Shimura y col., 2020).

Si comparamos los resultados obtenidos en el O con los observados en los FA y FOA, se evidencia que la ausencia de expresión de *PTCHI* y la expresión basal de *SMO* en el primero, contrastan en general con el patrón de expresión en los FA y FOA, donde *PTCHI* se mantiene en niveles basales y *SMO* presenta, en algunos casos, una leve sobreexpresión. Este perfil molecular se acompaña de diferencias en la actividad proliferativa, ya que la inmunohistoquímica para Ki-67 evidenció positividad en aproximadamente el 50% de los FA, FDA y FOA, con un índice de proliferación bajo, mientras que los O resultaron negativos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que, a diferencia de los O, los FA y FOA presentan no solo una mayor implicancia funcional de la vía Hedgehog, reflejada en los patrones de expresión de *PTCHI* y *SMO*, sino también un leve aumento en la actividad proliferativa, posiblemente asociado a un estado más activo de crecimiento o a etapas menos avanzadas de diferenciación tisular (Gurgel y col., 2014). En conjunto, estos hallazgos permiten proponer la existencia de un gradiente biológico entre las lesiones, en el cual los O representarían el extremo más diferenciado y menos dependiente de esta vía, mientras que los FA y FOA evidenciarían distintos niveles de activación. No obstante, este comportamiento no es uniforme entre todas las entidades. La diferencia observada con el FDA, así como con algunos FA y FOA, que presentaron un patrón de expresión basal para ambos genes, podría sugerir que algunas de estas lesiones comparten un comportamiento biológico más inocuo, similar al descrito para el O, lo que refuerza la heterogeneidad dentro de estos TO.

Comparando con la literatura, el estudio de Gurgel y col. (2014) demostró una activación constitutiva de la vía en queratoquistes y ameloblastomas, con sobreexpresión de *PTCHI* y *SMO*, la cual fue aún mayor en los casos recurrentes, asociándose a un comportamiento más agresivo. En contraste, en el presente estudio se observó una activación más leve y heterogénea de esta vía, con expresión basal de *PTCHI* y solo una leve sobreexpresión de *SMO* en algunos casos de FA y FOA. Estos hallazgos sugieren que, a diferencia de lo reportado para queratoquistes, la vía Hedgehog tendría un papel más limitado en estas lesiones, aunque su activación parcial en algunos casos podría contribuir a variaciones en el comportamiento biológico (Gurgel y col., 2014).

En conjunto, los distintos estudios publicados, independientemente de la metodología empleada —desde análisis de mutaciones hasta estudios de expresión génica— coinciden en señalar a la vía Sonic Hedgehog como un eje molecular central en la patogénesis del queratoquiste odontogénico, principalmente a través de alteraciones en *PTCH1* y *SMO*. La consistencia de estos hallazgos refuerza la concepción de esta lesión como una entidad con base molecular neoplásica y permite explicar su comportamiento clínico más agresivo y su mayor tendencia a la recidiva (Guo y col., 2013; Gurgel y col., 2014; Stojanov y col., 2020; Wang y col., 2023).

En contraste, los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian que, en los TO analizados, la participación de esta vía es más variable y, en general, menos intensa, con patrones de expresión basal de *PTCH1* y una leve sobreexpresión de *SMO* restringida a algunos casos de FA y FOA, sin detección de mutaciones en las regiones estudiadas. Asimismo, estos patrones permiten distinguir a los O de algunos FA y FOA, al evidenciar una menor implicancia de la vía en estos. En este contexto, estos hallazgos sugieren que, a diferencia del queratoquiste odontogénico, la vía Hedgehog no constituiría el principal determinante molecular en estas lesiones, sino que su activación sería parcial y modulada, probablemente asociada a procesos de diferenciación tisular.

5.3.3. Gen *CAVI*

CAVI es un gen implicado en la regulación de vías asociadas a proliferación, diferenciación y supervivencia celular, con un rol dual en tumorigénesis según el contexto tisular. Alteraciones en su estructura, como la mutación P132L, pueden afectar la capacidad de oligomerización de la proteína y su función biológica. Dada la relevancia de este residuo y la limitada evidencia en TO, esta región fue seleccionada para el análisis mutacional, permitiendo explorar posibles alteraciones estructurales de *CAVI* en estas lesiones (Han y col., 2023).

En cuanto al análisis mutacional, no se detectó la variante P132L previamente reportada en otras neoplasias, observándose en todos los casos la presencia de la variante de tipo salvaje (wild-type) (Williams y col., 2005; Koike y col., 2010). Este hallazgo sugiere que, en estas lesiones, las alteraciones en *CAVI* no estarían determinadas por mutaciones estructurales en este sitio crítico, sino más bien por otros mecanismos regulatorios. Como mencionamos para los otros genes, no puede descartarse la presencia de mutaciones en diferentes regiones del gen, dado que el análisis se focalizó en un dominio específico donde ha sido previamente reportada la mutación P132L (Williams y col., 2005; Koike y col., 2010).

En relación con la expresión del gen *CAVI*, en el presente estudio se evidenció una leve sobreexpresión en la totalidad de los casos de FOA, FA y FDA, en contraste con la leve subexpresión observada en los O. Este patrón sugiere una mayor participación de *CAVI* en los primeros en comparación con los O, posiblemente vinculada a diferencias en el grado de actividad biológica y diferenciación tisular. Estos hallazgos se correlacionan parcialmente con los resultados inmunohistoquímicos (ver 4.2.), donde se observó una alta frecuencia de positividad en FOA/FDA (100 %) y FA (75 %), así como también en los O (83,3 %), aunque con menor intensidad en los tejidos de control. En este sentido, la presencia de la proteína en los O, a pesar de la leve subexpresión génica, podría explicarse por mecanismos de regulación postranscripcional o por una mayor estabilidad proteica, lo que pone de manifiesto la complejidad en la relación entre los niveles de ARNm y proteína.

En la literatura, la expresión de *CAVI* ha sido ampliamente estudiada en tumores epiteliales orales, particularmente en el carcinoma oral de células escamosas, donde se ha reportado un aumento de su expresión en comparación con mucosa normal y lesiones potencialmente malignas. No obstante, en metástasis ganglionares se ha observado una disminución de su expresión respecto al tumor primario, lo que ha llevado a proponer un rol bifásico en la carcinogénesis oral, asociado tanto a la progresión tumoral como a mecanismos de regulación del crecimiento (Hung y col., 2003; Han y col., 2004; Kat y col., 2020).

Siguiendo con lo antes mencionado, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían interpretarse a la luz del comportamiento dual de *CAVI* descrito en la literatura. La leve subexpresión observada en los O —lesiones hamartomatosas altamente diferenciadas— sería compatible con su posible rol como supresor tumoral en estadios tempranos o en entidades de crecimiento limitado. En contraste, la leve sobreexpresión detectada en FOA, FA y FDA podría reflejar una mayor participación de *CAVI* en procesos asociados a la proliferación y dinámica tumoral, en concordancia con estudios que señalan su regulación positiva en etapas más avanzadas o en lesiones con mayor actividad biológica (Gong y col., 2019). No obstante, dado el carácter leve de estas variaciones, estos hallazgos deben interpretarse con cautela, sugiriendo un rol contextual y dependiente del tipo de lesión.

En tumores de glándulas salivales, la evidencia es igualmente variable. Algunos estudios han señalado una asociación inversa entre la expresión de *CAVI* y parámetros de agresividad o proliferación celular, sugiriendo un posible rol supresor tumoral,

mientras que otros no han encontrado correlaciones significativas con variables clínico-patológicas (Jaafari-Ashkavandi y col., 2016). Esta heterogeneidad es concordante con los hallazgos del presente estudio.

En el contexto de las lesiones odontogénicas, los estudios disponibles son limitados pero relevantes. Se ha descrito una expresión variable de Cav-1 asociada a diferentes grados de diferenciación epitelial (Bologna-Molina y col., 2017), así como una alta positividad en quistes odontogénicos y menor expresión en ameloblastomas, sugiriéndose que su pérdida podría relacionarse con mayor agresividad (Jaafari-Ashkavandi y col., 2014). Asimismo, estudios recientes han demostrado sobreexpresión de *CAVI* en ameloblastomas sin diferencias entre variantes histológicas (Sánchez-Romero y col., 2021), en concordancia con algunos resultados del presente estudio.

Desde una perspectiva funcional, *CAVI* participa en la regulación de múltiples vías metabólicas relevantes para la biología tumoral, incluyendo glucólisis, metabolismo lipídico y bioenergética mitocondrial, e interactúa con marcadores como GLUT-1, HIF-1A y FASN (Sánchez-Romero y col., 2021). En este contexto, la sobreexpresión de *CAVI* en los FOA, FA y FDA, junto con su mayor frecuencia de expresión proteica, podría vincularse con una mayor actividad metabólica y celular, mientras que en los O, la discordancia entre expresión génica y proteica y su perfil más diferenciado podrían reflejar una regulación distinta de estos procesos. En conjunto, estos resultados refuerzan la participación de *CAVI* en la biología de los TO y evidencian la importancia de considerar tanto el nivel génico como proteico para una mejor comprensión de su rol.

5.3.4. Gen *CTNNB1*

CTNNB1 es el gen que codifica a β -catenina, la cual actúa como un componente clave en la vía de señalización Wnt y regula la homeostasis celular. La mayoría de los estudios relacionados con *CTNNB1* se han centrado principalmente en su papel en el cáncer. β -catenina es un componente clave del complejo que media la adhesión intercelular y es una molécula crítica en la vía de señalización canónica Wnt (Zhuang y col., 2023). Esta vía es uno de los principales reguladores en la patogénesis de lesiones neoplásicas, cuya activación estabiliza a β -catenina, facilitando su acumulación citoplasmática y translocación nuclear. Dentro del núcleo participa además en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular formando varios complejos con proteínas de unión al ADN (Miyake y col., 2006; Chatterjee y col., 2023).

En el presente estudio, el análisis mutacional de *CTNNB1* no evidenció la presencia de variantes activadoras, incluyendo las mutaciones hotspot S33P y S45P,

ampliamente descritas en otras neoplasias (Baumhoer y col., 2022). Este hallazgo, en conjunto con los niveles de expresión génica observados —caracterizados por una leve subexpresión en el FA, FOA y FDA, y una discreta sobreexpresión en el O— sugiere que la vía Wnt/ β -catenina podría no desempeñar un rol central como mecanismo impulsor en estas lesiones.

En contraste, estudios recientes en osteomas han demostrado una alta frecuencia de mutaciones en *CTNNB1* (hasta un 61 %), particularmente en residuos críticos como S45P, asociadas a la estabilización de β -catenina y a la activación transcripcional de la vía Wnt. Estos tumores configuran así un modelo de neoplasia impulsada genéticamente por esta vía. Mientras que, en los O evaluados en el presente estudio no se identificaron mutaciones en *CTNNB1*, y la leve sobreexpresión observada sugiere un incremento regulado de la actividad de la vía más que una activación autónoma. En ausencia de alteraciones estructurales del gen, la β -catenina permanece sujeta a los mecanismos fisiológicos de control, lo que descarta una activación constitutiva comparable a la observada en los osteomas (Baumhoer y col., 2022).

Estas diferencias resultan coherentes con la naturaleza biológica de ambas entidades. Mientras que los osteomas corresponden a neoplasias óseas verdaderas, con crecimiento autónomo y base genética definida, los O son lesiones altamente diferenciadas, frecuentemente consideradas hamartomatosas, que reproducen en gran medida los procesos de odontogénesis (Speight y Takata, 2017). En este contexto, la leve sobreexpresión de *CTNNB1* en O podría vincularse con el rol fisiológico de la vía Wnt/ β -catenina en la formación y organización de los tejidos dentarios, más que con un mecanismo oncogénico primario (Baumhoer y col., 2022).

Los hallazgos del presente estudio resultan concordantes con lo reportado en la revisión sistemática de Chatterjee y col. (2023), la cual demuestra que la expresión de β -catenina y la activación de la vía Wnt/ β -catenina presentan un comportamiento heterogéneo en las lesiones odontogénicas, estrechamente vinculado a su tipo histológico y potencial biológico. En dicha revisión, las lesiones con mayor agresividad, como los TO malignos, evidenciaron con mayor frecuencia acumulación citoplasmática y localización nuclear de β -catenina, interpretadas como indicadores de activación de la vía. Por el contrario, las lesiones de comportamiento más indolente mostraron predominantemente una expresión membranosa, compatible con un estado basal de la señalización (Chatterjee y col., 2023). En este contexto, la ausencia de mutaciones en *CTNNB1* observada en nuestra serie, junto con los niveles de expresión génica caracterizados por una leve

subexpresión en FA, FOA y FDA, y una discreta sobreexpresión en O, sugiere la ausencia de una activación robusta de la vía Wnt/ β -catenina y se correlacionan con el carácter benigno y el bajo potencial agresivo de las lesiones analizadas.

Asimismo, la revisión destaca la existencia de discrepancias entre el estado mutacional de *CTNNB1* y el patrón inmunohistoquímico de β -catenina, lo que sugiere la participación de mecanismos alternativos de activación de la vía, independientes de mutaciones estructurales. En este sentido, si bien la ausencia de mutaciones en nuestro estudio no permite descartar completamente la implicancia de la vía Wnt/ β -catenina, los hallazgos obtenidos apoyan la hipótesis de que su participación sería limitada y probablemente asociada a procesos de regulación transcripcional o diferenciación tisular, más que a un evento oncogénico primario. En conjunto, estos resultados refuerzan el concepto de que la activación de la vía Wnt/ β -catenina en las lesiones odontogénicas es dependiente del contexto biológico, variando según el tipo de lesión y su comportamiento clínico (Chatterjee y col., 2023).

En la misma línea, los resultados del presente estudio concuerdan con lo reportado por Miyake y col. (2006), quienes evidenciaron que las mutaciones en *CTNNB1* son infrecuentes en los TO, incluso en aquellos con comportamiento más agresivo, y que su ausencia no excluye la posible participación de la vía mediante mecanismos alternativos (Miyake y col., 2006).

Por otra parte, *CTNNB1* ha sido descrito en determinados escenarios como un posible gen supresor tumoral, dado que su delección o mutación asociada a pérdida de expresión se ha vinculado con el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Zhuang y col., 2023). Esta función se relaciona principalmente con su rol en la adhesión celular y en el mantenimiento de la arquitectura tisular. En concordancia, la leve subexpresión observada en los FA, FOA y FDA podría asociarse a una disminución de estas funciones regulatorias, contribuyendo a alteraciones en la organización tisular más que a una activación oncogénica directa. No obstante, es importante considerar que β -catenina presenta funciones duales, participando tanto en mecanismos de adhesión celular como en la señalización de la vía Wnt, por lo que su comportamiento no se ajusta estrictamente al de un gen supresor tumoral clásico.

En contraste, la leve sobreexpresión observada en los O podría vincularse con la activación fisiológica de la vía Wnt/ β -catenina durante los procesos de odontogénesis y diferenciación de tejidos dentarios, en concordancia con el carácter altamente organizado de estas lesiones. En conjunto, estos hallazgos sugieren que las variaciones en la

expresión de *CTNNB1* en las lesiones estudiadas reflejan diferencias en el grado de diferenciación y organización tisular, más que un patrón uniforme de comportamiento supresor u oncogénico (Zhuang y col., 2023).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el gen *CTNNB1* no desempeñaría un rol central como impulsor oncogénico en los TO analizados, dado que no se identificaron mutaciones activadoras y los niveles de expresión génica fueron bajos o discretos. La leve subexpresión observada en los FA, FOA y FDA sugiere una posible alteración en funciones regulatorias vinculadas a la adhesión celular y organización tisular, mientras que la leve sobreexpresión en O podría relacionarse con procesos fisiológicos de diferenciación y formación de tejidos dentarios (Zhuang y col., 2023). En este sentido, los hallazgos refuerzan que la participación de la vía WNT/ β -catenina es limitada y dependiente del contexto biológico, variando según el grado de diferenciación y comportamiento de cada entidad. Asimismo, en concordancia con lo reportado en la literatura, esta vía no constituiría un mecanismo impulsor universal, pudiendo responder tanto a eventos mutacionales con impacto oncogénico en ciertas neoplasias, como los osteomas, como a procesos regulados de diferenciación tisular en lesiones como los O (Baumhoer y col., 2022).

5.4. Limitaciones del estudio

Este estudio presenta varias limitaciones que deben ser consideradas al interpretar los resultados. En primer lugar, el tamaño muestral reducido limita la potencia estadística y la generalización de los hallazgos. En segundo lugar, el diseño retrospectivo y el muestreo por conveniencia pueden introducir sesgos de selección. En tercer lugar, la heterogeneidad en la disponibilidad de muestras para los distintos análisis (inmunohistoquímico, expresión génica y secuenciación) podría haber influido en los resultados. Asimismo, la utilización de tejidos como MB y CP como controles, si bien metodológicamente justificable, no representa completamente el microambiente odontogénico normal. Debe considerarse como una limitación del estudio el tiempo de almacenamiento y las condiciones de conservación de las muestras. Si bien algunas de ellas correspondían a casos diagnosticados en las décadas de 1970 y 1980, el Laboratorio de Anatomía Patológica dispone de un archivo destinado a su resguardo, ubicado en un ambiente protegido de temperaturas elevadas y de la humedad. No obstante, no se dispone de registros objetivos o continuos que documenten dichas condiciones de almacenamiento a lo largo del tiempo. En consecuencia, no es posible descartar que la antigüedad de las muestras y las variaciones no documentadas en las condiciones de

conservación hayan influido, en cierta medida, en la calidad de los ácidos nucleicos obtenidos y, por ende, en algunos de los resultados de los análisis moleculares.

Capítulo 6 | Consideraciones finales

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente estudio permiten realizar una caracterización integral de los TO analizados, integrando variables clínico-patológicas, inmunohistoquímicas y moleculares. Desde el punto de vista clínico, si bien se observaron algunas diferencias respecto a lo reportado en la literatura —particularmente en relación con la edad de presentación—, los hallazgos confirmaron tendencias conocidas, como la predilección por pacientes jóvenes y la frecuente localización mandibular, especialmente en FOA y FDA. Estas variaciones podrían explicarse por el tamaño muestral limitado y las características propias de la población estudiada.

A nivel inmunohistoquímico, los TO analizados evidenciaron patrones de expresión similares entre FA, FOA y FDA, con diferencias claras respecto a los O y tejidos de control. La expresión de biomarcadores como MOC-31 y Cx-43 sugiere la presencia de una actividad biológica compartida entre los FA, FOA y FDA. En contraste, la baja o nula expresión de estos marcadores en los O muestra un comportamiento diferencial. Asimismo, el bajo índice proliferativo evidenciado por Ki-67 en todas las lesiones analizadas resulta consistente con su comportamiento clínico benigno y de crecimiento lento.

El análisis genético aportó información relevante para la comprensión de la biología de estas lesiones. En particular, la detección consistente de la mutación *BRAF* V600E en los FA, FOA y FDA, y su ausencia en los O, constituye uno de los hallazgos más significativos del estudio, apoyando la implicancia de la vía MAPK en la patogénesis de estas neoplasias y reforzando su naturaleza neoplásica.

Si bien no se detectaron las mutaciones ya reportadas en los genes *PTCH1*, *SMO*, *CTNNB1* y *CAVI*, el análisis de la expresión génica permitió identificar patrones de comportamiento biológico relevantes. En este sentido, se observaron tendencias similares de leve subexpresión o sobreexpresión entre los FA, FOA y FDA, en contraste con los O, que presentaron un perfil diferencial. Aunque estas variaciones no alcanzaron significación estadística, los resultados sugieren la existencia de mecanismos regulatorios comunes entre algunos de los FA, FOA y FDA, que podrían reflejar una base biológica compartida. La ausencia de significación estadística podría atribuirse, entre otros factores,

al tamaño muestral limitado, a la heterogeneidad intrínseca de estas lesiones y a las dificultades metodológicas asociadas a la obtención de material genético de calidad.

No obstante, los patrones de expresión observados constituyen hallazgos descriptivos que, si bien deben interpretarse con cautela debido a la ausencia de significación estadística, podrían orientar futuras investigaciones. Estudios con un mayor tamaño muestral y la incorporación de técnicas moleculares más amplias permitirán determinar si estos patrones representan diferencias biológicamente relevantes.

En conjunto, la integración de los resultados inmunohistoquímicos y moleculares apoyan la hipótesis de que los FA, FOA y FDA comparten cierta relación biológica que los diferencia de los O. No obstante, esta interpretación debe realizarse con cautela, ya que el tamaño muestral fue limitado y parte de los análisis moleculares no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En contraste, los O mostraron un comportamiento compatible con una entidad biológicamente diferenciada, caracterizado por una menor actividad proliferativa, una menor expresión de biomarcadores y la ausencia de alteraciones moleculares relevantes, evidenciada por la no detección de la mutación *BRAF* V600E y por la ausencia de expresión de BRAF, hallazgos que, en conjunto, respaldan su naturaleza hamartomatosa.

En relación con los objetivos planteados, los resultados obtenidos permiten considerar que estos fueron cumplidos en su totalidad, ya que se logró caracterizar el perfil clínico-patológico, inmunohistoquímico y molecular de las lesiones estudiadas, así como establecer asociaciones entre los distintos niveles de análisis. Asimismo, el estudio aporta evidencia local que contribuye a la comprensión de la patogénesis de los TO estudiados, incorporando herramientas moleculares que complementan la clasificación tradicional basada en criterios histológicos.

No obstante, el presente trabajo presenta algunas limitaciones. Entre ellas, se destaca el tamaño muestral reducido —condición inherente al estudio de patologías de muy baja frecuencia, lo que resalta la relevancia de contar con el número de casos aquí analizado—, la variabilidad en la calidad del material genético obtenido, especialmente en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, y el análisis restringido a regiones específicas de los genes estudiados, lo que no permite descartar la presencia de alteraciones en otras zonas no evaluadas. Asimismo, la naturaleza descriptiva de algunos análisis limita la posibilidad de establecer asociaciones concluyentes.

A partir de estos hallazgos, se podrían abrir nuevas líneas de investigación orientadas a profundizar en la caracterización molecular de estas lesiones. Futuras

investigaciones con mayor tamaño muestral —posiblemente mediante el desarrollo de estudios multicéntricos que permitan ampliar el número de casos—, el empleo de técnicas de secuenciación más amplias y la realización de estudios funcionales permitirán esclarecer con mayor precisión el rol de las distintas vías de señalización implicadas. Asimismo, el estudio de la interacción entre los componentes epitelial y mesenquimático, así como la evaluación de posibles blancos terapéuticos —particularmente en relación con la vía MAPK—, podría aportar nuevas herramientas para el diagnóstico, clasificación y manejo clínico de los TO.

Referencias bibliográficas

- Aasen T, Mesnil M, Naus CC, Lampe PD, Laird DW. “Gap Junctions and Cancer: Communicating for 50 Years.” *Nat Rev Cancer*. 2016; 16(12): 775–788.
- Abramyan J, Geetha-Loganathan P, Šulcová M, Buchtová M. Role of Cell Death in Cellular Processes During Odontogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 18(9):671475.
- 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; 26 (9): 750.
- Alberto L, Salgado Q, Javier L, Hernández E, Javier J, Vilchez R, David C, Midence G, José H, Díaz R. Frequency of Odontogenic Cysts and Tumors in Nicaraguan Population. A Seven-Year Retrospective Study. *Universitas Odontológica*. 2018; 37(78): 2027–3444.
- Andriescu CE, Giuscă E, Ciobanu Apostol SG, Lozneau D, Căruntu L. EpCAM (MOC-31)-immunohistochemical profile and clinico-pathological correlations in different histological variants of papillary thyroid carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2019; 2: 429–436.
- Arango S. Biomarkers for the evaluation of human health risks. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*. 2012; 30(1): 76–82.
- Aregbesola B, Soyele O, Effiom O, Gbotolorun O, Taiwo O, Amole I. Odontogenic Tumours in Nigeria: A multicentre study of 582 cases and review of the literature. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2018; 23(6): e761–e766.
- Ariotti N & Parton RG. SnapShot: Caveolae, Caveolins, and Cavins. *Cell*. 2013; 154(3): 704.
- Arpaia E, Blaser H, Quintela-Fandino M, Duncan G, Leong HS, Ablack A et al. The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene*. 2012 Feb 16;31(7):884-96.

- Balzar M, Winter MJ, De Boer CJ. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med.* 1999; 77(10): 699-712.
- Barba LT, Campos DM, Rascón MMN, Barrera VAR, Rascón AN. Aspectos descriptivos del odontoma: revisión de la literatura. *Revista Odontológica Mexicana.* 2016; 20(4): 272–276.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology & Genetics Head and Neck Tumours. 2005. Cap. 6 (p.p. 284-327). Lyon, France: Edición IARC.
- Baumhoer D, Berthold R, Isfort I, Heinst L, Ameline B, Grünewald I, Thieringer FM, Rudack C, Wardelmann E, Vieth V, Sperveslage J, Trautmann M, Hartmann W. Recurrent CTNNB1 mutations in craniofacial osteomas. *Mod Pathol.* 2022 Apr;35(4):489-494.
- Ben Rejeb S, Beltaifa D, Ghozzi A, Bellil K, Turki S. EpCAM (MOC-31): immunohistochemical expression in papillary thyroid carcinoma and noninvasive follicular thyroid neoplasia with papillary nuclear features (NIFTP). *Tunis Med.* 2021 Nov;99(11):1066-1071.
- Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, De Oca RM, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN and Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature.* 2003; 425(6960): 846–851.
- Bhuyan L, Sarangi S, Das BK, Das SN, Nayak S. Proliferative index in invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: A potential prognostic indicator. *Journal of Contemporary Dental Practice.* 2018; 19(2): 170–176.
- Bianco BCF, Sperandio FF, Hanemann JAC, Pereira AAC. New WHO odontogenic tumor classification: Impact on prevalence in a population. *Journal of Applied Oral Science.* 2020; 28: 1-6.

- Bivona TG. Dampening oncogenic RAS signaling. *Science*. 2019; 363: 1280–1281.
- Bilodeau EA and Collins BM. Odontogenic Cysts and Neoplasms. *Surgical Pathology Clinics*. 2017; 10(1):177–222.
- Bismah A, Anam AM, Jamal Sh, Zaib Khan M and Tahir Khadim M. Expression of Ki-67 and Beta-Catenin in Pseudoepitheliomatous Hyperplasia and Squamous Cell Carcinoma in Oral Mucosal Biopsies: An Immunohistochemical Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2020; 21(1):157–61.
- Bologna-Molina R, Salazar-Rodríguez S, Bedoya-Borella AM, Gil Carreón-Burciaga R, Tapia-Repetto G. and Molina-Frechero N. A Histopathological and Immunohistochemical Analysis of Ameloblastic Fibrodentinoma. *Case Reports in Pathology*. 2013; 2013: 1-7.
- Bologna-Molina R, Toshinari M, Pereira-Prado V, Ramoa Pires F, Bregni RC and Mosqueda-Taylor A. Primordial Odontogenic Tumor: An Immunohistochemical Profile. *Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Surgery*. 2017; 22(3): e314–23.
- Bonacquisti EE, Nguyen J. Connexin 43 (Cx43) in cancer: implications for therapeutic approaches through gap junctions. *Cancer Lett*. 2019 Feb 1;442:439–444.
- Brennan DF, Dar AC, Hertz NT, Chao WC, Burlingame AL, Shokat KM, Barford D. A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature*. 2011; 472: 366–369.
- Brown NA, Rolland D, Mchugh JB, Weigelin HC, Zhao L, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ, Betz BL. Activating FGFR2-RAS-BRAF Mutations in Ameloblastoma. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(21): 5517–5526.
- Campos A, Burgos-Ravanal R, González MF, Huilcaman R, Lobos González L y Quest AFG. Mecanismos celulares intrínsecos y extrínsecos de la metástasis mejorada de Caveolin-1. *Biomoléculas*. 2019; 9(8): 314.

- Chapel DB, Schulte JJ, Husain AN, Krausz T. Application of immunohistochemistry in diagnosis and management of malignant mesothelioma. In *Translational Lung Cancer Research*. 2020; 9(1): S3–S27.
- Chatterjee S, Devi A, Kamboj M, Narwal A. Localization of beta catenin across the domain of odontogenic lesions: A systematic review. *J Oral Pathol Med*. 2023 Nov;52(10):904–910.
- Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shiozawa T and Konishi I. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: It's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Science*. 2007; 98(1) : 68–76.
- Chen Y, Li TJ, Gao Y, Yu SF. Ameloblastic fibroma and related lesions: A clinicopathologic study with reference to their nature and interrelationship. In *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2005; 34(10): 588–595.
- Chrcanovic BR & Gomez RS. Ameloblastic Fibro-dentinoma and Ameloblastic Fibro-Odontoma: An Updated Systematic Review of Cases Reported in the Literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017; 75(7): 1425–1437.
- Chrcanovic BR, Brennan PA, Rahimi S and Gomez RS. Ameloblastic fibroma and ameloblastic fibrosarcoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med*. 2018 Apr;47(4):315–325.
- Clive RT. Predictive Biomarkers and Companion Diagnostics. The Future of Immunohistochemistry – ‘in situ proteomics’, or just a ‘stain’? *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014; 22(8): 555–561.
- Corcoran RB and Scott MP. A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome. *Journal of Neuro-Oncology*. 2001; 53 (3): 307–318).

- Cortegoso AV, Laureano NK, Silva AD, Da Danilecviz CK, Magnusson AS, Visioli F, Rados PV. Cell proliferation markers at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: comparative analysis in relation to clinicopathological parameters of patients. *Journal of Applied Oral Science*. 2017; 25(3): 318–323.
- Cortés-Reyes É, Rubio-Romero JA and Gaitán-Duarte H. Statistical Methods for Evaluating Diagnostic Test Agreement and Reproducibility. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2010; 61(3): 247-255.
- Coura BP, Bernardes VF, de Sousa SF, Diniz MG, Moreira RG, de Andrade BAB, Romañach MJ, Pontes HAR, Gomez RS, Odell EW, Gomes CC. Targeted Next-Generation Sequencing and Allele-Specific Quantitative PCR of Laser Capture Microdissected Samples Uncover Molecular Differences in Mixed Odontogenic Tumors. *J Mol Diagn*. 2020 Dec;22(12):1393-1399.
- Cruz López JE, Ernesto J, Villasana M, Luisa M, Salgado L, Santiago Álvarez N, Dailyn, Rodríguez, R. Ameloblastic fibrodontoma clinical case report and literature review. *Revista Mexicana de Cirugía Bucal y Maxilofacial*. 2020; 16(1): 8–12.
- Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Muller-Reichert T, Neumann B, Poser I, Ellenberg J, Hyman AA, Gerlich DW. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*. 2016; 535(7611): 308–312.
- De Villiers S, van Heerden WF, van Heerden MB, Raubenheimer EJ. BRAF V600E mutation in odontogenic tumours: a review and meta-analysis. *Head Neck Pathol*. 2021;15(1):157–167.
- Derderian N, Pereira-Prado V, Hernandez M, Isiordia-Espinoza M, Arocena M, Gonzalez-Gonzalez R, y col. Ep-CAM (MOC-31) Expression in Tooth Germ and Ameloblastoma. *Oral Med Cir Cirugía Oral*. 2022; 27(5): e403-9.

- Delmar M, Laird DW, Naus CC, Nielsen MS, Verselis VK, White TW, Purpura DP. Connexins and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018; 10(9): 1-18.
- Días EP, Silva Carlos Oliveira N, Oliveira Serra-Campos A, Fausto da Silva AK, Esmeraldo da Silva L and Soares Cunha K. A Novel Evaluation Method for Ki-67 Immunostaining in Paraffin-Embedded Tissues. *Virchows Archiv.* 2021; 479:121-131.
- Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BVA, Castro WH, Lacerda JCT, Cardoso SV, De Faria PR, Dias FL, Eisenberg ALA, Loyola AM, Gomez RS. Assessment of BRAF V600E and SMOF 412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumor Biology.* 2015; 36(7): 5649–5653.
- Dong F, Jiang J, McSweeney C, Zou D, Liu L and Mao Y. Deletion of CTNNB1 in inhibitory circuitry contributes to autism-associated behavioral defects. *Human Molecular Genetics.* 2016; 25(13): 2738–2751.
- Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev. Cancer.* 2003; 3:11–22.
- Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song K S, Okamoto T and Lisanti MP. Recombinant expression of Caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *Journal of Biological Chemistry.* 1997; 272(26): 16374–16381.
- Escobar E, Gómez-Valenzuela F, Peñafiel C, Ortega-Pinto A. Odontogenic tumours in a Chilean population: a retrospective study of 544 cases based on 2022 WHO classification. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2023; 28(6):e596-e606.
- Fabris GA, Ferretti S, Balderi A, Trombelli L, Calura G. Tumori odontogeni misti. Indagine sul significato delle correlazioni tra fibroma ameloblastico, fibro-odontoma ameloblastico e odontomi. *Minerva stomatologica.* 1991; 40(3):167–173.
- Farias L & Gomes CBJ. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. *Human Pathology.* 2012; 43(8): 1229–1233.

- Feria OH, Juan I, Sánchez Acuña G. Benign odontogenic neoplasms. Paper review. Invest. Medicoquir. 2019; 11(3): 1–18.
- Fernow I, Icking A, Tikkanen R. Reggie-1 and reggie-2 localize in non-Caveolar rafts in epithelial cells: Cellular localization is not dependent on the expression of Caveolin proteins. European Journal of Cell Biology. 2007; 86(6): 345–352.
- Fodde R and Brabletz T. Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. In Current Opinion in Cell Biology. 2007; 19(2): 150–158.
- Fra AM, Mastroianni N, Mancini M, Pasqualetto E and Sitia R. Human Caveolin-1 and Caveolin-2 are closely linked genes colocalized with WI-5336 in a region of 7q31 frequently deleted in tumors. Genomics. 1999; 56(3): 355–356.
- Fu Y, Zheng S, An N, Athanasopoulos T, Popplewell L, Liang A, Li K, Hu C and Zhu Y. β -catenin as a potential key target for tumor suppression. UICC International Journal of Cancer IJC. 2011; 129: 1541–1551.
- Gadbail AR, Sarode SC, Chaudhary MS, Gondivkar SM, Tekade SA, Yuwanati M, Patil S. Ki67 labelling index predicts clinical outcome and survival in oral squamous cell carcinoma. Journal of Applied Oral Science. 2021; 29(3): 1–10.
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and Molecular Biologic Characterization of the Cell Proliferation-associated Nuclear Antigen That Is Defined by Monoclonal Antibody Ki-67. American Journal Of Pathology. 1991; 138(4): 867–873.
- Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. Cancer Metastasis Rev. 2008; 27(4): 715–735.
- Gomes IP, Bastos VC, Guimarães LM, Gomes CC. The molecular basis of odontogenic cysts and tumours. J Oral Pathol Med. 2023; 52(4): 351–356.

- Gondak RO, Mariano FV, De Sousa SF, Siqueira EC, Díaz KP, Martins LAL, Altemani A, Mosqueda-Taylor A, Gomez RS and Gomes CC. Ctnnb1 and APC mutations in odontogenic carcinoma with dentinoid. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2020; 129(5): e249–e256.
- Gong Y, Yang Y and Tian S. Different Role of Caveolin-1 Gene in the Progression of Gynecological Tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019; 20(11): 3259–3268.
- González-González R, Molina-Frechero N, Carreón-Burciaga RG, López-Verdín S, Robles-Bonilla C, Pereira-Prado V, Bologna-Molina R. Comparison between Manual and Automated Methods for Ki-67 Immunoexpression Quantification in Ameloblastomas. *Analytical Cellular Pathology*. 2016. 2016:1-8
- Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Esteban F, Bravo M. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: Why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncology*. 2010; 46(7): 525–530.
- Gorlin RJ. Nevroid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*. 2004; 6: 530–539.
- Grätz KW, Makek M, Sailer HF. The ameloblastic fibro-odontoma. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*. 1991; 46(1): 71–73.
- Gu D, Li H, Wang Z, Chen Q, Jiang JZH. Caveolin-1 inhibits the growth of human laryngeal squamous cell carcinoma and down regulates EGFR-MAPKs signaling pathway. *Laryngoscope*. 2007; 117(10): 1782-1789.
- Guo X, Xue J, Sun L, Li T. Are Ameloblastic Fibroma-related Lesions True Tumors?: Evidence Through CNA and BRAF Mutation Analysis. *Am J Surg Pathol*. 2024 Dec 1;48(12):1481-1490.
- Gurgel CA, Buim ME, Carvalho KC, Sales CB, Reis MG, de Souza RO, de Faro Valverde L, de Azevedo RA, Dos Santos JN, Soares FA, Ramos EA. Transcriptional profiles of SHH

- pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2014 Sep;43(8):619-26.
- Han F, Gu D, Chen QZH. Caveolin-1 acts as a tumor suppressor by down-regulating epidermal growth factor receptor-mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic carcinoma cell lines. *Pancreas*. 2009; 38(7): 766–774.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.
- Howell RM, Burkes EJ. Malignant transformation of ameloblastic fibro-odontoma to ameloblastic fibrosarcoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1977; 43(3): 391–401.
- Hoyos CA, Kaminagakura E, Rodrigues MFSD, Pinto CAL, Teshima THN and Alves FA. Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway proteins (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, and Gli3) in sporadic and syndromic odontogenic keratocysts. *Clinical Oral Investigations*. 2019; 23(1): 153–159.
- Huang X, Bringas P, Slavkin HC, Chai Y. Fate of HERS during tooth root development. *Developmental Biology*. 2009; 334(1): 22–30.
- Huang Y, Jia W, Zhao G, Zhao Y, Zhang S, Li Z, Wu G. Clinical features and mutation analysis of class 1/2/3 BRAF mutation colorectal cancer. *Chin Clin Oncol*. 2024 Feb;13(1):3.
- Huber AH, Nelson WJ and Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell*. 1997; 90(5): 871–882.
- Hyun TS, Barnes MTZ. The diagnostic utility of D2-40, calretinin, CK5/6, desmin and MOC-31 in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in pleural effusion cytology. *Acta Cytol*. 2012; 56(5): 527-532.

- Ingham PW and McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development*. 2001; 15: 3059–3308.
- Ito A, Katoh F, Kataoka TR, Okada M, Tsubota N, Asada H, Yoshikawa K, Maeda S, Kitamura Y, Yamasaki H, Nojima H. A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells metastasis. *Journal of Clinical Investigation*. 2000; 105(9): 1189–1197.
- Jaafari-Ashkavandi Z, Mehranmehr F, Roosta E. MCM3 and Ki67 proliferation markers in odontogenic cysts and ameloblastoma. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2019; 9(1): 47.
- Jaafari-Ashkavandi Z, Pardis S, Asadzadeh M, Andisheh-Tadbir A, Dehghani-Nazhvani A. Caveolin-1 expression in odontogenic cysts and ameloblastomas. *Turk Patoloji Derg*. 2014; 30(2): 94-9.
- Jabbarzadeh M, Hamblin MR, Pournaghi-Azar F, Vakili Saatloo M, Kouhsoltani M, Vahed N. Ki-67 expression as a diagnostic biomarker in odontogenic cysts and tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. Winter 2021;15(1):66-75).
- Jing Y, Zhou Q, Zhu H, Zhang YE, Song Y and Zhang X. Ki - 67 Is an Independent Prognostic Marker for the Recurrence and Relapse of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Oncology Letters*. 2019; 974–80.
- Johnson NR, Gannon OM, Savage NW, Batstone MD. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 2014; 5(1): 9–14.
- Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Magnus Bäcklund L, Ichimura K, Collins VP. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res*. 2008; 68: 8673–8677.

- Jussila M and Thesleff I. Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012; 4(4): a008425.
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM and Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 2004; 431(7009): 707–712.
- Katanaev VL. The Wnt/Frizzled GPCR signaling pathway. In *Biochemistry*. 2010; 75(12): 1428–1434).
- Kato T, Miyamoto M, Kato K. Difference of Caveolin-1 expression pattern in human lung neoplastic tissue. Atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2004;214(1): 121-128.
- Kaye FJ, Ivey AM, Drane WE, y col. Clinical and radiographic response to targeted therapy in a case of ameloblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(2):dju40.
- Kim S and Jeong S. Mutation Hotspots in the β -Catenin Gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases. *Molecules and Cells*. 2019; 42(1): 8–16.
- Kintawati S & Pramesti HT. Immunoexpression of Ki-67 in determining prognosis of oral Cavity squamous cell carcinoma. *Padjadjaran Journal of Dentistry*. 2019; 31(2): 147.
- Koike S, Kodera Y, Nakao A, Iwata, YY. Absence of the Caveolin-1 P132L mutation in cancers of the breast and other organs. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*. 2010; 12(5): 712–717.
- Kolenc Fusé, F. J. Dental agenesis: in search of the genetic alterations responsible for the lack of development. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, 9(5):385-95, 2004
- Kovtun O, Tillu VA, Jung WR, Leneva N, Ariotti N, Chaudhary N, Mandyam RA, Ferguson C, Morgan GP, Johnston WA, Harrop SJ, Alexandrov K, Parton RG, Collins BM.

- Structural insights into the organization of the Cavin membrane coat complex. *Developmental Cell*. 2014; 31(4): 405–419.
- Kramer JJ. Histological types of odontogenic tumors, cysts of the jaws and related lesions. World Health Organization. 1972.
- Kruse A. Über die Entwicklung Cystischen Gesschwulste in Unterkiefer. *Arch F Pathol Anat*. 1891; 124-137.
- Kulkarni RS, Sarkar A, Goyal S. Recurrent ameloblastic fibroma: report of a rare case. *Case Reports in Dentistry*. 2013; (4): 1-4.
- Kumamoto H. Molecular pathology of odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med*. 2006 Feb;35(2):65-74.
- Kurppa KJ, Catón J, Morgan PR, y col. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol*. 2014;232(5):492–498.
- Kwon HJ and Jiang R. Development of Teeth 2018, In Reference Module in Biomedical Sciences. 2nd ed. Editorial Elsevier Inc.
- Lamaze C, Tardif N, Dewulf M, Vassilopoulos S, Blouin CM. The Caveolae dress code: structure and signaling. In *Current Opinion in Cell Biology*. 2017; 47: 117–125.
- Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P and Zucman-Rossi J. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 2001; 120(7): 1763–1773.
- Le Charpentier Y. Classification of odontogenic tumors, 2nd edition. WHO, 1992. *Ann Pathol*. 1994;14(1):55-7.
- Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S. Connexin 43 Deficiency Causes Delayed Ossification, Craniofacial Anomalies and Osteoblast Dysfunction. *J Cell Biol*. 2000; 151:931–944.

- Lee HS, Park MH, Yang SJ, Park KC, Kim NS, Kim YS, Kim D, YooHS, Choi EJ and Yeom Y. Novel candidate targets of Wnt/ β -catenin signaling in hepatoma cells. *Life Sciences*. 2007; 80(7): 690–698.
- Lee SW, Reimer CL, Oh P, Campbell DB. Tumor cell growth inhibition by Caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene*. 1998; 16(11): 1391–1397.
- Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G. Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochim. Biophys.* 2007; 1773: 1196–1212.
- Lena Sarkar PTS, Neubüser A, Peters H, Balling R, Martin GR. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development - ScienceDirect. *Mechanisms of Development*. 1999; 85(2): 1–2.
- Li J, Parada C, Chai Y. Cellular and molecular mechanisms of tooth root development. *Development Cambridge*. 2017; 144(3): 374–384.
- Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Predict Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2015; 11(3): 1566–1572.
- Liang W, Hao Z, Han JL, Zhu DJ, Jin ZF. CAV-1 contributes to bladder cancer progression by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Urol Oncol*. 2014; 32(6): 855–863.
- Linard Avelar R, Carvalho de Bezerra Falcão P, Neto AL. Fibroma Ameloblástico: Consideraciones Clínicas, Caso Clínico. *Acta Odontol. Venez.* 2009; 47(4): 256–264.
- Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F. Epithelial cell adhesion molecule (ep-cam) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol*. 1997; 139(5): 1337–1348.
- Liu F, Millar SE. Critical reviews in oral biology & Medicine: Wnt/ β -catenin signaling in oral tissue development and disease. *Journal of Dental Research*. 2010; 89(4): 318–330.

- Livak K and Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001; 25(4):402–8.
- López Fernández R, Téllez Rodríguez Molina TBR. Fibrodentinoma ameloblástico en un paciente pediátrico. Presentación de un caso. *Revista Odontológica Mexicana*. 2009; 13(1): 43-46.
- Loreto Castellón M, Fariña R, Fariña F, Martínez B, Canto L, Gunckel R. Ameloblastic fibro-odontoma of the jaw. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*. 2013; 35: 87–92.
- Maetzel D, Denzel S, Mack B. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*. 2009; 11(2): 162-171.
- Malčić A, Jukić S and Van der Stelt PF. Alterations of FHIT and P53 genes in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous and radicular cyst. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37(5): 294-301.
- Mantilla C, Suárez-Mellado, Duque-Jaramillo ANM. Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis β -catenin signaling mechanisms and its role in carcinogenesis. *Revista CES Medicina*. 2015; 29(1): 109–128.
- Mar BG, Amakye D, Aifantis I, Buonamici S. The controversial role of the Hedgehog pathway in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2011 Nov; 25(11): 1665-73.
- Marangon Junior H, Leão PLR, Melo VVM, Caixeta ÂB, Souza PEA, De Aguiar MCF, Horta MCR. Cell proliferation is associated with intensity of tumor budding in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2018; 47(2): 128–135.
- Marranci A, Jiang Z, Vitiello M, Guzzolino E, Comelli L, Sarti S, Lubrano S, Franchin C, Echevarría-Vargas I, Tuccoli A, Mercatanti A, Evangelista M, Sportoletti P, Cozza G, Luzi E, Capobianco E, Villanueva J, Arrigoni G, Signore G, Poliseno, L. The landscape of BRAF transcript and protein variants in human cancer. *Molecular Cancer*. 2017; 16(85): 1–25.

- Martinovic-Guzmán G, Santorcuato-Cubillos B, Alister-Herdener JP, Plaza-Álvarez C, Raffo-Solari J. Odontoma Compuesto: Diagnóstico y Tratamiento. Reporte de Casos; Revisión de la Literatura. *International Journal of Odontostomatology*. 2017; 11(4): 425–430.
- Matthews LC, Taggart MJ, Westwood M. Modulation of caveolin-1 expression can affect signalling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and cellular proliferation in response to insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 2008 Oct; 149(10): 5199-208
- Mayoral R, Fernández-Martínez A, Roy R. Role of Caveolin 1 on liver regeneration after partial hepatectomy. Mechanisms of signalling and effect on the regulation of hepatocyte proliferation. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2007; 73(4): 1093–1125.
- McHugh ML. Lessons in Biostatistics Interrater Reliability: The Kappa Statistic. *Biochemica Medica*. 2012; 22(3):276–82.
- McKay MM, Freeman AK, Morrison DK. Complexity in KSR function revealed by Raf inhibitor and KSRstructure studies. *Small GTPases*. 2011; 2: 276–281.
- Miyake T, Tanaka Y, Kato K, Tanaka M, Sato Y, Ijiri R, Inayama Y, Ito Y, Aoki S, Kawabe R and Tohnai I. Gene mutation analysis and immunohistochemical study of β -catenin in odontogenic tumors. *Pathology International*. 2006; 56(12): 732–737.
- Monge SC, Herra SS. The importance of genetic counseling in breast cancer. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2020; 37(1): 93-100.
- Morlan J, Baker J and Sinicropi D. Mutation Detection by Real-Time PCR: A Simple, Robust and Highly Selective Method. *PLoS One*. 2009; 4(2): 1-11.
- 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.

- Mucchielli ML, Mitsiadis TA, Raffo S, Brunet JF, Proust JP, Goridis C. Mouse *Otlx2*/RIEG expression in the odontogenic epithelium precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signals for its maintenance. *Developmental Biology*. 1997; 189(2): 275–284.
- Nazar M, Naz I, Mahmood MK, Hashmi SN. Immunohistochemical expression of Cyclin D1 and Ki-67 in primary and metastatic oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2020; 21(1): 37–41.
- Neubüser A, Peters H, Balling R, Martin GR. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: A mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell*. 1997; 90(2): 247–255.
- O’Connell DJ, Ho JWK, Mammoto T, Turbe-Doan A, O’Connell JT, Haseley PS, Koo S, Kamiya N, Ingber DE, Park PJ, Maas RL. A Wnt-Bmp feedback circuit controls intertissue signaling dynamics in tooth organogenesis. *Science Signaling*. 2012; 5(206): 1-25.
- Oh KY, Cho SD, Yoon HJ, Lee JI, Hong SD. Discrepancy between immunohistochemistry and sequencing for BRAF V600E in odontogenic tumours: Comparative analysis of two VE1 antibodies. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2021; 50(1): 85–91.
- Oh KY, Kim JH, Cho SD, Yoon HJ, Lee JI, Hong SD. BRAF V600E and previously unidentified KRAS G12C mutations in odontogenic tumors may affect MAPK activation differently depending on tumor type. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022 Aug;61(8):481-490.
- Ohata Y, Kayamori K, Yukimori A, Sumikura K, Ohsako TH, Hiroyuki S. A lesion categorized between ghost cell odontogenic carcinoma and dentinogenic ghost cell tumor with CTNNB1 mutation. *Pathology International*. 2018; 68: 307–312.

- Palacios Vivar DE, Guzmán Monroy B, Miranda Villasana JE, Ramos Montoya CA. Compound odontoma: A review of the literature and case report involving 40 denticles. *Revista ADM*. 2016; 73(4): 206–211.
- Parton RG, Del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013; 14(2): 98–112.
- Pentheroudakis G, Kotteas EA, Kotoula V, Papadopoulou K, Charalambous E, Cervantes A, Ciuleanu T, Fountzilas G and Pavlidis N. Mutational profiling of the RAS, PI3K, MET and b-catenin pathways in cancer of unknown primary: a retrospective study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2014; 31(7): 761–769.
- Peterkova R, Hovorakova M, Peterka M, Lesot H. Three-dimensional analysis of the early development of the dentition. *Australian Dental Journal*. 2014; 59(1): 55–80
- Phillips SL, Williams CB, Zambrano JN, Williams CJ, Yeh ES. Connexin 43 in the development and progression of breast cancer: What's the connection? (Review). *International Journal of Oncology*. 2017; 51(4): 1005–1013.
- Philipsen HP, Reichart PA. Revision of the 1992-edition of the WHO histological typing of odontogenic tumours: a suggestion. *J Oral Pathol Med*. 2002;31:253-8.
- Piedra J, Martínez D, Castaño J, Miravet S, Duñach M and García De Herreros A. Regulation of β -Catenin Structure and Activity by Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(23): 20436–20443.
- Pillay RR, Bilski A, Batstone M. Ameloblastic fibrosarcoma arising in the maxilla. *Ochsner Journal*. 2016; 16(2):143–145.
- Prade E, Tobiasch M, Hitkova I, Schäffer I, Lian F, Xing X, Tänzer M, Rauser S, Walch A, Feith M, Post S, Röcken C, Schmid RM, Ebert MP, Burgermeister E. Bile acids down-

- regulate caveolin-1 in esophageal epithelial cells through sterol responsive element-binding protein. *Mol Endocrinol*. 2012 May; 26(5):819-32.
- Provost E, McCabe A, Stern J, Lizardi I, D'Aquila TG and Rimm DL. Functional correlates of mutation of the Asp32 and Gly34 residues of beta-catenin. *Oncogene*. 2005; 24(16): 2667–2676.
- Rajendra Santosh AB, Ogle OE. Odontogenic Tumors. *Dent Clin North Am*. 2020; 64(1):121-138.
- Roza ALOC, Shrestha M, Bezerra HKF, Fonsêca TC, Schouwstra CM, Smit C, Rocha AC, Agostini M, Abrahão AC, Cabido LF, Woo V, Júnior JJ, van Heerden WFP, Wright JM, Romañach MJ, Vargas PA. New Insights into Ameloblastic Fibromas, Fibroidentinomas, and Fibro-Odontomas: Findings from an International Multicenter Study. *Head Neck Pathol*. 2025 May 8;19(1):57.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RGW. Caveolin, a protein component of Caveolae membrane coats. *Cell*. 1992; 68(4): 673–682.
- Rubin LL & Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006; 5(12): 1026–1033.
- Ryu HS, Lee K, Shin E, Kim SH, Jing J, Jung HY, Lee H. J. J. Comparative analysis of immunohistochemical markers for differential diagnosis of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Tumori*. 2012; 98(4): 478-484.
- Sales Gil R, Vagnarelli P. Ki-67: More Hidden behind a ‘Classic Proliferation Marker.’ *Trends in Biochemical Sciences*. 2018; 43(10): 747–748.
- Sánchez-Romero C, Pereira-Prado V, Sicco E, Suarez M, Tapia-Repetto G, Carreón-Burciaga R, González-González R, Villarroel-Dorrego M, Meleti M, Molina-Frechero N and Bologna-Molina R. Expression of Caveolin-1 in tooth germ, ameloblastoma and

ameloblastic carcinoma. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2021; 26(2): e238–e245.

Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genetics*. 1994; 6(4): 348–356.

Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Journal of Cell Biology*. 1993; 123(3): 513–522.

Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Ogler OB, Duchrow M. The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. *Journal of Pathology J Pathol*. 2003; 199: 18–27.

Schuch LF, Soares AC, de Mendonça EF, Moreira VHLO, Arantes DAC, Toledo Sanchez KB, Delgado Azañero W, Tetzner AC, Souza MRF, Pereira MC, Sassi LM, do Amaral-Silva GK, Antunes DM, Ayach ER, Paladines S, Torres Calle MF, Costa IFVJ, Xavier FCA, Dos Santos JN, Niklander SE, Martínez-Flores R, Rivero ERC, Assunção VEA, Amenábar JM, Schussel JL, de Lima HG, Paparella ML, Villarroel Dorrego M, Garcia Rejas RA, Horta MCR, Souto GR, Souza PEA, Hernández Ríos M, Morales C, Villabobos T, Gonzalez-Galvan MDC, Vera-González O, Gomes APN, Etges A, Peña Vega CP, Rodríguez-Mora JP, Menna-Barreto C, Martins MD, González Umpiérrez MN, Tancredi Cueto NF, Silveira FM, Abreu LG, Tilakaratne WM, Hunter KD, Gomez RS, Bologna-Molina R. Odontogenic Tumors in South America - A Multicenter Study of 4399 Cases From 20 Oral Pathology Centers. *Oral Dis*. 2025 Nov 24.

Schwab W, Harada W, Nowicki GM, Witt M, Kasper M and Barth K. Immunocytochemical and Biochemical Detection of EMMPRIN in the Rat Tooth Germ: Differentiation-Dependent Co-Expression with MMPs and Co-Localization with Caveolin-1 in

- Membrane Rafts of Dental Epithelial Cells. *Histochemistry and Cell Biology*. 2007; 128(3):195–203.
- Severino-Lazo RJG, de Vasconcelos Carvalho M, Campello CP, Moraes SLD, do Egito Vasconcelos BC, Pellizzer EP. Prevalence of BRAF p.V600E and Detection Methods in Benign Mixed and Malignant Odontogenic Tumors: A Systematic Review. *Head Neck Pathol*. 2023 Dec;17(4):1000-1010.
- Shi L, Li L, Wang D, Li S, Chen Z & An Z. Spatiotemporal expression of Caveolin-1 and EMMPRIN during mouse tooth development. *Journal of Molecular Histology*. 2016; 47(3): 337–344.
- Shimizu K, Kirita K, Aokage K, Kojima M, Hishida T, Kuwata T, Fujii S, Ochiai A, Funai K, Yoshida J, Tsuboi M and Ishii G. Clinicopathological significance of Caveolin-1 expression by cancer-associated fibroblasts in lung adenocarcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2017; 143(2): 321–328.
- 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, Uchid D and Kawamata H. Whole exome sequencing of smo, braf, ptch1 and gnas in odontogenic diseases. *In vivo*. 2020; 34(6): 3233–3240.
- Shirokova V, Jussila M, Hytönen MK, Perälä N, Drögemüller C, Leeb T, Lohi H, Sainio K, Thesleff I, Mikkola ML. Expression of Foxi3 is regulated by ectodysplasin in skin appendage placodes. *Developmental Dynamics*. 2013; 242(6): 593–603.
- Silveira Martins F, Molina-Frechero N, López-Verdín S, González Umpiérrez N, Gómez Palacio-Gastellum M, Almeda-Ojeda O, González-González R, Domingues Martins M, Sicco E, Pereira-Prado V and Bologna-Molina R. Connexin 43 Expression in Tooth Germ and Benign Odontogenic Tumors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2023; 135(5):661–68.

- Sinyuk M, Mulkearns-Hubert EE, Reizes O and Lathia J. Cancer Connectors: Connexins, Gap Junctions, and Communication. *Frontiers in Oncology*. 2018; 8(646):1–18.
- Siwach P, Joy T, Tupkari J, Thakur A. Controversies in odontogenic tumors: review. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2017 Aug;17(3):e268-e276.
- Suluk-Tekkeşi M & Wright JM. The World Health Organization classification of odontogenic lesions: a summary of the changes of the 2017 (4th) edition. *Turk Patoloji Derg*. 2018; 34(1): 1-18.
- Speight PM and Takashi Takata. New Tumour Entities in the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. Review and perspectives. *Head and Neck Pathology*. 2017; 472: 331–339.
- Stan RV. Structure of Caveolae. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2005; 1746(3): 334–348.
- Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V and Beermann FR. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104: 5895–5900.
- Sugie S, Mukai S, Yamasaki K, Kamibeppu T, Tsukino HKT. Significant association of Caveolin-1 and Caveolin-2 with prostate cancer progression. *Cancer Genomics Proteomics*. 2015; 12(6): 391-396.
- Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018; 127(2): 175–186.
- Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho J, Neahring L, Kwei KA, Qu K, Gong X, Ng T, Jones CD, Varma S, Odegaard JL, Sugiyama T, Koyota S, Rubin BP, Troxell ML, Pelham RJ, Zehnder JL, Beachy PA and West RB. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nature Genetics*. 2014; 46(7): 722–725.

- Takkem A, Barakat C, Zakaraia S, Zaid K, Najmeh J, Ayoub M, Seirawan MY. Ki-67 prognostic value in different histological grades of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2018; 19(11): 3279–3286.
- Tanabe S, Kawabata T, Aoyagi K, Yokozaki H and Sasaki H. Gene expression and pathway analysis of CTNNB1 in cancer and stem cells. *World Journal of Stem Cells*. 2016; 8(11): 384–395.
- Teglund S and Toftgård R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2010; 1805(2): 181–208.
- Tolentino EDS. Nova classificação da OMS para tumores odontogênicos: o que mudou? *Revista Da Faculdade de Odontologia - UPF*. 2018; 23(1): 119-123.
- Torres CI and Pérez CJI. Biomarcadores y práctica clínica. *Anales Sis San Navarra*. 2016; 39(1): 5–8.
- Tukachinsky H, Petrov K, Watanabe M. Mechanism of inhibition of the tumor suppressor Patched by Sonic Hedgehog. *Proc Natl Acad Sci*. 2016; 113: e5866–e5875.
- Twigg SRF, Hufnagel RB, Miller KA, Zhou Y, McGowan SJ, Taylor J, Craft J, Taylor J. C, Santoro SL, Huang T, Hopkin RJ, Brady AF, Clayton-Smith J, Clericuzio CL, Grange DK, Groesser L, Hafner C, Horn D, Temple IK, Wilkie AOM. A Recurrent Mosaic Mutation in SMO, Encoding the Hedgehog Signal Transducer Smoothened, Is the Major Cause of Curry-Jones Syndrome. *American Journal of Human Genetics*. 2016; 98(6): 1256–1265.
- Vahtokari A, Åberg T, Jernvall J, Keränen S, Thesleff I. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mechanisms of Development*. 1996; 54(1): 39–43.

- Van den Eynden GG, Van Laere SJ, Van der Auwera I. Overexpression of Caveolin-1 and -2 in cell lines and in human samples of inflammatory breast cancer. *Treat. Breast Cancer Res.* 2006; 95(3): 219-228.
- Ver Berne J, Jacobs R, Hauben E. Rethinking Ameloblastic Fibroma and Fibro-odontoma: A Serie of 6 Cases and Reclassification Proposal. *Head Neck Pathol.* 2025 Jun 25;19(1):77.
- Vered M and Wright JM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. *Head and Neck Pathology.* 2022 Mar;16(1):63-75.
- Verma N. and Neha. Ameloblastic fibroma or fibrosarcoma: A dilemma of oral surgeon. *National Journal of Maxillofacial Surgery.* 2016; 7(2): 191–193.
- Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT, Plikus MV, Maas RL, Chuong CM, Schimmang T, Thesleff I. An Integrated Gene Regulatory Network Controls Stem Cell Proliferation in Teeth. *PLoS Biology.* 2007; 5(6): e159.
- Watanabe S, Watanabe R, Oton-Leite AF, Alencar R, Oliveira JC, Leles CR, Batista A C, Mendonça EF. Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Science.* 2010; 52(3); 417–424.
- Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(11):875–885.
- Wettersten N, Maisel AS. Biomarkers for Heart Failure: An Update for Practitioners of Internal Medicine. *American Journal of Medicine.* 2016; 129(6): 560–567.
- Wiechen K, Diatchenko L, AgoulNIK A. Caveolin-1 is downregulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol.* 2001; 195(5): 1635-1643.
- Williams T, Terence ML, Michael P. Caveolin-1 in Oncogenic Transformation, Cancer, and Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 288:494–506.

- Witte RS and Witte JS. Statistics. 2017. 11th ed. Edited by Inc. John Wiley & Sons.
- Williams TM, Cheung MWC, Park DS, Razani B, Cohen AW, Muller WJ, Di Vizio D, Chopra NG, Pestell RG & Lisanti MP. Loss of Caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Molecular Biology of the Cell*. 2003; 14 (3); 1027–1042.
- Wilson CW and Chen MH, CP. Smoothed adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium. *PLoS One*. 2009; 4: e5182.
- Wiszniewski L, Limat A, Saurat JH, Meda P, Salomon D. Differential Expression of Connexins During Stratification of Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2000; 115(2): 278-285.
- Xue J, Chen H, Diao L, Chen X. Expression of Caveolin-1 in tongue squamous cell carcinoma by quantum dots. *Eur J Histochem*. 2010; 54(2): 20.
- Yan-Jun G, Wei-Wei P, Sheng-Bing L, Zhong-Fei S. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020; 19(3): 1997–2007.
- Yang G, Goltsov AA, Ren C, Kurosaka S, Edamura K, Logothetis R, DeMayo FJ, Troncoso P, Blando J, DiGiovanni J, Thompson TC. Caveolin-1 upregulation contributes to c-Myc-induced high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2012 Feb;10(2):218-29.
- Yang H, Guan L, Li S, Jiang Y, Xiong N, Li L et al. Mechanosensitive caveolin-1 activation-induced PI3K/Akt/mTOR signaling pathway promotes breast cancer motility, invadopodia formation and metastasis in vivo. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):16227-47. Erratum in: *Oncotarget*. 2018 Aug 24;9(66):32730. Yao Z, Torres NM, Tao A, Gao Y, Luo L, Li Q, De Stanchina E, Abdel-Wahab O, Solit DB, Poulikakos P, Rosen N. BRAF mutants evade ERK dependent feedback by different mechanisms that determine their

- sensitivity to pharmacologic inhibition HHS Public Access. *Cancer Cell*. 2015; 28(3): 370–383.
- Yoshimoto C. Development of the teeth. *Biomedical Research*. 2014; 48(5): 29–30, 33.
- You Z, Xu LL, Li XF, Zhang JY, DU J, Sun LS. BRAF gene mutations in ameloblastic fibromas. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2019 Feb; 18; 51(1):4-8.
- Zaman A, Wu W, Bivona TG. Cancers Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. *Cancers*. 2019; 11: 1–19.
- Zhang A, Hitomi M, Bar-Shain N, Dalimov Z, Ellis L, Velpula KK, Fraizer GC, Gourdie RG, Lathia JD. Connexin 43 expression is associated with increased malignancy in prostate cancer cell lines and functions to promote migration. *Oncotarget*. 2015; 6(13): 11640–11651.
- 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; 66(6): 798–807.
- Zhong Y, Wang L, Chen XM. Expression of p-p38MARK, uPA and Ki-67 in epithelial odontogenic tumour. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2010 Sep;45(9):535-9.
- Zhuang W, Ye T, Wang W, Song W, Tan T. CTNNB1 in neurodevelopmental disorders. *Front Psychiatry*. 2023 Mar 16;14:1143328.
- Zou H, Stoppani E, Volonte D. Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases. *Mech Ageing Dev*. 2011; 132(11–12): 533-542.
- Zundel W, Swiersz LM & Giaccia A. Caveolin 1-Mediated Regulation of Receptor Tyrosine Kinase-Associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity by Ceramide. *Molecular and Cellular Biology*. 2000; 20(5): 1507–1514.

Apéndices

APÉNDICE 1. Planilla electrónica

N° caso	N° AP	Diagnóstico histopatológico	Edad	Sexo	localización	Expresión Cav-1	Expresión MOC-31	Expresión Cx-43	Expresión Ki-67

APÉNDICE 2. RESUME /PREPRINT

The present study provides an integrated analysis of immunohistochemical expression, gene expression profiles, and mutational status of key signaling pathways in odontogenic tumors, with a particular focus on ameloblastic fibroma (AF), Ameloblastic fibrodentinoma (AFD), ameloblastic fibro-odontoma (AFO), and odontoma (O). These entities remain at the center of an ongoing debate regarding their biological nature, especially in light of the current World Health Organization classifications.

A consistent finding in this study was the similarity in immunoexpression patterns among AF, AFD, and AFO, in contrast to the lower expression levels observed in odontomas. This differential profile suggests that mixed odontogenic tumors exhibit a higher level of cellular activity compared to odontomas, which are traditionally regarded as developmental lesions. From a biological standpoint, these findings support the concept that at least a subset of AF, AFD, and AFO may behave as true neoplasms rather than representing purely hamartomatous stages of odontoma development.

The proliferative index, as assessed by Ki-67, was low across all groups, although slightly higher in AF, AFD, and AFO compared to odontomas. This is in agreement with previous reports describing low proliferative activity in these lesions. However, the observed differences in the expression of Caveolin-1, MOC-31, and Connexin 43 suggest that beyond proliferation, additional biological processes—such as cell adhesion, intercellular communication, and epithelial–mesenchymal interactions—may play a role in distinguishing these entities. Nevertheless, given the limited statistical significance in several comparisons, these observations should be interpreted as indicative trends rather than definitive differences.

Gene expression analysis revealed heterogeneous patterns across the different tumor types, including absent, basal, and mildly deregulated expression levels. This variability reflects the biological complexity of odontogenic tumors and is consistent with the involvement of multiple signaling pathways in odontogenesis and tumorigenesis. However, the absence of statistically significant differences between groups underscores the exploratory nature of these findings and highlights the need for further validation in larger cohorts.

A particularly relevant finding of this study is the identification of the BRAF V600E mutation in all analyzed cases of AF, AFD, and AFO, while it was absent in odontomas. This result reinforces the existence of molecular differences between these groups and

aligns with previous evidence supporting the role of MAPK pathway activation in odontogenic tumorigenesis. From a translational perspective, the presence of BRAF mutations may have diagnostic and potentially therapeutic implications, particularly considering the increasing use of targeted therapies in tumors harboring MAPK pathway alterations. However, the uniform detection of this mutation in the present series should be interpreted with caution due to the limited sample size and potential selection bias.

In contrast, no mutations were identified in PTCH1, SMO, CTNNB1, or CAV1, suggesting that, within the limitations of this study, these pathways may not play a central role in the molecular pathogenesis of the analyzed lesions. Alternatively, it is possible that alterations in these pathways occur at regulatory levels not assessed in this study, such as epigenetic or post-transcriptional mechanisms.

The findings of this study have important implications in the context of current WHO classifications, which consider AFD and AFO as developing odontomas rather than independent neoplastic entities. The molecular and immunohistochemical profiles observed here challenge this simplified model and support the notion of a biological spectrum, in which some lesions classified as AFD and AFO may exhibit neoplastic features. This perspective aligns with recent discussions in the literature suggesting that odontogenic tumors cannot be fully explained by a linear developmental model.

Several limitations must be acknowledged. The relatively small sample size reduces statistical power and limits the generalizability of the findings. The retrospective design and convenience sampling introduce potential selection bias. Additionally, the use of different subsets of samples for immunohistochemical, gene expression, and mutational analyses may have influenced the consistency of the results. The selection of oral mucosa and pericoronal tissue as controls, although methodologically practical, does not fully replicate the odontogenic microenvironment.

Despite these limitations, this study provides relevant preliminary evidence supporting biological differences between AF, AFD, and AFO compared to odontomas, particularly in relation to MAPK pathway activation. These findings highlight the importance of integrating molecular data into the classification of odontogenic tumors and underscore the need for multicenter studies with larger sample sizes to validate these observations.

In conclusion, the results of this study suggest that mixed odontogenic tumors represent a heterogeneous group with variable biological behavior, and that at least a subset of these lesions may have a true neoplastic nature. A more nuanced classification, incorporating

molecular features, may be necessary to better reflect their biological diversity and to guide clinical management.

Anexos

ANEXO 1. Registro de proyecto en el MSP

 Ministerio de Salud Pública	Dirección General de la Salud División Evaluación Sanitaria Solicitud de registro/autorización de proyectos de investigación en seres humanos
---	---

Montevideo, 11-05-2021.

Constancia de Solicitud de Registro de Proyecto

El presente documento hace constar que el proyecto: Expresión de los genes braf, smo, ptch 1, cttnb 1, cav 1 y de las proteínas caveolina 1, moc 31 y conexina 43; en el Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico y Fibroodontoma ameloblástico fue ingresado el día 11-05-2021, bajo el Nro. 3948745 con los siguientes datos:

Datos del investigador coordinador del proyecto

Nombre: María Natalia Gonzalez
Documento de identidad: cedula : 40251334
Institución a la cual pertenece: Facultad de Odontología de la Udelar
Función en el proyecto: Responsable
Correo electrónico: guillermina.26@hotmail.com
Teléfono de contacto: 099910970

"Esta constancia no implica la aprobación del protocolo registrado ni la autorización para su realización"

ANEXO 2. Aprobación comité de ética Facultad de odontología, Udelar



Montevideo, 02 de setiembre de 2021.-

Doctora
Natalia González

Se comunica a usted la resolución adoptada por el Comité de Ética de fecha 19/08/21:

RESOLUCIÓN 4) :

APROBAR el Proyecto titulado "Expresión de los genes braf, smo, ptch 1, ctnnb 1, cav 1 y de las proteínas caveolina 1, moc 31 y conexina 43 en el Fibroma ameloblástico, Fibroentinoma ameloblástico y Fibroodontoma Ameloblástico", presentado por la Responsable, Dra. Natalia González. (Exp. No. 091900-000084-21).

Sin otro particular, saluda atentamente;

Dra. Alicia Picapedra
Coordinadora del Comité de Ética

ANEXO 3. Aprobación INDT



Instituto Nacional
de Donación y Trasplante
de Células, Tejidos y Órganos
Ministerio de Salud Pública
Universidad de la República
Uruguay

Montevideo, 29 de setiembre de 2021

Dra. Natalia González
Presente

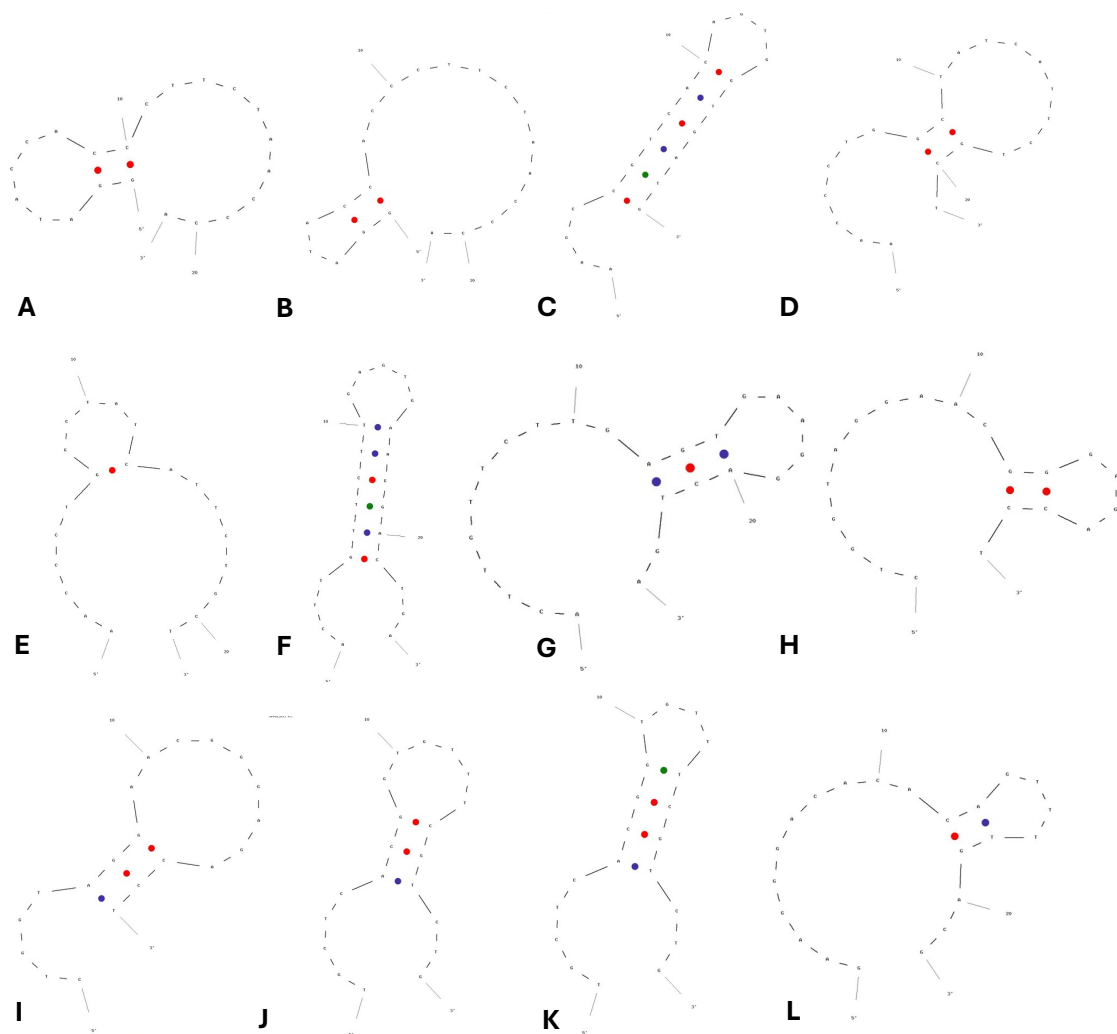
De mi mayor consideración:

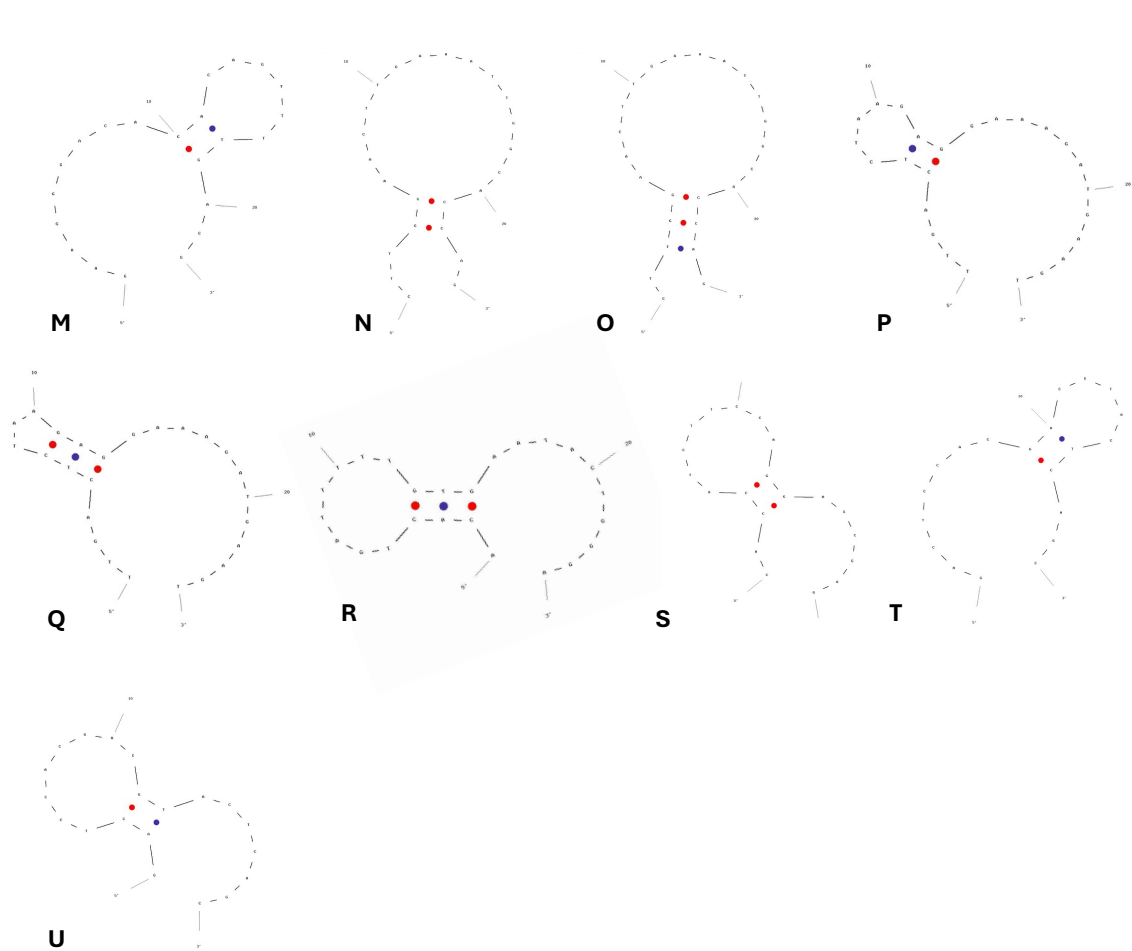
Por la presente comunicamos que la Comisión Honoraria Asesora (CHA) del Instituto Nacional de Donación y Trasplante de Células, Tejidos y Órganos (INDT), aprueba la versión 4, de fecha 4 de setiembre de 2021, del protocolo y consentimiento informado del proyecto titulado "Expresión de los genes braf, smo, pitch 1, ctnnb 1, cav 1 y de las proteínas caveolina 1, mce 31 y conexina 43 en el Fibroma ameloblástico, Fibrodentinoma ameloblástico y Fibroodontoma ameloblástico"

Sin otro particular, saluda atentamente,

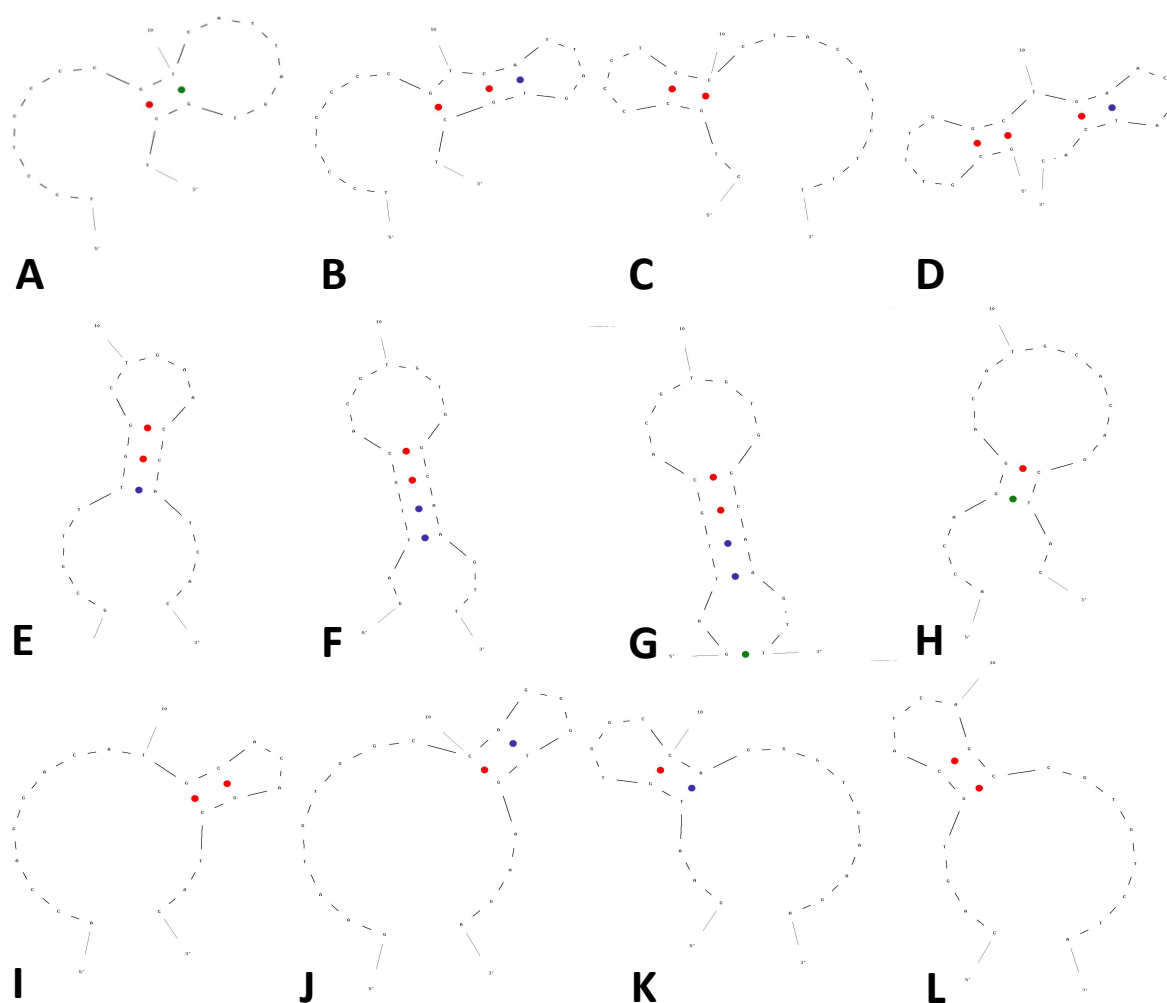
Prof. Dra. Milka Bengochea
Directora del INDT

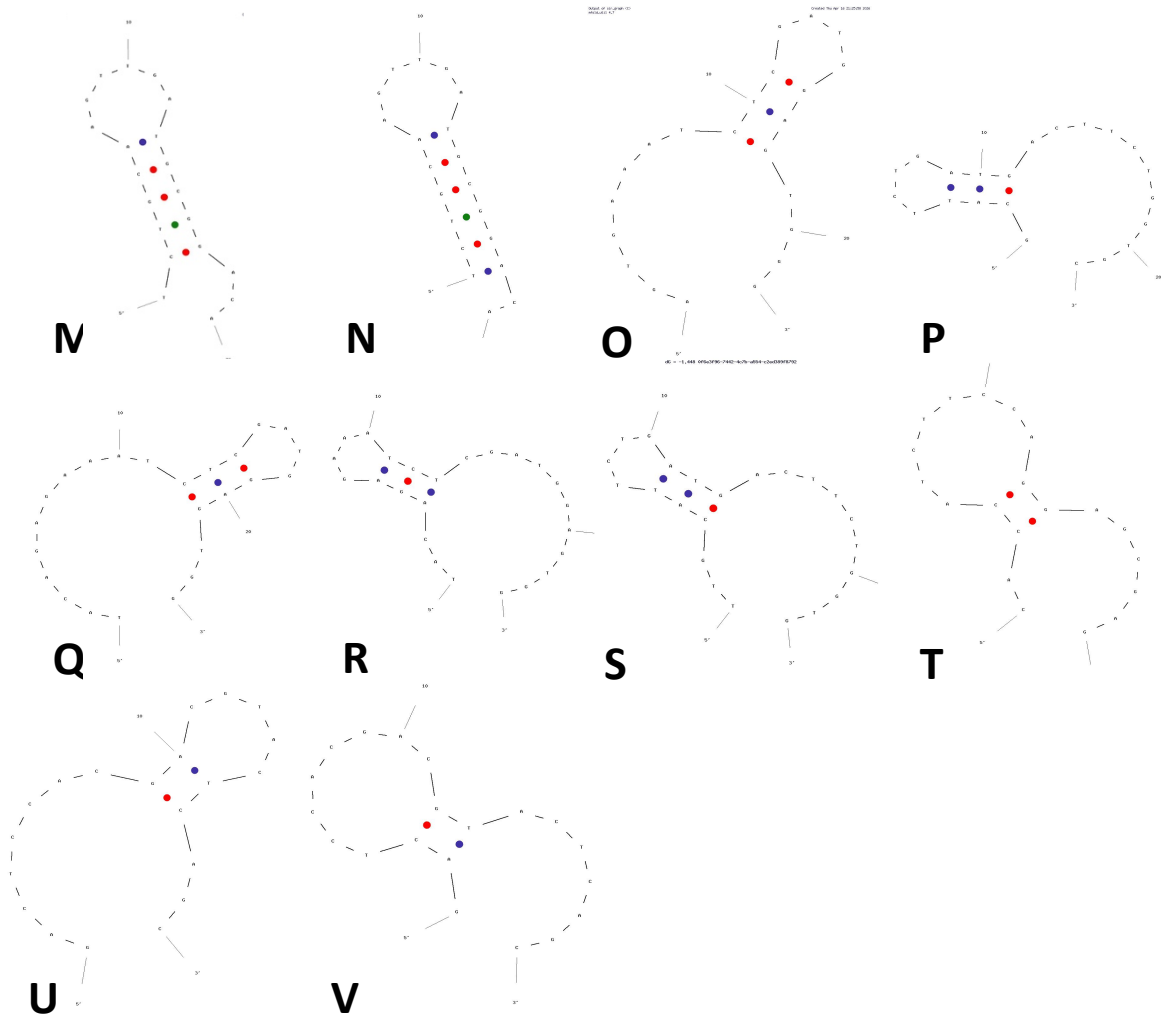
ANEXO 4. Imágenes de las horquillas obtenidas mediante el *Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies, USA) de las secuencias de los primers utilizados para PCR de los genes en estudio. (A, B) *PTCHI* Fower, (C) *PTCHI* Reverse, (D, E) *CTNNB1* Fower, (F, G) *CTNNB1* Reverse, (H, I) *SMO* Fower, (J, K) *SMO* Reverse, (L, M) *CAVI* Fower, (N, O) *CAVI* Reverse, (P, Q) *BRAF* Fower, (R) *BRAF* Reverse, (S) *GAPDH* Fower, (t, U) *GAPDH* Reverse.



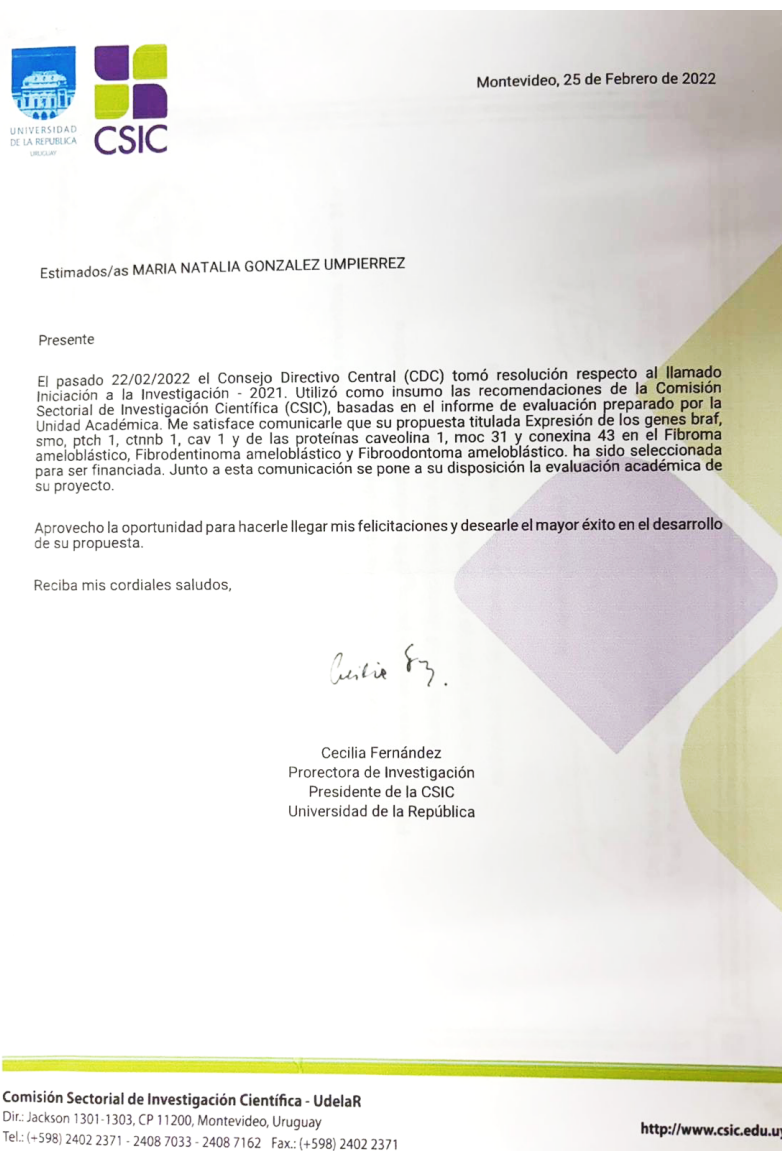


ANEXO 5. Imágenes de las horquillas obtenidas mediante el *Oligo Analyzer Tool* (Integrated DNA Technologies, USA) de las secuencias de los primers utilizados para qPCR de los genes en estudio. (A, B) *PTCHI* Fower, (C) *PTCHI* Reverse, (D, E) *CTNNB1* Fower, (F, G) *CTNNB1* Reverse, (H, I) *SMO* Fower, (J, K) *SMO* Reverse, (L) *CAVI* Fower, (M, N) *CAVI* Reverse, (O) *BRAF Wt* Fower, (P) *BRAF Wt* Reverse, (Q, R) *BRAF Mut* Fower, (S) *BRAF Mut* Reverse, (T) *GAPDH* Fower, (U, V) *GAPDH* Reverse.





ANEXO 6 Obtención de financiamiento en el marco del Programa de Iniciación a la Investigación de la CSIC (2021) para el desarrollo del proyecto de tesis



ANEXO 7 Presentación del Proyecto de investigación en la XVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Uruguaya de Investigación Odontológica, octubre de 2021



ANEXO 8 Presentación de los resultados inmunohistoquímicos en formato póster en el III Congreso Nacional de Biociencias, octubre de 2022.



Inmunoexpresión de las proteínas caveolina 1, Ki-67, conexina 43 y MOC-31 en el Fibroma ameloblástico, Fibroodontoma ameloblástico y Fibroodontoma ameloblástico



Facultad de Odontología
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

González, Natalia¹; Bologna-Molina, Ronell²; Beovide, Verónica¹; Sicco, Estefanía².

¹-Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República.

²-Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República.

Contacto: nataliagonzalez@odon.edu.uy

Introducción

Fibroma ameloblástico (FA) (Fig. 1), Fibroodontoma ameloblástico (FOA) y Fibroodontoma ameloblástico (FDA) son tumores odontogénicos (TO) benignos mixtos que contienen epitelio y mesénquima odontogénica. La falta de clasificación homogénea, unificación de criterios y la eliminación del FOA y FDA por la Organización Mundial de la Salud en 2017, impiden tener un panorama epidemiológico real y actual de los TO mixtos. Al considerar al FOA y FDA como etapas del desarrollo de un odontoma (O) y no como verdaderas neoplasias, nos planteamos la búsqueda de biomarcadores que permitan contribuir al diagnóstico.

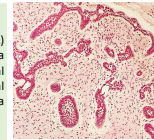


Fig 1. Fibroma ameloblástico. H-E.

Objetivo

Determinar la expresión de caveolina 1, Ki-67, conexina 43 y MOC-31 en el FA, FDA, FOA, usando como controles a los O y capuchones (CP).

Materiales y métodos

Muestreo no probabilístico, por conveniencia. Muestras almacenadas en Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología (Udelar). Procesamiento inmunohistoquímico en Patología molecular (Udelar).

Resultados

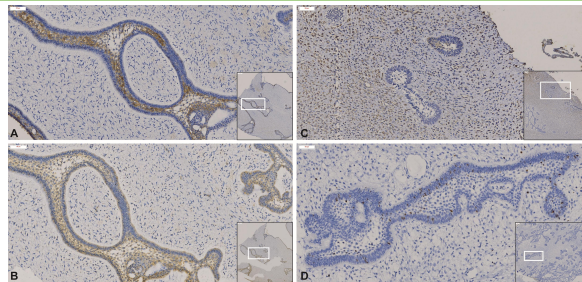


Fig 2. A- Expresión de MOC-31 en Fibroodontoma ameloblástico. B- Expresión de caveolina 1 en Fibroodontoma ameloblástico. C- Expresión de conexina 43 en Fibroma ameloblástico. D- Expresión de Ki-67 en Fibroma ameloblástico. Barra de escala: 50 µm y 200 µm.

Inmunohistoquímica en los tumores FA, FDA y FOA:

Proteínas	MOC-31	Caveolina 1	Conexina 43	Ki-67
FA	+E / -M	++E / -M	-E / ++M	<5% E
FDA	+E / -M	+E / -M	+E / +M	<5% E
FOA	++E / -M	+E / +M	-E / +M	<5% E
O	Negativo	+E / +M	Negativo	Negativo
CP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Escala semicuantitativa de control: (-) negativo o <5%, (+) 5 a 25% y (++) >25%.

(E) epitelio odontogénico y (M) mesénquima odontogénico.

- MOC-31 (Fig. 2A) principalmente en las zonas de retículo estrellado.
- Caveolina 1 (Fig. 2B) en ameloblastos, retículo y mesénquima.
- Conexina 43 (Fig. 2C) principalmente en mesénquima.
- Ki-67 (Fig. 2D) en células epiteliales.
- Todos fueron negativos en CP y O, exceptuando caveolina 1 que tuvo positividad moderada en las zonas de papila y epitelio reducido en O.

Conclusiones

De los hallazgos inmunohistoquímicos se desprende que las neoplasias odontogénicas benignas en estudio tienen actividad neoplásica tanto epitelial como mesenquimática, con baja tasa de proliferación. La sobreexpresión de caveolina 1, MOC-31 y conexina 43 en los tumores mixtos en comparación con la expresión en los O y CP (controles), sugiere un posible rol de dichas proteínas en los eventos del desarrollo tumoral.

Financiación:



BIOCIENCIAS

II Jornadas Binacionales Argentina Uruguay
III Congreso Nacional 2022
"Ciencia para el desarrollo sustentable"

19 al 21 de Octubre de 2022
Radisson Montevideo Victoria Plaza Hotel

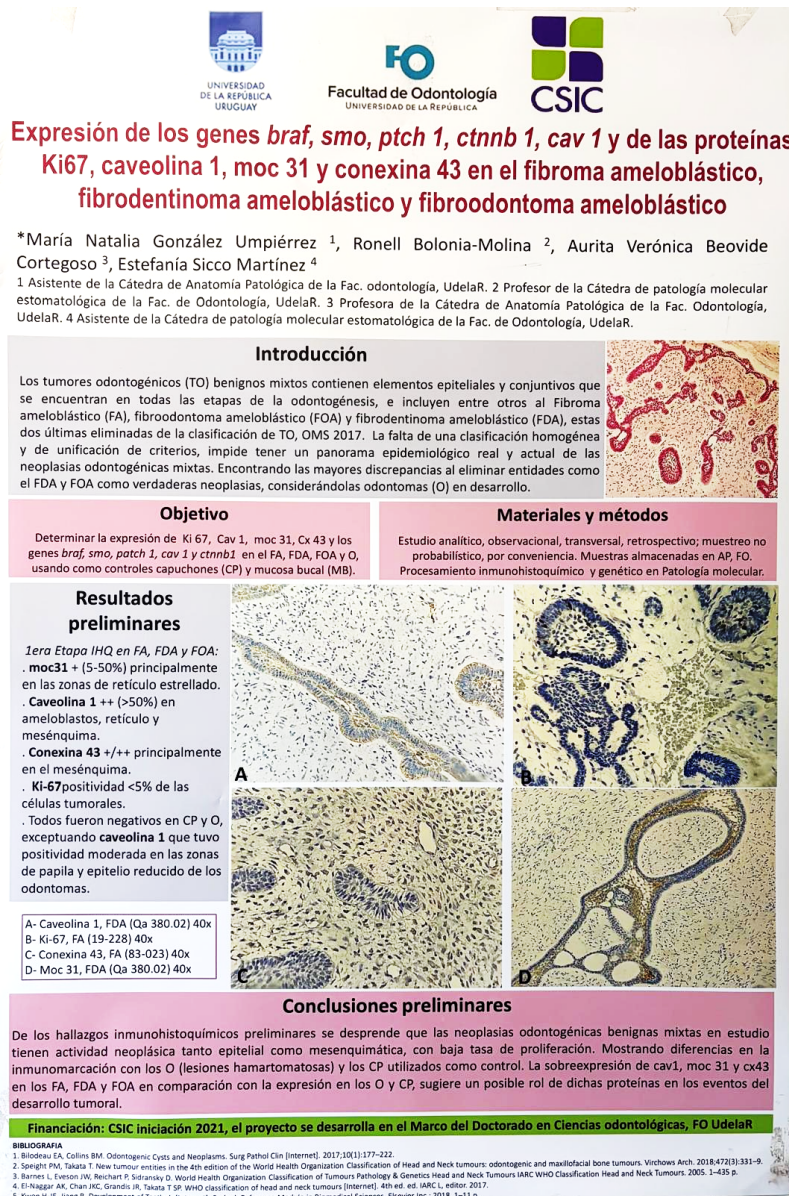
Se deja constancia que María Natalia González Umpierrez presentó el trabajo "Inmunoexpresión de las proteínas caveolina 1, Ki-67, conexina 43 y MOC-31 en el Fibroma ameloblástico, Fibroodontoma ameloblástico y Fibroodontoma ameloblástico" en formato Poster durante el III Congreso Nacional de Biociencias

Gianella Facchin
Presidenta



Gabriel Anesetti
Secretario

ANEXO 9 Presentación de los resultados inmunohistoquímicos en formato póster en las 4 tas. Jornadas de Investigación de la Facultad de Odontología, 2022.



ANEXO 10 Artículo publicado. Umpiérrez NG, Sicco E, Silveira F, Beovide AV, Bologna-Molina R. Differences of immunohistochemical profiling of MOC-31, caveolin-1, connexin-43, Ki-67 in ameloblastic fibroma, ameloblastic fibrodentinoma, ameloblastic fibro-odontoma, and odontomas. *World J Exp Med* 2026; 16(1): 115508.



Submit a Manuscript: <https://www.f6publishing.com>

World J Exp Med 2026 March 20; 16(1): 115508

DOI: 10.5493/wjem.v16.i1.115508

ISSN 2220-315x (online)

ORIGINAL ARTICLE

Retrospective Cohort Study

Differences of immunohistochemical profiling of MOC-31, caveolin-1, connexin-43, Ki-67 in ameloblastic fibroma, ameloblastic fibrodentinoma, ameloblastic fibro-odontoma, and odontomas

Natalia González Umpiérrez, Estefania Sicco, Felipe Silveira, Aurita Veronica Beovide, Ronell Bologna-Molina

Peer review: Externally peer reviewed.

Peer-review model: Single blind

Peer-review report's classification

Scientific quality: Grade A, Grade C

Novelty: Grade A, Grade C

Creativity or innovation: Grade A, Grade B

Scientific significance: Grade B, Grade C

P-Reviewer: Liu L, MD, PhD, Chief Physician, Professor, China

Received: October 20, 2025

Revised: November 3, 2025

Accepted: December 30, 2025

Published online: March 20, 2026

Processing time: 148 Days and 7.5 Hours

Copyright: ©Author(s) 2026. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial \(CC BY-NC 4.0\)](#) license. No commercial re-use. See [permissions](#). Published by Baishideng Publishing Group Inc.



Natalia González Umpiérrez, Estefania Sicco, Felipe Silveira, Aurita Veronica Beovide, Ronell Bologna-Molina, Department of Diagnostic in Oral Pathology and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, University of the Republic, Montevideo 14200, Uruguay

ORCID number: Natalia González Umpiérrez 0000-0001-9006-1680; Estefania Sicco 0000-0003-1137-6866; Felipe Silveira 0009-0005-8195-0036; Aurita Veronica Beovide 0000-0003-0888-507X; Ronell Bologna-Molina 0000-0001-9755-4779.

Corresponding author: Ronell Bologna-Molina, PhD, Professor, Department of Diagnostic in Oral Pathology and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, University of the Republic, Las Heras 1925, Montevideo 11600, Uruguay. ronellbologna@hotmail.com

Abstract

BACKGROUND

Odontogenic tumors are a heterogeneous group of lesions originating from tissues involved in odontogenesis. Mixed odontogenic tumors comprise a group of lesions characterized by the presence of ectodermal and mesenchymal odontogenic tissues with or without the formation of hard dental tissues.

AIM

To determine and compare the expression of caveolin-1, MOC-31, connexin-43 (Cx-43), and Ki-67 in ameloblastic fibromas (AF), ameloblastic fibrodentinomas (AFD), ameloblastic fibro-odontomas (AFO), and odontomas (O).

METHODS

Immunohistochemical analysis for caveolin-1, MOC-31, Cx-43, and Ki-67 was performed on eight AF, one AFD, five AFO, and six O.

RESULTS

Variable protein expression was identified in the epithelium and mesenchyme of most AF, AFD, and AFO with lower expression observed in O. Immunohistochemical analysis revealed significant differences in protein expression between AF and O ($P = 0.0085$) and between AFO/AFD and O ($P = 0.0250$). When evaluating individual proteins, a significant difference in MOC-31 expression was observed between AF and O ($P = 0.0310$), while Cx-43 expression differed between AFO/AFD and O ($P = 0.0022$) and between AF and O ($P = 0.0310$). Additionally,

protein expression decreased with increasing age ($P \leq 0.0100$).

CONCLUSION

This immunohistochemical study suggested that the similarity in protein expression between AFD, AFO, and AF compared with O may be due to the biological proximity among these lesions at the protein expression level. Further studies with larger sample sizes and complementary techniques are required to validate these findings.

Key Words: Caveolin-1; MOC-31; Connexin-43; Ki-67; Odontogenic tumors

Core Tip: This study compared the immunohistochemical expression of caveolin-1, MOC-31, connexin-43, and Ki-67 in ameloblastic fibroma (AF), ameloblastic fibrodentinoma (AFD), ameloblastic fibro-odontoma (AFO), and odontoma (O). AF, AFD, and AFO showed similar epithelial and mesenchymal profiles with lower expression in O. Significant differences in MOC-31 and Cx-43 between AF/AFO and O suggest that AFD and AFO may represent variants of AF rather than developing odontomas. These findings contribute to understanding the biological behavior and classification of mixed odontogenic tumors.

Citation: Umpiérrez NG, Sicco E, Silveira F, Beovide AV, Bologna-Molina R. Differences of immunohistochemical profiling of MOC-31, caveolin-1, connexin-43, Ki-67 in ameloblastic fibroma, ameloblastic fibrodentinoma, ameloblastic fibro-odontoma, and odontomas. *World J Exp Med* 2026; 16(1): 115508

URL: <https://www.wjgnet.com/2220-315x/full/v16/i1/115508.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.5493/wjem.v16.i1.115508>

INTRODUCTION

Mixed odontogenic tumors (OT) comprise a group of lesions characterized by the presence of ectodermal and mesenchymal odontogenic tissues with or without the formation of hard dental tissues[1-3]. Ameloblastic fibroma (AF) is a rare, benign, mixed tumor composed of odontogenic mesenchyme resembling dental papilla and odontogenic epithelium without the presence of hard dental tissues[3]. In contrast, ameloblastic fibrodentinoma (AFD) and ameloblastic fibro-odontoma (AFO) share the histological features of AF but also exhibit the formation of hard dental tissues[4]. AFO and AFD were removed from the World Health Organization (WHO) classification in 2017 as well-defined entities based on the rationale that in most cases they represent developmental stages of odontomas (O), which are mixed hamartomatous lesions composed of epithelium, mesenchyme, and hard dental tissues[3,5]. However, the clinicopathological features of AFD and AFO do not always support the concept of progressive maturation into O, and at least some cases may represent true neoplasms[5].

Cell signaling molecules are integral components of a complex communication system that regulates basic cellular functions and interactions with the microenvironment. Disruptions such as loss of adhesion, impaired maturation, altered intercellular communication, and increased proliferation may contribute to the development of odontogenic neoplasms [6]. Some of these biomolecules are useful biomarkers for understanding the behavior of some OTs. Our group previously used some biomarkers to provide knowledge to the tumor biology of odontogenic neoplasms[6,7].

MOC-31 is an intercellular adhesion molecule involved in tight junction formation in epithelial cells[8]. Its overexpression has been reported in epithelial-origin neoplasms, including ameloblastomas, and it has also been detected in mixed odontogenic lesions such as primordial OTs[2,6]. Caveolin-1 (Cav-1) is an integral membrane protein involved in various biological processes and expressed in both epithelial and mesenchymal cells with documented expression during different stages of tooth development[9]. Its presence has also been described in odontogenic cystic lesions and neoplastic lesions with locally aggressive clinical behavior, such as ameloblastomas[10].

Connexin-43 (Cx-43) is an integral membrane protein forming channels that facilitate intercellular communication and the exchange of ions and molecules[11]. Its role in osteoblast and osteoclast development has been established[12], and it has been suggested to contribute to ameloblast differentiation. However, its precise role in the development of OT remains poorly understood, with only a few studies investigating its expression in odontogenic lesions[7,13]. Lastly, Ki-67 is a non-histone nuclear protein associated with DNA[14]. Widely recognized as a prototypical biomarker for cellular proliferation, it identifies the total fraction of proliferating cells[15,16].

The biomarkers MOC-31, Cav-1, Ki-67, and Cx-43 are involved in critical cellular functions such as adhesion, proliferation, signaling, and intercellular communication. Although each has a distinct role, they functionally intersect in processes such as tumor progression, tissue remodeling, and cellular homeostasis.

These markers tend to interact in various biological processes. For example, Cx-43 colocalizes with Cav-1 and Cav-2 in keratinocytes and regulates intercellular communication[17]. Cx-43 interacts with specific domains of Cav-1, participating in cellular trafficking and signaling[18], and elevated expression of Cav-1 and Ki-67 has been associated with metastasis and tumor progression[19]. Moreover, Cx-43 and Ki-67 show a positive correlation, suggesting that Cx-43 may play a role in proliferation[20,21]. In summary, Cav-1 modulates the function of Cx-43, and MOC-31 activates proliferative pathways associated with Ki-67. When coexpressed in tumors, these molecules may have combined diagnostic and prognostic

value.

In the present study we focused our attention on mixed OTs, a group whose recognition and classification have been the subject of ongoing debate across successive editions of the WHO classification. This diagnostic ambiguity highlights the need for additional tools that may contribute to a better understanding of their histogenesis and biological behavior. In this context we deemed it pertinent to apply this panel of biomarkers previously used by our research group in other OTs[2,6,7]. The selection of this set of biomarkers was based on their indirect involvement in the regulation of cell proliferation, adhesion, and intercellular communication, especially in cancer contexts, and on the possibility of comparing the results obtained with those from previously studied OTs.

The aim of this study was to determine and compare the immunohistochemical expression patterns of MOC-31, Cav-1, Cx-43, and Ki-67 in AF, AFD, AFO, and O to contribute new knowledge that may help to better understand the biological behavior of these OTs.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The cases were randomly selected and consisted of formalin-fixed, paraffin-embedded samples (five AFO, one AFD, eight AF, and six O) obtained from the archives of the Subunit of Pathological Anatomy, Department of Diagnostics in Pathology and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, University of the Republic (Uruguay). Five pericoronal cap (PC) samples were included as controls. It is important to highlight the extreme rarity of these tumors; the cases analyzed represent all those diagnosed at the only oral pathology service in the country from 1985 to the present. Due to their low incidence, the sample size is necessarily limited.

Immunohistochemistry

For the immunohistochemical analyses all samples were subjected to the same standardized mild decalcification protocol implemented in the Department of Pathology at the School of Dentistry. We used Histodecal® Extra (Biopack S.A., Argentina), a chelating decalcifying solution based on ethylenediaminetetraacetic acid, with neutral pH and free from strong or organic acids. This formulation preserves tissue antigenicity and optimizes the detection of selected biomarkers in mineralized tissues.

For immunohistochemical processing 3-µm thick sections mounted on poly-L-lysine-coated slides of each sample were deparaffinized and hydrated. Antigen retrieval was performed at 100 °C for 1 min (Borg Decloaker, RTU; Biocare Medical). Endogenous peroxidases were blocked with 0.9% hydrogen peroxide for 5 min at room temperature (RT). The slides were incubated with the following primary antibodies: Anti-Ki-67 (MIB-1; dilution 1:100, Dako Corporation, United States); anti-Cav-1 (caveolin 1; dilution 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, United States); anti-MOC-31 (Ep-CAM; dilution 1:100, Dako Corporation, United States); or anti-Cx-43 (CX-1 B1; dilution 1:100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) for 60 min at RT. Subsequently, the sections were incubated with biotinylated anti-mouse/anti-rabbit antibody and with the streptavidin/peroxidase complex (LSA-B + Labeled streptavidin-biotin, Dako Corporation, Carpinteria, CA, United States) for 30 min each at RT. The reaction products were visualized with 3,3'-diaminobenzidine-H₂O₂ substrate (Dako Corporation, Carpinteria, CA, United States) and counterstained with Harris hematoxylin for 3 min at RT. As a negative internal control, the primary antibody was omitted, and for the positive external control, breast cancer samples were used for MOC-31, Cav-1, and Ki-67 and osteoblasts and osteocytes for Cx-43.

All histological slides were scanned in digital format using the Motic VM 3.0 Digital Slide Scanning System. For analysis, Motic VM 3.0 - Motic Digital Slide Assistant software (version 1.0.7.46, Copyright Motic China Group Co., Ltd. 2017) was used. The cases were quantified independently, recording protein expression in the epithelial and mesenchymal components of the samples for each marker in the fully scanned slide. Whole-slide scans were reviewed digitally. For quantitative tallies we applied random systematic sampling of five non-overlapping high-powered fields (× 400) per component per case. Positivity thresholds were 0 (< 5%), + (5%-49%), and ++ (≥ 50%) for membrane/cytoplasmic markers (MOC-31, Cav-1, Cx-43). Ki-67 was reported as proliferative index (number of positive cells/total number of observed cells × 100)[22]. Two pathologists scored independently (κ = 0.86); discrepancies ≥ 10 % or at category boundaries were resolved by consensus.

Statistical analysis

Given the rarity and archival nature of these entities, prospective sample-size calculation was not feasible; analyses were treated as exploratory with an emphasis on effect sizes and uncertainty. A sensitivity analysis excluding the single AFD case was conducted. An age-stratified (median split) analysis and an exploratory multivariable logistic mixed model (age, sex, location) assessed robustness of associations.

The results were analyzed using descriptive statistics. To assess the pattern of immunohistochemical expression, a mixed-effects logistic regression model was applied. To compare the expression and establish the degree of similarity, a post-hoc multiple comparison model and the Mann-Whitney test were performed. Additionally, contingency tables with χ^2 tests were used to evaluate the relationship between expression and clinical variables. The statistical package Stata was used, and results were considered significant with a *P* value ≤ 0.05.

Table 1 Global and individual immunoeexpression results

Sample (n)	Cav-1	MOC-31	Cx-43	Ki-67
AFO/AFD[6]	6 (100.0)	3 (50.0)	6 (100.0)	3 (50.0)
AF[8]	6 (75.0)	5 (62.5)	5 (62.5)	4 (50.0)
O[6]	5 (83.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
PC[5]	1 (20.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	1 (20.0)
OT[20]	17 (85.0)	8 (40.0)	11 (55.0)	7 (35.0)
Global[25]	18 (72.0)	9 (36.0)	14 (56.0)	8 (32.0)

Data are expressed as n (%). Overall and individual percentage of expression for caveolin-1, MOC-31, connexin-43, and Ki-67 in ameloblastic fibromas, ameloblastic/fibro-odontomas, ameloblastic/fibro-dentinomas, odontomas and pericorony caps. AF: Ameloblastic fibroma; AFD: Ameloblastic fibro-dentinoma; AFO: Ameloblastic fibro-odontoma; O: Odontoma; PC: Pericorony cap; OT: Odontogenic tumors; Cx-43: Connexin-43; Cav-1: Caveolin-1.

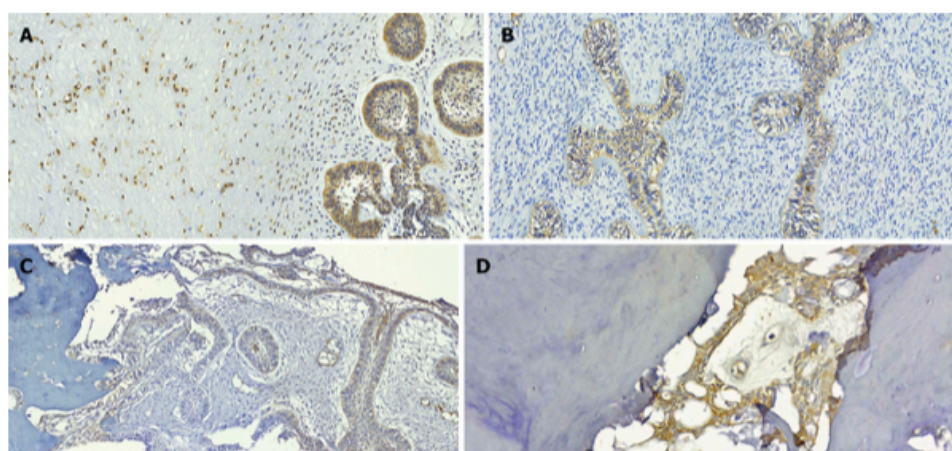


Figure 1 Immunoeexpression of caveolin-1 in ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-dentinoma, ameloblastic fibro-odontoma, and odontoma. A: Ameloblastic fibroma showing positivity (++) in ameloblastic epithelial islands and odontogenic mesenchymal cells; B: Ameloblastic fibro-dentinoma with positivity (++) only in the ameloblastic epithelial component; C: Ameloblastic fibro-odontoma with positivity (++) in the ameloblastic epithelial component, also showing its relation to the formation of mineralized dental tissues (dentin); D: Odontoma with positivity (++) in the epithelial component. Immunohistochemistry, caveolin-1, A-D: $\times 20$.

RESULTS

In this study OT were in the mandible in 13 (65%) cases and affected 13 (65%) males with a mean age of 23 years (ranging from 4 to 68 years). All AFO were in the mandible with 3 (60%) in males and a mean age of 12 years. AF were in both the maxilla and mandible with 5 (62%) in males and a mean age of 27 years. The AFD was in the mandible in a male aged 24 years. The O were in 3 (50%) cases in the mandible with 4 (67%) in males and a mean age of 23 years. For statistical analysis AFO and AFD were grouped together due to the presence of only one case of AFD and the consideration that they may be similar in biological behavior according to the WHO classification[4,6].

Cav-1 was expressed in 17 (85%) of the 20 OT evaluated with membrane-cytoplasm staining (+) and (++) at the level of ameloblasts, stellate reticulum areas, and odontogenic mesenchyme in all AFO and AFD, 6 AF (75%), and dental papilla areas in 5 O (83.3%). No staining was observed in two of the eight AF (25%), and in the PC, except for one (20%) that showed (+) staining in the reduced enamel epithelium of the enamel organ (Table 1, Figure 1).

Regarding the tissue expression of MOC-31, membrane-cytoplasm staining (+) and (++) was observed in the ameloblasts and stellate reticulum areas of the single AFD, 2 AFO (40%), 5 AF (63%), and 1 PC (20%). O were all negative for this biomarker (Table 1, Figure 2).

For Cx-43 expression membranous (+) and (++) mesenchymal staining was observed in all AFD and AFO, 5 AF (63%), and 3 PC (60%). In one AFO, one AF, and the AFD, the positivity was (++) and mixed, also involving the ameloblasts. All O were negative for this biomarker (Table 1, Figure 3).

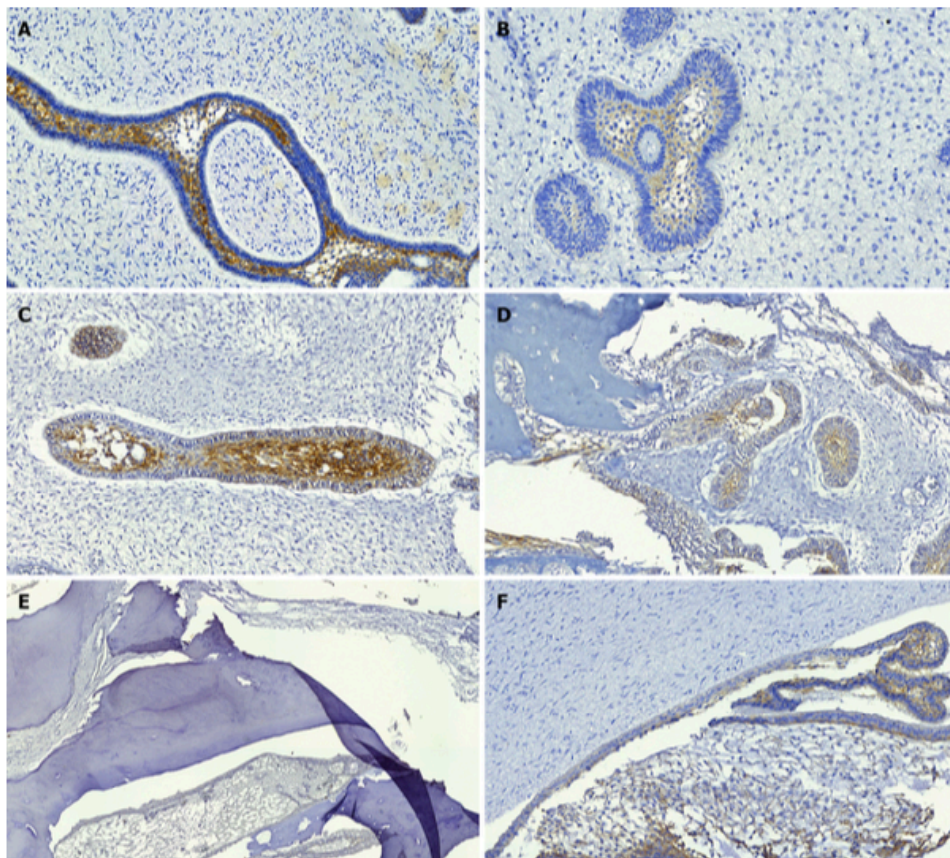


Figure 2 Immunorexpression of MOC-31 in ameloblastic fibro-dentinoma, ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, odontoma, and pericoronal cap. A: Ameloblastic fibro-dentinoma with positivity (++) in the stellate reticulum; B: Ameloblastic fibroma with positivity (+) in the stellate reticulum; C: Ameloblastic fibro-odontoma showing positivity (++) in stellate reticulum areas and ameloblasts; D: Ameloblastic fibro-odontoma where positivity is observed in epithelial islands continuous with the formation of mineralized structures; E: Odontoma, which was negative for protein immunorexpression; F: Pericoronal cap with positivity (+) in odontogenic epithelial tissues. Immunohistochemistry, MOC-31, A-F: x 20.

Ki-67 was positive in 3 AFO/AFD (50%) and 4 AF (50%) with a low degree of proliferation (0.5% to 5% of neoplastic cells) while the staining was negative in all O. Positivity was localized in the ameloblastic cells except in one AFO and one AF in which the positivity was mixed, showing both mesenchymal and odontogenic epithelial staining (Table 1, Figure 4).

Statistical analysis of the different biomarkers

Observed differences in expression depended on the sample type ($P = 0.0020$) and the patient's age ($P = 0.0100$). Additionally, it was observed that with increasing age, the expression of the biomarkers decreased (odds ratio = 0.93) (Table 2), and a greater tendency to decrease expression with age was observed for MOC-31 and Cav-1 ($P = 0.0770$). The values in Table 3 correspond to the expression of the biomarkers in all samples (AFD/AFO, AF, O, and PC), considering variables such as sex, age, and location, highlighting differences in expression between AFD/AFO and O ($P = 0.0250$) and between AF and O ($P = 0.0080$). The expression of biomarkers in AFD/AFO resembled that in AF, whereas the immunohistochemical expression in O was lower than that in AFD/AFO and AF. Finally, the expression in PC was closer to that observed in O. For Cx-43 a difference in expression was found between O and AFD/AFO ($P = 0.0022$) and between O and AF ($P = 0.0310$). Similar trends were also observed for MOC-31 when comparing O with AF ($P = 0.0310$). In contrast, Cav-1 only showed differences in expression between PC and AFD/AFO ($P = 0.0087$).

Table 2 Mixed-effects logistic regression model

Variable	LRT	gL	P value	OR
OT	15	3	0.0020 ^b	
Biomarker	17	3	< 0.0010 ^c	
Sex	0	1	0.9720	
Age	6	1	0.0110 ^a	0.93

^aP < 0.05.

^bP < 0.01.

^cP < 0.001.

Model used to compare the behavior of biomarkers according to the variable: Type of neoplasia (ameloblastic fibro-dentinoma/ameloblastic fibro-odontoma, ameloblastic fibroma, odontoma, pericorony cap); sex; and age. Only the factors affecting the expression of biomarkers are shown. OT: Odontogenic tumor; LRT: Likelihood ratio test statistic; OR: Odds ratio.

Table 3 Post-hoc multiple comparisons of immunohistochemical expression

Sample	Expression, %	95%CI	P value, compared with O	P value, compared with AF
O	12	(2.9-37.9)	-	0.008 ^b
PC	19	(3.6-57.7)	0.973	0.092
AFO/AFD	72	(38.5-91.5)	0.025 ^a	0.984
AF	78	(51.5-92.5)	0.008 ^b	-

^aP < 0.05.

^bP < 0.01.

Post-hoc multiple comparisons of expressions in ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-dentinoma/ameloblastic fibro-odontoma, odontoma, and pericorony cap, considering the variables age, sex, and location. The degree of similarity in immunohistochemical expression is described. AF: Ameloblastic fibroma; AFD: Ameloblastic fibro-dentinoma; AFO: Ameloblastic fibro-odontoma; CI: Confidence interval; O: Odontoma; PC: Pericorony cap.

DISCUSSION

AF, AFD, AFO, and O were classified by the WHO in 2005 as different entities, but starting with the 2017 classification, AFD and AFO began to be considered as entities that represent different stages of a developing odontoma[5,23]. In this study the immunohistochemical assays conducted revealed that the OT under investigation exhibited variable epithelial and mesenchymal expression for Cav-1, Cx-43, and MOC-31 with similar expression patterns among AFD, AFO, and AF as well as low proliferation rates, consistent with lesions of clinically benign behavior. Considering the expression of the biomarkers across different variables through a logistic regression model, a significant effect was found between the immunorexpression of the studied proteins and age with a trend towards lower expression with increasing age. This result was primarily observed for the expression of MOC-31 and Cav-1. These results are consistent with the pediatric nature of these tumors as well as the possible hamartomatous behavior of some cases as proposed by the WHO in 2017 that some of these lesions could exhibit a hamartomatous-like clinical behavior with a decrease in the expression of certain proteins as age progresses[5].

In this study Cav-1 was found to be expressed in most of the tumors, localized in both the epithelial and mesenchymal components with a preference for the stellate reticulum and ameloblast areas. No differences in the expression of this protein were observed in the studied samples; however, differences in expression were determined in the non-neoplastic control tissues (PC) when compared with AFD/AFO ($P = 0.0087$). This result is similar to that reported by Sánchez-Romero *et al*[22], who described the expression of Cav-1 in both benign and malignant OTs with lower expression in control gingival tissue that could be related to protumoral events. In some cancers Cav-1 expression is associated with increased cell migration, invasion, and metastasis. It can facilitate the reorganization of the cytoskeleton and enhance the motility of cancer cells[24,25]. Cav-1 can activate prosurvival signaling pathways, such as the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (known as PI3K/AKT) pathway, which may support tumor growth and survival under stress conditions [26].

Furthermore, in this study a broad, variable expression of Cav-1 was found in the OT while its expression was absent in the non-neoplastic odontogenic control tissues. However, Shi *et al*[27] demonstrated that Cav-1 is expressed during the embryonic stage of mouse dental germs at both the epithelial and mesenchymal levels during the differentiation and organization stages of the tissues, primarily in the enamel organ.

A strong expression of MOC-31 was found in the odontogenic epithelium (ameloblasts and stellate reticulum areas) of AFD, AFO, and AF with negativity in O and PC. This event could be related to the importance of cellular cohesion during the development and growth of epithelial neoplasms. Ben Rejeb *et al*[28] observed that MOC-31 was variably expressed in

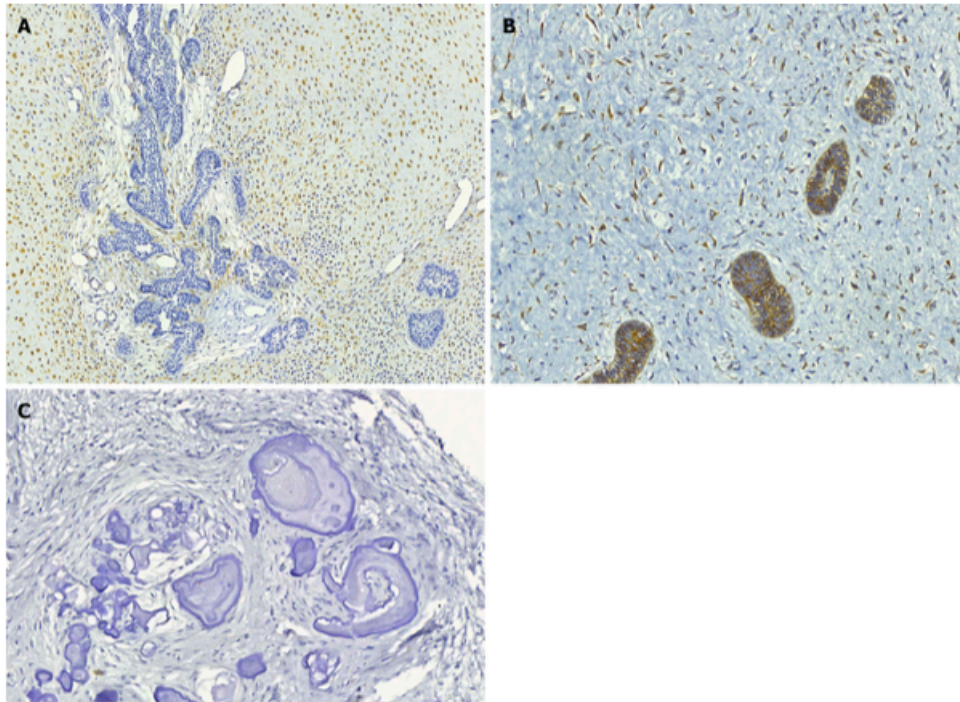


Figure 3 Immunoreexpression of connexin-43 in ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, and odontoma. A: Ameloblastic fibroma with positivity (++) in odontogenic mesenchymal cells; B: Ameloblastic fibro-odontoma with positive staining (++) in ameloblasts and odontogenic mesenchymal cells; C: Odontoma, which was negative for protein immunoreexpression. Immunohistochemistry, connexin-43, A: $\times 9$, B and C: $\times 20$.

both benign and malignant tumors in noninvasive neoplasms and thyroid carcinomas, supporting the idea that it could be a prognostic molecule. MOC-31 plays a multifaceted role in cancer, influencing cell adhesion, proliferation, invasion, immune evasion, and therapy resistance. Its expression and function make it a valuable biomarker and a potential target for therapeutic interventions in cancer treatment[29,30]. There is little information about the immunoreexpression of this protein in OTs.

Cx-43 plays a dual role in cancer, functioning as both a tumor suppressor and promoter, depending on the cellular context, cancer type, and stage. Its role in cell communication, apoptosis, metastasis, and chemoresistance makes it a significant player in cancer biology and a potential target for therapeutic interventions[31]. The results obtained for the Cx-43 protein indicate a predominantly mesenchymal expression with differences in expression between O and AFD/AFO ($P = 0.0022$) and between O and AF ($P = 0.0310$). These results could be in accordance with the suggestion that Cx-43 is a protein associated with mesenchymal cells in the studied odontogenic neoplastic tissues[7]. Previous studies have shown that Cx-43 is involved in the formation of gap junctions during dental development, participating in amelogenesis, dentinogenesis, cell differentiation, and the deposition and mineralization of the matrix[13].

In this study the expression of Cx-43 was observed in all AFD and AFO, suggesting a role for this protein in the induction of odontogenesis, facilitating the production of dentin matrix in AFD and enamel/dentin in AFO[7]. Based on the differential expression of Cx-43 in the studied OT and the similarity observed between AFD/AFO and AF, it could be suggested that AFD and AFO may be histological variants of AF that in their evolution could eventually initiate inductive processes leading to the formation of mineralized hard tissues, rather than developing as O as established in the last two classifications by the WHO[3,5].

MOC-31, caveolin, Ki-67, and Cx-43 are indirectly involved in the regulation of cell proliferation, adhesion, and intercellular communication, particularly in cancer contexts. Caveolin modulates the function of Cx-43 while Ep-CAM activates proliferative pathways associated with Ki-67. When coexpressed in tumors, these molecules may hold combined diagnostic and prognostic value.

We must remember that the main objective of this study was to determine the expression of several proteins in OT with an epithelial and mesenchymal component. The main limitation of our study was the small sample size. However, it should be noted that these are rare pathologies, and it is difficult to expand the samples. The results obtained could contribute to subsequent discussions that refer to the classification of these pathologies.

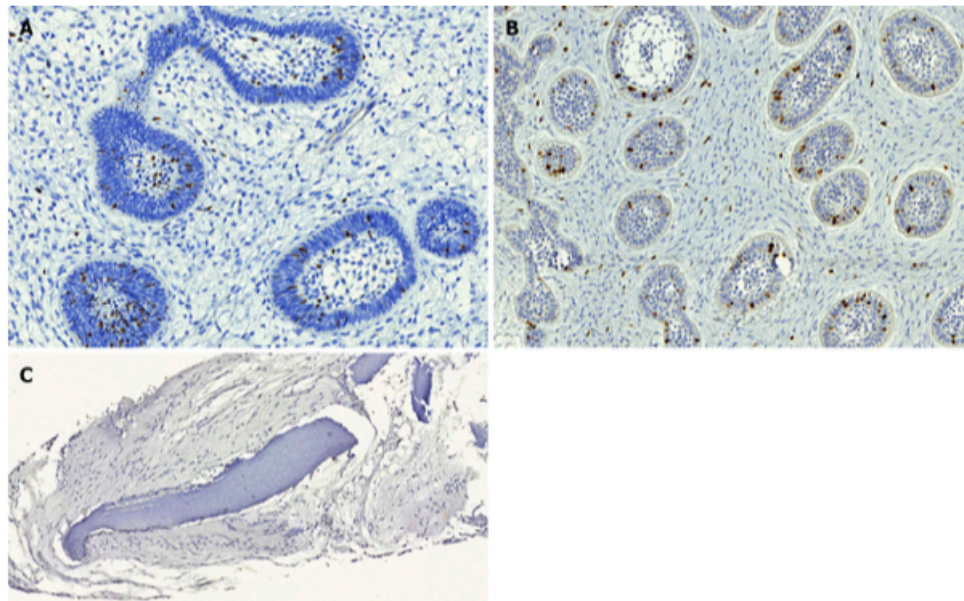


Figure 4 Immunoreactivity of Ki-67 in ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, and odontoma. A: Ameloblastic fibroma with nuclear positivity in 5% of cells with staining in ameloblastic cells; B: Ameloblastic fibro-odontoma with immunoreactivity in 4.5%, involving both ameloblasts and odontogenic mesenchymal cells; C: Odontoma, which was negative for protein immunoreactivity. Immunohistochemistry, Ki-67, A-C: $\times 20$.

Another limitation of this study lies in the absence of complementary imaging data as it is a retrospective analysis based on archived samples from the Department of Pathology. Such information would have been useful for correlating histopathological findings with radiographic characteristics, particularly in OTs in which clinical and radiological features may contribute to the differential diagnosis. Nevertheless, this limitation does not compromise the final diagnosis of the included lesions nor the primary objective of the study, which focused on the immunohistochemical characterization of the tumor components. Proper tissue preservation and the application of a standardized immunohistochemical protocol allowed for valid comparisons across cases and yielded relevant data on the expression of the selected biomarkers.

Due to the low frequency of OT, the statistical analysis performed was descriptive and based on the formulation of similarities in immunohistochemical expression and post-hoc multiple comparisons. This approach allowed the observation of expression similarities between AFD, AFO, and AF while also highlighting some differences in expression with O and PC (lower tissue immunostaining). These data are more evident when analyzing the expression of MOC-31 and Cx-43. Furthermore, the observed differences in protein expression between O and the other tissue types, coupled with the similarities in MOC-31 and Cx-43 expression among AFD, AFO, and AF, suggest that AFD and AFO share similar biological behavior and are more closely related to AF than to O. Additionally, the absence of MOC-31 and Cx-43 expression in O reinforces the distinction between these tissues and the others examined. On the other hand, in this study when analyzing the relationship between the immunoreactivity of various proteins and patient age, a decline in expression with increasing age was observed. This finding underscores the pediatric prevalence of these OTs. This fact is fully justified by the age prevalence of these odontogenic neoplasms although some cases have also been reported in older adult patients[3,5,32].

However, the methodology used only describes the immunolocalization and presence of these proteins in the studied samples. This only allows us to hypothesize possible functions of these proteins within the tumor biology of these odontogenic lesions. Further investigation with more cases is needed to support our results.

CONCLUSION

AF, AFD, and AFO exhibit similar immunophenotypic profiles for MOC-31 and Cx-43 compared with O, suggesting biological proximity among these lesions at the protein-expression level. Given the small, unbalanced cohort and the absence of molecular assays, these data should be considered exploratory and hypothesis-generating. Confirmation in larger multicenter cohorts integrating molecular profiling and clinicoradiologic correlation is required before any taxonomic change is contemplated.

REFERENCES

- 1 Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruiz-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; **84**: 672-675 [RCA] [PMID: 9431538 DOI: 10.1016/s1079-2104(97)90371-1] [FullText]
- 2 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**: e314-e323 [RCA] [PMID: 28390134 DOI: 10.4317/medoral.21859] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 3 Vered M, Wright JM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. *Head Neck Pathol* 2022; **16**: 63-75 [RCA] [PMID: 35312978 DOI: 10.1007/s12105-021-01404-7] [FullText]
- 4 Siwach P, Joy T, Tupkari J, Thakur A. Controversies in Odontogenic Tumours: Review. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2017; **17**: e268-e276 [RCA] [PMID: 29062548 DOI: 10.18295/squmj.2017.17.03.003] [FullText]
- 5 Speight PM, Takata T. New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. *Virchows Arch* 2018; **472**: 331-339 [RCA] [PMID: 28674741 DOI: 10.1007/s00428-017-2182-3] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 6 Amm HM, MacDougall M. Molecular Signaling in Benign Odontogenic Neoplasia Pathogenesis. *Curr Oral Health Rep* 2016; **3**: 82-92 [RCA] [PMID: 27547697 DOI: 10.1007/s40496-016-0085-z] [FullText]
- 7 Silveira FM, Molina-Frechero N, López-Verdín S, Umpiérrez NG, Palacio-Gastellum MG, Almeda-Ojeda O, González-González R, Martins MD, Sicco E, Pereira-Prado V, Bologna-Molina R. Connexin 43 expression in tooth germ and benign odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2023; **135**: 661-668 [RCA] [PMID: 36925450 DOI: 10.1016/j.oooo.2023.01.010] [FullText]
- 8 Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)* 1999; **77**: 699-712 [RCA] [PMID: 10606205 DOI: 10.1007/s001099900038] [FullText]
- 9 Schwab W, Harada H, Goetz W, Nowicki M, Witt M, Kasper M, Barth K. Immunocytochemical and biochemical detection of EMMPRIN in the rat tooth germ: differentiation-dependent co-expression with MMPs and co-localization with caveolin-1 in membrane rafts of dental epithelial cells. *Histochem Cell Biol* 2007; **128**: 195-203 [RCA] [PMID: 17684756 DOI: 10.1007/s00418-007-0313-7] [FullText]
- 10 Jaafari-Ashkavandi Z, Mehranmehr F, Roosta E. MCM3 and Ki67 proliferation markers in odontogenic cysts and ameloblastoma. *J Oral Biol Craniofac Res* 2019; **9**: 47-50 [RCA] [PMID: 30225187 DOI: 10.1016/j.jobcr.2018.09.003] [FullText]
- 11 Sinyuk M, Mulkearns-Hubert EE, Reizes O, Lathia J. Cancer Connectors: Connexins, Gap Junctions, and Communication. *Front Oncol* 2018; **8**: 646 [RCA] [PMID: 30622930 DOI: 10.3389/fonc.2018.00646] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 12 Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R. Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol* 2000; **151**: 931-944 [RCA] [PMID: 11076975 DOI: 10.1083/jeb.151.4.931] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 13 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; **9**: 750 [RCA] [PMID: 30013481 DOI: 10.3389/fphys.2018.00750] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 14 Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, Poser I, Ellenberg J, Hyman AA, Gerlich DW. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* 2016; **535**: 308-312 [RCA] [PMID: 27362226 DOI: 10.1038/nature18610] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 15 Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Esteban F, Bravo M. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol* 2010; **46**: 525-530 [RCA] [PMID: 20400362 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.020] [Full Text]
- 16 Cortegoso AVB, Laureano NK, Silva ADD, Danilevich CK, Magnusson AS, Visioli F, Rados PV. Cell proliferation markers at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: comparative analysis in relation to clinicopathological parameters of patients. *J Appl Oral Sci* 2017; **25**: 318-323 [RCA] [PMID: 28678951 DOI: 10.1590/1678-7757-2016-0238] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 17 Langlois S, Cowan KN, Shao Q, Cowan BJ, Laird DW. Caveolin-1 and -2 interact with connexin43 and regulate gap junctional intercellular communication in keratinocytes. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 912-928 [RCA] [PMID: 18162583 DOI: 10.1091/mbc.e07-06-0596] [FullText]
- 18 Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP. Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 2002; **41**: 5754-5764 [RCA] [PMID: 11980479 DOI: 10.1021/bi0121656] [FullText]
- 19 Kim BH, Kim CI, Park CH. Caveolin-1 and Ki-67 Expression as Prognostic Factors in Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *Korean J Urol* 2008; **49**: 99-106 [RCA] [DOI: 10.4111/kju.2008.49.2.99] [FullText]
- 20 Krigers A, Moser P, Fritsch H, Demetz M, Kerschbaumer J, Brawanski KR, Thomé C, Freyschlag CF. The relationship between connexin-43 expression and Ki67 in non-glial central nervous system tumors. *Int J Biol Markers* 2023; **38**: 46-52 [RCA] [PMID: 36726335 DOI: 10.1177/03936155221143138] [FullText]
- 21 Dias EP, Oliveira NSC, Serra-Campos AO, da Silva AKF, da Silva LE, Cunha KS. A novel evaluation method for Ki-67 immunostaining in paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 2021; **479**: 121-131 [RCA] [PMID: 33464376 DOI: 10.1007/s00428-020-03010-4] [FullText]
- 22 Sánchez-Romero C, Pereira-Prado V, Sicco E, Suarez M, Tapia-Repetto G, Carreón-Burciaga R, González-González R, Villarroel-Dorrego M, Meleti M, Molina-Frechero N, Bologna-Molina R. Expression of caveolin-1 in tooth germ, ameloblastoma and ameloblastic carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2021; **26**: e238-e245 [RCA] [PMID: 33037799 DOI: 10.4317/medoral.24151] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 23 Reichart PA, Philipsen HP, Sciubba JJ. The new classification of Head and Neck Tumours (WHO)--any changes? *Oral Oncol* 2006; **42**: 757-758 [RCA] [PMID: 16679047 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2005.10.011] [FullText]
- 24 Arpaia E, Blaser H, Quintela-Fandino M, Duncan G, Leong HS, Ablack A, Nambiar SC, Lind EF, Silvester J, Fleming CK, Rufini A, Tusche MW, Brüstle A, Ohashi PS, Lewis JD, Mak TW. The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene* 2012; **31**: 884-896 [RCA] [PMID: 21765460 DOI: 10.1038/onc.2011.288] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 25 Yang H, Guan L, Li S, Jiang Y, Xiong N, Li L, Wu C, Zeng H, Liu Y. Mechanosensitive caveolin-1 activation-induced PI3K/Akt/mTOR signaling pathway promotes breast cancer motility, invadopodia formation and metastasis in vivo. *Oncotarget* 2016; **7**: 16227-16247 [RCA] [PMID: 26919102 DOI: 10.18632/oncotarget.7583] [FullText] [Full Text(PDF)]
- 26 Matthews LC, Taggart MJ, Westwood M. Modulation of caveolin-1 expression can affect signalling through the phosphatidylinositol 3-

- kinase/Akt pathway and cellular proliferation in response to insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 2008; **149**: 5199-5208 [RCA] [PMID: 18583416 DOI: 10.1210/en.2007-1211] [FullText]
- 27 Shi L, Li L, Wang D, Li S, Chen Z, An Z. Spatiotemporal expression of caveolin-1 and EMMPRIN during mouse tooth development. *J Mol Histol* 2016; **47**: 337-344 [RCA] [PMID: 27075451 DOI: 10.1007/s10735-016-9675-2] [FullText]
 - 28 Ben Rejeb S, Beltaifa D, Ghazzi A, Bellil K, Turki S. EpCAM (MOC-31) - immunohistochemical expression in papillary thyroid carcinoma and non invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP). *Tunis Med* 2021; **99**: 1066-1071 [RCA] [PMID: 35288910] [FullText] [Full Text(PDF)]
 - 29 Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 162-171 [RCA] [PMID: 19136966 DOI: 10.1038/ncb1824] [FullText]
 - 30 Chapel DB, Schulte JJ, Husain AN, Krausz T. Application of immunohistochemistry in diagnosis and management of malignant mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res* 2020; **9**: S3-S27 [RCA] [PMID: 32206567 DOI: 10.21037/tlcr.2019.11.29] [FullText] [Full Text(PDF)]
 - 31 Bonacquisti EE, Nguyen J. Connexin 43 (Cx43) in cancer: Implications for therapeutic approaches via gap junctions. *Cancer Lett* 2019; **442**: 439-444 [RCA] [PMID: 30472182 DOI: 10.1016/j.canlet.2018.10.043] [FullText]
 - 32 Escobar E, Gómez-Valenzuela F, Peñaflor C, Ortega-Pinto A. Odontogenic tumours in a Chilean population: a retrospective study of 544 cases based on 2022 WHO classification. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2023; **28**: e596-e606 [RCA] [PMID: 37823289 DOI: 10.4317/medoral.26008] [FullText]

FOOTNOTES

Specialty type: Pathology

Country of origin: Uruguay

Author contributions: Umpiérrez NG contributed to data acquisition and analysis of data; Umpiérrez NG, Sicco E, Beovide V, and Bologna-Molina R contributed to conception and design of the study; Umpiérrez NG and Silveira FM contributed to the discussion of the results; Umpiérrez NG, Sicco E, Silveira FM, Beovide V, and Bologna-Molina R contributed to drafting the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Institutional review board statement: The study was approved by the Ethics Committee, Exp. No. 091900-000084-21, Faculty of Dentistry, University of the Republic, Uruguay.

Informed consent statement: All participants (or their legal guardians, when applicable) provided written informed consent prior to inclusion in the study in accordance with the Declaration of Helsinki and institutional ethical regulations.

Conflict-of-interest statement: All authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

Data sharing statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. All data supporting the findings of this study were derived from anonymized and de-identified samples and images collected in accordance with institutional and ethical guidelines. Due to ethical restrictions and patient confidentiality agreements, raw histopathological and molecular data are not publicly available but can be shared upon justified academic request and approval by the Ethics Committee of the Faculty of Dentistry, University of the Republic.

STROBE statement: The authors have read the STROBE Statement – checklist of items, and the manuscript was prepared and revised according to the STROBE Statement – checklist of items.

S-Editor: Liu JH

L-Editor: Filipodia

P-Editor: Zhang L

ANEXO 11 Artículo enviado para publicación a la revista *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*.

Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology
Gene expression and mutational analysis of PTCH1, SMO, BRAF, CTNNB1 and CAV1
in ameloblastic fibroma, ameloblastic fibrodentinoma, ameloblastic fibro-odontoma and
odontoma
--Manuscript Draft--

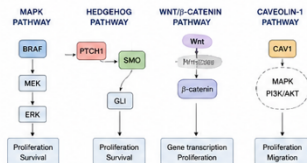
Manuscript Number:	
Full Title:	Gene expression and mutational analysis of PTCH1, SMO, BRAF, CTNNB1 and CAV1 in ameloblastic fibroma, ameloblastic fibrodentinoma, ameloblastic fibro-odontoma and odontoma
Article Type:	Research
Keywords:	Odontogenic Tumors, Gene Expression, Mutation
Corresponding Author:	Ronell Bologna Molina, DDS, Ph.D. School of Dentistry, Universidad de la Republica Montevideo, Montevideo URUGUAY
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	School of Dentistry, Universidad de la Republica
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Natalia González-Umpiérrez, DDS,MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Natalia González-Umpiérrez, DDS,MSc Estefania Sicco, BSC,PhD Veronica Beovide, DDS,PhD Ronell Bologna Molina, DDS, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	URUGUAY
Abstract:	Odontogenic tumors, such as ameloblastic fibroma, ameloblastic fibrodentinoma, ameloblastic fibro-odontoma, and odontoma, constitute a group of lesions exclusive to the maxillofacial region, whose study is of particular interest due to their diagnostic and therapeutic implications. Early detection by dentists is essential, given that some of these entities may require radical treatments. However, the lack of a standardized classification and the modifications introduced by the WHO in the most recent classifications have generated controversy, particularly regarding the nature of ameloblastic fibrodentinoma and ameloblastic fibro-odontoma. The objective of this study was to analyze gene expression and the presence of mutations in the BRAF, SMO, PTCH1, CAV1, and CTNNB1 genes in a series of odontogenic tumors. An observational, analytical, cross-sectional, and retrospective study was conducted on 20 cases from the archives of the Pathology Laboratory at the Faculty of Dentistry, UdelaR. Molecular biology techniques and statistical analyses were applied to evaluate clinicopathological associations. The results showed a higher frequency in the mandible, in young patients, and predominantly in males. At the molecular level, heterogeneous gene expression patterns were observed, with differential trends between ameloblastic fibroma, ameloblastic fibrodentinoma, and ameloblastic fibro-odontoma compared to odontomas. No previously reported mutations were detected in SMO, PTCH1, CTNNB1, or CAV1. However, the BRAF V600E mutation was identified in all pathologies except for odontomas, which presented only the wild-type variant. These findings suggest molecular differences between these tumor groups, providing evidence for a better understanding of their biological behavior.
Suggested Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

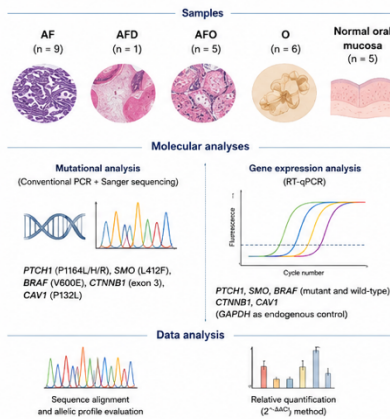
Molecular Profile of Ameloblastic Fibroma, Ameloblastic Fibrodentinoma, Ameloblastic Fibro-Odontoma, and Odontoma: Mutational and Gene Expression Analysis

BACKGROUND

- Odontogenic tumors (OTs) show overlapping histopathologic features, making accurate diagnosis and classification challenging.
- Recent WHO classifications suggest AFD and AFO represent stages in odontoma development, controversial due to distinct clinicopathologic and molecular features.
- Key signaling pathways (MAPK, Hedgehog, Wnt/ β -catenin, and caveolin-1) are implicated in tumorigenesis.
- This study analyzed mutational status and gene expression of *PTCH1*, *SMO*, *BRAF*, *CTNNB1*, and *CAV1* in AF, AFD, AFO, and odontoma (O).



METHODS



RESULTS

Mutational analysis (Sequencing)

Gene	AF (n = 7)	AFD (n = 1)	AFO (n = 2)	O (n = 1)
PTCH1	Wt	Wt	Wt	Wt
SMO	Wt	Wt	Wt	Wt
CTNNB1	Wt	Wt	Wt	Wt
CAV1	Wt	Wt	Wt	Wt
BRAF (V600E)	Mut	Mut	Mut	Wt

■ Mut: mutation detected ■ Wt: wild-type (no reported mutation detected)

Gene expression analysis (RT-qPCR)

Gene	AF (n = 9)	AFD (n = 1)	AFO (n = 3)	O (n = 1)
PTCH1	Basal	Basal	Basal	No expression
SMO	↑ mild	Basal	↑ mild / Basal	Basal
CTNNB1	↓ mild	↓ mild	↓ mild / Basal	↑ mild
CAV1	↑ mild	↑ mild	↑ mild	↓ mild
BRAF	Mut (5/9)	–	Mut (2/3)	Wt

■ ↑ mild (Overexpression) ■ ↓ mild (Underexpression) ■ Basal (Comparable to control)
 ■ No expression ■ Mut (Mutant expression) ■ Wt (Wild-type expression)

CONCLUSION

- The *BRAF* V600E mutation was detected in all AF, AFD, and AFO cases, but absent in odontomas, supporting the neoplastic nature of these lesions and distinguishing them from hamartomatous entities.
- Altered expression of Hedgehog pathway genes (*PTCH1* and *SMO*) in AF and AFO suggests different degrees of pathway involvement related to tumor behavior and tissue differentiation.
- CAV1* overexpression in AF, AFD, and AFO, and underexpression in odontomas, is consistent with its context-dependent role in tumorigenesis and cellular metabolism.
- CTNNB1* showed no activating mutations and variable expression, suggesting that the Wnt/ β -catenin pathway is not a major driver in these odontogenic tumors.



Integrated mutational and gene expression profiling provides molecular evidence to support the biological distinction between ameloblastic fibroma and its variants (AFD, AFO) and odontoma, contributing to a better understanding of their pathogenesis and classification.

CLINICAL IMPLICATION



Molecular biomarkers such as *BRAF* V600E may aid in the differential diagnosis, prognostic assessment, and future targeted therapeutic strategies for odontogenic tumors.