



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS  
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
MENCIÓN PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

**NIVELES DEL RECEPTOR ACTIVADOR DEL FACTOR NUCLEAR  $\kappa$ B,  
LIGANDO DE RANK Y OSTEOPROTEGERINA EN CASOS DE  
AMELOBLASTOMAS, TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO Y  
QUISTE DENTÍGERO**

**Andrés Alberto Gallardo Neira**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**TUTOR PRINCIPAL:  
Prof. Dra. Ana Ortega Pinto**

**TUTORES ASOCIADOS:  
Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo  
Prof. Dr. Enrico Escobar López**

**Santiago-Chile**

**2017**

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por el candidato

**Andrés Alberto Gallardo Neira**

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención Patología y Medicina Oral, en examen rendido el 14 de Junio de 2017

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

Dr. Gonzalo Alberto Rojas Alcayaga

Dr. Juan Pablo Rodriguez Vives

Dr. Juan Carlos Aguillón Gutierrez

**DEDICADO A MI PADRE QUE SIEMPRE HA ESTADO PRESENTE EN TODO  
ESTE PROCESO, CON SU VITAL APOYO EN TODO.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi esposa e hijos, que soportando tanta ausencia que involucró la dedicación a este grado académico, me apoyaron en todo momento

A mis padres, siempre presentes con su amor incondicional

A mis tutores Drs Ortega, Escobar y Vernal, fueron fundamentales para crecer académicamente, cumpliendo los objetivos de este trabajo de la mejor manera

A todos quienes pertenecen al Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que de alguna u otra forma colaboraron en este trabajo, mención especial para Montse y Coté.

A todos los familiares y amigos que me ayudaron al momento de viajar a Santiago para poder concluir con este trabajo de investigación

## INDICE

INTRODUCCION	1
MARCO TEÓRICO	6
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	49
MATERIALES Y METODO	52
ASPECTOS ÉTICOS	66
RESULTADOS	68
DISCUSION	89
CONCLUSIONES	100
SUGERENCIAS	102
RESUMEN	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXO 1	146
Acta aprobación Comité de Ética, Facultad de Odontología, Universidad de Chile	
ANEXO 2	148
Comparación de expresión relativa de rank-rankl-opg Y porcentaje de expresión de RANK-RANKL-OPG	
ANEXO 3	156
Análisis estadístico qPCR de rank-rankl-opg	

## INTRODUCCION

Los tumores odontogénicos (TO) son principalmente lesiones benignas que derivan de tejidos participantes de la odontogénesis, con una etiología en su mayoría desconocida (OMS,2005) <sup>(64)</sup>. En este grupo de tumores destacan por su agresividad y frecuencia los ameloblastomas (AM) y los tumores odontogénicos queratoquísticos (TOQ) (Ochsenius 2002, 2007) <sup>(87,89)</sup>. Se describen 4 tipos de ameloblastomas, siendo los más frecuentes: Ameloblastoma Sólido/Multiquístico (A-S/M) y el Ameloblastoma Uniquístico (A-U). Los ameloblastomas sólidos y uniquísticos son tumores odontogénicos epiteliales, del grupo de las neoplasias benignas, principalmente intraóseos, de crecimiento lento, localmente invasivo, cuyas células epiteliales pueden infiltrar tejidos y crecer entre las trabéculas óseas, con alta frecuencia de recidiva al realizar tratamientos conservadores <sup>(72,139,171)</sup>. Los tumores odontogénicos queratoquísticos son lesiones menos agresivas que los ameloblastomas, consideradas como quistes del desarrollo según la Organización Mundial de la Salud (OMS 1992) <sup>(187)</sup> y como tumor benigno por esta misma institución el año 2005 (OMS 2005) <sup>(64)</sup>. Los TOQ, al igual que los ameloblastomas, son lesiones en que prolifera epitelio de origen odontogénico dentro de los huesos maxilares, de crecimiento lento y localmente invasivo, sin embargo, la capacidad de infiltrar es menor que la de los ameloblastomas y gran parte de este epitelio odontogénico se encuentra tapizando una cavidad quística rodeada por tejido conjuntivo fibroso con múltiples lóculos que en la mayoría de los casos se continúan con la cavidad mayor (OMS, 2005)

<sup>(64)</sup>. Los tumores odontogénicos queratoquísticos presentan una tasa de recurrencia menor a los ameloblastomas, pero mayor a la mayoría de los quistes odontogénicos <sup>(67, 72, 73, 76)</sup>. Por otro lado, el quiste dentígero (QD) es una patología común en los huesos maxilares, considerado un quiste epitelial del desarrollo odontogénico (OMS 1992) <sup>(187)</sup>, que rodea la corona de un diente incluido en los huesos maxilares, de baja agresividad y mínima frecuencia de recidiva <sup>(78, 79, 83)</sup>.

A diferencias de los ameloblastomas, las lesiones como el tumor odontogénico queratoquístico y el quiste dentígero que tradicionalmente los cirujanos han considerado “quistes de los maxilares” están formados por un epitelio que reviste en forma continua una cavidad quística que puede presentar divertículos y están rodeados por una cápsula o pared formada por tejido conjuntivo fibroso que los separa del hueso circundante <sup>(63,201)</sup>. Generalmente en estas lesiones, el límite radiográfico coincide con el límite microscópico de la lesión y por este motivo un tratamiento más conservador ya sea enucleación o descompresión de la lesión se asocia con menor porcentaje de recidiva <sup>(202, 203, 204, 205)</sup>.

Las tres lesiones antes mencionadas, son exclusivas de los huesos maxilares, y requieren interactuar con el hueso adyacente para su crecimiento. Diversos estudios muestran la participación de proteínas RANK, RANKL y OPG en procesos de osteoclastogénesis en

tumores odontogénicos tales como AM y TOQ y en quistes como QD; en algunos de estos estudios se ha realizado inmunodetección de estas proteínas, obteniendo resultados diversos y controvertidos.

Autores como Tekkesin <sup>(7)</sup>, De Matos <sup>(95)</sup> y Da Silva <sup>(6)</sup> han observado similar o mayor expresión inmunohistoquímica de RANKL en AM que TOQ y QD, o mayor expresión de RANK en ameloblastomas, lo que estos autores interpretan como una mayor expresión de moléculas inductoras de osteoclastogénesis en neoplasias más agresivas. Sin embargo, autores como Iakovou <sup>(120)</sup> y Siar <sup>(121)</sup> han observado baja o mínima expresión inmunohistoquímica de RANKL en ameloblastomas. Adicionalmente Iakovou observó una mayor expresión de OPG sobre RANKL en A-S/M comparado con A-U.

Por otro lado, los estudios de expresión de RANK, RANKL y OPG a nivel de mRNA en tumores odontogénicos son escasos y se han dirigido principalmente al estudio de rankl en ameloblastomas. Kumamoto y Ooya <sup>(133)</sup> estudiaron la expresión de rankl y opg mediante PCR (RNA total) e inmunohistoquímica en ameloblastomas y en dientes en desarrollo, identificándolas tanto a nivel de mRNA como de proteínas, los que ellos consideraron como factores reguladores locales para la reabsorción ósea y la progresión y crecimiento tumoral.

Qian y Huang <sup>(54)</sup>, analizaron la expresión de RANKL en ameloblastomas tanto a nivel de mRNA como de proteína, empleando RT-PCR e inmunohistoquímica, encontrando expresión inmunohistoquímica y de mRNA de RANKL en todas las muestras; las células de ameloblastoma en cultivo fueron capaces de inducir osteoclastogénesis, por lo que concluyeron que RANKL juega un rol esencial en la osteoclastogénesis *in vitro* de AM.

Ferry y cols (110), en estudios sobre mecanismos de reabsorción ósea, observaron que RANKL fue expresado y secretado por células de ameloblastoma en ensayos *in vitro*, resultando en diferenciación de osteoclastos y formación de lagunas de reabsorción en cortes de dentina.

La evidencia científica revisada muestra muy escasos estudios sobre la expresión cuantitativa de los mRNA de rank y opg en ameloblastomas, y de rank, rankl y opg en tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero y su comparación con la expresión a nivel de proteínas.

Frente a estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo de investigación es estudiar la expresión de RANK/RANKL y OPG en los tipos de ameloblastoma que se presentan con mayor frecuencia en nuestro país: ameloblastoma sólido/multiquístico y ameloblastoma unikuístico y compararlos con su expresión en TOQs y QDs, mediante el uso de inmunohistoquímica y la reacción cuantitativa en cadena de polimerasa (RT-qPCR).

## **I. MARCO TEORICO**

### **I.1 REMODELACIÓN ÓSEA; ROL DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO RECEPTOR ACTIVADOR DEL FACTOR NUCLEAR $\kappa$ B, LIGANDO DE RANK Y OSTEOPROTEGERINA.**

Nuestro organismo pasa por periodos de daño y reparación celular, formación de nuevos tejidos y atrofia de los mismos una vez que han cumplido su función primaria y el tejido óseo no es la excepción a estos cambios, es por esto que los estudios de los mecanismos de remodelación ósea se ha convertido en un área de suma importancia en las investigaciones que buscan entender el metabolismo del tejido óseo.

La remodelación ósea involucra la acción conjunta, celularmente acoplada y molecularmente regulada entre osteoclastos y osteoblastos. Cada una de estas células presenta distintas vías de diferenciación, en las cuales la vía predominante de la diferenciación osteoclástica es la conformada por el receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK), ligando de RANK (RANKL) y osteoprotegerina (OPG). Esta vía se basa en osteoblastos que promueven la diferenciación de osteoclastos a través de la presentación de RANKL y la unión de este factor al receptor RANK presente en la membrana celular de los precursores osteoclásticos mononucleares<sup>(1, 2, 3)</sup>.

El proceso de remodelación ósea se podría resumir en cuatro etapas según Delgado-Calle <sup>(4)</sup>:

- **Activación:** Activación de osteoclastos en una región determinada del hueso a través de la atracción de precursores de osteoclastos y la inducción de su diferenciación a osteoclastos maduros mediada por la interacción RANK/RANKL.
- **Reabsorción:** Los osteoclastos se unen a la superficie ósea reabsorbiendo la matriz mediante la secreción de ácidos y proteasas de matriz. Durante esta etapa también se liberan factores de crecimiento tales como el Factor de Crecimiento Insulínico (*IGF*) y Factor de Crecimiento Tumoral  $\beta$  (*TGF- $\beta$* ), las que actúan sobre células osteoblásticas <sup>(5)</sup>. Cuando la reabsorción está por completarse, pre-osteoblastos maduran a osteoblastos, deteniendo la secreción de RANKL; en su lugar producen OPG, un receptor señuelo que bloquea la unión de RANKL a los osteoclastos <sup>(5, 6, 7)</sup>. Esta etapa finaliza con la apoptosis de los osteoclastos.
- **Proliferación:** Conjuntamente a la apoptosis osteoclástica, se producen señales responsables del reclutamiento de osteoblastos hacia las cavidades de reabsorción.
- **Formación:** Síntesis de matriz orgánica no mineralizada por parte de los osteoblastos, quienes son responsables de su posterior mineralización.

Cualquier desequilibrio en el balance reabsorción – formación, conduce a una pérdida de tejido óseo si los niveles de reabsorción sobrepasan a los de formación (osteoporosis, osteopenia, entre otros), o a un exceso del mismo, y no por ello con una mayor calidad, si es la formación ósea la que supera a la reabsorción, como lo es por ejemplo en los casos de osteopetrosis. El control de este equilibrio está regulado por diversas citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, tanto en la actividad de osteoblastos como de osteoclastos y este control puede ocurrir tanto en las etapas de diferenciación desde sus precursores inmaduros, como en cualquiera de las etapas de remodelado <sup>(8)</sup>.

En la literatura se describe que el mecanismo principal de reabsorción ósea sería la alteración del equilibrio del sistema RANK/RANKL/OPG, tras lo cual se podrían describir citoquinas específicas a tumores de desarrollo intraóseo, que pudiesen tener una participación en la estimulación y/o regulación de este proceso. En el caso de tumores odontogénicos como el ameloblastoma, Zhong <sup>(9)</sup> menciona una serie de citoquinas entre las cuales IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), promueven actividad osteolítica, además de poder estimular el crecimiento celular.

La osteopontina (OPN) con RGD (tripéptido compuesto por L-arginina, L-glicina y ácido aspártico), está asociada con la remodelación ósea, además de jugar un rol de inducción en el proceso de mineralización. Además, la OPN puede incrementar la

adhesión y la migración celular, al unirse al receptor CD44v6 de las células epiteliales del ameloblastoma, lo que favorecería la infiltración celular entre las trabéculas óseas, pudiendo relacionar las características de agresividad local con la habilidad osteolítica de un ameloblastoma. OPN también ha sido encontrada en tumor odontogénico queratoquístico donde se postula que tendrían un rol en la activación de osteoclastos, además promovería la migración, invasión y propagación de células <sup>(10)</sup>.

### **I.1.1 OSTEOPROTEGERINA (OPG)**

El primero de los componentes del complejo RANK/RANKL/OPG en ser descrito fue la osteoprotegerina (OPG) <sup>(12)</sup> o TNFRSF11B, la que fue reportada de manera simultánea por Simonet *et al* <sup>(9)</sup> y Yasuda <sup>(12)</sup>, estudiando cDNAs en intestino de rata y factores de inhibición y/o estimulación de osteoclastos respectivamente. Se conoce como el factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF), basado en su capacidad para suprimir la osteoclastogénesis *in vitro* <sup>(11,12)</sup>, demostrándose poco después de su descubrimiento su rol también en la supresión de la supervivencia, adhesión a superficies óseas y actividad de osteoclastos <sup>(16,17,18,19,20,21,22)</sup>. Este miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral se localiza en cromosoma 8q24; el mRNA de *opg* se expresa en numerosos tejidos humanos (pulmón, corazón, riñones, hígado, intestino, estómago, cerebro, glándula tiroides y médula espinal) además del tejido óseo <sup>(11,12)</sup>.

La osteoprotegerina se sintetiza inicialmente como un propéptido de 401 aminoácidos, y tras la pérdida de un fragmento de 21 aminoácidos, queda como proteína madura con 380 aminoácidos <sup>(9,10)</sup>, momento a partir del cual pierde sus dominios transmembrana y citoplasmáticos, siendo secretada como proteína soluble, a diferencia de RANK Y RANKL. El extremo C-terminal posibilita la homodimerización de la molécula. Su extremo N-terminal contiene 4 dominios ricos en cisteína (D1-D4), siendo suficientes para su unión con su ligando RANKL y para la inhibición de osteoclastos, en estudios de cultivos celulares <sup>(4,11,15)</sup>.

OPG existe como formas monoméricas y homodiméricas, según Tomoyasu, 1998 <sup>(35)</sup> ambas formas presentan una potencia similar para inhibir la osteoclastogénesis *in vitro*, pero según Schneeweis, 2005 <sup>(32)</sup>, la forma homodimérica tiene una afinidad 1000 veces mayor para RANKL que la forma monomérica, sugiriendo que el dímero de OPG, es un inhibidor de RANKL más potente que la forma monomérica <sup>(14)</sup>.

### **I.1.2 LIGANDO DE RANK (RANKL)**

El descubrimiento de RANKL se puede remontar a principios de la década de los 80, cuando Chambers <sup>(24)</sup> observó que células del linaje osteoblástico podrían estar implicadas en la función del reclutamiento y actividad de los osteoclastos <sup>(14)</sup>.

RANKL pertenece a la familia de receptor de factor de necrosis tumoral (TNFRSF11), también identificado como el factor de diferenciación de osteoclastos. En contraste con el factor estimulante de colonias de macrófagos (*M-CSF*), la expresión de RANKL por los osteoblastos es inducible <sup>(26, 27)</sup>.

Usando el receptor señuelo (OPG) como una sonda, el ligando fue aislado y clonado independientemente por dos grupos <sup>(29,30)</sup> y se denominó ODF y ligando OPG (OPGL), respectivamente. Este ligando, un nuevo miembro de la superfamilia de TNF, estimula la diferenciación de los osteoclastos, potencia la actividad de los osteoclastos maduros y prolonga la vida de los osteoclastos al inhibir la apoptosis. En presencia de concentraciones permisivas de factor estimulante de colonias de macrófagos (*M-CSF*, también denominado factor estimulador de colonias 1), el ligando es tan necesario como suficiente para la formación de osteoclastos y, por lo tanto, para resorción ósea. La

delección selectiva del ligando en ratones conduce a la osteopetrosis, huesos acortados, erupción dentaria alterada y anomalías inmunológicas<sup>(18,28, 29)</sup>.

Se encontró que el ligando era idéntico con la molécula previamente informada en la literatura de inmunología como la citoquina inducida por activación de TNF (TRANCE)<sup>(31)</sup> o activador del receptor del ligando NF-kB<sup>(33)</sup> en el que se informó que estimulaba el crecimiento de células T y la función de las células dendríticas.

RANKL es una proteína homotrimérica transmembrana tipo II que se expresa unida a la membrana celular o secretada, siendo esta última una derivación de su variante de membrana gracias a un clivaje proteolítico por ADAM (un dominio desintegrina y metaloproteasa) y metaloproteasa de matriz<sup>(26,27)</sup>.

Existen al menos tres formas de RANKL, codificadas por un solo gen que puede presentar varias posibilidades de «corte y pegado» del ARN transcrito<sup>(127)</sup>. Dos de las formas de RANKL poseen un dominio transmembrana que posiciona el carboxi-terminal biológicamente activo al dominio extracelular (es decir, una proteína transmembrana de tipo II)<sup>(14)</sup>. La isoforma 1 parece ser la más importante; tiene una secuencia que permite su anclaje a la membrana. No obstante, algunas moléculas de RANKL soluble se originan a partir del RANKL originalmente fijado a la membrana, cuando éste es degradado por algunas proteasas, como la metaloproteasa de la matriz MMP14<sup>(131)</sup>.

### **I.1.3 RECEPTOR ACTIVADOR DEL FACTOR NUCLEAR $\kappa$ B**

#### **RANK**

RANK fue descubierto por Anderson en trabajos sobre células dendríticas derivadas de médula ósea. Es una proteína transmembrana tipo I, su gen se encuentra localizado en el cromosoma 18q22.1 <sup>(33)</sup>, cuya expresión fue inicialmente detectada exclusivamente en precursores de osteoclastos, osteoclastos maduros y células dendríticas, sin embargo, así como RANKL, RANK se expresa ampliamente en distintos orígenes epiteliales: glándula mamaria, cáncer de mama y células de cáncer de próstata <sup>(13, 40, 41, 42)</sup>.

RANK humano consiste de 616 aminoácidos (aa) divididos de la siguiente manera: 383aa de dominio citoplasmático C-terminal, 184aa de dominio extracelular N-terminal, un péptido señal de 28aa y un dominio transmembrana de 21aa, que contiene cuatro pseudo repeticiones ricas en cisteína y dos sitios de N-glicosilación <sup>(33,43)</sup>.

Esta proteína pertenece a la superfamilia de receptor de necrosis tumoral (TNFRSF), es un activador central de factor de necrosis  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), controlando su transcripción y es el receptor de señalización para RANKL <sup>(7)</sup>.

Se ha demostrado que algunas mutaciones en el exón 1 de rank causan un aumento en la señalización de NF- $\kappa$ B mediada por RANK, resultando en un aumento en la función de osteoclastos y el aumento consecuente de la osteolisis <sup>(26)</sup>.

## **I.2 OSTEOCLASTOGÉNESIS, IMPORTANCIA DEL SISTEMA RANK-RANKL-OPG.**

El osteoclasto es un macrófago multinuclear tejido específico diferenciado desde células precursoras monocitos/macrófagos presentes o cerca del tejido óseo <sup>(124)</sup>. Por tanto, posiblemente la mayor parte de los precursores osteoclásticos indiferenciados se encuentran en el seno de la médula ósea hematopoyética. Sin embargo, como ocurre con otras células de estirpe hematopoyética, existen también precursores circulantes en la sangre periférica. De hecho, con los estímulos adecuados se puede inducir la diferenciación de células «monocitoides» circulantes hacia osteoclastos. Por otro lado, se han identificado precursores osteoclásticos quiescentes más diferenciados próximos a la superficie de las trabéculas óseas <sup>(128)</sup>. Estas células representan un *pool* de precursores listos para iniciar la resorción, y en consecuencia un nuevo ciclo de remodelado, en caso de que sea requerido <sup>(15)</sup>.

La expresión de M-CSF por células estromales osteoblásticas es necesaria para que las células progenitoras se diferencien en osteoclastos, pero el M-CSF por sí mismo es incapaz de completar este proceso. Este requisito para el M-CSF se descubrió observando ratones que no expresan M-CSF funcional, los cuales tienen osteopetrosis porque carecen de osteoclastos <sup>(154)</sup>. El término de la diferenciación de precursores osteoclásticos (OCPs) requiere la expresión de RANKL por las células del estroma osteoblástica y de RANK por OCPs <sup>(3)</sup>.

Los recientes avances en biología ósea han identificado moléculas reguladoras del remodelado óseo, proceso iniciado por la resorción osteoclástica, que erosiona una laguna de reabsorción, cuya profundidad varía entre 60  $\mu\text{m}$  en individuos jóvenes y 40  $\mu\text{m}$  en individuos mayores <sup>(103)</sup>, cruciales para la formación, diferenciación y actividad de los osteoclastos. Para reabsorber el hueso con eficacia, los osteoclastos deben adherirse firmemente a la superficie ósea usando podosomas especializados ricos en actina. Por medio de estos podosomas, forman sellos estrechos con la matriz ósea subyacente en extensiones aproximadamente circulares de su citoplasma y dentro de estas zonas selladas forman membranas de frontera rizadas. Este plegamiento de la membrana citoplasmática aumenta el área de la superficie celular para la secreción de la enzima proteolítica, catepsina K y ácido clorhídrico (HCl) sobre la superficie ósea <sup>(157)</sup>. Mediante este mecanismo de sellado y secreción, degradan simultáneamente la matriz y

disuelven el mineral de hueso, mientras que protegen las células vecinas de los efectos dañinos del HCl. RANKL y beta integrina median la señalización de la matriz ósea para activar osteoclastos <sup>(158)</sup>. Los precursores de osteoclastos se fusionan entre sí y se vuelven multinucleados bajo la influencia de RANKL. Esta fusión requiere expresión por OCP de DC-STAMP <sup>(159)</sup> y de Atp6v0d2, una subunidad de v-ATPasa, un componente del complejo de bomba de protones H<sup>+</sup> + ATP6i de tipo V que secreta H<sup>+</sup> de los osteoclastos <sup>(155)</sup>. RANKL también induce expresión de fosfatasa ácida resistente a tartrato y catepsina K a través de NFATc1 <sup>(156)</sup>.

Entre estas moléculas reguladoras está el TNF, una súper familia compuesta por 19 ligandos y 29 receptores cuya función principal es estimular la osteoclastogénesis <sup>(122)</sup>. Todos los miembros de esta súper-familia exhiben actividad proinflamatoria mediante la activación del factor nuclear transcripcional NF-κB (RANK). RANK está presente en la superficie de los precursores de osteoclastos y es activado por RANKL (factor nuclear NF-κB ligando), un miembro de la familia TNF, que es crucial para la formación de osteoclastos <sup>(14)</sup>. La osteoprotegerina (OPG) es una glicoproteína soluble capaz de mediar la remodelación ósea, ya que se une al receptor RANKL e interrumpe las interacciones RANKL / RANK expresadas por tejido óseo (osteoblastos y células mesenquimales), células inmunes (células T y B) y vasos sanguíneos (células del músculo liso y endotelio vascular) <sup>(14)</sup>. Se ha observado un desequilibrio en estos

factores en la osteoporosis, osteopetrosis, artritis reumatoide, enfermedades periodontales y la erupción dental alterada <sup>(124,125)</sup>.

Cuando RANKL, interacciona con su receptor RANK, se activan diferentes vías de señalización intracelular; por lo menos cinco cascadas de señalización distintas mediadas por quinasas son inducidas durante la osteoclastogénesis y la activación-inhibidor de la quinasas NF- $\kappa$ B (IKK), quinasas N-terminal c-Jun (JNK), p38, quinasas reguladas por señal extracelular (ERK) y vía Src. El paso preliminar clave en la señalización RANK es la unión de factores citoplásmicos asociados a TNFR, o TRAF, a dominios específicos dentro del dominio citoplásmico de RANK <sup>(124)</sup>. Estas proteínas son de vital importancia; tal es así que los modelos murinos *knock out* para TRAF6, en los que se bloquea la expresión de este gen, desarrollan osteopetrosis al carecer de osteoclastos <sup>(129)</sup>. Las TRAF inician la cascada de señales, a través de la activación de varias vías, incluyendo NF- $\kappa$ B, JNK y Src. La vía NF- $\kappa$ B, quizá la más importante de las tres, implica la traslocación del factor de transcripción NF $\kappa$ B al núcleo, liberándolo de los complejos IKK que lo retiene en el citoplasma, donde es inactivo <sup>(14,130)</sup>. TRAF6 actúa como un adaptador clave para ensamblar proteínas de señalización que dirigen la expresión génica específica de los osteoclastos conduciendo a la diferenciación y activación. Las dos vías más estudiadas son la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y activador de la proteína-1 (AP-1), cuyas actividades se induce rápidamente

después de la unión del ligando. La mutagénesis dirigida del componente p50 / p52 de NF- $\kappa$ B, así como el componente cFos de AP-1, da como resultado una osteopetrosis debido a un bloqueo en la osteoclastogénesis. La activación de estos factores de transcripción puede ser inducida por cascadas de señalización mediada por proteínas quinasas, incluyendo IKK1 / 2 (NF- $\kappa$ B) y JNK1 (AP-1) <sup>(124)</sup>. A continuación de TRAF6, se ha demostrado que la señalización RANK en OCs activa JNK1 <sup>(144)</sup>, Akt / PKB <sup>(143)</sup>, p44 / 42 ERK <sup>(143)</sup>, p38 MAPK <sup>(145)</sup> y la vía canónica NF- $\kappa$ B <sup>(142)</sup>.

Por otro lado, la estimulación de la vía JNK promueve la formación y activación del complejo AP-1, formado por c-Fos y c-Jun. De forma conjunta, AP-1 y NF- $\kappa$ B son capaces de inducir la expresión del factor de transcripción NFATc1. Al igual que ocurre con el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, NFATc1 debe trasladarse al núcleo para llevar a cabo su función. Para ello es necesario activar la vía de Src. A través de la estimulación de esta vía se consigue un aumento de los niveles intracelulares de calcio. El aumento del calcio provoca la activación de la calcineurina, que cataliza la eliminación de un grupo fosfato de NFATc1. Esta defosforilación es la que promueve finalmente la traslocación de este factor al núcleo. Allí NFATc1 induce la expresión de diversos genes implicados en la osteoclastogénesis <sup>(14,130)</sup>.

La activación mediada por la vía RANKL-RANK y la inducción de c-fos, NFATc1 / NFAT2, vías NF-kB canónica y no canónica durante el desarrollo osteoclasto (OC) es necesaria para la activación de genes específicos en OC, incluyendo ácido tartárico resistente (trap), catepsina-k, receptor de calcitonina, así como c-myc, para promover la proliferación OC <sup>(141)</sup>. La señalización de RANKL-RANK también juega un papel crucial en la función de resorción ósea de OCs maduros, que después de la unión de OCs a la superficie ósea mediada por Vb3, conduce a la activación de vías dependientes de Src, incluyendo Syk, a través de la formación de complejos implicando RANK, SIp -76, Vav3 y Rac. La activación de estas vías y los reordenamientos citoesqueléticos promueven la formación de bordes ondulados a través de fusiones entre vesículas secretorias lisosómicas y la membrana citoplasmática <sup>(141)</sup>.

La activación de la vía c-src mediada por RANK se vincula como un requisito crítico para el desarrollo normal de OC <sup>(143, 152, 146, 147)</sup>. Los estudios de la diferenciación de OC también han identificado una vía coestimuladora fundamental para la señalización de RANK que involucra ITAM (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*) que contiene receptores DNAX, proteína de activación de 12 kDa (DAP12) y la subunidad g de receptor Fc <sup>(148)</sup>. Esta vía coestimuladora es necesaria para la osteoclastogénesis mediada por RANK y para la cascada de reacciones a través de la proteína quinasa Syk <sup>(149, 150)</sup>, que activa la fosfolipasa Cg (PLCg) y las quinasas BTK y Tec <sup>(151)</sup>,

conduciendo eventualmente a la activación mediada por calcio de NFATc1 / NFAT2  
(148).

Varios factores humorales que promueven la resorción de hueso actúan, al menos en parte, incrementando la expresión de RANKL. Es el caso de la parathormona, la 1,25-dihidroxitamina D o algunas citoquinas, como la IL-1, IL-6, IL-11<sup>(131, 141)</sup>. Además de inducir la diferenciación de los precursores, RANKL puede potenciar la actividad de los osteoclastos maduros e inhibir su apoptosis. RANKL puede tener también un efecto quimiotáctico indirecto sobre los precursores. La esfingosina 1-fosfato o S1P es un fosfolípido que modula la permeabilidad capilar y ejerce efectos quimiotácticos sobre diversos tipos de células. El S1P se encuentra en la sangre en concentración relativamente elevada y parece provenir esencialmente de las plaquetas y de los hematíes. En modelos experimentales murinos se ha demostrado que el S1P es también quimiotáctico sobre los precursores osteoclásticos. Por otro lado, el RANKL reduce la expresión de los receptores de membrana del S1P. En consecuencia, se ha elaborado una teoría que postula que en condiciones normales los precursores circulantes de los osteoclastos que llegan al microambiente óseo tienden a pasar de nuevo a la circulación en función del efecto quimiotáctico de S1P. Sin embargo, cuando aumenta la producción de RANKL en una determinada zona del hueso, la disminución de la expresión de los receptores de S1P hace que ese efecto quimiotáctico sea menos intenso y que los

precursores osteoclásticos permanezcan en el foco, siendo así posible su ulterior diferenciación bajo el estímulo del propio RANKL y de otros factores pro-osteoclastogénicos <sup>(15)</sup>.

Curiosamente, además de RANKL los osteoblastos producen OPG, que es un inhibidor del RANKL. En efecto OPG es una proteína soluble que guarda una alta similitud estructural con el RANK. En consecuencia, actúa como señuelo, se fija al RANKL e impide la interacción de éste con su receptor RANK. Recientemente, se ha sugerido que OPG puede regular el tráfico intracelular de RANKL. Según esta hipótesis, cuando hay abundante OPG hace que la mayor parte del RANKL sintetizado se mantenga en el interior de vesículas intracelulares y, en consecuencia, inactivo. Por el contrario, en ausencia de OPG, RANKL se localizaría preferentemente en la membrana, donde es capaz de interactuar con los precursores osteoclásticos <sup>(136)</sup>.

### **I.3 LESIONES DE ORIGEN ODONTOGÉNICO**

Las lesiones de origen odontogénico corresponden a un grupo heterogéneo de lesiones, tanto en su naturaleza histológica como en su comportamiento clínico; que se desarrollan en los huesos maxilares a partir de tejidos epiteliales, ectomesenquimáticos o ambos, los cuales participan del órgano formador del diente. Entre los tumores odontogénicos (TO) encontramos verdaderas neoplasias, la mayoría de tipo benignas y con menor frecuencia neoplasias malignas; otras en cambio pueden representar malformaciones tumorales tipo hamartomas <sup>(63, 64)</sup>.

Se conoce que las fuentes potenciales para el desarrollo de tumores odontogénicos es variado, los que incluyen <sup>(98)</sup>:

1. Lámina dental prefuncional (epitelio odontogénico con la habilidad de desarrollo en un diente), el que es más abundante a distal de terceros molares inferiores.
2. Lámina dental postfuncional, concepto que reúne a los remanentes epiteliales tales como restos epiteliales de Serré, localizados en encía; restos epiteliales de Malassez en el ligamento periodontal y el epitelio

reducido del esmalte, el cual cubre la superficie del diente antes de su erupción.

3. Capa basal del epitelio gingival
4. Papila dental, origen de la pulpa dentaria, el que tiene el potencial de ser inducida a producir odontoblastos y sintetizar dentina y/o material dentinoide
5. Folículo dental
6. Ligamento periodontal, el cual tiene el potencial de inducir la producción de material mineralizado fibroso y cemento-óseo.

La OMS ha clasificado a estos tumores en benignos y malignos; y dentro del grupo de tumores benignos incluye tres grandes grupos, según el origen de los grupos celulares que forman la lesión <sup>(64)</sup>:

- Tumores de epitelio odontogénico: se componen por proliferación de epitelio odontogénico sin participación de ectomesénquima odontogénico. Se pueden distinguir una serie de tumores, dentro de los cuales los ameloblastomas y los TOQ se encuentran entre los más agresivos y frecuentes.

- Tumores de ectomesénquima odontogénico: la lesión está formada por proliferación del componente mesenquimático.
- Tumores mixtos: ambos componentes forman a las lesiones o tumores

Clasificados por frecuencia, se presentan tres entidades como los tumores odontogénicos más comunes según la clasificación de la OMS del año 2005 <sup>(64)</sup>:

- Odontoma: compuesto y complejo.
- Ameloblastomas: Siendo el más común el ameloblastoma sólido/multiquístico, en segundo lugar, por frecuencia el ameloblastoma unikuístico y en tercer y cuarto lugar el ameloblastoma periférico y el ameloblastoma desmoplástico respectivamente.
- Tumor Odontogénico Queratoquístico, a partir de su incorporación a los tumores odontogénicos según la clasificación de la OMS del año 2005, se encuentra entre los más frecuentes.

La etiología de la mayoría de los TO permanece desconocida, sin embargo, se han descrito mutaciones del gen *ptch* en los tumores odontogénicos queratoquísticos <sup>(10,47,49,50)</sup> y de  $\beta$ -catenina en el tumor odontogénico quístico calcificante <sup>(45,51,52)</sup>.

La falta de marcadores específicos para confirmar el origen odontogénico de todas las lesiones incluidas en la actual clasificación de la OMS sobre tumores odontogénicos, hace que el diagnóstico se base principalmente en consideraciones anatómicas, relación dental o en similitudes histomorfológicas de algunos tumores con las estructuras odontogénicas mencionadas anteriormente <sup>(98)</sup>.

### **I.3.1 AMELOBLASTOMA**

El ameloblastoma (AM), es un tumor odontogénico de origen epitelial que posee un potencial de crecimiento lento e ilimitado, con un comportamiento agresivo local, alta tasa de recurrencia y raramente metastásico <sup>(62)</sup>, normalmente asintomático hasta que el aumento de volumen se hace notorio, pudiendo llegar hasta la perforación de la cortical ósea e invasión de tejidos vecinos <sup>(63,64)</sup>.

Aproximadamente un 94% de los ameloblastomas son de desarrollo intraóseo y presentan una imagen radiográfica multilocular o unilocular asociada a reabsorción ósea y dentaria, por lo que para su crecimiento requiere interaccionar con los mecanismos de remodelación ósea, fenómenos escasamente estudiados en relación a esta patología <sup>(62)</sup>.

## **Etiología**

Todos los cambios celulares que pueden sufrir los restos de epitelio odontogénico, incluyendo proliferación, diferenciación, senescencia, tumorigénesis, etc., se producen a través de la activación o inactivación de vías de señalización molecular relacionadas. La sobreexpresión o subexpresión de importantes moléculas de señalización puede desempeñar un papel importante en la tumorigénesis de los ameloblastomas <sup>(53, 62)</sup>. Estas vías, se desconocían en su mayoría hasta el 2014, cuando se relacionó de manera bastante importante la activación de la vía de señalización mediada por la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) <sup>(191)</sup>. Varios estudios han demostrado la activación de componentes de la vía MAPK en la línea celular de ameloblastoma (AM-1), en varias circunstancias, las que incluyen estimulación con TNF $\alpha$  <sup>(193)</sup> y factores de crecimiento fibroblástico 7 y 10 <sup>(192)</sup>. La vía de señalización Ras/MAPK se activa fuera de la célula, controlando procesos celulares tales como proliferación y diferenciación por medio de cascadas de fosforilación. El receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2) es uno de los varios receptores que activan RAS <sup>(190)</sup>. Una vez activado, entre otras proteínas, se activa braf, la cual se puede asociar a una serie de neoplasias malignas, que incluyen melanoma, leucemia de células pilosas y cáncer colorectal. Más de 40 diferentes mutaciones se han identificado en el oncogen humano braf; el 90% de estas mutaciones considera un cambio de bases de adenina por timina en

el par de base posición 1,799. Esta mutación misense, localizada en el exón 15, resulta en un cambio en el residuo 600 que sustituye glutamina por valina (V600E) <sup>(190, 195)</sup>. Además, es posible la activación de la cascada de señales, en ausencia de cualquier estímulo extracelular, lo que permitiría a la célula neoplásica ser autosuficiente en señales de crecimiento con la vía de señales que constituye BRAF <sup>(195)</sup>.

La mutación brafV600E ocurre en células somáticas y ha demostrado jugar un rol importante en la patogénesis del ameloblastoma <sup>(175, 189, 190)</sup>, no siendo registrada en casos de tumor odontogénico queratoquístico o en quistes dentígeros <sup>(189)</sup>. Esta mutación se ha mostrado exclusiva para tumores de origen ameloblástico, sugiriendo un potencial rol como señal diagnóstica <sup>(191)</sup>.

En la investigación de Brown 2014 <sup>(190)</sup>, fueron evaluados un total de 84 ameloblastomas, a través de PCR alelo específica brafV600E, inmunohistouímica VE1, *panel Ion AmpliSeq Cancer Hotspot* y secuenciación Sanger. La eficacia de un inhibidor BRAF se evaluó en una línea celular derivada de ameloblastoma (AM-1) <sup>(188, 190)</sup>.

Las mutaciones somáticas, activadoras y mutuamente exclusivas ras-braf y fgfr2 fueron identificadas en el 88% de los casos; brafV600E fue la mutación más común, encontrada en un 62% de los ameloblastomas. Esta mutación se asoció con una edad más temprana

de aparición, mientras que los casos de tipo salvaje BRAF se presentaron con mayor frecuencia en el maxilar y mostraron recurrencias más tempranas. Hubo un 100% de concordancia en lo observado entre la inmunohistoquímica y la detección molecular de la mutación de braf V600E <sup>(190)</sup>.

En el estudio de Diniz 2015 <sup>(194)</sup>, reportó mutaciones en BRAF en un 82% de casos de ameloblastomas. La incidencia acumulada de 4 investigaciones es de 62,7% (96/153) <sup>(175, 188, 190, 194)</sup>.

El perfil de mutación de los ameloblastomas se correlaciona con histopatología, localización, edad al diagnóstico y pronóstico <sup>(191)</sup>. Sweeney et al <sup>(188)</sup>, postularon que los tumores con BRAF y SMO mutados representan dos subtipos moleculares distintos con ameloblastoma con diferentes características clínico-patológicas, incluyendo localización, patrón histológico (folicular versus plexiforme) y posiblemente pronóstico <sup>(191)</sup>.

Entre otros factores que se relacionan con la patogénesis del ameloblastoma se encuentran genes que codifican factores de transcripción, factores de crecimiento y sus receptores y constituyentes de matriz extracelular tales como, en un orden decreciente de sobreexpresión: *c-fos*, receptor de la superfamilia de factor de necrosis tumoral miembro

1A (*TNFRSF1A*) y metaloproteinasas de matriz (*MMPs*), como por ejemplo MMP-2, MMP-9 y MMP-14 <sup>(9,53,54,55,56)</sup>. Por ejemplo la sobreexpresión de MMP-9, en los ameloblastomas posiblemente es modulada por la no metilación de su gen pudiendo influir en las características de agresividad y alta recurrencia del ameloblastoma <sup>(57)</sup>. MMP-9 juega un importante rol en la angiogénesis, así como en la invasión tumoral y metástasis, principalmente por su capacidad de clivar el colágeno IV presente en la membrana basal <sup>(58)</sup>.

RANK regula la expresión de un gran número de citoquinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , interleuquina-1 e interleuquina-6, como también metaloproteinasas (*MMPs*) <sup>(14)</sup>. Las *MMPs* son proteasas que causan cambios estructurales y funcionales en componentes de la matriz extracelular. Bajo condiciones fisiológicas, *MMPs* son pobremente expresadas en los tejidos, lo que cambia en condiciones patológicas, resultado de un desbalance entre la actividad de *MMPs* y sus inhibidores <sup>(60)</sup>.

El hecho de que RANKL y MMP-9 se expresan en ameloblastomas sugiere que las células del ameloblastoma tienen el potencial de inducir osteoclastogénesis, resultando en una rápida destrucción ósea <sup>(7, 54, 62)</sup>.

## **Clasificación**

La clasificación de la OMS del año 2005 <sup>(64)</sup> describe cuatro tipos de ameloblastomas: Ameloblastoma sólido/multiquístico (A-S/M), Uniquístico (A-U), Extraóseo o tipo Periférico (A-E/P) y Desmoplástico (A-D), siendo los más frecuentes los dos primeros.

### **Ameloblastoma Sólido/Multiquístico**

Aunque es infrecuente, el A-S/M es el segundo tumor odontogénico más común en América, no exhibiendo variaciones por sexo, ocurriendo en un amplio rango de edad, preferentemente entre los 30 a 60 años <sup>(64)</sup>. Ocurre preferentemente en los huesos maxilares y raramente en las cavidades sinusales. Aproximadamente un 80% ocurre en la mandíbula, con una marcada predilección por la región posterior <sup>(64)</sup>.

El diagnóstico definitivo de un A-S/M no puede hacerse radiográficamente debido a su imagen similar con otros tumores odontogénicos, por ejemplo, tumor odontogénico queratoquístico o mixomas, por lo que se requiere el uso de estudios histopatológicos complementado con tomografía computarizada o resonancia magnética <sup>(64)</sup>.

### **Características histológicas**

Existen dos patrones histopatológicos básicos en que se presenta el A-S/M y estos con un patrón celular bastante característico, patrón folicular y plexiforme, ambos sin una relevancia clínica <sup>(64)</sup>. Las figuras mitóticas son escasas en la mayoría de los ameloblastomas, de acuerdo con su lenta tasa de crecimiento <sup>(67)</sup>.

El tipo folicular puede ser clasificado en 4 subtipos: células fusiformes, acantomatoso, granular y de células basales. El tipo folicular consiste en islas de epitelio odontogénico en un estroma fibroso. Las células basales tienen forma columnar, con distribución en empalizada, núcleo de polaridad inversa, hipercromáticas, citoplasma generalmente se encuentra vacuolado. Las células centrales pueden disponerse libremente asemejando el retículo estrellado <sup>(61,62,64)</sup>; las células centrales pueden sufrir necrosis, formando microquistes <sup>(62)</sup>. El tipo folicular puede crecer formando nódulos multiquísticos, resultando en una masa tumoral multilocular <sup>(66)</sup>.

El tipo plexiforme contiene epitelio que prolifera en un patrón de “red de pesca”. Se presentan capas celulares entre el epitelio proliferativo con uniones desmosómicas bien definidas, simulando capas de células fusadas. Los ameloblastomas plexiformes con

formación de quistes múltiples son tumores odontogénicos raros y benignos que pueden alcanzar proporciones grotescas, afectando a una gran región de la mandíbula <sup>(62)</sup>.

### **Ameloblastoma uniuístico**

El A-U en las clasificaciones antiguas de la OMS se consideraba una variante, desde el 2005 la OMS lo considera un tipo distinto de ameloblastoma que presenta una cavidad patológica revestida por un epitelio neoplásico. La edad promedio de aparición está entre los 16 y los 35 años, lo cual es significativamente inferior al A-S/M que en varias series es de 45 años <sup>(64)</sup>. El A-U es una lesión de crecimiento expansivo, que puede destruir una porción significativa de la mandíbula. Normalmente no se comporta como A-S/M y no infiltra el hueso circundante <sup>(64)</sup>.

Radiográficamente se presenta como una radiolucencia unilocular bien corticalizada, a menudo pericoronar de un diente incluido, puede ocurrir la reabsorción radicular. Así como con A-S/M, el diagnóstico definitivo debe realizarse mediante estudios histopatológicos, ya que con frecuencia el diagnóstico clínico radiográfico es de un quiste dentígero <sup>(64)</sup>. En este examen histológico se observa una cavidad quística, recubierta por el típico epitelio ameloblástico, con o sin crecimiento tumoral luminal y/o mural.

En la presentación luminal, puede presentarse un crecimiento intraluminal, el cual usualmente exhibe un patrón epitelial plexiforme, no habiendo infiltración hacia la pared fibrosa <sup>(62,64)</sup>.

En la variante mural, la pared quística es infiltrada por el epitelio ameloblástico, pudiendo presentar un patrón epitelial folicular o plexiforme. A veces ambos patrones se pueden presentar en la misma lesión <sup>(64)</sup>.

Respecto al tratamiento, la variante luminal no infiltra en el hueso adyacente, por lo que no requiere de otro tratamiento que la enucleación completa de la lesión <sup>(62,64)</sup>.

### **Tratamiento y pronóstico**

El tratamiento por elección es la remoción quirúrgica con un amplio margen de seguridad, con una excepción en los casos de ameloblastoma unicístico, en el que la enucleación de encontraría justificada <sup>(61)</sup>. Los márgenes adecuados pueden confirmarse histológicamente en el postoperatorio o radiológicamente con imágenes intraoperatorias. El seguimiento a largo plazo es crítico ya que las recurrencias pueden ocurrir hasta 45 años después de la resección inicial <sup>(70)</sup>. Las lesiones que se localizan en la región posterior de la maxila, son las que tiene el peor pronóstico <sup>(64)</sup>.

### **I.3.2 TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO (TOQ)**

El TOQ se clasifica como un tumor de origen odontogénico, intraóseo, uni o multiquístico, con un característico epitelio estratificado paraqueratinizado; con un potencial agresivo. Puede ser solitario o múltiple, en tal caso puede ser uno de los signos del síndrome nevoide basocelular (SNBC) <sup>(63,64,73,74,75)</sup>.

El TOQ se puede diagnosticar en un amplio rango de edad, pero la mayoría de los casos (60%) son diagnosticados en pacientes entre los 10 y los 40 años. Preferentemente se presenta en mandíbula con alrededor del 60% al 80% de los casos, con una marcada tendencia a localizarse en el ángulo mandibular, extendiéndose anterior y superiormente <sup>(64)</sup>. Puede ser asintomático o provocar dolor, tumefacción y drenaje, pudiendo penetrar la cortical ósea e invadir estructuras adyacentes <sup>(63,64)</sup>, presentando una alta tasa de recurrencia cercana al 29% <sup>(74)</sup>.

La imagen radiográfica de TOQ, puede mostrarse como una pequeña radiolucidez unilocular, redonda u ovoidea, o ser una amplia lesión con márgenes festoneados. La imagen radiolúcida tiene tendencia a ser bien definida con distintos márgenes escleróticos o difusos; los dientes adyacentes pueden estar desplazados, habiendo siendo rara la reabsorción radicular <sup>(64)</sup>.

El diagnóstico definitivo se basa en sus características histopatológicas <sup>(63)</sup>. EL TOQ está revestido por un epitelio estratificado plano paraqueratinizado regular, por lo general con un espesor de 5- 8 capas de células y sin crestas epiteliales. Presenta una capa basal bien definida de células columnares o cuboideas en empalizada. Los núcleos de las células columnares tienden a orientarse alejadas de la membrana basal y a presentar una intensa basofilia. La capa de paraqueratina usualmente presenta una superficie corrugada, la cual se descama en la mayoría de las cavidades <sup>(64)</sup>. Algunas veces las células del estrato basal invaden la región adyacente de tejido conectivo, con una formación consecuente de microquistes satélites que, conectados a vacuolas relativamente frágiles y delgadas, se considera la principal causa de la alta tasa de recurrencia posquirúrgica (10-60%), la que aumenta en pacientes con lesiones múltiples <sup>(76)</sup>. En presencia de un intenso infiltrado inflamatorio, las células y la conformación estructural de estas en el epitelio tumoral, pierden las características usuales <sup>(64)</sup>.

Su crecimiento se da principalmente en sentido anteroposterior, pudiendo alcanzar un tamaño notable sin deformar significativamente la estructura ósea. Las lesiones múltiples de este tipo son más raras, pero no excepcionales. La tendencia particular al crecimiento rápido se debe a una mayor actividad de las células epiteliales que revisten el quiste, las que estimulan la actividad osteolítica de las sustancias de prostaglandina en la población celular del revestimiento del quiste y una mayor acumulación de restos

hiperqueratósicos en el lumen del quiste, lo que contribuye a un aumento en la presión hidrostática <sup>(76)</sup>.

Según Madras <sup>(74)</sup>, para minimizar la invasividad y la recurrencia, la opción de tratamiento más efectiva parece ser la enucleación del TOQ y la posterior aplicación de la solución de Carnoy. Alternativamente, la marsupialización seguida de cistectomía es igualmente eficaz, ya que este tratamiento no da como resultado una tasa de recurrencia significativamente mayor que la enucleación más la solución de Carnoy <sup>(74)</sup>.

En la investigación de Heikinheimo <sup>(59)</sup> se señala que estudios en casos de TOQ, fueron detectadas supresiones en genes relacionados con genes de caderina (cdh5 y cdh18); de esta forma se brindaría una explicación al frecuente desprendimiento observado en el epitelio de revestimiento quístico, una característica típica de esta lesión.

Existe una asociación entre mutaciones del gen ptch y el desarrollo de TOQs, pero también se ha descrito pérdidas de alelos en algunos genes que contribuyen a la explicación de las características de agresividad del TOQ <sup>(44,46,48,171)</sup>:

- cdkn2a: codificante de la proteína inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina o p16,
- tp53: codificante de la proteína P53

- *mcc*: codificante de la enzima metilcrotonil-CoA carboxilasa,
- *tslc1*: gen supresor de tumor que codifica un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Tiene una alta homología de su dominio extracelular con otras moléculas de adhesión celular de la superfamilia de IG (IgCAMs), plantea la posibilidad de que *tslc1* participa en la interacción célula-célula <sup>(51)</sup>.
- *Itas2*
- *fhit*: *Fragile Histidine Triad*, corresponde a un gen supresor de tumores

### 1.3.3 QUISTE DENTÍGERO

Los quistes dentígeros (QDs) se definen como un quiste que se origina por la separación del folículo que rodea a la corona completamente formada de un diente definitivo, incluido, unido a su cuello, desarrollándose por la acumulación de líquido en el espacio folicular <sup>(63)</sup>, raramente se desarrolla en un diente temporal <sup>(90)</sup>. Es importante destacar que esta definición debe ser estricta en la evaluación radiográfica, ya que lesiones radiolúcidas adyacentes a dientes incluidos, pueden sub estimar el diagnóstico de QD, al no considerar un posible diagnóstico de ameloblastoma o TOQ <sup>(86)</sup>.

Según Ledesma <sup>(85)</sup> es el segundo quiste odontogénico, con una frecuencia de un 35.5%, por su lado, Shear <sup>(86)</sup> menciona una frecuencia de 17.1%, la frecuencia relativa de QD

en Chile, corresponde a 18,5%, también en un segundo lugar de mayor frecuencia, según Ochsenius <sup>(87)</sup>, teniendo una mayor prevalencia en el sexo masculino <sup>(85,86,87)</sup>.

Los dientes involucrados con mayor frecuencia son: terceros molares (28,9%), caninos maxilares (20,1%), en el tercer lugar segundos premolares inferiores con un 12,1% <sup>(87)</sup>. En las primeras etapas suelen ser asintomáticos, pudiendo llegar a expandir las corticales causando asimetría facial, con crecimiento lento, expansivo y no infiltrante <sup>(7, 63, 78, 79)</sup>.

De inicio asintomático, cuando logran ser palpables, suelen presentar una cápsula depresible (signo de Dupuytren). Cuando afectan al seno maxilar, pueden manifestarse por dolores infraorbitarios, sinusitis maxilar unilateral crónica u obstrucción nasal unilateral. Todas estas lesiones se pueden complicar cuando se extienden fuera del seno maxilar y afectan al seno etmoidal, la base del cráneo, la fosa pterigopalatina y/o la fosa infratemporal <sup>(91,92,93)</sup>.

Radiográficamente muestra un área radiolúcida unilocular alrededor de la corona del diente incluido. Los bordes del quiste presentan un margen esclerótico bien definido, hasta que se infecta. Se observa reabsorción radicular de los dientes vecinos al quiste. Ocasionalmente, se pueden observar trabéculas dando la impresión errónea de multilocularidad <sup>(86)</sup>. Se pueden describir tres variantes radiográficas del QD <sup>(86)</sup>:

- QD central: la corona es rodeada simétricamente, de esta forma la presión ejercida sobre la corona del diente causante y lo empuja en sentido contrario a su erupción.
- QD lateral: imagen radiográfica que resulta de la dilatación del folículo sólo en un área de la corona. Esta variante es común verla en terceros molares inferiores incluidos semierupcionados.
- QD circunferencial: el diente completo aparenta estar rodeado por el quiste. Es importante diferenciar esta variante de un TOQ.

### **Tratamiento**

Es indispensable realizar una tomografía computada antes de adoptar cualquier decisión terapéutica, ya que permite apreciar su ubicación exacta, volumen y relaciones con los tejidos adyacentes, así como el estado de las corticales óseas <sup>(90)</sup>.

El énfasis del tratamiento está dirigido a un tratamiento conservador, en que, para la resolución de la lesión, no es necesario considerar márgenes de seguridad al momento de realizar la excéresis de la lesión.

Según Hyomoto (2003) y Motamedi y Talesh (2005) <sup>(86)</sup>, es posible que posterior a la eliminación de la lesión, el diente incluido en relación al QD puede erupcionar normalmente, ya sea con o sin ayuda ortodóncica. Este potencial de erupción tiene relación con el nivel de desarrollo radicular, que entre menor sea este, mayor potencial tiene de erupcionar normalmente. Ahora, otros factores a considerar son: posición y angulación del diente incluido, edad del paciente, tamaño del quiste. Un procedimiento inicial para el tratamiento del QD, es realizar una aspiración con una aguja de 16 o 18 y así confirmar que se trata de una lesión quística y no tumoral. El tratamiento de grandes QD se puede complementar con la descompresión del quiste y así mejorar el pronóstico postquirúrgico, realizando excéresis de una lesión más pequeña que la original.

#### **I.4 TUMORES ODONTOGÉNICOS Y REABSORCION OSEA.**

La fisiopatología de los huesos maxilares muestra características distintas en comparación con la del hueso axial y apendicular. La presencia de dientes en los maxilares determina no solo la existencia de tejidos mineralizados distintos al hueso como: esmalte que recubre la corona, dentina y cemento como revestimiento de la raíz<sup>(176)</sup>, sino que también implica la presencia de restos de epitelio odontogénico en el contorno radicular ubicados en el ligamento periodontal.

La articulación de los dientes a los huesos maxilares está asegurada por una estructura anatómica especializada: el hueso alveolar que está conectado al cemento radicular por el ligamento periodontal. El diente y los huesos alveolares están directamente involucrados en la masticación. La fisiología de la célula ósea maxilofacial es única en sí. Algunas características fisiopatológicas discriminan la región maxilofacial del hueso axial y apendicular. Una labilidad única caracteriza al hueso alveolar que aparece y desaparece con la pérdida del diente. Su plasticidad biomecánica, íntimamente relacionada con el movimiento dental, permite el desplazamiento ortodóncico del diente<sup>(96)</sup>.

En la actualidad, no se delimita una especificidad molecular para las células óseas del territorio bucal. Esta especificidad ósea podría ser indirecta (es decir, relacionada con el diente y su situación peculiar dentro del medio bucal). La corona dental está expuesta a microorganismos orales y a la biomecánica masticatoria. La caries dental y las enfermedades periodontales pueden destruir los tejidos mineralizados; los procesos infecciosos e inflamatorios afectan la pulpa dental y el periodonto, pudiendo extenderse dentro del hueso maxilar. En un contexto fisiológico, las proteínas de la matriz de esmalte producidas por las células dentales pueden enriquecer el microambiente del hueso alveolar <sup>(96)</sup>.

Los recientes avances en biología ósea han identificado moléculas reguladoras de la remodelación ósea, que son cruciales para la formación, diferenciación y actividad de los osteoclastos. Entre estas moléculas reguladoras está el TNF, una súper familia compuesta por 19 ligandos y 29 receptores cuya función principal es estimular la osteoclastogénesis <sup>(122)</sup>.

El ameloblastoma y el tumor odontogénico queratoquístico, se caracterizan por un comportamiento benigno, pero localmente invasivo, con un alto riesgo de recurrencia <sup>(6,7)</sup>; ambos, aunque con mayor grado el ameloblastoma, pueden presentar un compromiso de los tejidos blandos adyacentes, infiltración en el hueso esponjoso, y el

crecimiento destructivo. En general, el ameloblastoma presenta imagenología de radiolucidez multilocular que algunos radiólogos describen como “pompas de jabón”, con frecuente reabsorción radicular, mientras que el tumor odontogénico queratoquístico aparece como un área radiolúcida unilocular o multilocular con bordes lisos o festoneados, y el quiste dentígero se observa como un área radiolúcida unilocular en torno a la corona de un diente incluido <sup>(64,126)</sup>.

En el ameloblastoma, varias citoquinas, incluyendo la interleuquina-1 $\alpha$ , la interleuquina-1 $\beta$ , la interleuquina-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), tienen actividad osteolítica y también pueden estimular el crecimiento celular. Las actividades de estas citoquinas fueron consistentes con sus papeles tanto en el crecimiento del ameloblastoma como en la expansión intraósea. Además, la localización inmunocitoquímica de IL-1 $\alpha$  e IL-6 en ameloblastoma se confirmó mediante hibridación de mRNA, lo que apoya la hipótesis de que la expansión osteolítica en la invasión de ameloblastomas participan IL-1 $\alpha$  e IL-6, siendo uno de los principales factores osteolíticos <sup>(132)</sup>.

Al revisar la literatura en relación a proteínas asociadas a osteoclastogénesis en tumores odontogénicos tales como ameloblastomas y TOQ y en quistes como QD y QR se

observa que se han realizado estudios a través de inmunodetección de las proteínas RANK, RANKL y OPG, con resultados controvertidos.

En la investigación de Siar <sup>(121)</sup>, en casos de ameloblastomas recurrentes, la tríada RANK-RANKL-OPG se detectó heterogéneamente en muestras de ameloblastomas recurrentes. RANK, fundamental para la diferenciación de osteoclastos, se expresó fuertemente en el epitelio tumoral. Por el contrario, RANKL, un activador de osteoclastos, fue marcadamente subexpresado y la localización de proteínas fue predominantemente estromal. OPG, un factor inhibidor de la osteoclastogénesis, se detectó en el epitelio neoplásico más que en el estroma, lo que sugiere la inactivación funcional de RANKL <sup>(121)</sup>.

En el estudio de Tekkesin <sup>(7)</sup> se comparó la expresión de RANK mediante inmunohistoquímica en queratoquistes, ameloblastomas y quistes radiculares (QRs), observándose un mayor número de células RANK positivas en el estroma de queratoquistes en comparación con las otras entidades, con medias de células RANK<sup>+</sup> de 65% para queratoquiste, 50% para ameloblastoma y un 50% para los QRs. La expresión de RANKL fue uniforme en los tres tipos de tumores, por lo que estos autores consideraron que la variable que determina la osteoclastogénesis es la expresión de RANK.

Por otro lado, Da Silva <sup>(6)</sup> encontró similar inmunodetección de RANK, RANKL y OPG en el epitelio odontogénico de TOQ, AM y QD, sin embargo, en el estroma de estos tumores encontró mayor número de células positivas para RANK y RANKL en ameloblastomas comparados con QD. Además, encontró que la mayoría de los ameloblastomas tenían mayor número de células RANKL positivas que células OPG positivas.

En el estudio de De Matos <sup>(95)</sup> se observó que TOQ y ameloblastomas mostraron mayor marcación inmunohistoquímica de RANKL que QR y QD en el epitelio. Junto con esto observaron una relación OPG menor a RANKL más frecuente en ameloblastomas y una relación de mayor expresión de OPG que RANKL en QD.

Otro autor que ha estudiado mediante inmunohistoquímica las proteínas RANK, RANKL y OPG en otros tumores odontogénicos es Andrade y col. <sup>(94)</sup> quien encontró similar patrón de expresión para RANKL y OPG en el epitelio de tumores odontogénicos benignos con distinto grado de agresividad tales como: tumor odontogénico quístico calcificante, tumor odontogénico epitelial calcificante, y tumor odontogénico adenomatoide entre otros.

La característica más controvertida del ameloblastoma es su invasividad en el hueso circundante a través de la destrucción ósea osteoclástica, a pesar de su naturaleza

benigna<sup>(67)</sup>; y si bien existen algunos estudios sobre la expresión inmunohistoquímica de las proteínas RANK, RANKL y OPG en tumores odontogénicos, a nuestro entender existe escasa literatura sobre los mRNA de estas moléculas en tumores odontogénicos. Kumamoto y Ooya<sup>(133)</sup> investigaron la expresión de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), RANKL y OPG mediante PCR (RNA total) e inmunohistoquímica en ameloblastomas y en dientes en desarrollo. La expresión de mRNA de pthrp, rankl y opg fue detectado en todas las muestras de gérmenes dentarios y de ameloblastoma. La expresión de RANKL y OPG fue menor en ameloblastomas que en dientes en desarrollo, interpretándolo como una disminución de la capacidad de regular el metabolismo óseo debido a la transformación neoplásica del epitelio odontogénico<sup>(133)</sup>.

En la investigación de Ferry, 2005<sup>(110)</sup>, estudiaron en muestras obtenidas de diversos tipos de ameloblastoma y de células de ameloblastoma en cultivo (AM-1, Harada<sup>(199)</sup>) la expresión de RANKL y TNF $\alpha$ , mediante análisis de western blot. También se estudió en 10-CM (medio concentrado 10 veces de células AM-1) la secreción de RANKL, TNF $\alpha$  y OPG mediante ELISA encontrando que RANKL presentó una concentración más de 10 veces mayor que la de TNF $\alpha$  y OPG. Adicionalmente, en ensayos *in vitro* demostraron que estas células eran capaces de inducir osteoclastogénesis y reabsorción de dentina.

Según los resultados de Ferry, RANKL ha demostrado desempeñar un papel más importante que el TNF $\alpha$  en la inducción de la osteoclastogénesis <sup>(110)</sup>.

Por otro lado, Qian y Huang en el año 2010 <sup>(54)</sup>, analizaron la expresión de RANKL y MMP-9 en ameloblastomas empleando RT-PCR e inmunohistoquímica, encontrando expresión inmunohistoquímica de RANKL en todas las muestras y de MMP-9 sólo en algunas muestras, adicionalmente observaron que las células de ameloblastoma *in vitro* eran capaces de inducir diferenciación de células de la médula ósea a osteoclastos con capacidad de resorción de hueso. Estos autores concluyeron que las células de ameloblastoma tienen la capacidad de inducir osteoclastogénesis y que RANKL juega un rol esencial en la formación de osteoclastos *in vitro* <sup>(54)</sup>.

Según Iakovou <sup>(120)</sup>, el ameloblastoma sólido mostró una expresión de OPG significativamente mayor (P = 0,004) asociado al patrón folicular (P <0,05) en comparación al patrón plexiforme o mixto. La ausencia o baja inmunoreactividad de RANKL se observó en el 79,3% de los tumores sólidos. Se encontró un resultado estadísticamente significativo (P <0,05) en el ameloblastoma uniuquístico, según los diferentes patrones histopatológico (no se observó expresión de RANKL cuando comparó el patrón plexiforme con el folicular) <sup>(120)</sup>. Se observó una mayor expresión de OPG sobre RANKL en el 86,2% de los A-S/M comparado con el 36,4% del A-U. No

hubo diferencias en la relación de expresión de TRAIL / RANKL en el A-U, mientras que el 55,2% de los ameloblastomas sólidos mostraron una mayor expresión de TRAIL sobre RANKL <sup>(120)</sup>.

La literatura recién mencionada muestra que faltan estudios sobre la expresión cuantitativa de los mRNA de RANK, RANKL y OPG en lesiones benignas de los huesos maxilares con diferentes grados de agresividad y de infiltración ósea como ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero. Tampoco existen estudios que comparen la relación entre la expresión a nivel de mRNA y de las proteínas de RANK, RANKL y OPG en las lesiones de los huesos maxilares recién mencionadas.

Frente a estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo de investigación es estudiar la expresión de RANK/RANKL y OPG en los tipos de ameloblastoma que se presentan con mayor frecuencia en nuestro país: ameloblastoma sólido/multiquístico y ameloblastoma unikuístico y compararlos con su expresión en TOQs y QDs, mediante el uso de inmunohistoquímica y la reacción cuantitativa en cadena de polimerasa (qPCR).

## **II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **HIPOTESIS**

La expresión de las proteínas RANKL, RANK y OPG se localizan principalmente en los estratos basales comparado a los estratos superiores de los epitelios de: ameloblastomas sólido/multiquístico, ameloblastoma unikuístico, tumor odontogénico queratokuístico y quistes dentígeros.

Mayores niveles cuantitativos de expresión de mRNA de rankl, se observan en ameloblastomas sólido/multiquístico y ameloblastoma unikuístico, seguido de tumor odontogénico queratokuístico y por último quistes dentígeros. Los niveles de expresión cuantitativos de mRNA de rank y opg son similares en ameloblastomas sólido/multiquístico, ameloblastoma unikuístico, tumor odontogénico queratokuístico y quistes dentígeros

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión y localización tisular de las proteínas RANKL, RANK y OPG en ameloblastomas sólido/multiquístico, ameloblastoma unikuístico, tumor odontogénico queratoquístico y quistes dentígeros.

Determinar los niveles cuantitativos de expresión de mRNA de RANKL, RANKL y OPG en ameloblastomas sólido/multiquístico, ameloblastoma unikuístico, tumor odontogénico queratoquístico y quistes dentígeros.

## **Objetivos Específicos**

1. Determinar la localización tisular en los diferentes estratos de los epitelios y el porcentaje de expresión de RANK, RANKL y OPG en ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero mediante inmunohistoquímica.
2. Cuantificar los niveles de expresión de los mRNAs de rank, rankl y opg en ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero mediante RT-qPCR.

3. Analizar y comparar la expresión de las proteínas RANK, RANKL y OPG con los niveles de expresión de sus respectivos mRNA en ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentífero mediante inmunohistoquímica.
  
4. Describir la distribución etaria y de sexo de pacientes con ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentífero y la localización anatómica de estas lesiones en relación a la expresión de RANK, RANKL y OPG.

### **III. MATERIALES Y MÉTODO**

#### **TIPO DE ESTUDIO**

Estudio observacional descriptivo transversal

#### **MUESTRA**

##### **SELECCIÓN DE CASOS**

Con la aprobación de comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, se revisó la base de datos del Servicio de Biopsias, dependiente del Departamento de Patología, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, seleccionando muestras de biopsias con diagnóstico de ameloblastomas (AM), tumor odontogénico queratoquístico (TOQ) y quiste dentígero (QD), registradas entre los años 1995 y 2008, según criterios diagnósticos histopatológicos basados en la clasificación de Tumores Odontogénicos de la Organización Mundial de la Salud del año 2005<sup>(64)</sup>.

Estas muestras corresponden a envíos de biopsias, para solicitud de informes anatomopatológicos con fines diagnósticos. Estas biopsias fijadas en formalina, provenientes de hospitales públicos, servicios odontológicos privados y servicios de cirugía maxilofacial universitarios de la Región Metropolitana de Santiago de Chile. Las muestras estudiadas fueron en su mayoría de tipo incisional y en los casos de biopsia escisional se evaluó solo uno de los segmentos para conservar la mayor parte de la muestra.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Muestras que correspondan a los diagnósticos histopatológicos de: Ameloblastoma Sólido/Multiquístico (A-S/M), Ameloblastoma Uniquístico (A-U), Tumor Odontogénico Queratoquístico (TOQ) y Quiste Dentígero (QD). Se preseleccionaron 120 casos registrados según este criterio, correspondiendo a 54 casos de Ameloblastomas, 54 casos de TOQ y 12 casos de QD.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

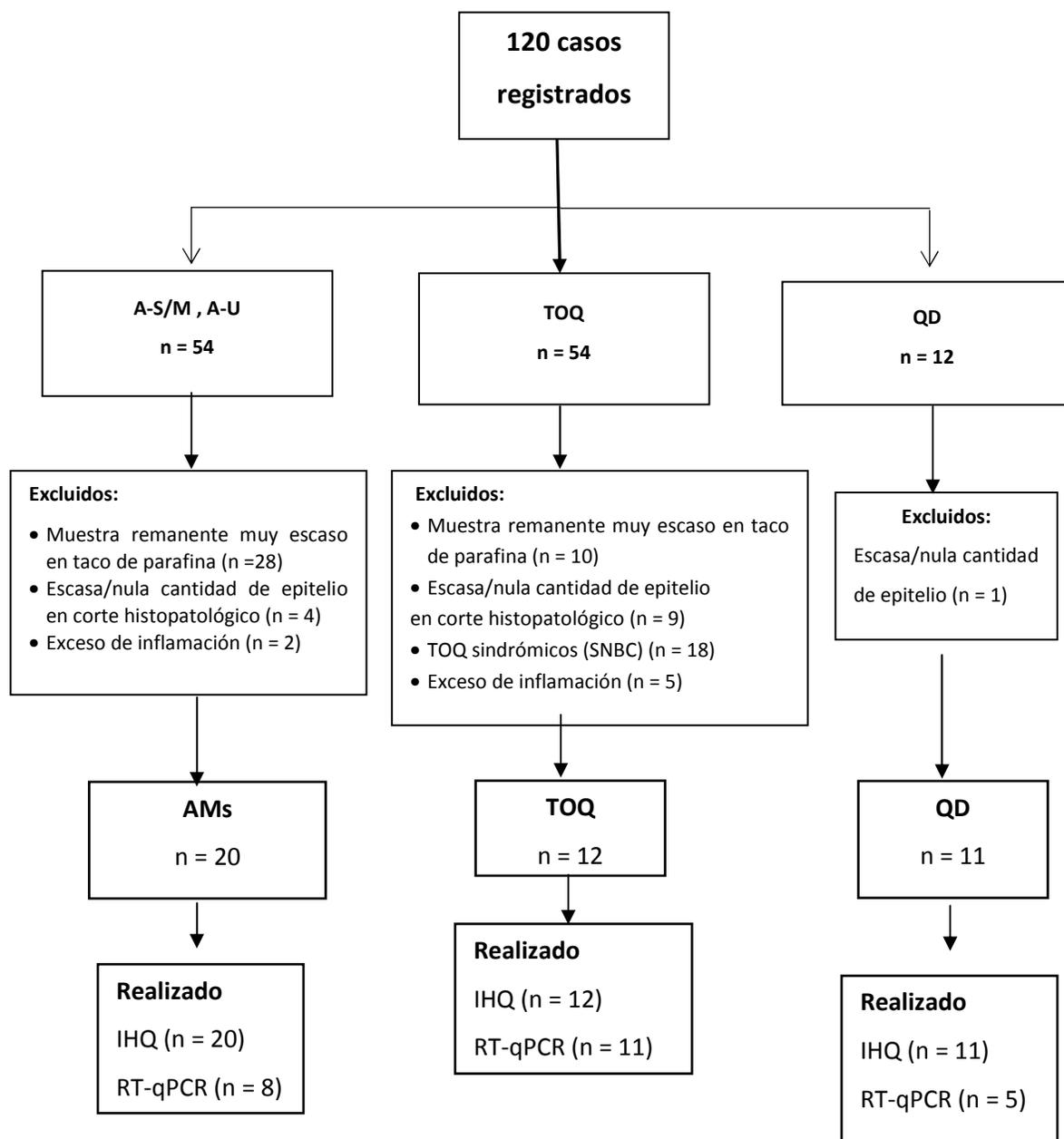
1. Muestras asociadas a recurrencias y/o recidivas post-tratamiento quirúrgico
2. Muestra remanente muy escaso en taco de parafina
3. Muestras que presenten inflamación moderada a severa <sup>(95, 174)</sup>.
4. Muestras que contengan escasa o nula cantidad de epitelio, que impida realizar un recuento de por lo menos tres campos representativos una vez realizados la inmunohistoquímica de RANK, RANKL, OPG.
5. Casos asociados a TOQ sindrómico (Síndrome Nevoide Basocelular)

## **RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

Aplicados los criterios de exclusión, se seleccionaron 20 casos de AM, 12 casos de TOQ y 11 casos de QD; cada uno de estos fueron utilizados para realizar inmunohistoquímica de RANK, RANKL, OPG. De los casos seleccionados, se realizó una selección de muestras para RT-qPCR de mRNA de rank, rankl, opg: AM (n=8), TOQ (n= 11), QD (n= 5).

El proceso de selección de casos y muestras, se resumen en la figura 1.

**Figura 1. Proceso de selección de casos. Se indican los criterios de exclusión utilizados**



**Figura 1.** S/M, Sólido Multiquistico; U, Uniquístico; TOQ, Tumor Odontogénico Queratoquistico; SNBC, Síndrome Nevoide Basocelular; QD, Quiste dentígero; IHQ, Inmunohistoquímica; RT-qPCR, *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*.

## INMUNOHISTOQUÍMICA

Una vez obtenidos los moldes seleccionados, se realizaron 3 cortes de 4µm a cada uno con navajas de corte para tejidos duros y blandos marca Feather, en micrótopo marca E. Leitz Wetzlar, posteriormente colocadas en un baño de flotación marca Labline a 38°C; cada corte fue recogido en portaobjetos cargados positivamente (Cellpath Ltda, UK) y secados a 60° C por 30 minutos en estufa marca Memmerty.

Las muestras fueron desparafinadas en una batería de xilol y alcohol durante un tiempo total de 55 minutos. Para la recuperación de antígenos, las muestras fueron incubadas en una solución de buffer citrato (pH 6), en vaporera a 95° por 20 minutos; enfriadas en congelador hasta alcanzar 21°C, para ser lavadas en buffer PBS durante 5 minutos.

El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó incubando las muestras en metanol al 0,3% en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 45 minutos a temperatura ambiente de 21°C. El bloqueo secundario se realizó con suero normal (*Prediluted Normal Horse Serum, R.T.U*

*Vectastain® Universal Elite® ABC KIT*, catalog No. PK-7200), a temperatura ambiente durante 30 minutos.

La incubación con anticuerpos primarios se realizó con los anticuerpos descritos en la tabla I.

**TABLA I. Características de anticuerpos utilizados en procedimientos de inmunohistoquímica en esta investigación**

Anticuerpo	Laboratorio	Tipo de Anticuerpo	Número de catálogo	Control positivo	Concentración utilizada
<b>anti-factor nuclear <math>\kappa</math>B (RANK)</b>	R&D System, MN, USA	Monoclonal de ratón IgG2A	MAB6831	G.C.C.G (27, 197,198,196)	25ug/ml
<b>anti – ligando de RANK (RANKL)</b>	R&D System, MN, USA	Monoclonal de ratón IgG2B	MAB626	Linfonodo humano	25ug/ml
<b>anti - osteoprotegerina (OPG)</b>	R&D System, MN, USA	Antígeno purificado por afinidad de IgG policlonal de cabra	AF805	Linfonodo humano	15ug/ml

*G.C.C.G: Granuloma Central Células Gigantes*

Para RANK y OPG se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente de 21°C, mientras que RANKL, se incubó durante toda la noche a una temperatura de 4°C en cámara húmeda. Como control negativo se reemplazó el anticuerpo primario por buffer PBS. El anticuerpo secundario para RANK y RANKL se hizo reaccionar durante 30 minutos (Ig biotinilado prediluido de caballo anti ratón/anti conejo, listo para usar. *R.T.U Vectastain® Universal Elite® ABC KIT*). En el caso de

OPG, las muestras se incubaron con anticuerpo secundario anticabra durante 30 minutos (*R.T.U. Biotinylated Horse Anti-Goat IgG Antibody (Ready-to-Use)*).

Las muestras fueron luego incubadas en cromógeno (ImmPACT™ DAB, SK-4105, Vector laboratories) durante 1,5 minutos y contra teñidos con hematoxilina de Harris por 10 segundos.

#### **Controles positivos y negativos.**

Se utilizaron las siguientes muestras para los controles positivos (figura 2):

- RANK: granuloma central a células gigantes
- RANKL – OPG: linfonodo humano

Como control negativo, se omitió la incubación con el anticuerpo primario, sustituyéndolo por buffer PBS.

Del total de muestras seleccionadas, se obtuvieron cortes de 4  $\mu\text{m}$ , los que fueron montados en portaobjetos cargados positivamente y se realizó el procedimiento de inmunohistoquímica en cada muestra para RANK, RANKL y OPG. Del total de muestras seleccionada de A-S/M y A-U (n=20), TOQ (n=12) y QD (n=11), se

descartaron las muestras en que se desprendió el epitelio, obteniendo el siguiente resultado descrito en la tabla II:

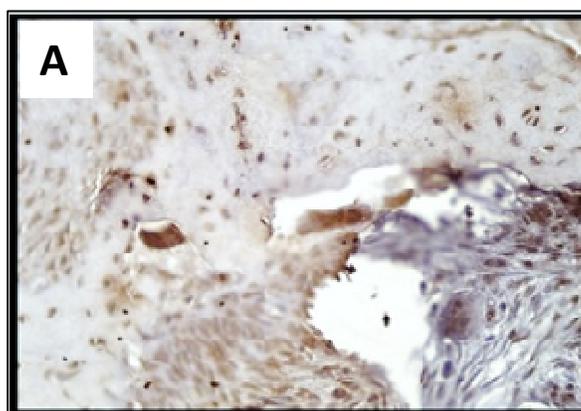
**Tabla II. Casos analizados por técnica inmunohistoquímica para RANK, RANKL y OPG en AMs, TOQ, QD**

Lesión en estudio	Molécula en estudio		
	RANK	RANKL	OPG
Ameloblastoma S/M	7	5	6
Ameloblastoma U	9	6	7
Tumor Odontogénico Queratoquístico	12	12	12
Quiste Dentígero	11	11	11

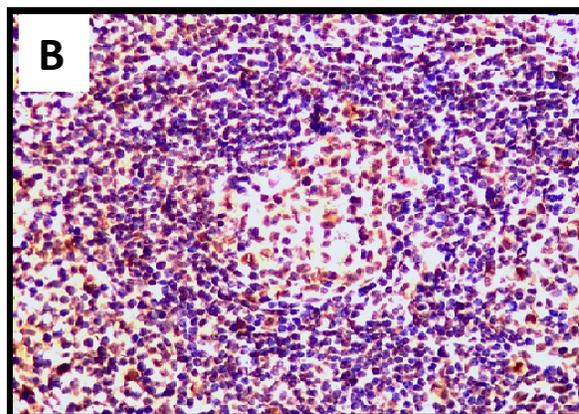
S/M, sólido/multiquístico; U, unikuístico

**Figura 2.**  
**Controles positivos empleados en la técnica inmunohistoquímica.**

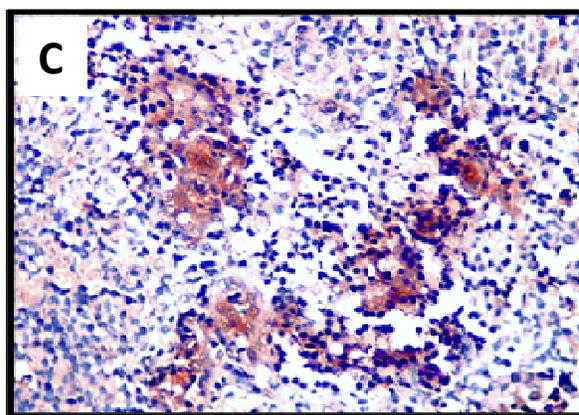
- A.** Anticuerpo RANK  
R&D (catalog number MAB6831)  
Concentración 25 µg/ml.  
Control positivo: Granuloma Central a Células Gigantes.  
Aumento original 400x.



- B.** Anticuerpo RANKL  
R&D (catalog number MAB626)  
Concentración: 25 µg/ml  
Control positivo: linfonodo.  
Aumento original 400x.



- C.** Anticuerpo OPG  
R&D (catalog number AF805).  
Concentración 15 µg/ml  
Control positivo: linfonodo.  
Aumento original 400x.



### **Localización tisular y Recuento celular**

Las muestras para inmunohistoquímica fueron codificadas con un número y cada anticuerpo con una letra, seguido por otro número según se tratase del campo a observar, numerados del 1 al 5, códigos que sólo fueron conocidos por el tesista de esta investigación. La marcación celular positiva para RANK, RANKL y OPG fue evaluada en células epiteliales por un especialista de patología oral, perteneciente al departamento

de Patología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Prof. Dra. Ana Verónica Ortega Pinto, quien, al realizar el recuento celular, desconocía el anticuerpo empleado y la lesión analizada, ya que las placas histopatológicas estaban marcadas por la codificación.

La observación se realizó con un microscopio Olympus BX41 y con un aumento inicial total de 40x, se seleccionaron 5 campos, con mayor densidad de epitelio de inmunomarcación positiva (*hot-spots*)<sup>(179,180)</sup>; cada uno de esos campos se observó a una magnificación total de 400x y fueron fotografiados con este aumento.

La localización de las proteínas en estudio, se determinó por la marcación inmunohistoquímica (coloración parda) que se diferencia de la tinción de contraste que presenta color azul (Hematoxilina de Harris) la cual presenta afinidad tintorial por moléculas ácidas y por lo tanto tiñe de color azul los núcleos celulares. Se emplearon parámetros morfológicos para determinar localización de la marcación inmunohistoquímica como estratos epiteliales, marcación nuclear, citoplasmática o de membrana, etc. basándose en criterios de expertos en patología de quistes y tumores odontogénicos<sup>(64,98)</sup>.

El recuento de células positivas se realizó utilizando el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) <sup>(6,7,27,94)</sup>, con el que el operador marca las células positivas y el programa realiza la contabilización de estas.

Se consideró positivas células de color marrón según criterios de Polley <sup>(181)</sup>. Los resultados se expresaron en porcentaje de células positivas, respecto al total de células epiteliales contabilizadas por caso.

Los datos obtenidos se reunieron en una planilla Excel, Microsoft Excel 2016 ®

## **TÉCNICA RT-qPCR (qPCR)**

### **Purificación de RNA total y síntesis de la primera cadena de DNA complementario (cDNA) <sup>(182, 183)</sup>.**

La extracción del RNA total se realizó utilizando un kit de extracción para muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina (*Optimun FFPE RNA Isolation Kit, Ambion, Austin, TX, USA*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se suspendió en 30 µl agua milli-Q libre de RNAsas y su calidad y cantidad se

analizó utilizando un espectrofotómetro (*Nanodrop*®, *Thermo Fisher Scientific, USA*) a 260 nm y 280 nm. El RNA se almacenó a -80°C a una concentración de 1 µg/ml.

La primera cadena de cDNA se sintetizará utilizando un kit de transcripción reversa (*SuperScript*™ III, *Invitrogen, Grand Island, NY, USA*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **RT-qPCR** <sup>(184)</sup>

Los niveles de expresión de *rank*, *rankl* y *opg* se cuantificaron mediante RT-qPCR a partir de 50 ng de cDNA utilizando los primers apropiados (**Tabla III**) y el reactivo *KAPA*™ SYBR® Fast qPCR Reagent (*KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA*), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en un termociclador en tiempo real *StepOnePlus*® (*Applied Biosystems, Singapore*) siguiendo el siguiente protocolo de amplificación: 95°C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 3 seg y 60°C por 30 seg y finalmente una curva de lisis de 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min y 95°C por 15 seg para la detección de productos de amplificación no específicos y falsos positivos. Como control endógeno se cuantificarán los niveles de expresión de la subunidad 18S rRNA.

**Tabla III, primers <sup>(4, 185, 186)</sup> utilizados en cuantificación RT-qPCR**

	<b>Forward primer (5'– 3')</b>	<b>Reverse primer (5'– 3')</b>
<b>rank</b>	tcaacaaggacacagtggtgc	ttaggtggtttctagctgg
<b>rankl</b>	aaccagatgggatgctgggtgcatta	agcagatgggtggatggctcatggtag
<b>opg</b>	gtcatctaaagcacctctag	tgaagaatgcctcctcacac
<b>18S</b>	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizará usando el programa SPSS v19.0.

Para los resultados de inmunohistoquímica:

- Para determinar si la distribución es normal, se realizó test Shapiro Wilk por cada marcador en cada una de las lesiones
- Mediante test ANOVA se comparó el índice de marcación entre anticuerpos RANK, RANKL y OPG para cada lesión y de cada una de estas proteínas entre A-S/M, A-U, TOQ y QD

Para los resultados de RT-qPCR:

- Los datos de RT-qPCR se cuantificaron utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$
- La normalidad de la distribución de los datos se analizó usando la prueba Kolmogorov-Smirnov y las diferencias de los niveles expresados de rank, rankl y opg por cada tipo de lesión se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar y evaluaron usando las pruebas ANOVA y post-hoc de Tukey.
- Correlación entre RT-qPCR / inmunohistoquímica se analizó con test de Pearson

Se considerará una diferencia estadísticamente significativa si la significancia es  $p \leq 0,05$ .

## IV. ASPECTOS ETICOS

Las muestras (tacos de parafina) obtenidas por biopsia incisional de los pacientes con las lesiones a estudiar en esta investigación, sólo fueron empleados para análisis inmunohistoquímicos y RT -qPCR y no se utilizaron para otro tipo de estudios; los objetivos y procedimientos de la presente investigación no cambiarán el diagnóstico, pronóstico y por ende, el plan de tratamiento que los pacientes a los cuales pertenezcan las muestras pudiesen haber seguido o seguirán a futuro. Estas biopsias han sido enviadas al Servicio de biopsias por los cirujanos dentistas que han realizado el acto quirúrgico para la obtención de la muestra con el objetivo de obtener un diagnóstico en beneficio del paciente. Las muestras, placas histológicas y fichas clínicas de los pacientes están registradas y almacenadas en el servicio de biopsias. Este trabajo de investigación está adscrito al Proyecto FONDECYT Regular N° 1140904. Además, la presente investigación sigue igual manejo de las muestras y es una continuación de la unidad de investigación del estudiante de magister, la cual estuvo adscrita al Proyecto de investigación FIOUCH 09-11, el que contó con aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se adjunta en el anexo 1, copia del Acta de Aprobación del Comité de Ética, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

La información recopilada de las fichas de biopsias de los pacientes, que comprenden variables demográficas (edad, sexo, nacionalidad, fecha de nacimiento y estado civil) y datos personales (nombres, apellidos, rol único tributario (RUT), domicilio, número telefónico, profesión o actividad y previsión social) se mantuvo en absoluta confidencialidad. El detalle de los datos antes mencionados, sólo es conocido por el encargado del SAP-FOUCH y no por parte de los investigadores.

Para esta investigación sólo son conocidos los datos respecto a edad y sexo de los pacientes y la localización anatómica de las lesiones.

## **V. RESULTADOS**

### **V.1 LOCALIZACIÓN TISULAR EN LOS DIFERENTES ESTRATOS DE LOS EPITELIOS Y EL PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE RANK, RANKL Y OPG EN AMELOBLASTOMAS, TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO Y QUISTE DENTÍGERO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.**

En el caso de los AMs, la expresión inmunohistoquímica de RANK y OPG fue localizado en el citoplasma celular, observada con mayor positividad en el estrato basal que en retículo estrellado, con escasa marcación en células del estroma. La inmunomarcación de RANKL se localizó principalmente en el estrato basal y fue menor que RANK y OPG, presentando un patrón de marcación celular principalmente nuclear y secundariamente citoplasmática (tabla 6, 7).

Respecto a los casos de TOQ, la marcación de RANK se presentó en citoplasma, con una intensidad similar tanto en estrato basal, como en estratos superiores, así como también se expresó en células del estroma. RANKL tiene una expresión nuclear, de igual positividad en los distintos estratos del epitelio. OPG se observó con una marcación nuclear y citoplasmática (tabla 6, 7)

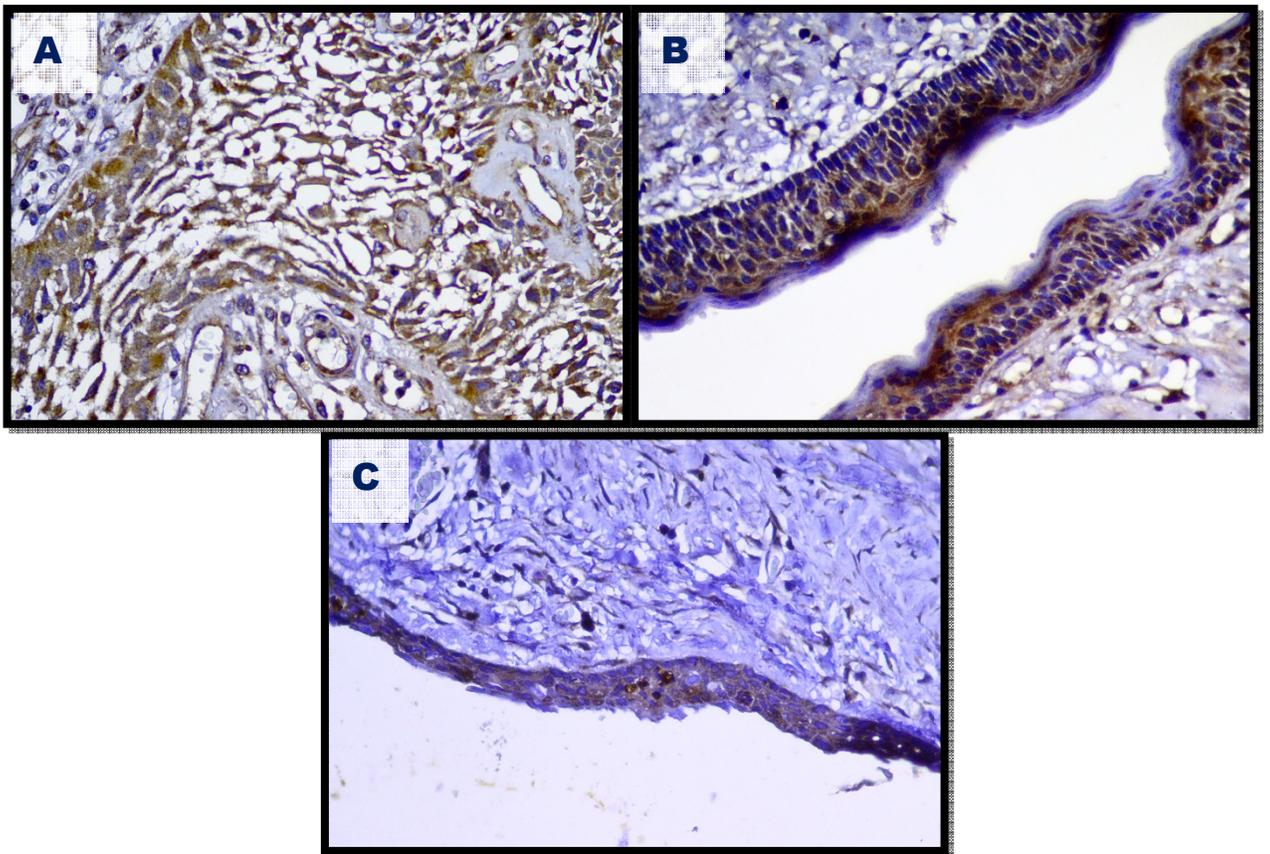
La marcación de RANK y OPG en quistes dentígeros, se observó con un patrón citoplasmático de moderado a intenso y RANKL, se presentó con una marcación nuclear de intensidad variable en los distintos casos (tabla 6, 7)

Tanto en los AM S/M como A-U y en los QD se observó mayor porcentaje de células positivas a OPG que ha RANK, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (tabla IV).

Las microfotografías correspondientes a la inmunohistoquímica de RANK, RANKL y OPG en AM, TOQ y QD, se pueden observar en las figuras 3, 4 y 5.

**FIGURA 3. Microfotografías representativas de inmunohistoquímica para RANK en Ameloblastomas, Tumor odontogénico queratoquístico y Quiste dentífero.**

RANK se observó con marcación citoplasmática en los tres tipos de lesión. (A) Ameloblastoma multiquístico en que se observa mayor inmunomarcación en el estrato basal que en zonas tipo retículo estrellado. (B) Tumor odontogénico queratoquístico, la inmunomarcación es más homogénea entre los distintos estratos del epitelio. (C) Quiste dentífero, inmunomarcación similar entre los distintos estratos epiteliales. (Magnificación original 400X).

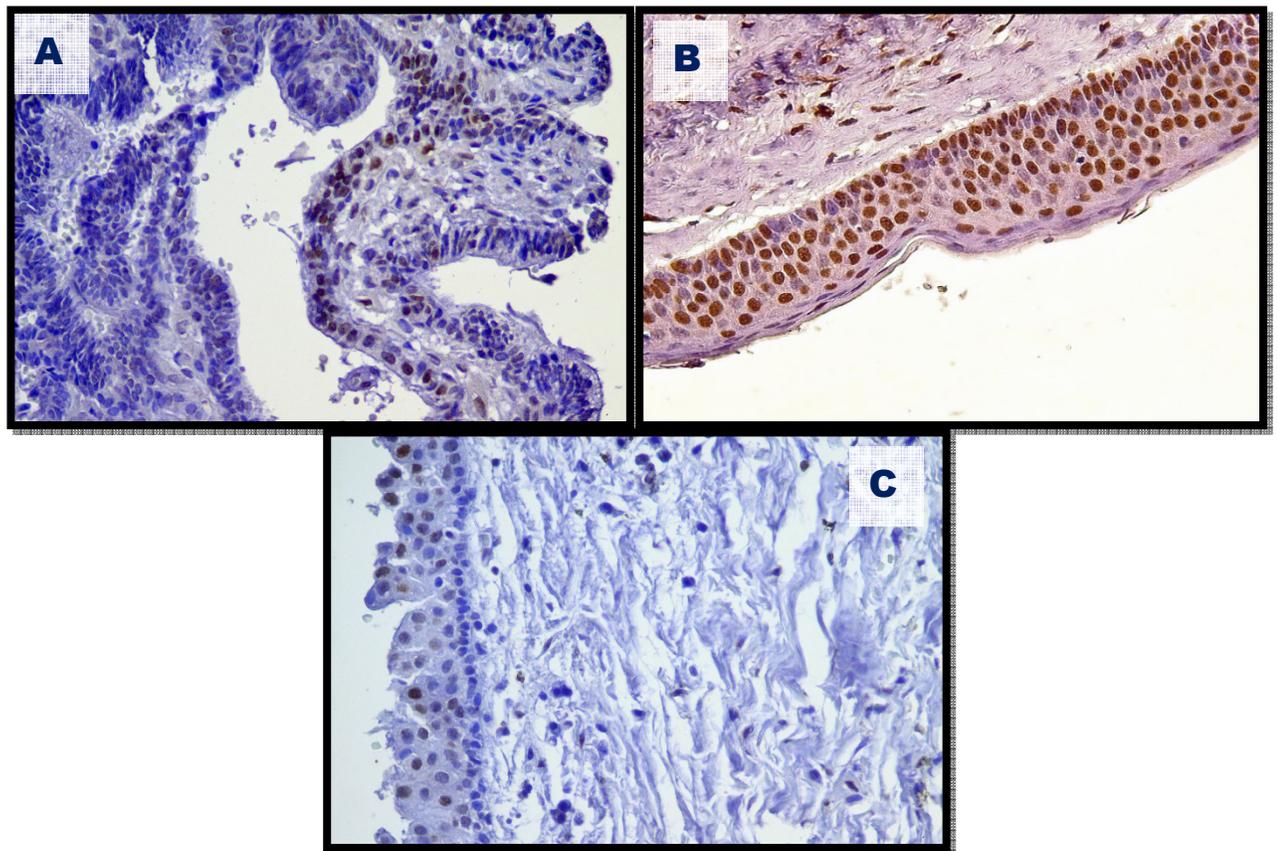


**FIGURA 4. Microfotografías representativas de inmunohistoquímica para RANKL en Ameloblastomas, Tumor odontogénico queratoquístico y Quiste dentígero.**

RANKL se observó con marcación principalmente nuclear en los tres tipos de lesión.

(A) Ameloblastoma multiquístico en que se observa mayor inmunomarcación en el estrato basal. (B) Tumor odontogénico queratoquístico, la inmunomarcación es más homogénea entre los distintos estratos del epitelio. (C) Quiste dentígero, inmunomarcación principalmente en estrato parabasal y superiores.

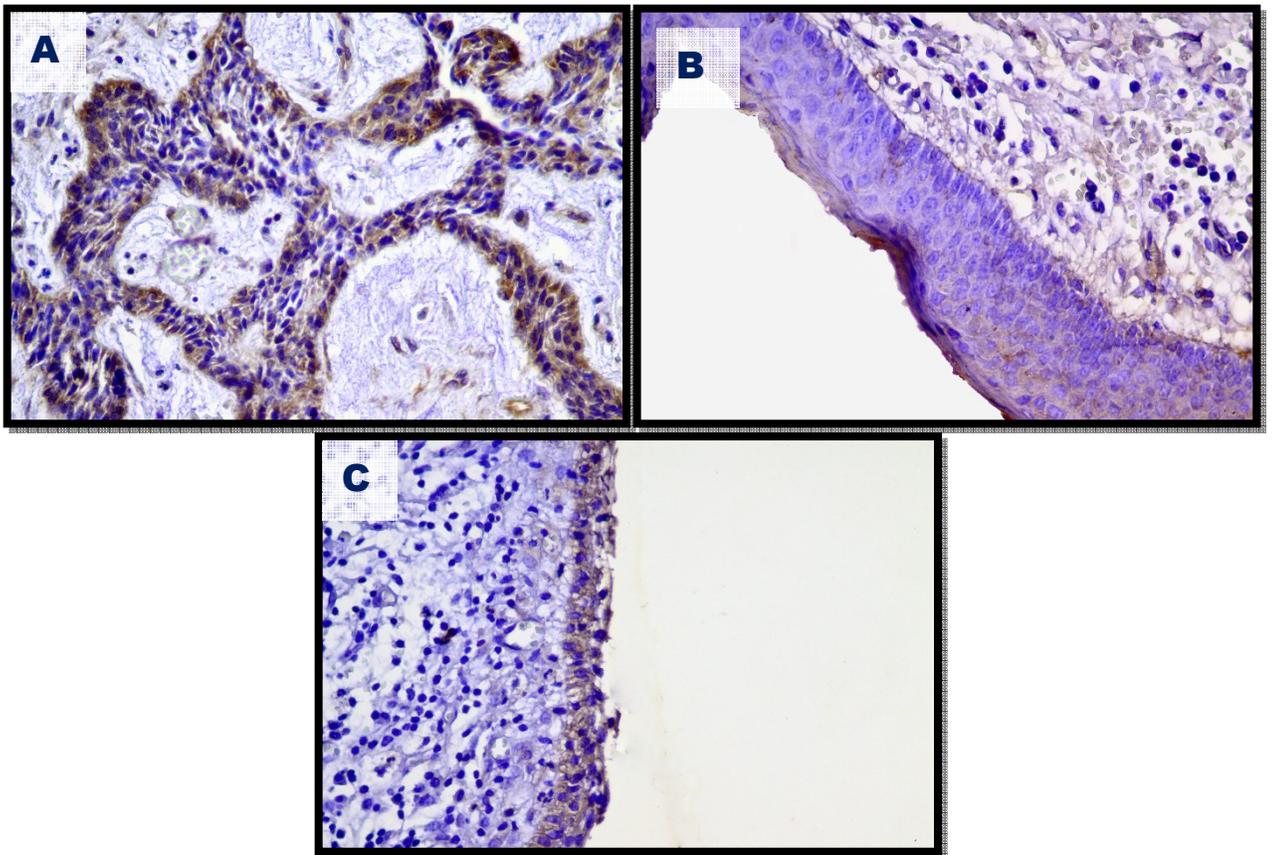
(Magnificación original 400X).



**FIGURA 5. Microfotografías representativas de inmunohistoquímica para OPG en Ameloblastomas, Tumor odontogénico queratoquístico y Quiste dentífero.**

OPG se observó con marcación principalmente citoplasmática en los tres tipos de lesión.

(A) Ameloblastoma multiquistico en que se observa mayor inmunomarcación en el estrato basal. (B) Tumor odontogénico queratoquístico, la inmunomarcación es más homogénea entre los distintos estratos del epitelio. (C) Quiste dentífero, inmunomarcación en todos los estratos epiteliales. (Magnificación original 400X).



**Tabla IV. Expresión de RANK, RANKL y OPG en ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero mediante inmunohistoquímica.**

Lesión en estudio	Porcentajes de células positivas		
	RANK % ± DS	RANKL % ± DS	OPG % ± DS
Ameloblastoma S/M	55 ± 0,34 *	41 **	78 **
Ameloblastoma U	69 ± 0,22 *	49 **	67 ± 0,33 *
Tumor Odontogénico Queratoquístico	64 ± 0,26 *	51 ± 0,26 *	47 ± 0,20 *
Quiste dentígero	81 #	48 ± 0,28 *	62 ± 0,24 *

*S/M, sólido/multiquístico; U, unikuístico*

\* Distribución normal, test estadístico Shapiro Wilk

\*\* Muestra muy pequeña, no es posible realizar test estadístico

# Distribución no normal, test estadístico Shapiro Wilk: mediana 84% (rango 37% - 100%)

**Tabla V. Localización tisular de RANK, RANKL y OPG en ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero mediante inmunohistoquímica.**

Lesión en estudio	Localización tisular		
	RANK	RANKL	OPG
Ameloblastoma S/M	E. Basal	E. Basal	E. Basal
Ameloblastoma U	E. Basal	E. Basal	E. Basal
Tumor Odontogénico Queratoquístico	E. Basal y superiores	E. Basal y superiores	E. Basal y superiores
Quiste dentígero	E. Basal y superiores	E. parabasal y superiores	E. Basal y superiores

*E: estrato epitelial, S/M: sólido/multiquístico, U: unikuístico*

**Tabla VI. Localización celular de RANK, RANKL y OPG en ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero mediante inmunohistoquímica.**

Lesión en estudio	Localización Celular		
	RANK	RANKL	OPG
Ameloblastoma S/M	Citoplasma	Núcleo y citoplasma	Citoplasma
Ameloblastoma U	Citoplasma	Núcleo y citoplasma	Citoplasma
Tumor Odontogénico Queratoquístico	Citoplasma	Núcleo	Núcleo y citoplasma
Quiste dentígero	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma

Luego de evaluar la normalidad de los datos por test Shapiro Wilk, se aplicó el test de ANOVA para el análisis del índice de marcación de RANK, RANKL y OPG en las lesiones estudiadas, no encontrando diferencias significativas para cada una de las lesiones estudiadas (tabla VII):

**Tabla VII. Análisis estadístico de expresión de RANK, RANKL, OPG**

Lesiones estudiadas	Diferencia estadística de niveles de marcación		
	RANK	RANKL	OPG
<i>AMs / TOQ / QD</i>	0,184	0,929	0,606

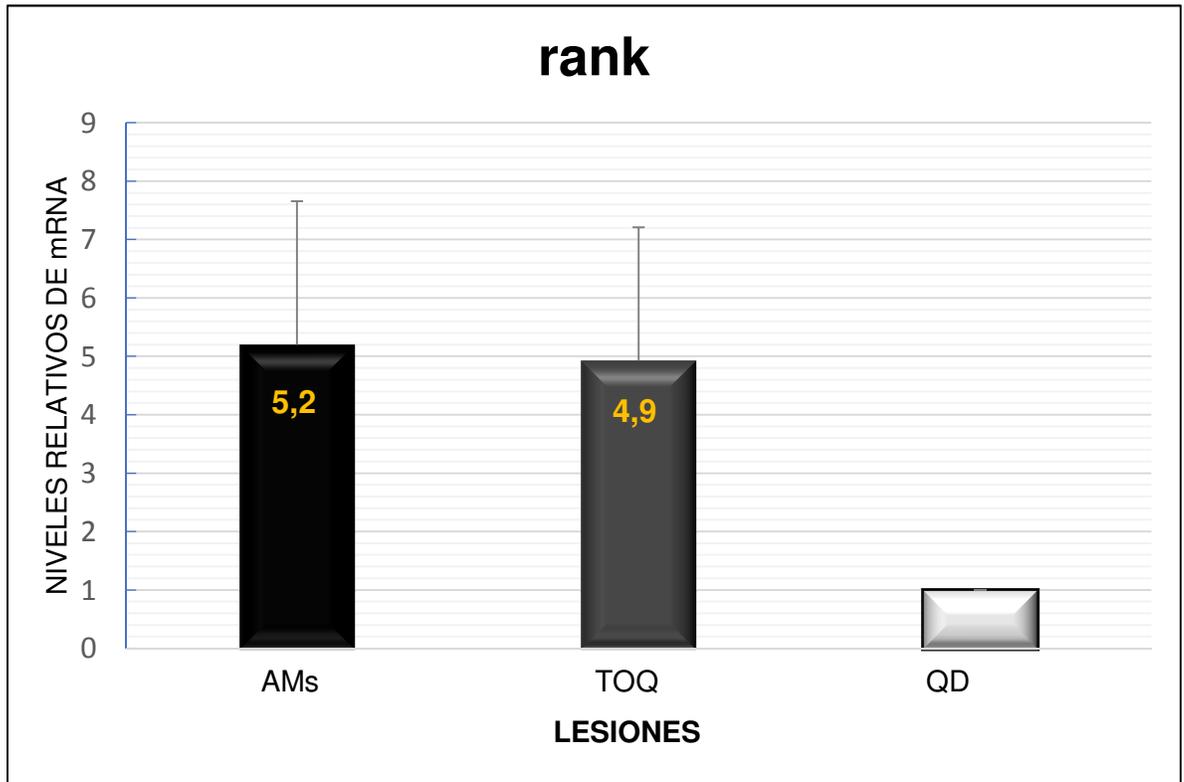
Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si la significancia es  $p \leq 0,05$

## **V.2 NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS mRNAs DE rank, rankl Y opg EN AMELOBLASTOMAS, TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO Y QUISTE DENTÍGERO MEDIANTE RT-qPCR.**

La normalidad de la distribución de los datos se analizó usando la prueba Kolmogorov-Smirnov y las diferencias de los niveles expresados de rank, rankl y opg por cada tipo de lesión se expresó como promedio  $\pm$  desviación estándar y evaluaron usando las pruebas ANOVA y post-hoc de Tukey.

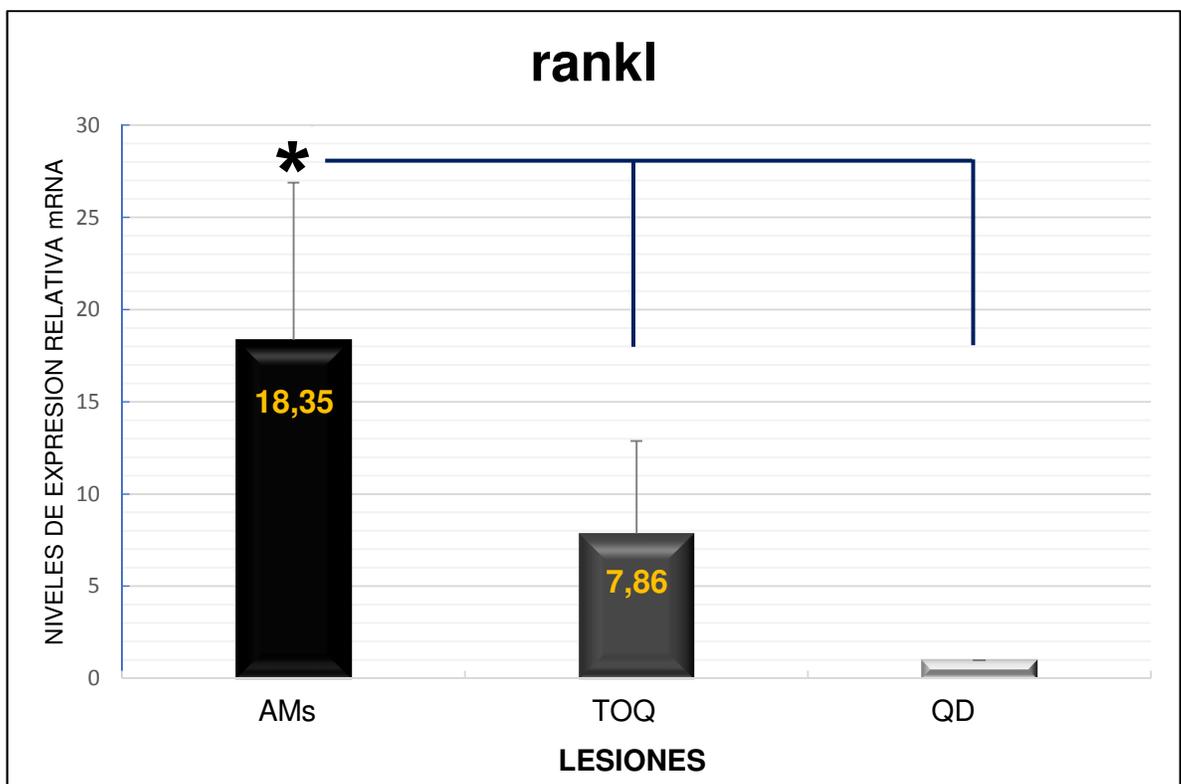
Para la expresión de rank, se compararon los casos de AMs y TOQ los que tuvieron una expresión relativa de 5,2 y 4,9 veces más, comparados a la expresión relativa de los casos de QD al que se le dio el valor de 1, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los casos (prueba post hoc hsd de Tukey) (Gráfico 1)

**Gráfico 1. Expresión relativa de mRNA de rank en ameloblastoma, tumor odontogénico queratoquístico, quiste dentígero.**



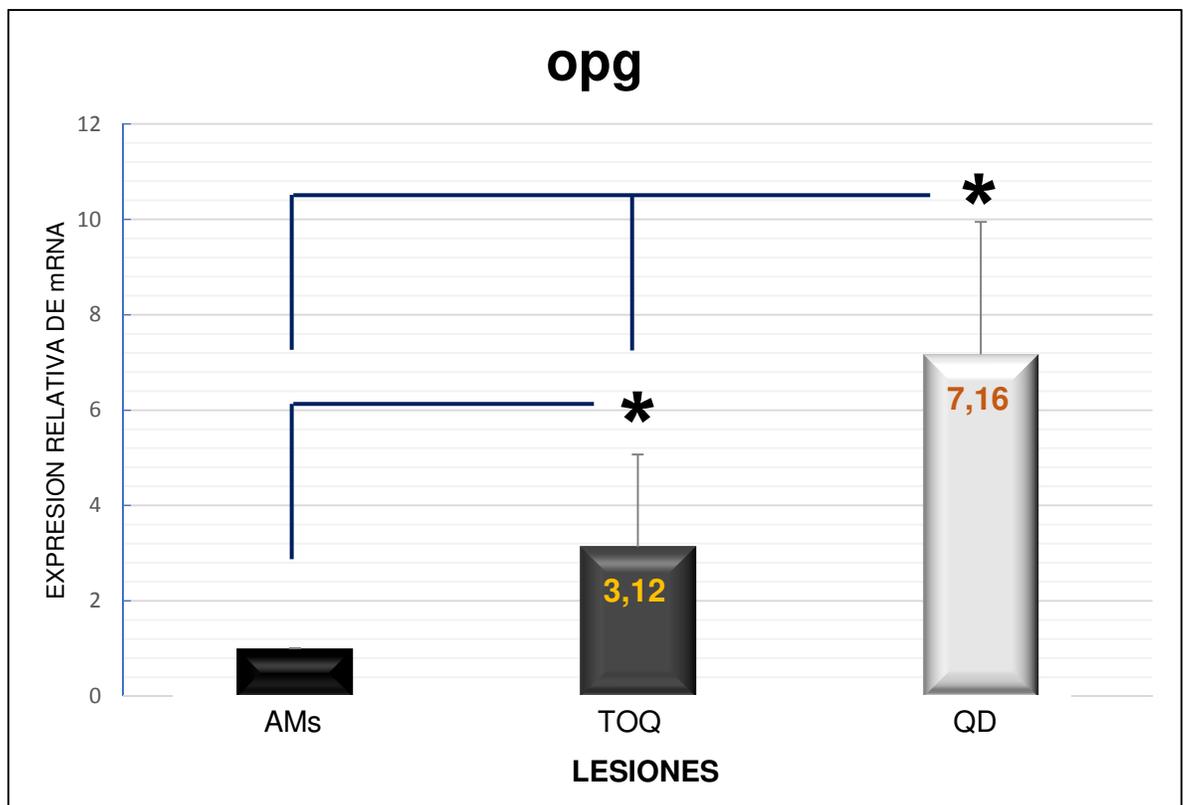
Para la expresión de mRNA de rankl, se compararon los casos de AMs y TOQ los que tuvieron una expresión relativa de 18,35 y 7,86 veces más, comparados a la expresión relativa de los casos de QD al que se le dio el valor de 1, habiendo diferencia significativa de los casos de AMs respecto a TOQ y QD (prueba post hoc hsd de Tukey) (Gráfico 2)

**Gráfico 2. Expresión relativa de mRNA de rankl en ameloblastoma, tumor odontogénico queratoquístico, quiste dentífero.**



Para la expresión de *opg*, se compararon los casos de TOQ y QD los que tuvieron una expresión relativa de 3,12 y 7,16 veces más, versus a la expresión relativa de los casos de AMs al que se le dio el valor de 1, habiendo diferencia significativa de los casos de QD, respecto a AM y TOQ, también hay diferencia significativa entre TOQ y AMs. (prueba post hoc hsd de Tukey) (Gráfico 3)

**Gráfico 3. Expresión relativa de mRNA de *opg* en ameloblastoma, tumor odontogénico queratoquístico, quiste dentífero.**



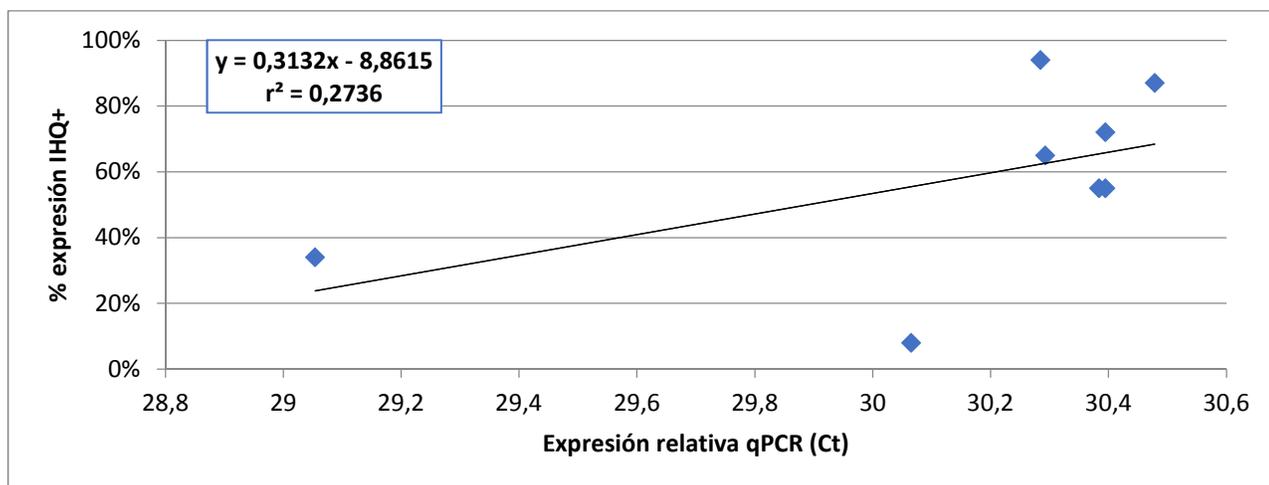
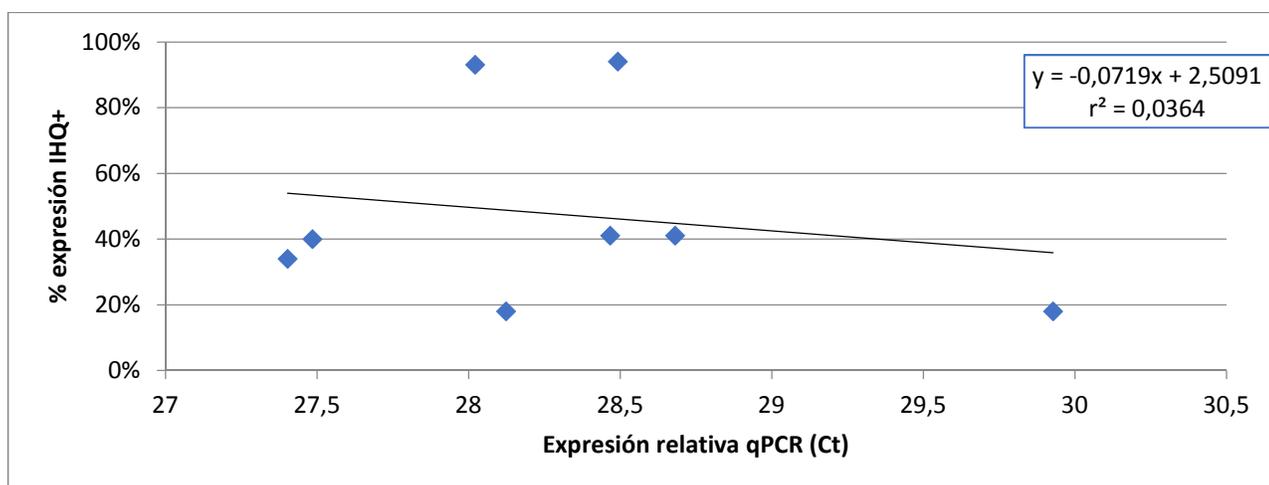
### **V.3 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RANK, RANKL Y OPG CON LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DE SUS RESPECTIVOS mRNA EN AMELOBLASTOMAS, TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO Y QUISTE DENTÍGERO.**

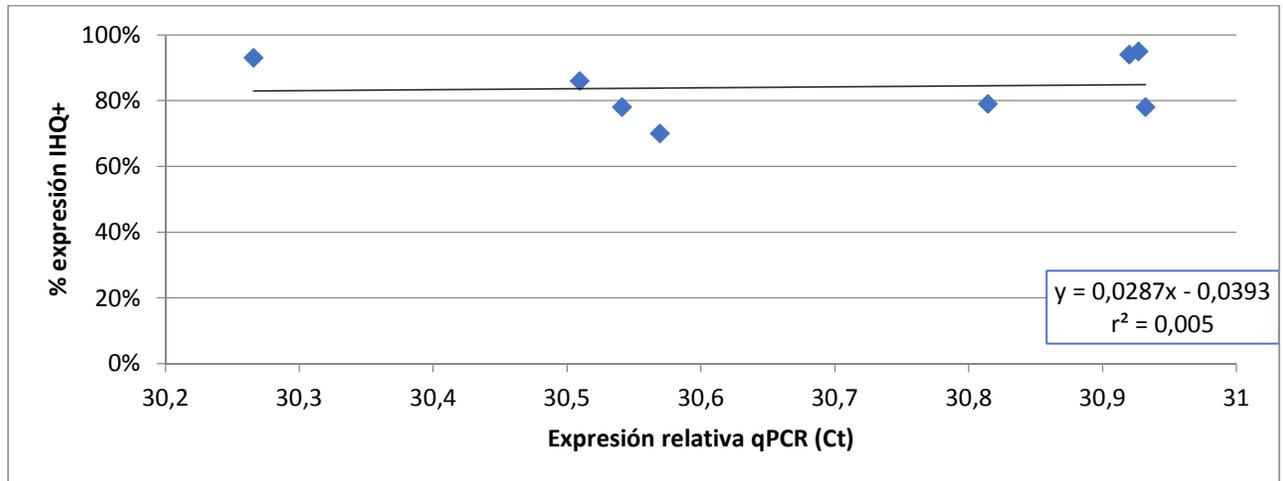
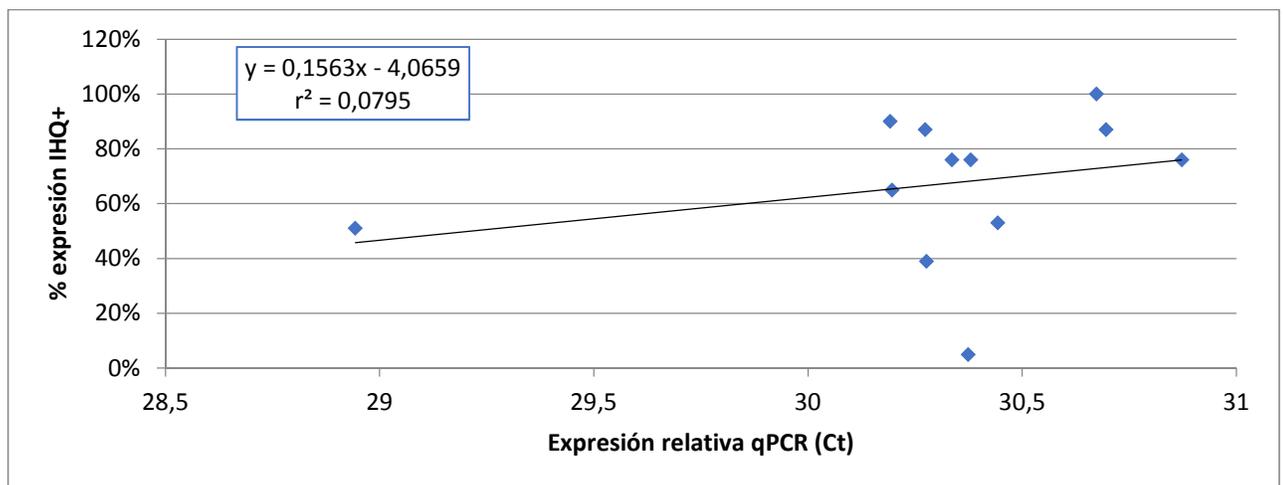
Del total de los casos en que se realizó RT-qPCR, se graficó la media de Ct (*threshold cycle*) de los mRNA de rank, rankl, opg, versus el porcentaje de expresión promedio de RANK, RANKL, OPG, en muestras para inmunohistoquímica para cada caso involucrado en RT-qPCR.

Para la variable expresión relativa de mRNA/expresión de proteínas, se determinó su grado de correlación por coeficiente de Pearson. Sólo rankl/RANKL en los casos de QD se acercó a una correlación entre la expresión de mRNA y proteína ( $r^2$ : 0,788)

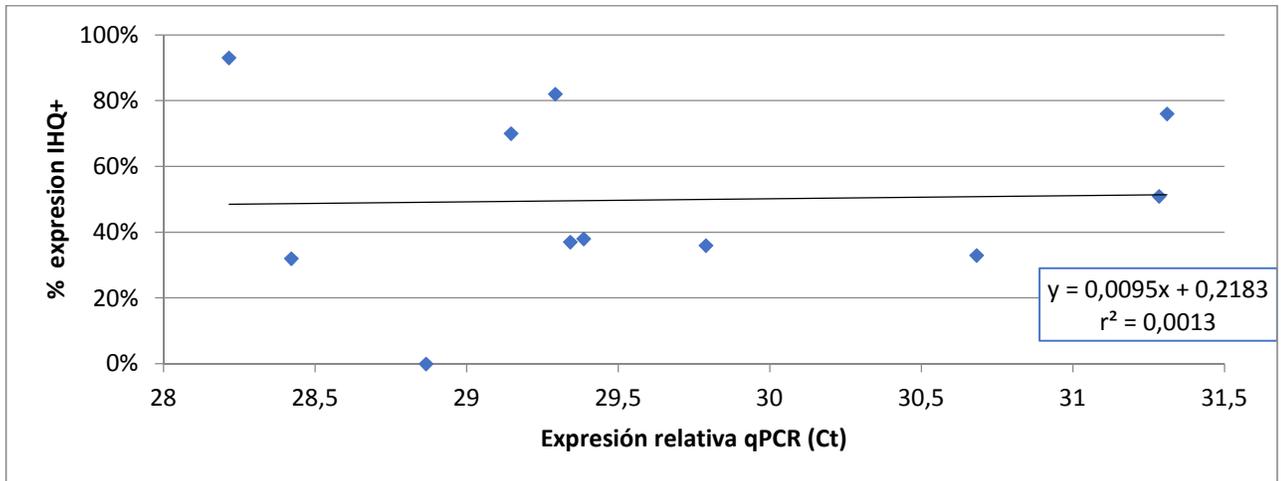
**(Gráfico 11).**

La tabla donde se detallan los resultados de RT-qPCR comparando las muestras de IHQ, se encuentran en el anexo N° 3. A continuación, se muestran los gráficos con la comparación de expresión de mRNA/proteína en los casos involucrados (**4, 5, 6** ameloblastomas; **7, 8, 9** tumor odontogénico queratoquístico; **10, 11, 12** quiste dentígero).

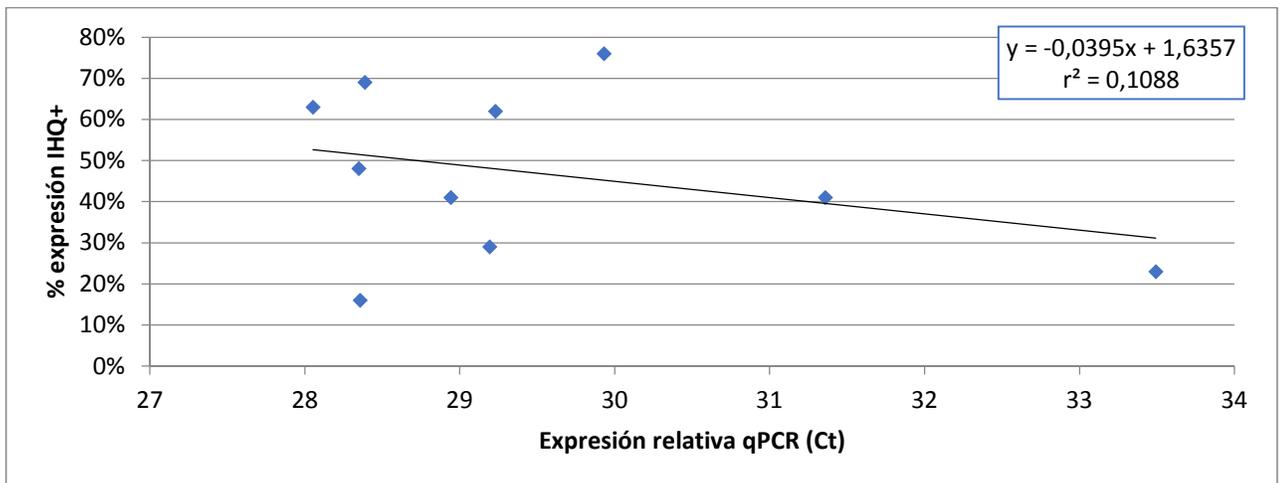
**Gráfico 4. Comparación de rank/RANK en AM****Gráfico 5. Comparación de rankl/RANKL en AM**

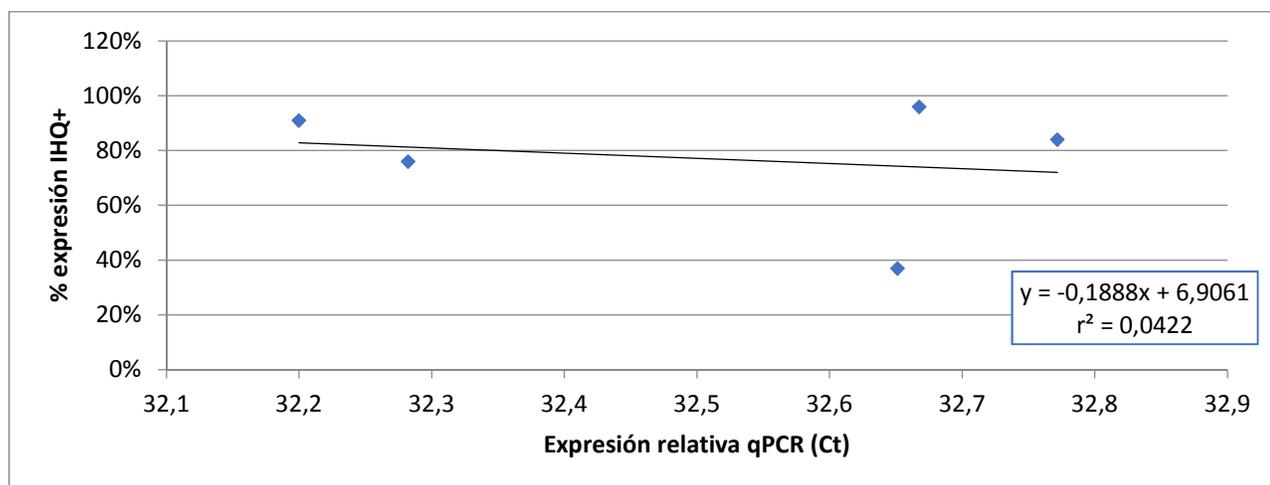
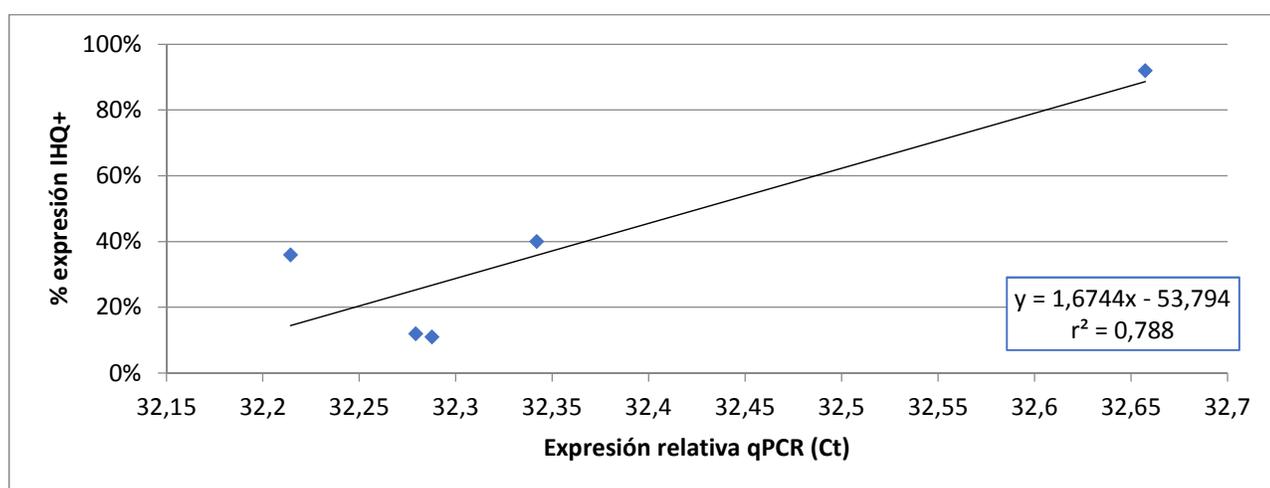
**Gráfico 6. Comparación de opg/OPG en AM****Gráfico 7. Comparación de rank/RANK en TOQ**

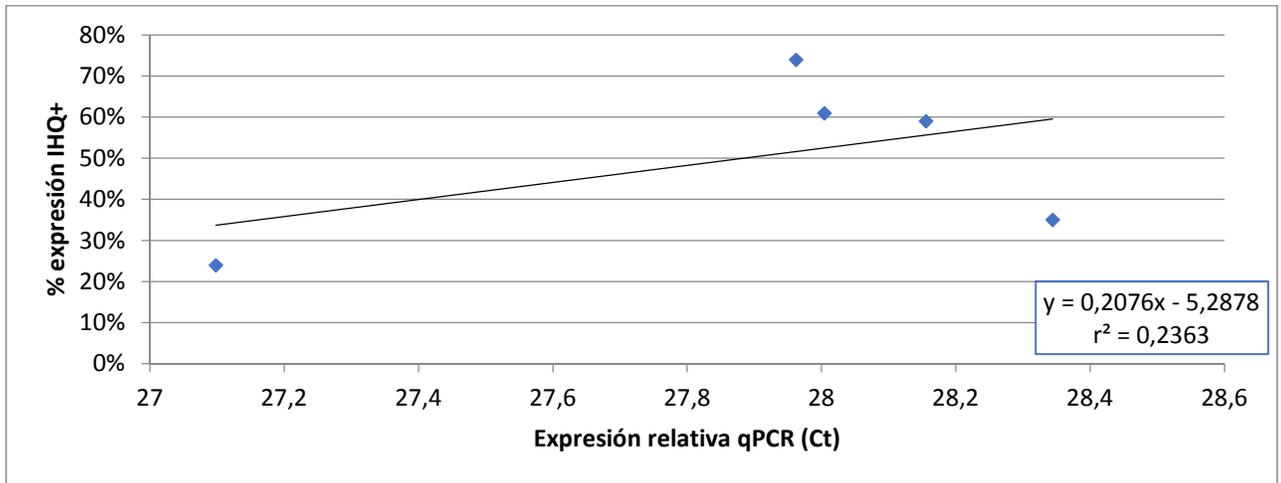
**Gráfico 8. Comparación de rankl/RANKL en TOQ**



**Gráfico 9. Comparación de opg/OPG en TOQ**



**Gráfico 10. Comparación de rank/RANK en QD****Gráfico 11. Comparación de rankl/RANKL en QD**

**Gráfico 12. Comparación de opg/OPG en QD**

#### **V.4 DISTRIBUCIÓN ETARIA Y DE SEXO DE PACIENTES CON AMELOBLASTOMAS, TUMOR ODONTOGÉNICO QUERATOQUÍSTICO Y QUISTE DENTÍGERO**

Del total de pacientes con las tres lesiones en estudio la mediana de edad fue de 23 años con un rango de 7 a 80 años. En el grupo de los ameloblastomas S/M la mediana de edad fue de 27 años con un rango de 16 a 75 años. Los A-U presentaron una mediana de 22 años, con un rango de 8 a 68 años. Los TOQ presentaron una mediana de 26,5 años con un rango de 8 a 80 años, mientras que los QD presentaron una mediana de 13 años con un rango de 7 a 69 años. En la Tabla VIII se muestran los casos agrupados por grupos etarios definidos por la OMS en niños y adolescentes (0-19 años), adultos (20 a 59 años) y adultos mayores (60 años y más).

Se observa que los A-S/M y AU fueron más frecuentes en adultos, mientras que los TOQ y los QD fueron más frecuentes en niños y adolescentes. Al estudiar la distribución por sexo se observa que todas las lesiones fueron más frecuentes en hombres. (Tabla VIII)

**Tabla VIII. Distribución etaria y por sexo de pacientes con ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentífero.**

Lesión en estudio	n	Sexo	Grupo etario años		
		H:M	0 - 19	20 - 59	60 y +
A - S/M	11	7:4	2	6	3
A - U	9	4:5	3	5	1
T O Q	12	7:5	6	4	2
Q D	11	7:4	6	4	1

*A-S/M, ameloblastoma sólido/multiquístico; A-U, ameloblastoma unikuístico; TOQ, tumor odontogénico queratoquístico; QD, quiste dentífero; H, hombre; M, mujer*

La localización anatómica de estas lesiones en los huesos maxilares se muestra en la tabla IX. Los ameloblastomas sólidos y multiquísticos y los tumores odontogénicos queratoquísticos se ubicaron mayoritariamente en la zona mandibular posterior. Los quistes dentíferos se localizaron con mayor frecuencia en la zona maxilar anterior. En un caso de A-U y en uno de QD no se encontraba registrada la ubicación de la lesión. (Tabla IX)

**Tabla IX. Localización anatómica de ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentífero**

Lesión en estudio	n	Localización anatómica				
		Maxilar posterior	Maxilar anterior	Mandíbula anterior	Mandíbula Posterior	Sin información
<b>A - S/M</b>	11	2	1	0	8	0
<b>A - U</b>	9	0	0	0	8	1
<b>T O Q</b>	12	1	2	2	7	0
<b>Q D</b>	11	0	7	1	2	1

*A-S/M, ameloblastoma – sólido/multiquistico; A-U, ameloblastoma uniuquistico; TOQ, tumor odontogénico queratoquístico; QD, quiste dentífero.*

## VI. DISCUSION

El proceso de osteoclastogénesis se ha caracterizado especialmente en relación a la vía de señalización para la diferenciación de osteoclastos, que considera las proteínas RANK, RANKL y OPG, en procesos como osteoporosis o metástasis óseas. Sin embargo, la interacción de las proteínas RANK, RANKL y OPG es menos conocida en relación a lesiones infrecuentes como los tumores odontogénicos, en los cuales es de vital importancia conocer cómo se expresan y cómo interactúan ya que este conocimiento, puede mejorar ostensiblemente la calidad de vida de los pacientes, más aun considerando que ante lesiones de gran capacidad osteodestructiva y capacidad de infiltrar tejidos circundantes, como lo es el ameloblastoma, se requiere de grandes cirugías que involucran la resección de extensos segmentos óseos <sup>(6, 7, 61, 63, 70)</sup>, por lo tanto el nivel de expresión y el grado de equilibrio entre RANK, RANKL y OPG es fundamental para estimar el grado de la capacidad osteolítica que puedan poseer patologías como los tumores odontogénicos <sup>(6, 95, 200)</sup>.

Se han realizado algunos estudios sobre la expresión de RANK, RANKL y OPG en tumores odontogénicos, pero sus resultados son controvertidos, pues se han encontrado diferencias entre el grado de expresión e inmunofenotipo en las células epiteliales;

además que no se han hecho análisis cuantitativos respecto del nivel de expresión de estas proteínas <sup>(6, 7, 27, 94)</sup>.

En la presente investigación, al comparar los índices de marcación inmunohistoquímica de RANK, RANKL y OPG entre las tres lesiones estudiadas, no se observan diferencias significativas, cuando se analiza el patrón de marcación en los distintos estratos del epitelio de ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero, lo que concuerda con investigaciones anteriores <sup>(6,7)</sup>. Sin perjuicio de lo anterior, al estudiar la marcación positiva de las células epiteliales de ameloblastomas, encontramos que RANKL presentó el menor porcentaje versus RANK e inclusive OPG, en comparación a lo expresado en TOQs y QDs. En la investigación de Siar y cols <sup>(121)</sup>, encontraron una baja o nula expresión de RANKL en el 80% de las muestras de ameloblastoma recurrente estudiadas. En ambas investigaciones coincidimos que este hallazgo es algo, aparentemente, inesperado en base a los distintos artículos donde se indica una fuerte inmunoexpresión de RANKL en ameloblastomas y más aún, en que no existen diferencias significativas con otros tumores odontogénicos con comportamiento agresivo local, por ejemplo, el tumor odontogénico queratoquístico <sup>(7)</sup>. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kumamoto y cols <sup>(133)</sup>, quienes reportaron un porcentaje mayor de células inmunopositivas a OPG versus RANKL en ameloblastomas. Coincidimos con Siar en que los bajos niveles de RANKL en ameloblastomas, pueden significar un

comportamiento de inducción/inhibición del estímulo a pre-osteoclastos, que permitiría a las células tumorales tener un crecimiento infiltrativo, lento y así invadir a través de las trabéculas óseas e inducir en forma tardía la osteolisis, lo que ante un tratamiento de enucleación y/o cirugía que alcance solamente los límites radiográficos, favorecería la alta recurrencia que tiene el ameloblastoma. <sup>(61)</sup>.

En esta investigación, se realizó qPCR para cuantificar la expresión de mRNA de rank, rankl y opg en los casos de AM, TOQ y QD. Al analizar sus resultados, no hubo diferencias significativas en la expresión de rank entre AM, TOQ y QD; presencia de diferencia significativa en la expresión de rankl en AM comparado con TOQ y QD y presencia de diferencias significativas en la expresión de opg en casos de QD comparado con TOQ y AM y de TOQ comparado con AM. Al graficar la expresión gen/proteína y aplicar test estadístico de Pearson, se confirma que no existe correlación entre la expresión del gen y la traducción a su proteína. Este hecho se ve con mayor claridad en el caso de la alta expresión de rankl *versus* a la baja inmunoexpresión de RANKL en el caso de AM.

Proponemos que esta diferencia entre los altos niveles de mRNA de rankl y la baja expresión de la proteína al ser evaluada mediante inmunohistoquímica, en el caso específico de ameloblastomas, puede deberse a la activación/supresión de microRNA

(miRNA - MiR) que actúan sobre el mRNA de RANKL. Los miRNA son pequeñas moléculas de RNA no codificante de 19 - 25 nucleótidos aproximadamente, que tienen como función silenciar RNA y regular la expresión post-transcripcional de genes. Los MiR se codifican mediante genes separados que se encuentran a menudo en la parte no codificante del genoma; alrededor de un 30-60% de los genes humanos se prevé que estén sujetos a regulación por miRNA <sup>(210)</sup>. Los MiR interactúan con zonas de secuencia similar, complementarias en la región 3' no traducida de mRNA induciendo la degradación o inhibición del mRNA objetivo; así, juegan un importante rol en la formación de tejidos, desarrollo del cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, entre otras <sup>(209)</sup>. Los MiR se expresan de una manera tejido-específica, por lo tanto, el perfil de MiR es diferente en los distintos tejidos y por ende, su acción es específica según el tejido de origen. Es posible que existan factores inhibidores de MiR intracelulares cuya expresión también podría ser tejido-específica <sup>(210)</sup>. Se han descrito a MiR-17 y 20a, en relación a RANKL y MiR-503, en relación a RANK, proteínas que son inhibidas cuando estos MiR se encuentran sobre expresados <sup>(209)</sup>.

En la investigación de Shi <sup>(211)</sup>, se estudió por Western Blot que MiR-17/20a reducen marcadamente los niveles de RANKL y atenúan su expresión en osteoblastos inducidos por dexametasona. Sus resultados mostraron que MiR-17 y MiR-20a pueden jugar un rol

significativo en la diferenciación y función de osteoclastos inducidos por glucocorticoide, mediando en la expresión de RANKL en osteoblastos.

Chen, y col <sup>(212)</sup>, mostraron evidencia que MiR-503 en PBMC CD14<sup>+</sup> regula la formación de osteoclastos, teniendo como objetivo la disminución de función de RANK. Además, la expresión de MiR-503 en PBMC CD14<sup>+</sup> de mujeres postmenopáusicas, resultan en una osteoclastogénesis acelerada que contribuye a la osteoporosis. Además, la sobreexpresión de MiR-503 *in vivo* inhibe la osteoclastogénesis, previniendo la pérdida ósea.

Una de las limitaciones del presente estudio es la naturaleza de las muestras disponibles, esto es, muestras fijadas en formalina, embebidas en parafina. La cadena de eventos necesarios para llegar finalmente a la observación de la inmunomarcación positiva en inmunohistoquímica y a la expresión relativa de los mRNA en qPCR, le otorga variables a la muestra que no siempre son fáciles de manejar. Las muestras utilizadas en esta investigación, proceden de biopsias tomadas para diagnóstico histopatológico que provienen de distintos centros de atención, las cuales son referidas al servicio de patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estas muestras debiesen ser enviadas fijadas adecuadamente, como por ejemplo con el fijador de rutina que es formalina buffer al 10%, bajo las siguientes recomendaciones: las muestras deben

estar a 4°C en todo tiempo, antes de procesar se debiese esperar el tiempo necesario para que el fijador ingrese en toda la muestra dependiendo de su tamaño, la muestra no puede permanecer en el fijador (formalina buffer a concentración requerida) por más de 72 horas ya que puede producir tinción inespecífica como background <sup>(206)</sup>. Demoras en la fijación o en el enfriamiento conlleva a una reducción de proteínas de alto peso molecular con la concomitante alza de proteínas de bajo peso molecular, sugiriendo recurrencia de proteolisis <sup>(214)</sup>.

La fijación modifica el estado fisicoquímico de tejido, incluyendo los potenciales redox y de membrana y con ello modifica la reactividad de los componentes celulares con la tinción <sup>(213)</sup>. Es por esto, que el proceso de fijación debe proveer un estado lo más adecuado posible del tejido, tal como si estuviese en estado natural <sup>(213)</sup>. La fijación máxima de un tejido ocurre con pH entre 4 y 5.5, no habiendo una mayor estabilidad del tejido por sobre pH 5.5, sino que sólo colaboraría con mayores epítomos bloqueados <sup>(213)</sup>.

O'Leary y cols <sup>(207)</sup>, ha estudiado los efectos en el inmunoreconocimiento luego de la fijación, determinando que en una muestra de ribonucleasa A y tras sólo 30 minutos de incubación en formalina tamponada 10%, el monómero de 14.4KDa se transformó en dímeros, trímeros y oligómeros superiores. El número de estos disminuyó al calentar la muestra, esto apoya el uso de la recuperación de antígeno para recuperar el

inmunoreconocimiento <sup>(207)</sup>. El grado de alteración de los epítomos producida por el formol es directamente proporcional a la duración de la fijación, de tal manera que, para conseguir una óptima fijación y preservación antigénica, las biopsias pequeñas deberían fijarse no menos de 4 horas ni más de 8 horas y las muestras grandes, al menos 8 horas y no más de 24 horas. Es importante mencionar, que la fijación debe ser inmediata para evitar la proteólisis del tejido <sup>(216)</sup>.

Un problema que surge al fijar las muestras en formalina es la fragmentación del ácido nucleico. Como ya fue mencionado, la fijación produce un alto número de enlaces cruzados de todos los componentes del tejido, y así los ácidos nucleicos sufren una considerable fragmentación. La extensión de la fragmentación depende del tipo de tejido y de las condiciones de fijación <sup>(208)</sup>. Esto supone una complicación para realizar ensayos como qPCR, ya que esos cortes pueden estar ubicados en el exón del gen que se quiera estudiar. Evers y col <sup>(215)</sup>, determinaron la cantidad de pares de bases en un análisis de RNA usando un modelo de mRNA (RNA unido a perlas magnéticas oligo (dT) conjugadas. El modelo de RNA forma amplicones de al menos 1550pb, al pasar por todas las etapas de procesamiento histológico, excepto la inclusión en parafina caliente. A diferencia del modelo que, si lo hizo, obteniendo solamente amplicones de 750pb. La qPCR sugirió una disminución de 1400 veces o más en el RNA amplificado cuando se comparó con el control <sup>(215)</sup>. Comparado con las etapas de procesamiento que anteceden

a la inclusión de las muestras en parafina, estas muestras producen RNA de alto peso molecular y agregados insolubles. qPCR de RNA parafinado, sugirió por lo menos una disminución de 10 a 160 veces del RNA amplificable, comparado con el control <sup>(215)</sup>. Evers y col sugieren como medio de fijación y almacenaje de tejido a *HOPE* (*HEPES-glutamic acid buffer-mediated organic solvent protection effect*). Este método utiliza alcohol para fijar, omitiendo la formalina y usa formalina de baja temperatura (aproximadamente 52°C). Así, ellos observaron una aparente no formación de enlaces cruzados en RNA, mejor calidad de RNA en relación a la menor temperatura de la parafina <sup>(215)</sup>. Aspecto que se puede considerar en futuros estudios.

Resumiendo, los resultados no correlacionados entre las muestras sometidas a qPCR, versus a IHQ, sugiere que existen múltiples factores que intervienen entre la generación de ese mRNA que traducirá en una proteína funcional, estos factores pueden ser:

- Regulación post-transcripcional mediante MiR, almacenamiento de la proteína producida, degradación por nucleasas o proteasas.
- Procesamiento histológico
- Interacción entre las proteínas estudiadas, por ejemplo, OPG actúa como señuelo para RANKL, por lo que su identificación posterior mediante inmunohistoquímica no sería posible del todo.

Respecto a la inmunomarcación nuclear de RANKL en células epiteliales obtenidas en esta investigación, pudimos observar una diferencia respecto a la investigación de Da Silva <sup>(6)</sup> y Tekkesin <sup>(7)</sup>, quienes estudiando lesiones similares a las de esta investigación; encontraron que RANKL se presentó en citoplasma y membrana citoplasmática, al contrario de De Matos y col <sup>(95)</sup> quienes estudiaron A-S/M, TOQ y QD, encontraron una positividad de RANKL en núcleo y citoplasma, concordando con nuestros resultados. La presentación nuclear de RANKL, no tan sólo se ha registrado en lesiones de origen odontogénico, sino también en el desarrollo de la articulación temporomandibular (ATM). Carda y cols (163), estudiaron la expresión de rankl/RANKL y opg/OPG por qPCR e inmunohistoquímica en muestras de ATM fetal, con un desarrollo entre las semanas 16 y 21, obtenidos por autopsias. Los resultados de inmunohistoquímica indicaron alta positividad en núcleos de condrocitos hipertróficos del cartílago articular. Así también Brown y col, 2001 <sup>(164)</sup>, registraron positividad nuclear de RANKL en muestras de metástasis de cáncer prostático.

En esta investigación, al analizar la distribución etaria y de sexo de pacientes con ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero, podemos observar que el grupo de AM es más frecuente en pacientes hombres, adultos con una mediana de edad de 27 años para los casos de A-S/M y de 22 años para A-U, cuyas lesiones se ubicaron principalmente en la región mandibular posterior. Estos resultados

no están de acuerdo con los reportados por Ochsenius y col <sup>(89)</sup> respecto al sexo de los pacientes, quienes reportaron una mayor cantidad de casos en pacientes mujeres, pero si están de acuerdo respecto a la ubicación anatómica con una mayor cantidad de casos ubicados en la región posterior de la mandíbula. Siar y col <sup>(121)</sup> reportaron 15 casos de ameloblastoma recurrente, con mayor número de pacientes hombres, con una mediana de 29 años. Los resultados de Mosqueda <sup>(115)</sup>, no indican preferencia por sexo en la presentación de los casos de ameloblastomas, manteniéndose la mayor cantidad de casos en la región mandibular posterior.

En la presente investigación, los casos de TOQ y QD se presentaron mayoritariamente en pacientes niños y adultos, hombres, con una mediana de edad de 26,5 años para TOQ y de 13 años para QD. Respecto a la localización anatómica, TOQ se ubicó preferentemente en región mandibular posterior y QD en región maxilar anterior. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Ochsenius <sup>(87)</sup> y Tekkesin <sup>(7)</sup>.

Por los antecedentes descritos y los resultados obtenidos, se entiende que se requiere de una mayor comprensión de la compleja interacción de los factores involucrados en la osteoclastogénesis en tumores y quistes con origen en epitelio odontogénico. La incorporación del análisis de mRNA por qPCR, entrega una mejor visión de lo visto hasta ahora respecto al estudio del complejo RANK-RANKL-OPG realizado hasta el

momento principalmente por IHQ, en tumores odontogénicos y quistes dentígeros. Es necesario expandir el estudio de los factores que intervienen en el desarrollo de lesiones benignas, pero tan agresivas como lo es el ameloblastoma, a otros factores que intervienen en la regulación de RANK/rank - RANKL/rankl - OPG/opg, como lo son los micro-RNA y de esta manera, obtener finalmente un tratamiento específico menos agresivo, que aumente la sobrevida y calidad de vida de los pacientes que padecen alguna de las lesiones estudiadas en esta investigación.

## VII. CONCLUSIONES

1. En los ameloblastomas las proteínas RANK, RANKL y OPG se localizaron principalmente en el estrato basal del epitelio neoplásico. Mientras que en tumor odontogénico queratoquístico y en quistes dentígeros RANK, RANKL y OPG se localizaron tanto en estrato basal como estratos superiores.
2. La proteína RANKL se localizó principalmente en núcleo y en citoplasma en ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero, mientras que las proteínas RANK y OPG se localizaron principalmente en citoplasma.
3. No se observó diferencias en el porcentaje de células que expresaron las proteínas RANK, RANKL y OPG en ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero.
4. Los ameloblastomas presentaron mayor nivel de expresión de mRNA de rankl que tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero.

5. No se observó correlación entre la expresión de RANK, RANKL y OPG con los niveles de expresión de sus respectivos mRNA en ameloblastomas, tumor odontogénico queratoquístico y quiste dentígero al comparar inmunohistoquímica con qPCR.
  
6. Los ameloblastomas se presentaron principalmente en adultos, mientras que los tumores odontogénicos queratoquístico y quistes dentígeros se presentaron principalmente en niños y adolescentes. No hubo diferencias por sexo entre estas lesiones.
  
7. Los ameloblastomas y los tumores odontogénicos queratoquísticos se localizaron principalmente en zona mandibular posterior, mientras que los quistes dentígeros se localizaron principalmente en zona maxilar anterior.

## VIII. SUGERENCIAS

La combinación de las técnicas de inmunohistoquímica y RT-qPCR, permite un significativo avance en el conocimiento sobre la interacción de RANK, RANKL, OPG, desde un punto de vista de su forma mRNA y proteica en relación a lesiones de origen odontogénico. Los resultados de esta investigación permiten proyectar lo que puede suceder desde la expresión de mRNA hasta la expresión de las proteínas que tienen relación con la reabsorción ósea. Sin perjuicio de lo anterior, el hecho de haber observado la ausencia de correlación entre la expresión de rankl/RANKL en casos de ameloblastomas, aumenta la necesidad de realizar una mayor investigación de los factores relacionados con la actividad osteolítica de este tipo de tumor odontogénico y así también, extender estos futuros estudios a otras lesiones con similar origen.

Por lo anterior, se sugiere que se puedan realizar otras técnicas para estudiar tanto aspectos genómicos como proteicos, que se relacionen con la actividad osteolítica en lesiones de origen odontogénicos, a saber:

- RT-qPCR, para detección de expresión de microRNA
- FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)
- Proteómica
- Western Blot
- Inmunofluorescencia

## IX. RESUMEN

Los tumores odontogénicos (TO) generalmente se comportan como lesiones benignas y tienen en su mayoría una causa desconocida. En este grupo de tumores destacan por su invasividad local y frecuencia los ameloblastomas (AM) y los tumores odontogénicos queratoquísticos (TOQ). Se describen 4 tipos de ameloblastomas, siendo los más frecuentes: Ameloblastoma Sólido/Multiquístico (A-S/M) y el Ameloblastoma Uniquístico (A-U). Tanto los ameloblastomas sólidos y uniquísticos como el TOQ son lesiones epiteliales de origen odontogénico de crecimiento lento, localmente invasivo y principalmente intraóseos por lo que requieren interactuar con el hueso adyacente para su crecimiento. Por otro lado, el quiste dentígero (QD) es una patología común en los huesos maxilares y de baja agresividad. Por lo tanto, el crecimiento de estos tumores y quistes podría involucrar cambios en los niveles de expresión de las proteínas involucradas en la formación y reabsorción ósea: receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK), ligando de RANK (RANKL) y osteoprotegerina (OPG).

En este estudio se comparó la distribución y niveles de expresión de RANK, RANKL y OPG mediante inmunohistoquímica y expresión de mRNA de rank, rankl y opg mediante RT-qPCR en casos con diagnóstico de A-S/M, A-U, TOQ y QD.

La inmunomarcación de RANK, RANKL y OPG fue observada en todas las lesiones estudiadas, no encontrando diferencias significativas entre ellas, teniendo en general una distribución basal y parabasal. La inmunomarcación de RANKL tuvo un porcentaje menor en los casos de AMs, al compararlos con TOQ y QD. El patrón de marcación de RANKL fue predominantemente nuclear en todas las muestras, mientras que RANK y OPG tuvo una marcación preferentemente citoplasmática.

Se observaron diferencias significativas en la expresión de rankl entre los casos de AMs, en comparación con TOQ y QD. De manera similar, los niveles de opg fueron mayores en QD comparado con TOQ y AMs y al comparar TOQ con AMs.

Al comparar los resultados obtenidos por IHQ versus RT-qPCR, se observó la ausencia de correlación positiva entre la expresión de mRNA/proteína de las moléculas estudiadas. Además se observó que el sexo de los sujetos estudiados no fue determinante en la distribución de estas lesiones considerando la variable sexo de los pacientes. AMs se presentó preferentemente en pacientes adultos, mientras que TOQ y QD se presentó principalmente en niños y adolescentes. Tanto los casos de AMs y TOQ, se presentaron preferentemente en la región mandibular posterior, mientras que los casos de QD, su ubicación preferente fue de maxilar anterior.

Los resultados de esta investigación permiten sugerir que es necesario expandir el análisis de los factores que intervienen en la patogénesis y desarrollo de lesiones benignas, pero con comportamiento agresivo como lo son los tumores y quistes de origen odontogénico, estudiando la regulación de RANK/rank - RANKL/rankl - OPG/opg, y de esta manera, obtener finalmente un tratamiento específico menos agresivo, que aumente la sobrevida y calidad de vida de los pacientes que padecen alguna de las lesiones estudiadas en esta investigación.

## X. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Kohli S.S, Kohli V.S. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. Indian J Endocrinol Metab. 2011Jul-Sep; 15(3): 175-181
2. Eriksen E. Cellular mechanisms of bone remodeling. Rev Endocr Metab Disord 2010 11:219–227
3. Boyce B F, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch Biochem Biophys. 2008 May 15; 473(2): 139–146
4. Delgado-Calle J, Sañudo C, Sumillera M, Garcés CM, Riancho JA. Expresión de RANKL y OPG en osteoblastos primarios. Rev Osteoporos Metab Miner 2012 4; 4:133-139
5. Graham J M, Ayati B P, Ramakrishnan P S, Martin J A. towards a new spatial representation of bone remodeling. Math Biosci Eng. 2012 April; 9(2): 281–295

6. Da Silva T A, Carvalho A, Mendonça E, Rodriguez C, Fukada S, Queriroz F. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105:333-41
7. Tekkesin M S, Mutlu S, Olgac V. The Role of RANK/RANKL/OPG Signalling Pathways in Osteoclastogenesis in Odontogenic Keratocysts, Radicular Cysts, and Ameloblastomas. *Head and Neck Pathol* (2011) 5:248–253
8. Ferrer C J, Tovar I, Martínez P. Osteoprotegerina y Sistema RANKL/RANK: ¿el futuro del metabolismo óseo? *An Med Interna (Madrid)* 2002; 19: 385-388
9. Zhong Y, Guo W, Wang L, Chen X. Molecular markers of tumor invasiveness in ameloblastoma: An update. *Ann Maxillofac Surg* 2011; 1:145-9
10. Wang Y P, Liu B Y. High Expression of Osteopontin and CD44v6 in Odontogenic Keratocysts. *J Formos Med Assoc* 2009;108(4):286–292

11. Yasuda H, et al. Identity of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) and Osteoprotegerin (OPG): A Mechanism by which OPG/OCIF Inhibits Osteoclastogenesis in Vitro. *Endocrinology* 1998; 139:1329–1337
12. Simonet W S, et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 1997, Vol. 89, 309–319, April 18
13. Wright H L, et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* (2009) 2:56–64
14. Kearns A E, Khosla S, Kostenuik P. Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocr Rev.* Apr 2008; 29(2): 155–192
15. Riancho J A, Delgado-Calle J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatol Clin.* 2011;7(S2):S1–S4
16. Akatsu T. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor Exhibits Hypocalcemic Effects in Normal Mice and in Hypercalcemic Nude Mice Carrying Tumors Associated with Humoral Hypercalcemia of Malignancy. *Bone* 1998; 23:495– 498

17. Hakeda Y, et al. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) Directly Inhibits Bone-Resorbing Activity of Isolated Mature Osteoclasts. *Biochemical and biophysical research communications* 1998; 251, 796–801
18. Burgess T, et al. The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts. *The Journal of Cell Biology* 1999, Vol 145, Num 3, May 3, 527-538
19. Akatsu T, et al. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor Suppresses Osteoclast Survival by Interfering in the Interaction of Stromal Cells with Osteoclast. *Biochemical and biophysical research communications* 1998; 250,229–234
20. Lacey D L, et al. Osteoprotegerin Ligand Modulates Murine Osteoclast Survival *in Vitro* and *in Vivo*. *American Journal of Pathology* 2000, Vol. 157, No. 2, August
21. O'Brien E A, Williams J H H, Marshall M J. Osteoprotegerin Ligand Regulates Osteoclast Adherence to the Bone Surface in Mouse Calvaria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 274, 281–290

22. O'Brien E A, Williams J H H, Marshall M J. Osteoprotegerin Is Produced When Prostaglandin Synthesis Is Inhibited Causing Osteoclasts to Detach from the Surface of Mouse Parietal Bone and Attach to the Endocranial Membrane. *Bone* 2001; 28:208–214
23. Wong B R, et al. TRANCE (Tumor Necrosis Factor [TNF]-related Activation-induced Cytokine), a New TNF Family Member Predominantly Expressed in T cells, Is a Dendritic Cell-specific Survival Factor. *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press 1997. Vol 186, Num 12, December 15, 2075–80
24. Chambers T J. The pathobiology of the osteoclast. *J Clin Pathol* 1985; 38:241-252
25. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed Standard Nomenclature for New Tumor Necrosis Factor Family Members Involved in the Regulation of Bone Resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15:2293–2296
26. Boyce B F, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy* 2007, 9(Suppl 1): S1

27. Tay JYY, Bay BH, et al. Identification of RANKL in Osteolytic Lesions of the Facial Skeleton. *J Dent Res* 2004;83(4)
28. Takahashi N, Maeda K, et al. Regulatory Mechanism of Osteoclastogenesis by RANKL and Wnt Signals. *Frontiers in Bioscience* 2011;16,21-30, January 1
29. Yasuda H, Shima N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Cell Biology* 1998; Vol. 95, pp. 3597–3602
30. Lacey DL, Timms E, et al. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* 1998, Vol. 93, 165–176, April 17
31. Wong B R, Rho J, et al. TRANCE Is a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Receptor Family That Activates c-Jun N-terminal Kinase in T Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; Vol. 272, No. 40, Issue of October 3, 25190–94
32. Schneeweis L, Willard D, Milla M. Functional Dissection of Osteoprotegerin and Its Interaction with Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand. *The Journal of Biological Chemistry* 20015; VOL. 280, NO. 50, pp. 41155–41164, December 16

33. Anderson DM, Maraskovsky E, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Letters to Nature* 1997; Vol 390: November 13
34. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE Is Necessary and Sufficient for Osteoblast-mediated Activation of Bone Resorption in Osteoclasts. *J. Exp. Med.*The Rockefeller University Press 1998; Vol 188, Num 5, September 7, 997–1001
35. Tomoyasu A, Goto M, et al. Characterization of Monomeric and Homodimeric Forms of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;245, 382–387
36. Mizuno A, Amizuka N, et al. Severe Osteoporosis in Mice Lacking Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 1998;247, 610–615
37. Udagawa N, Takahashi N, et al. The Bone Marrow-Derived Stromal Cell Lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 Support Osteoclast-Like Cell Differentiation in Cocultures with Mouse Spleen Cells. *Endocrinology* 1989; 125:1805-1813

38. Takahashi N, Akatsu T, et al. Osteoblastic Cells Are Involved in Osteoclast Formation. *Endocrinology* 1988; 0013-7227, 2600-02
39. Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). *Molecular Medicine Reports* 2015;11: 3212-3218
40. Fata J, Kong YY, et al. The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. *Cell* 2000; Vol. 103, 41–50, September 29
41. Kim NS, Kim HJ, et al. Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand Regulates the Proliferation of Mammary Epithelial Cells via Id2. *Molecular and Cellular Biology* 2006; Feb, P. 1002–13
42. Chen G, Sircar K, et al. Expression of RANKL/RANK/OPG in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer as Markers of Disease Stage and Functional Regulation. *Cancer* 2006; 107:289–98

43. Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *European Journal of Endocrinology* 1999;141 195–210.
44. Masuda M, Yageta M, et al. The Tumor Suppressor Protein TSLC1 Is Involved in Cell-Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:31014-19.
45. Sekine S, Sato S, et al.  $\beta$ -Catenin Mutations Are Frequent in Calcifying Odontogenic Cysts, but Rare in Ameloblastomas. *American Journal of Pathology* 2003; Vol. 163, No. 5, November
46. Cabay RJ. An Overview of Molecular and Genetic Alterations in Selected Benign Odontogenic Disorders. *Arch Pathol Lab Med.* 2014; 138:754–758
47. Pastorino L, Pollio A, Pellacani G, Guarneri C, GhiorzoP, et al. Novel PTCH1 Mutations in Patients with Keratocystic Odontogenic Tumors Screened for Nevroid Basal Cell Carcinoma (NBCC) Syndrome. *PLoS ONE* 2012;7(8): e43827
48. Agaram NP, Collins BM, et al. Molecular Analysis to Demonstrate That Odontogenic Keratocysts Are Neoplastic. *Arch Pathol Lab Med.* 2004; 128:313–317

49. Grachtchouk M, Liu J, Wang A, et al. Odontogenic Keratocysts Arise from Quiescent Epithelial Rests and Are Associated with Deregulated Hedgehog Signaling in Mice and Humans. *The American Journal of Pathology* 2006; Vol. 169, No. 3, September
50. Joshi P, Deshmukh V, Golgire S. Gorlin-Goltz syndrome. *Dent Res J (Isfahan)* 2012; Jan-Mar; 9(1): 100–106
51. Hassanein A, Glanz SM, Kessler HP, Eskin TA, Liu C.  $\beta$ -Catenin Is Expressed Aberrantly in Tumors Expressing Shadow Cells. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:732-736
52. Ahn SG, Kim SA, Kim SG, Lee SH, Kim J, Yoon JH. Beta-catenin gene alterations in a variety of so-called calcifying odontogenic cysts. *APMIS* 2008 Mar; 116(3):206-11
53. Heikinheimo K, Jee KJ, Niini T, Aalto Y, Happonen RP, Leivo I, Knuutila S. Gene expression profiling of ameloblastomas and human tooth germ by means of a cDNA microarray. *J Dent Res.* 2002 Aug; 81(8):525-30

54. Qian Y, Huang HZ. The role of RANKL and MMP-9 in the bone resorption caused by ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2010; 39:592–98
55. De Oliveira Ramos G, Costa A, Meurer MI, Vieira DS, Rivero ER. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinases (1, 2, and 9), Ki-67, and myofibroblasts in keratocystic odontogenic tumors and pericoronal follicles. *J Oral Pathol Med* 2014 Apr;43(4):282-8
56. Zhang B, Zhang J, Xu ZY, Xie HL. Expression of RECK and matrix metalloproteinase-2 in ameloblastoma. *BMC Cancer* 2009, 9:427
57. Farias LC, Gomes CC, et al. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinase expression in ameloblastomas. *BMC Clinical Pathology* 2012, 12:11
58. Ribeiro BF, Iglesias DP, Nascimento GJ, Galvao HC, Medeiros AM, Freitas RA. Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Diseases* 2009;15,472–477
59. Heikinheimo K, et al. Genetic Changes in Sporadic Keratocystic Odontogenic Tumors(Odontogenic Keratocysts). *J Dent Res* 2007;86(6):544-549

60. Valentine JC, Nelson BL. Central Giant Cell Lesion. *Head and Neck Pathol* 2011; 5:385–388
61. Hertog D, Bloemena E, Aartman IHA, Van-der-Waal I. Histopathology of ameloblastoma of the jaws; some critical observations based on a 40 years single institution experience. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Jan 1;17 (1):e76-82
62. Keun Lee S, Sook Kim Y. Current Concepts and Occurrence of Epithelial Odontogenic Tumors: I. Ameloblastoma and Adenomatoid Odontogenic Tumor. *The Korean Journal of Pathology* 2013; 47: 191-202
63. Neville B, Damm D, Allen C, Chi A. *Oral and Maxillofacial Pathology* 4<sup>th</sup> edition. Elsevier 2016. ISBN: 978-1-4557-7052-6
64. Barnes L., Everson J.W, Reichart P., Sidransky D. (Eds): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press: Lyon 2005.

65. Wada T, Nakashima T, Nishina H, Penninger J. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.12 No.1 January 2006
66. Shahidi Sh, Bronoosh P, Daneshbod Y. Follicular Ameloblastoma Presenting as a Sinonasal Tumor. *Iran Red Crescent Med J* 2012; 14(2):113-116
67. Cavalieri C, Pires A, GonÇalves M, Santiago R. Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med* (2010) 39:585–591
68. Ricci M, Mangano F, Tonelli P, Barone A, Galletti C, Covani U. An unusual case of unicystic intramural ameloblastoma and review of the literature. *Contemporary Clinical Dentistry*, September 2012; Vol 3, Supplement 2
69. Gowdara Prakash Smitha et al., Immunohistochemistry of Solid/ Multicystic ameloblatoma and Unicystic ameloblastoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016 May, Vol-10(5): ZC52-ZC57

70. Chae MP, Smoll NR, Hunter-Smith DJ, Rozen WM. Establishing the Natural History and Growth Rate of Ameloblastoma with Implications for Management: Systematic Review and MetaAnalysis. PLoS ONE 2015;10(2): e0117241
71. Rameshet al.: Unicystic ameloblastoma of the mandible - an unusual case report and review of literature. Head & Neck Oncology 2010; 2:1
72. Morgan PR. Odontogenic tumors: a review. Periodontology 2000 (2011); Vol. 57, 160–176.
73. MacDonald DS. Keratocystic odontogenic tumour: systematic review. Dentomaxillofacial Radiology (2011) 40,1–23
74. Madras J, Lapointe H. Keratocystic Odontogenic Tumour: Reclassification of the Odontogenic Keratocyst from Cyst to Tumour. JCDA March 2008, Vol. 74, No.
75. Selvi F, Tekkesin MS, et al. Keratocystic Odontogenic Tumors: Predictive Factors of Recurrence by Ki-67 and AgNOR Labelling. Int. J. Med Sci 2012; 9(4):262-268

76. Pazdera J, Kolar Z, Zboril V, Tvrdy P, Pink R. Odontogenic keratocysts/keratocystic odontogenic tumours: biological characteristics, clinical manifestation and treatment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014 Jun; 158(2):170-174
77. Garg K, Chandra Sh, RajV, Fareed W, Zafar M. Molecular and genetic aspects of odontogenic tumors: a review. *Iran J. Basic Med Sci* 2015; 18:529-536
78. Guruprasad Y, Chauhan DS, Kura U. Infected Dentigerous Cyst of Maxillary Sinus Arising from an Ectopic Third Molar. *J Clin Imaging Sci* 2013; 3:7
79. Ciulli E, et al. Maxillary Cyst: Description of a Clinical Case. *ORAL & Implantology - Anno II - N. 2/2009*
80. Jeon JH, et al. Bilateral dentigerous cysts that involve all four dental quadrants: a case report and literature review. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2016; 42:123-126
81. Devi P, Thimmarasa VB, Mehrotra V, Agarwal M. Multiple Dentigerous Cysts: A Case Report and Review. *J. Maxillofac. Oral Surg.* (2015) 14(Suppl 1): S47–S51

82. Farhadi S, Shahsavari F, Davardan M. The Possible Role of Mast Cells in the Odontogenic Cyst's Pathogenesis: A Comparative Study between Dentigerous Cyst and Keratocystic Odontogenic Tumor. *Pathology Research International* Volume 2016, Article ID 8754567
83. Pin Lin H, et al. A clinicopathological study of 338 dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* (2013) 42:462–467
84. Benn A, Altini M. Dentigerous cysts of inflammatory origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;81:203-9
85. Ledesma C, Hernandez JC, Garcés M. Clinico-Pathologic Study of Odontogenic Cysts in a Mexican Sample Population. *Archives of Medical Research* 31 (2000) 373–376
86. Shear M, Speight P. *Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions* 4<sup>th</sup> edition. Shear & Speight 2007.
87. Ochenius G, Escobar E, Gody L, Peñafiel C. Quistes odontogénicos: Análisis de 2.944 casos de Chile. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12: E85-91

88. Vazques DJ, Gandini PC, Carvajal EE. Quiste dentígero: diagnóstico y resolución de un caso. Revisión de la literatura. Av. Odontoestomatol 2008; 24 (6): 359-364
89. Ochenius G, Ortega A, Gody L, Peñafiel, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. J Oral Pathol Med 2002;31:415–20
90. Spinit R, et al. Quiste dentígero. Reporte de un caso. Arch Argent Pediatr 2016;114(5): e338-e342
91. Hervé S, Conessa C, Chollet O, Poncet JL. Quistes del maxilar. EMC – Otorrinolaringología 2004;33(1):1-8.
92. De Vicente Rodríguez JC, López-Arranz J. Quistes de los maxilares. In Suárez Nieto C. Tratado de Otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. 2.<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: Panamericana; 2008; Págs.3689-706
93. Pina Godoy G, Silveira EJD, Gordón-Nuñez M, Guedes Queiroz L, Dantas Gomes D. Quistes de los maxilares en niños: un análisis clínico. Acta Odontol Venez2007: 45(4): 1-7

94. Andrade F, et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:548-55)
95. De Matos F, de Moraes M, et al. Immunohistochemical Detection of Receptor Activator Nuclear  $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin in Odontogenic Cysts and Tumors. *J Oral Maxillofac Surg* 2013; 71:1886-1892
96. Ruhin B, et al. Facts and Hypothesis on Osteolytic Lesions Related to Normal and Tumoral Epithelial Dental Cell Differentiation. *Bone Cancer, Progression and Therapeutic Approaches*, Edited by: Dominique Heymann. chapter 7, 2010. ISBN: 978-0-12-374895-9
97. Chaisuparat, et al. Activation of the Akt/mTOR pathway in dentigerous cysts, odontogenic keratocysts, and Ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 116:336-342
98. Mosqueda A. New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Sep 1;13(9):E555-8

99. Premalatha B R, Patil S, Rao R S, Reddy N P, Indu M. Odontogenic Tumor Markers - An Overview. *J Int Oral Health* 2013; 5(2):59-69
100. Duvina M, et al. Biochemical markers as predictors of bone remodelling in dental disorders: a narrative description of literature. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2012; 9(2): 100-106
101. De Souza AP, et al. Jaw and Long Bone Marrows Have a Different Osteoclastogenic Potencial. *Calcif Tissue Int* (2011) 88:63–74
102. Plotkin L, Bivi N. Local Regulation of Bone Cell Function. *Basic and Applied Bone Biology* 2014, pages 47-73.
103. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* (2010) 11:219–227
104. Soltanoff CS, Chen W, Yang S, Li YP. Signaling Networks that Control the Lineage Commitment and Differentiation of Bone Cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009; 19(1): 1–46

105. Hikita A, et al. Negative Regulation of Osteoclastogenesis by Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand. *The Journal Of Biological Chemistry* December 1, 2006; Vol. 281, No. 48, Pp. 36846–36855
106. Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. Immunohistochemical Localization of Receptor Activator of Nuclear Factor KappaB (RANK) and its Ligand (RANKL) in Human Deciduous Teeth. *Calcif Tissue Int* 2002; 71:45-52
107. Weege C, et al. Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Archives of Oral Biology* 57 2012; 230-237
108. Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. Characterization and management of the keratocystic odontogenic tumor in relation to its histopathological and biological features. *Oral Oncology* 46 (2010) 219–225
109. Shetty DC, Urs AB, Godhi S, Gupta S. Classifying odontogenic keratocysts as benign cystic neoplasms: a molecular insight into its aggressiveness. *J Maxillofacial Oral Surg* 2010; 9. (1): 30-34

110. Sandra F, et al. Ameloblastom induces osteoclastogenesis: a possible role of ameloblastoma in expanding in the bone. *Oral Oncology* 2005; 41,637–644
111. Mahadesh J, et al. Unicystic ameloblastoma with diverse mural proliferation - a hybrid lesion. *Imaging Science in Dentistry* 2011; 41 : 29-33
112. Lau SL, Samman. Recurrence related to treatment modalities of unicystic ameloblastoma: a systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2006; 35: 681 – 690
113. Bachmann AM, Linfesty R. Ameloblastoma, Solid/Multicystic Type. *Head and Neck Pathol* (2009) 3:307–309
114. Fregnani ER, et al. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2010 ;39: 145–149
115. Ledesma C, Mosqueda A, et al. Ameloblastomas: a regional Latin-American multicentric study. *Oral Diseases* (2007) 13, 303–307

116. Migaldi M, Sartori G, Rossi G, Cittadini A, Sgambato A. Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma. *Oral Oncology* (2008)44, 50–6
117. Li Y, Han B, Li LJ. Prognostic and proliferative evaluation of ameloblastoma based on radiographic boundary. *International Journal of Oral Science* (2012) 4,30–33
118. De Silva I, Rozen WM, Ramakrishnan A, Mirkazemi M, Baillieu C, et al. Achieving Adequate Margins in Ameloblastoma Resection: The Role for Intra-Operative Specimen Imaging. Clinical Report and Systematic Review. *PLoS ONE* 7(10) 2012: e47897
119. Sathi GSA, et al. Stromal cells promote bone invasion by suppressing bone formation in ameloblastoma. *Histopathology* 2008; 53,458–467
120. Iakavou M, et al. A comparative study of bone remodeling molecules expression in different types of jaw ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2015 Aug; 44(7):543-51

121. Siar Ch, et al. RANK, RANKL, and OPG in recurrent solid/multicystic ameloblastoma: their distribution patterns and biologic significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2015; 119:83-91
122. Motta do Canto A, Rodrigues J, et al. Immunohistochemical biomarkers in ameloblastomas, *Acta Odontologica Scandinavica* 2016, 74:8
123. Ottoman Bacem A.E., Al-Shiaty Rami A., A Novel Marker of Ameloblastoma and Systematic Review of Immunohistochemical Findings, *Annals of Diagnostic Pathology* 2016.
124. Boyle W, Scott W, Lacey D. Osteoclast differentiation and activation. *NATURE* May 2003; vol 423: 15
125. Taubman M, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. *J Periodontol* • November 2005; Volume 76 • Number 11 (Suppl)

126. Myoung H. Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91:328-33
127. Suzuki J, et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314 (2004) 1021–1027
128. Mizoguchi T. Identification of cell cycle – arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J. Cell Biol* 2009; Vol. 184 No. 4, 541–554
129. Naito A, et al. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes to Cells* 1999; 4, 353–362
130. Zhao Q, et al. NFATc1: Functions in osteoclasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2010) 576–579
131. O'Brien C. Control of RANKL Gene Expression. *Bone*. 2010 April; 46(4): 911–919

132. Pripatnanont P, Song Y, Harris M, Meghji S: In situ hybridisation and immunocytochemical localisation of osteolytic cytokines and adhesion molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 496–500
133. Kumamoto H, Ooya K. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:46-52
134. Andisheh A, Pardis S, Ranjbaran P. Twist expression in dentigerous cyst, odontogenic keratocyst, and ameloblastoma. *Oral Maxillofac Surg.* 2015 Mar;19(1):103-7
135. Siar C, Han Ng K. Differential expression of transcription factors Snail, Slug, SIP1, and Twist in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med* (2014) 43: 45–52
136. Raggatt L, Partridge N. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* August 13 2010; VOL. 285, NO. 33, pp. 25103–25108

137. Imran A, Jayanthi P, Tanveer S, Gobu SC. Classification of odontogenic cysts and tumors – Antecedents. *J Oral Maxillofac Pathol* 2016; 20:269-71
138. Walsh M, Choi Y. Biology of the RANKL–RANK–OPG system in immunity, bone, and beyond. *Front Immunol*. 2014 Oct 20;5:511
139. Sham E, et al. Mandibular ameloblastoma: clinical experience and literature review. *ANZ J Surg* 79 2009; 739–744
140. Warburton G, Shihabi A, Ord R. Keratocystic Odontogenic Tumor (KCOT/OKC)—Clinical Guidelines for Resection. *J. Maxillofac. Oral Surg.* (July–Sept 2015) 14(3):558–564
141. Boyce B.F. Advances in the regulation of Osteoclasts and Osteoclast functions. *J Dent Res*. 2013 Oct;92(10):860-7
142. Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR) associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* (1998) 273(51):34120–7

143. Wong BR, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* (1999) 4(6):1041–9
144. David JP, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EF. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and independent mechanisms. *J Cell Sci* (2002) 115(Pt 22):4317–25.
145. Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, et al. p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* (2002) 143(8):3105–13
146. Boyce BF, Yoneda T, Lowe C, Soriano P, Mundy GR. Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice. *J Clin Invest* (1992) 90(4):162
147. Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. Targeted disruption of the csrc proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* (1991) 64(4):693–702.
148. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* (2005) 83(3):170–9

149. Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* (2004) 428(6984):758–63
150. Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, et al. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101(16):6158–63
151. Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, et al. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell* (2008) 132(5):794–806
152. Arron JR, Vologodskaja M, Wong BR, Naramura M, Kim N, Gu H, et al. A positive regulatory role for Cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (trance) and CD40L-mediated Akt activation. *J Biol Chem* (2001) 276(32):30011–7

153. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. Tcell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* (2000) 408(6812):600–5
154. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990; 345:442–444
155. Lee SH, Rho J, Jeong D, Sul JY, Kim T, Kim N, Kang JS, Miyamoto T, Suda T, Lee SK, et al. vATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med* 2006;12:1403–1409
156. Matsuo K, et al. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J Biol Chem* 2004;279:26475–26480
157. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews Genetics* 2003;4:638–649
158. Teitelbaum SL. Osteoclasts and integrins. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:95–99

159. Yagi M, et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 2005;202:345–351
160. Wang H.C, Li T.J. The growth and osteoclastogenic effects of fibroblasts isolated from keratocystic odontogenic tumor. *Oral Dis.* 2013 Mar;19(2):162-8
161. Tan S, Pollack JR, Kaplan MJ, Colevas AD, West RB, BRAF inhibitor treatment of primary BRAF-mutant ameloblastoma with pathologic assessment of response, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* (2016), doi: 10.1016/j.oooo.2015.12.016
162. Rotellini M, Maggiore G, Trovati M, Saraceno MS, Franchi A. Metastasizing Maxillary Ameloblastoma: Report of a Case with Molecular Characterization *J Oral Maxillofac Res* 2016;7(1): e5
163. Carda C, et al. Osteoprotegerin (OPG) and RANKL expression and distribution in developing human craniomandibular joint. *Tissue and Cell* 37 (2005) 247–255
164. Brown J.M, et al. Osteoprotegerin and RANK Ligand Expression In Prostate Cancer. *UROLOGY*2001; 57:611–616

165. Güller N, Sencift K, Demirkol Ö. Conservative Management of Keratocystic Odontogenic Tumors of Jaws. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 680397
166. Mendenhall W. Ameloblastoma. *Am J Clin Oncol* 2007;30: 645– 648
167. Ohazama A, Courtney J.M, Sharpe P.T. Opg, Rank, and Rankl in Tooth Development: Co-ordination of Odontogenesis and Osteogenesis. *J Dent Res* 2004; 83(3):241-244
168. Vermeer J, et al. Jaw bone marrow-derived osteoclast precursors internalize more bisphosphonate than long-bone marrow precursors. *Bone* 2013; 57:242–251
169. Özcan A, Yavan I, Günhan Ö. Immunohistochemical Characteristics of Cystic Odontogenic Lesions: A Comparative Study. *Turk Patoloji Derg* 2015, 31:104-110
170. Wang E, et al. Histochemical and immunohistochemical double staining for osteolytic related factors in keratocystic odontogenic tumor. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2010 Feb 18;42(1):85-9

171. Gaonkar P. Locally Aggressive Benign Odontogenic Neoplasms – A Review. International Journal of Oral Health Dentistry. January – March 2016; 2(1):15-18
172. Nayak M, Singh A, Singhvi A, Sharma R. Odontogenic keratocyst: What is in the name? Journal of Natural Science, Biology and Medicine July 2013; Vol 4: Issue 2
173. Bilodeau E, Prasad J, Alawi F, Seethala R. Molecular and Genetic Aspects of Odontogenic Lesions. Head and Neck Pathol 2014; 8:400–410
174. De Moraes, et al. Immunoexpression of RANK, RANKL, OPG, VEGF, and vWF in radicular and dentigerous cysts. J Oral Pathol Med 2013; 42:468–473
175. Kurppa K, et al. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. J Pathol 2014; 232:492–498
176. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology\_ Development, Structure, and Function- Mosby, 2003

177. De la Rica L, et al. NF- $\kappa$ B-direct activation of microRNAs with repressive effects on monocyte-specific genes is critical for osteoclast differentiation. *Genome Biology* 2015; 16:2
178. Park H-S, et al. The effectiveness of decompression for patients with dentigerous cysts, keratocystic odontogenic tumors, and unicystic ameloblastoma. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2014;40:260-265
179. Ginter P, et al. Phosphohistone H3 expression correlates with manual mitotic counts and aids in identification of “hot spots” in fibroepithelial tumors of the breast. *Human Pathology* 2016; 49,90–98
180. Lopez X, et al. Clustering Methods Applied in the Detection of Ki67 Hot-Spots in Whole Tumor Slide Images: An Efficient Way to Characterize Heterogeneous Tissue-Based Biomarkers. *Cytometry* 2012; Part A81A:765–775
181. Polley M, et al. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Modern Pathology* 2015; 28, 778–786

182. Kashofer K, Viertler C, Pichler M, Zatloukal K. Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for rt-PCR and microarray analysis. *Plos One*. 2013;8(7): e70714
183. Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol* 2001;158(2):419-29
184. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009;36(5):396-403
185. Von dem Knesebeck A, Felsberg J, Waha A, Hartmann W, Scheffler B, Glas M, et al. RANK (TNFRSF11A) is epigenetically inactivated and induces apoptosis in gliomas. *Neoplasia*. 2012;14(6):526-34
186. Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, Mason RS. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Br J Pharmacol*. 2009;157(7):1291-300

187. Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. Histological typing of odontogenic tumours. Berlin: Springer Verlag; 1992. p. 34-42
188. Sweeney R, et al. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in Ameloblastomas. *Nature Genetics* July 2014; vol 46: Num 7, p 722-26
189. Brunner P, Bihl M, Jundt G, Baumhoer D, Hoeller S. Letter to the editor: BRAF p.V600E mutations are not unique to ameloblastoma and are shared by other odontogenic tumors with ameloblastic morphology. *Oral Oncology* 51 (2015) e77–e78
190. Brown N, et al. Activating FGFR2–RAS–BRAF Mutations in Ameloblastoma. *Clin Cancer Res* 2014; 20(21); 5517–26.
191. Brown N, Betz B. Ameloblastoma: A Review of Recent Molecular Pathogenetic Discoveries. *Biomark Cancer*. 2015 Oct 4;7(Suppl 2):19-24
192. Nakao Y, et al. Fibroblast growth factors 7 and 10 are involved in ameloblastoma proliferation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *International Journal Of Oncology* 2013; 43: 1377-1384

193. Hendarmin L. TNF played a role in induction of Akt and MAPK signals in ameloblastoma. *Oral Oncology* (2005); 41,375–382
194. Gonçalves M, et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol.* 2015 Jul;36(7):5649-53
195. Cantwell-Dorris E, O'Leary J, Sheils O. BRAF<sup>V600E</sup>: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(3);385–94
196. Werner M. Giant cell tumour of bone: morphological, biological and histogenetical aspects. *International Orthopaedics (SICOT)* (2006) 30:484–489
197. Mallapudi S.V, Kumar U, Boindala S. Odontogenic tumors and giant cell lesions of jaws - a nine-year study. *World J Surg Oncol.* 2011 Jul 5; 9:68
198. Brodbeck WG, Anderson JM. Giant cell formation and function. *Curr Opin Hematol.* 2009 Jan;16(1):53-7
199. Harada et al. Establishment of ameloblastoma cell line, AM-1. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 207–12

200. Koren SR, Livshits G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles?. *Osteoporos Int* (2014) 25:2685–2700
201. Vosough, et al. Dentigerous Cyst Associated with a Mesiodens: A Case Report. *JODDD Spring* 2011, vol 5, N°2
202. Soliman MM, et al. Marsupialization as a Treatment Modality of Large Jaw Cysts. *World Applied Sciences Journal* 2013; 21 (12): 1752-1759
203. Rohilla M, Marwah N, Rishi T. Anterior Maxillary Dentigerous Cyst. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, January-April 2009;2(1):42-45
204. Kumar P, Joshi N. Conservative Management of a Dentigerous Cyst Associated with an Impacted Mandibular Second Premolar in Mixed Dentition: A Case Report. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* 2009; 3(3):98-102
205. T.J Li. The Odontogenic Keratocyst: A Cyst, or a Cystic Neoplasm?. *J Dent Res* 90 2011; (2):133-142.

206. The Royal Collegue of Pathologists of Austalia. Guideline: Fixation of tissues. ABN 52 000 173 231. August 2016.
207. Grizzle W E. Models of Fixation and Tissue Processing. *Biotech Histochem.* 2009 October ; 84(5): 185–193
208. Lehmann U, Kreipe H. Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies. *METHODS* 25,409–418 (2001).
209. Sun M, et al. The Regulatory Roles of MicroRNAs in Bone Remodeling and Perspectives as Biomarkers in Osteoporosis. Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Volume 2016, Article ID 1652417,11 pages.
210. Igaz I, Igaz P. Why is microRNA action tissue specific? A putative defense mechanism against growth disorders, tumordevelopment or progression mediated by circulating microRNA? *Med Hypotheses* (2015)

211. Shi C, et al. MicroRNA-17/20a inhibits glucocorticoid-induced osteoclast differentiation and function through targeting RANKL expression in osteoblast cells. *Bone* 68 (2014) 67–75
212. Chen C, et al. MiR-503 Regulates Osteoclastogenesis via Targeting RANK. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 29, No. 2, February 2014, pp 338–347
213. Meyer W, Hornickel IN. Tissue fixation – the most underestimated methodical feature of immunohistochemistry. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.). Formatex © 2010. 953-59
214. Fowler C, O’Leary TJ, Mason JT. Toward improving the proteomic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Expert Rev. Proteomics* 10(4), 389–400 (2013).
215. Evers D, et al. Paraffin Embedding Contributes to RNA Aggregation, Reduced RNA Yield, and Low RNA Quality. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 13, No. 6, November 2011

216. Riera Velasco JR. Estandarización y control en inmunohistoquímica 1º parte, problemas de fijación y procesamiento de los tejidos: la recuperación antigénica como solución. Rev Esp Patol 1999; vol 32,Nº 4, 573-581

## ANEXO 1

Ed 01/09/2014



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE CHILE

COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

**ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

---

Dra. MA.Torres Pdte./ Srta. K. Lagos Secr/ Dr. E.Rodríguez/ / Dra. X.Lee / Dra. B.Urzúa/ Srta. A.Herrera/ /Srta. MICornejo

ACTA N°: 4

1. **Acta De Aprobación De Protocolo De Estudio N° 2014/11**
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

<b>Dra. M<sup>a</sup> Angélica Torres V</b> Presidente CEC	<b>Srta. Karin Lagos</b> Secretaría CEC	<b>Dr. Eduardo Rodríguez Y.</b> Miembro permanente del CEC
<b>Dra. Blanca Urzúa</b> Miembro permanente del CEC	<b>Srta. Ma. Isabel Cornejo</b> Miembro permanente del CEC	<b>Dra. Ximena Lee .</b> Miembro permanente del CEC
<b>Srta. Andrea Herrera</b> Miembro permanente del CEC		
3. **Fecha d Aprobación:** 20/08/2014
4. **Título completo del proyecto:** "Niveles de RANK, RANKL y OPG en casos de Ameloblastomas Sólido/Multiquistico, Tumor Odontogénico Queratoquistico y Quiste Dentígero" Versión del 7/08/2014
5. **Investigador responsable:** Dr. Andrés Gallardo Neira
6. **Institución Patrocinante:** Biobanco FOUCH y Proyecto FONDECYT Regular N° 1140904 "Rol de los serotipos bacterianos periodonto-patógenos en la inducción de la reabsorción ósea alveolar producida durante la periodontitis mediante un desbalance de la respuesta inmune Th1/Th17 y T reguladora".
7. **Documentación Revisada:**
  - Proyecto "Niveles de RANK, RANKL y OPG en casos de Ameloblastomas Sólido/Multiquistico, Tumor Odontogénico Queratoquistico y Quiste Dentígero" Versión del 7/08/2014
  - Currículo del investigador responsable Dr. Andrés Gallardo Neira y Tutores Coinvestigadores: Dra. Ana Verónica Ortega Pinto, Dr. Rolando Vernal y Dr. Enrico Escobar.-
  - Carta de aceptación del Biobanco FOUCH de aportar las muestras solicitadas por el investigador, versión 14/07/2014.
8. **Carácter de la población:**

Se solicitarán muestras que corresponden a biopsias, con diagnósticos de Ameloblastomas Sólido/Multiquistico (A-S/MS), Tumor Odontogénico Queratoquistico (TOQ) y Quiste Dentígero (QD) y de granuloma central de células gigantes (GCCG, como control positivo), registradas entre

Ed 01/09/2014

los años 1994-2008 y conservados en el Biobanco FOUC, dependiente del Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

#### 9. Fundamentación de la aprobación

Los tumores odontogénicos (TO) son generalmente lesiones benignas, con una etiología desconocida y alta agresividad, lo que destruye el tejido óseo. Analizar las proteínas involucradas en la formación y resorción ósea: receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK), ligando de RANK (RANKL) y osteoprotegerina (OPG), podría permitir corroborar la relación de los efectores de resorción ósea con la agresividad de estas lesiones tumorales y de alguna manera explicar el comportamiento biológico localmente agresivo y la capacidad infiltrante de estos tumores hacia el tejido óseo, alentando al desarrollo de un perfil de expresión que permita, en un futuro nuevas estrategias terapéuticas y farmacológicas que limiten las secuelas asociadas a la resección quirúrgica agresiva, necesaria actualmente. Las muestras a utilizar corresponden a biopsias mantenidas en el Biobanco del Departamento de Patología y Medicina Oral. El estudio tiene validez científica, es de interés y los investigadores tienen experiencia en el tema. Este comité ha emitido una evaluación de este proyecto basado en la capacidad de los comités éticos científicos de decidir la legitimidad ética de una investigación que usa muestras y datos anonimizados de fichas clínica sin consentimiento informado, cuando la investigación no es de riesgo. De otro modo, sería impracticable y no se podría responder a una pregunta importante de investigación de acuerdo a pautas éticas internacionales (Pautas CIOMS 2008 de Estudios Epidemiológicos) en ausencia de legislación específica en Chile, ya que el artículo 13 de la ley 20584 no hace referencia a investigación retrospectiva en fichas clínicas y bases de datos y se refiere más bien a temas de salud poblacional y ensayos clínicos.

Este comité sugiere sin embargo, desvincular este proyecto de Magister del Proyecto FONDECYT Regular N° 1140904, dado que ninguno de los objetivos planteados por la tesis del Dr. Andrés Gallardo Neira se condice con el tema tratado por dicho proyecto Fondecyt.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba el estudio "Niveles de RANK, RANKL y OPG en casos de Ameloblastomas Sólido/Multiquístico, Tumor Odontogénico Queratoquístico y Quiste Dentígero" Versión del 7/08/2014, bajo la conducción del Dr. Andrés Gallardo Neira, en el contexto de su Tesis, para optar al título de Magister en Patología y Medicina Oral, FOUC, U. de Chile, bajo la tutela de los Doctores Ana Verónica Ortega P., Rolando Vernal A. y Enrico Escobar L.

Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si lo considera necesario y el investigador deberá, bajo mutuo acuerdo, presentar los antecedentes solicitados.

c/c.: Investigador Principal y Secretaria C.E.C.



*Ames*  
Dra. María Angélica Torres V.  
Presidente CEC

## ANEXO 2

**COMPARACION DE EXPRESION RELATIVA DE rank – rankl – opg y  
porcentaje de expresión de RANK-RANKL-OPG**

## Ameloblastomas

	mRNA	Ct1	Ct2	Ctmean	DCt	% células IHQ+
<b>A1</b>	RANKL	28,172699	28,7614526	28,4670758	9,80317598	41%
	RANKL	28,7614526				
	RANK	28,8982561	29,2100282	29,0541421	10,3902423	34%
	RANK	29,2100282				
	OPG	30,4259902	30,712517	30,5692536	11,9053537	70%
	OPG	30,712517				
	18S	18,6753729	18,6524268	18,6638998		
	18S	18,6524268				
<b>A2</b>	RANKL	27,3589175	27,611803	27,4853602	8,82057593	40%
	RANKL	27,611803				
	RANK	30,5111071	30,4455352	30,4783211	11,8135368	87%
	RANK	30,4455352				
	OPG	30,9048413	30,9488082	30,9268247	12,2620404	95%
	OPG	30,9488082				
	18S	18,6441992	18,6853694	18,6647843		
	18S	18,6853694				
<b>A3</b>	RANKL	28,7027312	28,6613729	28,682052	10,0172404	41%
	RANKL	28,6613729				
	RANK	30,082803	30,6847598	30,3837814	11,7189698	55%
	RANK	30,6847598				
	OPG	30,9422196	30,0765794	30,5093995	11,8445879	86%
	OPG	30,0765794				
	18S	18,5784657	18,7511575	18,6648116		
	18S	18,7511575				

	mRNA	Ct1	Ct2	Ctmean	DCt	% células IHQ+
<b>A4</b>	RANKL	29,8195421	30,0367194	29,9281308	11,2623301	18%
	RANKL	30,0367194				
	RANK	30,3099403	29,819961	30,0649507	11,39915	8%
	RANK	29,819961				
	OPG	30,9716638	30,1102739	30,5409689	11,8751682	78%
	OPG	30,1102739				
	18S	18,5955003	18,7361011	18,6658007		
	18S	18,7361011				
<b>A5</b>	RANKL	28,1743113	28,0730034	28,1236573	9,4611492	18%
	RANKL	28,0730034				
	RANK	30,1487526	30,4362349	30,2924938	11,6299856	65%
	RANK	30,4362349				
	OPG	30,6917501	30,9370983	30,8144242	12,1519161	79%
	OPG	30,9370983				
	18S	18,6652557	18,6597605	18,6625081		
	18S	18,6597605				
<b>A6</b>	RANKL	28,5005166	28,4852438	28,4928802	9,82887962	94%
	RANKL	28,4852438				
	RANK	30,3571655	30,2118316	30,2844986	11,620498	55%
	RANK	30,2118316				
	OPG	30,1684673	30,3632759	30,2658716	11,601871	93%
	OPG	30,3632759				
	18S	18,6625944	18,6654067	18,6640006		
	18S	18,6654067				
<b>A7</b>	RANKL	28,0218538	28,0213159	28,0215849	9,35579658	93%
	RANKL	28,0213159				
	RANK	30,2351154	30,554012	30,3945637	11,7287754	72%
	RANK	30,554012				
	OPG	30,8777285	30,9619259	30,9198272	12,2540389	94%
	OPG	30,9619259				
	18S	18,6852813	18,6462953	18,6657883		
	18S	18,6462953				

	mRNA	Ct1	Ct2	Ctmean	DCt	% células IHQ+
<b>A8</b>	RANKL	27,6614662	27,1450397	27,4032529	8,73853782	34%
	RANKL	27,1450397				
	RANK	30,960675	30,9737315	30,9672032	12,3024881	94%
	RANK	30,9737315				
	OPG	30,9621864	30,9020531	30,9321197	12,2674046	78%
	OPG	30,9020531				
	18S	18,6531608	18,6762694	18,6647151		
	18S	18,6762694				

### Tumor Odontogénico Queratoquístico

	mRNA	Ct1	Ct2	Ctmean	DCt	% células IHQ+
<b>Q1</b>	RANKL	31,2770495	31,344254	31,3106517	12,6489024	76%
	RANKL	31,344254				
	RANK	30,6553283	30,0158837	30,335606	11,6738566	5%
	RANK	30,0158837				
	OPG	31,0496553	31,6708633	31,3602593	12,6985099	41%
	OPG	31,6708633				
	18S	18,728516	18,5949827	18,6617493		
	18S	18,5949827				
<b>Q2</b>	RANKL	29,0575383	29,2373919	29,1474651	10,4827299	70%
	RANKL	29,2373919				
	RANK	30,8993926	30,8447473	30,8720699	12,2073347	76%
	RANK	30,8447473				
	OPG	30,4501365	30,3996275	30,424882	11,7601468	16%
	OPG	30,3996275				
	18S	18,6876919	18,6417785	18,6647352		
	18S	18,6417785				

	mRNA	Ct1	Ct2	Ctmean	DCt	% células IHQ+
<b>Q3</b>	RANKL	29,3934287	29,3794139	29,3864213	10,7236679	38%
	RANKL	29,3794139				
	RANK	30,4355867	30,311847	30,3737168	11,7109634	87%
	RANK	30,311847				
	OPG	29,0856708	28,4374983	28,7615845	10,0988311	62%
	OPG	28,4374983				
	18S	18,6339377	18,6915692	18,6627534		
	18S	18,6915692				
<b>Q4</b>	RANKL	28,7187705	28,1251062	28,4219384	9,75846083	32%
	RANKL	28,1251062				
	RANK	30,0725568	30,6874569	30,3800069	11,7165293	39%
	RANK	30,6874569				
	OPG	28,5731897	28,1405506	28,3568701	9,69339262	48%
	OPG	28,1405506				
	18S	18,6242882	18,7026668	18,6634775		
	18S	18,7026668				
<b>Q5</b>	RANKL	29,5312607	30,047815	29,7895378	11,125715	36%
	RANKL	30,047815				
	RANK	30,344207	30,2021466	30,2731768	11,609354	65%
	RANK	30,2021466				
	OPG	29,2300126	29,2294478	29,2297302	10,5659073	29%
	OPG	29,2294478				
	18S	18,6648856	18,66276	18,6638228		
	18S	18,66276				

	mRNA	Ct1	Ct2	Ctmean	DCt	% células IHQ+
<b>Q6</b>	RANKL	28,2582209	28,1754443	28,2168326	9,55317469	93%
	RANKL	28,1754443				
	RANK	30,2966899	30,2555441	30,276117	11,6124591	100%
	RANK	30,2555441				
	OPG	28,3772348	28,3198356	28,3485352	9,6848773	69%
	OPG	28,3198356				
	18S	18,6822127	18,6451031	18,6636579		
	18S	18,6451031				
<b>Q7</b>	RANKL	29,2275075	29,3590518	29,2932797	10,6300966	82%
	RANKL	29,3590518				
	RANK	30,1668872	30,2247492	30,1958182	11,5326351	90%
	RANK	30,2247492				
	OPG	29,1903553	29,1948766	29,1926159	10,5294328	76%
	OPG	29,1948766				
	18S	18,6490195	18,6773468	18,6631831		
	18S	18,6773468				
<b>Q8</b>	RANKL	28,7896571	28,9425317	28,8660944	10,2030731	0%
	RANKL	28,9425317				
	RANK	30,9742862	30,372693	30,6734896	12,0104683	87%
	RANK	30,372693				
	OPG	28,2714734	28,5044046	28,387939	9,7249177	41%
	OPG	28,5044046				
	18S	18,6703526	18,6556901	18,6630213		
	18S	18,6556901				
<b>Q9</b>	RANKL	30,4628622	30,9022659	30,6825641	12,0163457	33%
	RANKL	30,9022659				
	RANK	30,1109928	30,2719199	30,1914564	11,525238	53%
	RANK	30,2719199				
	OPG	30,0494329	29,8145443	29,9319886	11,2657702	63%
	OPG	29,8145443				
	18S	18,6560298	18,6764069	18,6662184		
	18S	18,6764069				

	mRNA	Ct1	Ct2	Ctmean	DCt	% células IHQ+
<b>Q10</b>	RANKL	30,2346133	30,9226453	30,5786293	11,9132193	37%
	RANKL	30,9226453				
	RANK	30,618028	30,7731169	30,6955724	12,0301624	51%
	RANK	30,7731169				
	OPG	28,8908801	28,9927326	28,9418063	10,2763963	23%
	OPG	28,9927326				
	18S	18,643629	18,687191	18,66541		
	18S	18,687191				
<b>Q11</b>	RANKL	29,2948747	29,3892793	29,342077	10,6765579	51%
	RANKL	29,3892793				
	RANK	30,5525987	30,3325586	30,4425786	11,7770595	64%
	RANK	30,3325586				
	OPG	28,1759425	27,9281157	28,0520291	9,38651001	66%
	OPG	27,9281157				
	18S	18,6857323	18,6453059	18,6655191		
	18S	18,6453059				
<b>Q12</b>	RANKL	31,1267116	31,4432678	31,2849897	12,6181985	61%
	RANKL	31,4432678				
	RANK	30,6764532	27,2100282	28,9432407	10,2764495	55%
	RANK	27,2100282				
	OPG	33,2761545	33,7097584	33,4929565	14,8261652	25%
	OPG	33,7097584				
	18S	18,6214259	18,7121566	18,6667912		
	18S	18,7121566				

### Quieste dentífero

	mRNA	Ct1	Ct2	Ctmean	DCt	% células IHQ+
<b>D1</b>	RANKL	32,2042247	32,2244836	32,2143542	13,5516668	36%
	RANKL	32,2244836				
	RANK	32,9356849	32,6079997	32,7718423	14,1091549	84%
	RANK	32,6079997				
	OPG	28,4066918	28,281842	28,3442669	9,68157953	35%
	OPG	28,281842				
	18S	18,861097	18,4642777	18,6626874		
	18S	18,4642777				
<b>D2</b>	RANKL	32,5918024	32,7230301	32,6574163	13,9926356	92%
	RANKL	32,7230301				
	RANK	32,3912072	32,9111019	32,6511546	13,9863739	37%
	RANK	32,9111019				
	OPG	26,993237	27,2029249	27,0980809	8,43330026	24%
	OPG	27,2029249				
	18S	18,6623161	18,6672452	18,6647807		
	18S	18,6672452				
<b>D3</b>	RANKL	32,4643511	32,1109651	32,2876581	13,6230228	11%
	RANKL	32,1109651				
	RANK	32,1761567	32,3885063	32,2823315	13,6176962	76%
	RANK	32,3885063				
	OPG	27,8623843	28,0622395	27,9623119	9,29767664	74%
	OPG	28,0622395				
	18S	18,7548936	18,574377	18,6646353		
	18S	18,574377				
<b>D4</b>	RANKL	32,3935643	32,2904171	32,3419907	13,679737	40%
	RANKL	32,2904171				
	RANK	32,2931489	32,1067739	32,1999614	13,5377077	91%
	RANK	32,1067739				
	OPG	28,1643522	28,1473799	28,155866	9,49361235	59%
	OPG	28,1473799				
	18S	18,6654937	18,6590136	18,6622537		
	18S	18,6590136				

	mRNA	Ct1	Ct2	Ctmean	DCt	% células IHQ+
<b>D5</b>	RANKL	33,1152676	31,4432678	32,2792677	13,6161725	12%
	RANKL	31,4432678				
	RANK	32,5564754	32,7784636	32,6674695	14,0043743	96%
	RANK	32,7784636				
	OPG	28,1121565	27,8964516	28,0043041	9,34120887	61%
	OPG	27,8964516				

## ANEXO 3

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO qPCR de rank – rankl - opg

## Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov

		rank	rankl	opg
<b>N</b>		25	25	25
<b>Parámetros</b>	Media	4,2296660	9,8484792	3,2545543
<b>Normales<sup>a,b</sup></b>	Desviación típica	2,6207203	8,6654530	2,8130421
<b>Diferencias más extremas</b>	Absoluta	,262	,154	,208
	Positiva	,262	,130	,208
	Negativa	-,121	-,154	-,135
<b>Z de Kolmogorov-Smirnov</b>		1,312	,768	1,038
<b>Sig. Asintót. (bilateral)</b>		,064	,597	,231

a. La distribución de contraste es la Normal

b. Se han calculado a partir de los datos

## ANOVA rank- rankl- opg

## RANK

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	65,549	2	32,775	7,262	,004
Intra-grupos	99,287	22	4,513		
Total	164,836	24			

## RANKL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1017,193	2	508,597	14,254	,000
Intra-grupos	784,968	22	35,680		
Total	1802,162	24			

OPG

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	117,460	2	58,730	17,832	,000
Intra-grupos	72,457	22	3,293		
Total	189,917	24			

**PRUEBA POST HOC HSD DE TUKEY****rank**

(I) Condición	(J) Condición	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
AM	QQ	,272698268	,969648804	,957	-2,16312091	2,7085174
	QD	4,200701445*	1,2110910	,006	1,15836427	7,2430386
QQ	AM	-,272698268	,969648804	,957	-2,70851744	2,1631209
	QD	3,928003177*	1,1307951	,006	1,08737429	6,7686321
QD	AM	-4,200701445*	1,2110910	,006	-7,24303862	-1,158364
	QQ	-3,928003177*	1,1307951	,006	-6,76863207	-1,087374

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

**rankl**

(I) Condición	(J) Condición	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
AM	QQ	10,486558355*	2,7264287	,002	3,63759687	17,335520
	QD	17,352534038*	3,4053084	,000	8,79818388	25,906884
QQ	AM	-10,48655835*	2,7264287	,002	-17,33551984	-3,637597
	QD	6,865975684	3,1795349	,101	-1,12121731	14,853169
QD	AM	-17,35253404*	3,4053084	,000	-25,90688419	-8,798184
	QQ	-6,865975684	3,1795349	,101	-14,85316867	1,1212173

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

opg

(I) Condición	(J) Condición	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
AM	QQ	-2,126725610*	,828338043	,045	-4,20756321	-,04588801
	QD	-6,168630013*	1,0345939	,000	-8,76759534	-3,569665
QQ	AM	2,126725610*	,828338043	,045	,04588801	4,2075632
	QD	-4,041904403*	,965999857	,001	-6,46855719	-1,615252
QD	AM	6,168630013*	1,0345939	,000	3,56966468	8,7675953
	QQ	4,041904403*	,965999857	,001	1,61525161	6,4685572

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.