



Departamento de Biología Celular e Histología
Zelulen Biologia eta Histología Saila

Valoración del papel de la angiogénesis, y las moléculas que regulan las vías de señalización de la osteoclastogénesis en el mixoma odontogénico

Trabajo dirigido por:

Dr. José Manuel Aguirre Urizar

Dr. Xabier Marichalar Mendia

Para optar al grado de doctor de:

María del Carmen González Galván

Leioa, 2015

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a muchas personas que estuvieron a mi lado en estos años

A Diospor darme esta maravillosa oportunidad de poder viajar en busca de nuevos conocimientos.

A mi esposo...por el apoyo, comprensión y amor.

A mi familia..... por el acompañamiento en todo este tiempo.

A mis directores..... por la paciencia y las enseñanzas.

A mis amigos por levantarme el ánimo en los días malos.

Gracias de corazón....

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	23
2. INTRODUCCIÓN	30
2.1. Hipótesis	36
2.2. Objetivos	37
3. ANTECEDENTES	39
3.1. Tumores Odontogénicos	41
3.2. Mixoma Odontogénico	43
3.2.1. Epidemiología	43
3.2.2. Etiopatogenia	43
3.2.3. Aspectos clínicos	46
3.2.4. Aspectos imagenológicos	47
3.2.5. Aspectos histopatológicos	52
3.2.6. Matriz extracelular	53
3.2.7. Aspectos inmunohistoquímicos	55
3.2.8. Diagnóstico diferencial	58
3.2.9. Aspectos terapéuticos	61

3.3. Crecimiento Neoplásico	61
3.4. Marcadores inmunohistoquímicos	64
3.4.1. Metaloproteinasas	64
3.4.2. Proteína CD-105	71
3.4.3. Marcadores para células cebadas	75
3.4.4. El Sistema molecular RANK/RANK-L/OPG	79
3.4.5. Proteína Bcl-2	83
4. MATERIAL Y MÉTODOS	87
4.1. Pacientes	89
4.1.1. Criterios de selección para los mixomas odontogénicos	90
4.1.2. Criterios de exclusión para los mixomas odontogénicos	90
4.1.3. Criterios de inclusión y exclusión para los folículos dentarios	91
4.2. Material	92
4.3. Infraestructura	92
4.4. Anticuerpos	93
4.5. Métodos	94
4.5.1. Procedimiento	94
4.5.2. Valoración	98

4.5.2.1. Valoración histológica	99
4.5.2.2. Valoración inmunohistoquímica	99
4.6. Análisis estadístico	102
4.7. Búsqueda bibliográfica	103
5. RESULTADOS	105
5.1. Hallazgos clínicos	107
5.2. Hallazgos histopatológicos de los mixomas odontogénicos	111
5.3. Hallazgos inmunohistoquímicos	112
5.3.1. Expresión de MMP-2	114
5.3.2. Expresión de MMP-9	115
5.3.3. Expresión de OPG	117
5.3.4. Expresión de RANK	118
5.3.5. Expresión de RANK-L	121
5.3.6. Expresión de Bcl-2	124
5.3.7. Expresión de CD-105	125
5.3.8. Densidad microvascular	127
5.3.9. Expresión de Triptasa	129
6. DISCUSIÓN	132

6.1. En relación con los aspectos clínico patológicos de los mixomas odontogénicos	134
6.2. En relación a la participación de células cebadas y la expresión de MMPs	
6.3. En relación con la expresión de OPG/RANK/RANK-L	144
6.4. En relación a la expresión de Bcl-2	147
6.5. En relación a la expresión de la proteína CD-105 y la densidad microvascular	150
7. CONCLUSIONES	152
8. BIBLIOGRAFÍA	157

1. ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACT α 1: Antiquimotripsina α 1.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AT α 1: Antitripsina α 1.

Bcl-2: Proteína del Linfoma de células B-2.

Bcl-X: Proteína del Linfoma de células B-X.

PBS: Buffer fosfato salino.

CD-105: Endoglina.

CD-31: Grupo de diferenciación 31. Molécula de adhesión plaquetaria endotelial.

CD-34: Grupo de diferenciación 34. Glicoproteína transmembrana presente en células endoteliales.

CK-14: Citoqueratina 14.

CK-18: Citoqueratina 18.

CK-19: Citoqueratina 19.

CK-8: Citoqueratina 8.

CK AE1/AE3: Citoqueratinas básicas y ácidas.

CK-1: Citoqueratina 1.

CS4: Condroitín sulfato 4.

CS6: Condroitín sulfato 6.

DAB: 3,3 diamino bencidina.

DMV: Densidad microvascular.

DS: Dermatán sulfato.

EDTA: ácido etil diamino tetra acético.

FA: Fibroma ameloblástico.

FD: Folículo dentario.

FGAP: Proteína ácida glial fibrilar.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

HA: Ácido hialurónico.

HHF35: Actina de músculo específico.

HS: Heparán sulfato.

IL: Interleucina.

KS: Keratán sulfato.

MEC: Matriz extracelular.

MMP-1: Metaloproteinasa de matriz 1.

MMP-3: Metaloproteinasa de matriz 3.

MMP-9: Metaloproteinasa de matriz 9.

MMPs: Metaloproteinasas de matriz.

MO: Mixoma odontogénico.

MOP: Mixoma odontogénico pequeño.

MOG: Mixoma odontogénico grande.

NSE: Enolasa neuronal específica.

OPG: Osteoprotegerina.

ORM-1: Orosomucoide 1.

PAS: Ácido periódico de Schiff.

PG-M: Proteoglicano –M

PGS: Proteoglicanos.

pH: Potencial de hidrógeno.

QR: Quiste radicular.

RANK: Receptor activador nuclear del coeficiente kappa B.

RANK-L: Ligando del receptor activador nuclear del coeficiente kappa B.

RC: Radiografía convencional.

RM: Resonancia magnética.

SMA: Actina músculo liso.

TC: Tomografía computarizada.

TGF- β 1: Complejo receptor del factor de crecimiento β -1.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TO: Tumor odontogénico.

TOQC: Tumor odontogénico quístico calcificante.

TOA: Tumor odontogénico adenomatoide.

TOEC: Tumor odontogénico epitelial calcificante.

TOQQ: Tumor odontogénico queratoquístico.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

2. INTRODUCCIÓN

Los tumores odontogénicos (TO) representan un grupo de neoplasias derivadas de elementos odontogénicos epiteliales, ectomesenquimatosos y/o mesenquimatosos que constituyen un conjunto heterogéneo de lesiones, localizadas exclusivamente en la región maxilofacial y presentan diversas características histopatológicas y manifestaciones clínicas (Barnes *et al.* 2005, Mosqueda *et al.* 2008, Siriwardena *et al.* 2012).

El espectro biológico de estas lesiones es muy variado y va desde lesiones hamartomatosas o proliferaciones de tejido no neoplásico hasta neoplasias agresivas y malignas (Barnes *et al.* 2005, Mosqueda *et al.* 2008, Siriwardena *et al.* 2012).

Las características morfológicas y la relación inductiva entre las diferentes partes del diente en formación, son reproducidas en los diferentes tumores odontogénicos (Jing *et al.* 2007, Mosqueda *et al.* 2008, Wright *et al.* 2014).

Clínicamente, la mayoría ocurren con características no específicas, como un crecimiento expansivo lento, con ligero dolor o asintomático. Cuando la lesión cursa con dolor y rápido crecimiento, suele estar asociada frecuentemente a agresividad y/o malignidad (Mosqueda *et al.* 2003, Barnes *et al.* 2005, Buchner *et al.* 2006).

Debido a la gran diversidad de lesiones que pueden formarse a partir de los tejidos odontogénicos, se han publicado diferentes esquemas de clasificación, en un intento de definir sus criterios diagnósticos y su comportamiento biológico (Mosqueda Taylor *et al.* 1997).

La primera clasificación de estos tumores aceptada internacionalmente, fue publicada en 1971 por la Organización Mundial de la Salud (Pindborg *et al.* 1971), que fue revisada y actualizada en 1992 (Kramer *et al.* 1992) y en 2005 (Barnes *et al.* 2005).

En todas las clasificaciones, el mixoma odontogénico (MO) aparece como una neoplasia benigna de estirpe mesenquimatoso, cuyas características, aunque bien definidas, son similares a las de otras entidades benignas localmente agresivas.

El Mixoma Odontogénico (MO) es una neoplasia benigna intraósea específica de los huesos maxilares, que muestra un comportamiento localmente agresivo y una elevada capacidad recidivante (Simón *et al.* 2004, Li *et al.* 2006, Noffke *et al.* 2007). Su incidencia varía entre el 2,2% y el 17,7% de todos los tumores odontogénicos (Mosqueda Taylor *et al.* 1997, Buchner *et al.* 2006, Osterne *et al.* 2011, Siriwardena *et al.* 2012). Aparece principalmente en individuos jóvenes, durante la segunda y tercera décadas, en un rango de edad que va desde los 5 a los 72 años, con predilección por las mujeres en relación de 2 a 1. La localización más común es la mandíbula, con 2/3 de los casos y muestra un crecimiento lento, progresivo y generalmente asintomático (Peltola *et al.* 1994, Barker *et al.* 1999, Simón *et al.* 2004, Buchner *et al.* 2006, Li *et al.* 2006, Noffke *et al.* 2007). Posee un gran potencial de infiltración y destrucción ósea y una elevada capacidad de recurrencia (Lo Muzio *et al.* 1996, Barker *et al.* 1999, Noffke *et al.* 2007).

El mixoma odontogénico puede presentar dificultades de diagnóstico debido al parecido histomorfológico similar al folículo dentario, al tumor odontogénico primordial, la papila dental, y las variantes mixoides de otros tumores, siendo diferente su pronóstico y tratamiento. Por ello consideramos que el análisis inmunohistoquímico de la expresión de las proteínas MMP-2, MMP-9, Bcl-2, CD-105, Triptasa, RANK, RANK-L y OPG en los MOs, puede proporcionarnos datos importantes sobre el comportamiento biológico de esta neoplasia benigna localmente agresiva.

2.1. Hipótesis

Está bien reconocido el potencial de agresividad de los mixomas odontogénicos, pero no existe consenso sobre los mecanismos por los cuales crece e invade los tejidos adyacentes (Bast *et al.* 2003, Iezzi *et al.* 2007, Martínez *et al.* 2008, Miyagi *et al.* 2008, Nonaka *et al.* 2009, De Andrade *et al.* 2011, Bologna *et al.* 2015).

Existen múltiples teorías que tratan de explicar el desarrollo de esta neoplasia, pero ninguna ha permitido aclarar la totalidad de los fenómenos que ocurren en esta lesión (Slootweg *et al.* 1985, Bast *et al.* 2003, Martínez *et al.* 2008, Andrade *et al.* 2008).

El conocimiento de la expresión de diferentes marcadores proteicos relacionados con la apoptosis, la degradación de la matriz extracelular y la angiogénesis, así como los implicados en el balance osteogénesis/osteoclastogénesis, puede ser de gran ayuda para comprender mejor los mecanismos implicados en el crecimiento tumoral de los mixomas odontogénicos.

Nuestra hipótesis de partida en este estudio es que el crecimiento del mixoma odontogénico está relacionado con modificaciones en los procesos angiogénicos y osteoclastogénicos, así como en la degradación de la matriz extracelular y la apoptosis, presentes en esta neoplasia.

2.2. Objetivos

Objetivo General:

Analizar la expresión inmunohistoquímica de proteínas involucradas en los fenómenos de angiogénesis, osteoclastogénesis, degradación de la matriz extracelular y apoptosis en el mixoma odontogénico, comparativamente con la observada en el folículo dentario, tratando de obtener datos que contribuyan al conocimiento del comportamiento biológico de esta neoplasia odontogénica.

Objetivos Específicos:

- 1- Determinar la expresión inmunohistoquímica de las proteínas MMP-2, MMP-9, CD-105, triptasa, y Bcl-2 en el mixoma odontogénico y compararla con la observada en el folículo dentario.
- 2- Determinar y comparar la expresión inmunohistoquímica de las proteínas OPG, RANK, RANK-L, en el mixoma odontogénico y el folículo dentario.
- 3- Determinar y comparar la densidad microvascular y de células cebadas en el mixoma odontogénico y el folículo dentario a través de la inmunexpresión de CD-105 y triptasa.
- 4- Valorar y evaluar la actividad angiogénica y osteoclastogénica, y su asociación y expresión en relación con otras variables en el mixoma odontogénico y el folículo dentario.

3. ANTECEDENTES

3.1. Tumores odontogénicos

Los TO constituyen un heterogéneo grupo de lesiones específicas de la zona maxilofacial, con diversas características histopatológicas y manifestaciones clínicas (Buchner *et al.* 2006). Su espectro biológico es muy variado, desde lesiones hamartomatosas o proliferaciones de tejido no neoplásico hasta neoplasias agresivas y malignas (Barnes *et al.* 2005, Mosqueda *et al.* 2008, Siriwardena *et al.* 2012) (Figura 1). El conocimiento de la prevalencia de los distintos tipos de TOs y sus características clínicas, puede ser valioso para realizar un buen diagnóstico diferencial dependiendo de los datos clinicopatológicos.

MALIGNANT TUMOURS		
Odontogenic carcinomas		
Metastasizing (malignant) ameloblastoma ¹	9310/3	Odontogenic epithelium with odontogenic ectomesenchyme, with or without hard tissue formation
Ameloblastic carcinoma – primary type	9270/3	Ameloblastic fibroma
Ameloblastic carcinoma – secondary type (dedifferentiated), intraosseous	9270/3	Ameloblastic fibrodentinoma
Ameloblastic carcinoma – secondary type (dedifferentiated), peripheral	9270/3	Ameloblastic fibro-odontoma
Primary intraosseous squamous cell carcinoma – solid type	9270/3	Odontoma
Primary intraosseous squamous cell carcinoma derived from keratocystic odontogenic tumour	9270/3	Odontoma, complex type
Primary intraosseous squamous cell carcinoma derived from odontogenic cysts	9270/3	Odontoma, compound type
Clear cell odontogenic carcinoma	9341/3	Odontoameloblastoma
Ghost cell odontogenic carcinoma	9302/3	Calcifying cystic odontogenic tumour
		Dentinogenic ghost cell tumour
		Mesenchyme and/or odontogenic ectomesenchyme with or without odontogenic epithelium
Odontogenic sarcomas		Odontogenic fibroma
Ameloblastic fibrosarcoma	9330/3	Odontogenic myxoma / myxofibroma
Ameloblastic fibrodentino–and fibro-odontosarcoma	9290/3	Cementoblastoma
		Bone-related lesions
BENIGN TUMOURS		Ossifying fibroma
Odontogenic epithelium with mature, fibrous stroma without odontogenic ectomesenchyme		Fibrous dysplasia
Ameloblastoma, solid / multicystic type	9310/0	Osseous dysplasias
Ameloblastoma, extraosseous / peripheral type	9310/0	Central giant cell lesion (granuloma)
Ameloblastoma, desmoplastic type	9310/0	Cherubism
Ameloblastoma, unicystic type	9310/0	Aneurysmal bone cyst
Squamous odontogenic tumour	9312/0	Simple bone cyst
Calcifying epithelial odontogenic tumour	9340/0	
Adenomatoid odontogenic tumour	9300/0	OTHER TUMOURS
Keratocystic odontogenic tumour	9270/0	Melanotic neuroectodermal tumour of infancy
		see Chapter 1, pp. 70-73

Figura 1: Clasificación de los tumores odontogénicos (Barnes *et al.* 2005).

Se han publicado numerosas series con respecto a la frecuencia relativa de los TO, en diferentes países, en las que se confirma que dichas lesiones representan entre el 1,2% y el 9,6% de las muestras tisulares enviadas a

laboratorios de patología bucal y maxilofacial (Figura 2) (Mosqueda Taylor *et al.* 1997, Ochsenius *et al.* 2002, Ladeinde *et al.* 2005, Buchner *et al.* 2006, Jing *et al.* 2007, Sriram *et al.* 2008, Luo *et al.* 2009, Gupta *et al.* 2010, Osterne *et al.* 2011, Siriwardena *et al.* 2012, Costa *et al.* 2012). Algunos estudios (Mosqueda *et al.* 1997, Luo *et al.* 2009, Osterne *et al.* 2011, Costa *et al.* 2012) sugieren la existencia de diferencias en la prevalencia de estos tumores en distintas poblaciones, principalmente con respecto a la incidencia relativa del ameloblastoma y del odontoma, y también se ha señalado que la diferencia en cuanto a la frecuencia relativa de algunos de ellos se podría deber a diferencias en cuanto a las fuentes de origen de la información (por ej. Datos provenientes de escuelas de odontología vs datos provenientes de hospitales y servicios de cirugía maxilofacial) (Mosqueda *et al.* 1997). Según algunos investigadores (Luo *et al.* 2009, Costa *et al.* 2012), hay una mayor incidencia de TO en el género masculino y la edad media de diagnóstico es de 35 años. Sin embargo Osterne y cols. obtuvieron una mayor frecuencia en mujeres y una edad media de 30,5 años (Osterne *et al.* 2011).

	Nro de biopsias	Nro de T.O
Mosqueda Taylor <i>et al.</i> (México) 1997	16079	349(2,17%)
Ochsenius <i>et al.</i> (Chile) 2002	28041	362(1,29%)
Ajayi <i>et al.</i> (Nigeria) 2004	477	92 (19.3%)
Ladeinde <i>et al.</i> (Nigeria) 2005	3337	319(9,6%)
Buchner <i>et al.</i> (EEUU) 2006	91178	1088 (1,2%)
Guerrisi <i>et al.</i> (Argentina) 2007	2237	153 (7%)
Jing <i>et al.</i> (China) 2007		1642
Mortellano <i>et al.</i> (Italia) 2008		86
Sriram <i>et al.</i> (India) 2008		250
Luo <i>et al.</i> (China) 2009	33354	1309 (3,92%)
Saghraivanian <i>et al.</i> (Irán) 2010	8766	165 (1.9%)
Gupta <i>et al.</i> (India) 2010	11843	498(4,13%)
Osteme <i>et al.</i> (Brasil) 2011	6231	185 (2,97%)
Siriwardena <i>et al.</i> (Sri Lanka) 2012	44458	1677 (3,8%)
Costa <i>et al.</i> (Brasil) 2012	15758	201 (1,3%)
Servato <i>et al.</i> (Brasil) 2013	11181	240 (2.14%)
Sekerci <i>et al.</i> (Turquía) 2015	7942	218 (2.74%)

Figura 2: Frecuencia de los tumores odontogénicos de acuerdo a diversas series publicadas a nivel internacional con base en criterios definidos por la O.M.S.

3.2. Mixoma odontogénico

El Mixoma Odontogénico (MO) es una neoplasia benigna intraósea de los huesos maxilares, que muestra un comportamiento agresivo local y una elevada capacidad recidivante (Schmidt-Westhausen *et al.* 1994, Peltola *et al.* 1994, Zhao *et al.* 1999, Noffke *et al.* 2007, Li *et al.* 2006). Esta neoplasia fue descrita inicialmente por Thoma y Goldman en 1947 (Thoma *et al.* 1947).

3.2.1. Aspectos epidemiológicos

El MO es una neoplasia infrecuente, aunque su incidencia varía dependiendo de la zona geográfica en la que se estudie, situándose entre el 2,2% y el 17,7% de todos los tumores odontogénicos, siendo el tercero más

común en América y el sexto en Asia (Mosqueda Taylor *et al.* 1997, Ochsenius *et al.* 2002, Ladeinde *et al.* 2005, Buchner *et al.* 2006, Jing *et al.* 2007, Sriram *et al.* 2008, Luo *et al.* 2009, Gupta *et al.* 2010, Osterne *et al.* 2011, Siriwardena *et al.* 2012, Costa *et al.* 2012)(Figura 3). Esta discrepancia podría tener su explicación en las diferencias étnicas, geográficas y del tipo de servicio en el cual se registra la información (Zhang *et al.* 2007).

El MO se diagnóstica principalmente en individuos jóvenes, con una mayoría de casos diagnosticados entre la segunda y tercera décadas, con un rango que va desde los 5 a los 74 años (White *et al.* 1975, Keszler *et al.* 1995, Barker *et al.* 1999, Noffke *et al.* 2007, Bologna *et al.* 2015). Esta neoplasia muestra predilección por las mujeres frente a los hombres en relación de 3,6 a 1 (Peltola *et al.* 1994, Barker *et al.* 1999, Oschsenius *et al.* 2002, Buchner *et al.* 2006, Bologna *et al.* 2015).

Aunque es muy infrecuente en niños y adultos mayores de 50 años (Noffke *et al.* 2007), Keszler y cols. encontraron en un estudio realizado en Argentina, que el 8% de los mixomas odontogénicos se presentaron en niños menores de 16 años y que la frecuencia de este tumor era mayor que otros tumores odontogénicos agresivos en este rango de edad (Keszler *et al.* 1995). La localización más común del MO es la mandíbula, donde se presentan hasta 2/3 de los casos (White *et al.* 1975, Peltola *et al.* 1994, Barker *et al.* 1999, Simón *et al.* 2004, Buchner *et al.* 2006, Jing *et al.* 2007, Noffke *et al.* 2007, Bologna *et al.* 2015). La zona molar y la región de la rama mandibular son las zonas más frecuentemente afectadas en la mandíbula, y la región premolar al

primer molar el lugar habitual en el maxilar superior (Simón *et al.* 2004, Noffke *et al.* 2007, Kheir *et al.* 2013).

	Nro de biopsias	Nro de T.O	Nro de mixomas	Porcentaje de los mixomas	Posición relativa respecto al total de TO
Mosqueda Taylor <i>et al.</i> (México) 1997	16079	349(2,17%)	62	17,7	3°
Ochsenius <i>et al.</i> (Chile) 2002	28041	362(1,29%)	32	8,9	3°
Ajayi <i>et al.</i> (Nigeria) 2004	477	92 (19,3%)	8	8.7	3°
Ladeinde <i>et al.</i> (Nigeria) 2005	3337	319(9,6%)	21	6,5	3°
Buchner <i>et al.</i> (EEUU) 2006	91178	1088 (1,2%)	24	2,2	3°
Guerrisi <i>et al.</i> (Argentina) 2007	2237	153 (7%)	13	8.5	3°
Jing <i>et al.</i> (China) 2007		1642	76	4,6	4°
Mortellano <i>et al.</i> (Italia) 2008		86	10	11.6	3°
Sriram <i>et al.</i> (India) 2008		250	15	6	3°
Luo <i>et al.</i> (China) 2009	33354	1309 (3,92%)	34	2,6	4°
Saghravarian <i>et al.</i> (Irán) 2010	8766	165 (1,9%)	15	9.1	3°
Gupta <i>et al.</i> (India) 2010	11843	498(4,13%)	13	2,66	6°
Osterne <i>et al.</i> (Brasil) 2011	6231	185 (2,97%)	13	7,03	4°
Siriwardena <i>et al.</i> (Sri Lanka) 2012	44458	1677 (3,8%)	64	3,8%	6°
Costa <i>et al.</i> (Brasil) 2012	15758	201 (1,3%)	9	4,5%	4°
Servato <i>et al.</i> (Brasil) 2013	11181	240 (2.14%)	11	4.60%	4°
Sekerci <i>et al.</i> (Turquía) 2015	7942	218 (2.74%)	5	2.29%	4°

Figura 3: Principales series de mixomas odontogénicos descritos a nivel internacional.

3.2.2. Aspectos etiopatogénicos

Actualmente se considera que el MO deriva del mesénquima odontogénico o de células mesenquimatosas indiferenciadas pluripotenciales situadas en el ligamento periodontal (Takahashi *et al.* 1991, Simón *et al.* 2004, Li *et al.* 2006, Noffke *et al.* 2007, Martínez *et al.* 2008, Gomes *et al.* 2011).

Esta hipótesis está sustentada por su aparición en estrecha proximidad con las zonas de soporte dentario de los maxilares, su frecuente asociación con dientes no erupcionados, la presencia ocasional de restos de epitelio

odontogénico inactivo y su bajísima incidencia en otros huesos del organismo (Barker 1999, Simón *et al.* 2004, Noffke *et al.* 2007).

3.2.3. Aspectos clínicos

Los mixomas odontogénicos son tumores de crecimiento lento y generalmente asintomáticos, a pesar de poseer un gran potencial de infiltración y destrucción ósea, causando expansión cortical y una alta tasa de recurrencia (Lo Muzio *et al.* 1995, Barker *et al.* 1999, Mac Donald-Jankowski *et al.* 2002, Noffke *et al.* 2007) (Figura 4).



Figura 4: Tumoración en la zona central mandibular, que provoca expansión ósea por vestibular, con una coloración similar a la de la mucosa adyacente. Reconstrucción radiológica volumétrica de la misma lesión clínica.

En el estudio de Simón y *cols.* realizado sobre 33 MOs se señala que el 21% de los casos presentaban perforación ósea e invasión de los tejidos blandos al momento del diagnóstico. En algunas ocasiones, los pacientes pueden presentar dolor, parestesia, movilidad dentaria y ulceración, llegando incluso a señalar la presencia de hemorragia nasal (Simón *et al.* 2004, Li *et al.* 2006).

En el MO de maxilar superior, el seno maxilar con frecuencia es ocupado por la masa tumoral y el paciente puede presentar exoftalmos (Li *et al.* 2006, Noffke *et al.* 2007).

Se ha descrito la presencia de movilidad de los dientes asociados al MO, que usualmente son vitales y que generalmente ocurre en los casos mandibulares (MacDonald-Jankowski *et al.* 2002, Noffke *et al.* 2007). Una explicación para este hallazgo podría ser que en el maxilar probablemente el crecimiento del MO se produce hacia el seno maxilar a diferencia de lo que ocurre en la mandíbula, en donde el crecimiento ocurre dentro de los alveolos dentarios, lo que incrementa la destrucción de hueso y facilita la movilidad dentaria (Noffke *et al.* 2007).

3.2.4. Aspectos imagenológicos

Esta neoplasia odontogénica puede mostrar aspectos imagenológicos muy variados (Peltola *et al.* 1994, Lo Muzio *et al.* 1996, Simón *et al.* 2004). Algunos de los reportes sobre mixomas los describen como lesiones uniloculares, multiloculares (Figura 5), o con un patrón no loculado, mientras que otros solo se definen como un patrón radiolúcido o mixto (Peltola *et al.* 1994, Lo Muzio *et al.* 1996, Simón *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2007).

La característica radiográfica más común de esta neoplasia es la presencia de trabéculas finas o muy finas de hueso dentro del defecto radiolúcido (Barker *et al.* 1999, MacDonald-Jankowski *et al.* 2004, Li *et al.* 2006), lo que con frecuencia produce el patrón radiográfico de “pompas de jabón”, “panal de abejas” o “raqueta de tenis” (Peltola *et al.* 1994, Lo Muzio *et*

al. 1996, MacDonald-Jankowski *et al.* 2004). Las características radiológicas más frecuentemente reflejadas en ésta neoplasia son: desplazamiento dentario (47,8% al 80%) y reabsorción radicular (10 al 16% de los casos) (Peltola *et al.* 1994, Barker *et al.* 1999, Kimura *et al.* 2001, Li *et al.* 2006, Noffke *et al.* 2007, Kheir *et al.* 2013, Bologna *et al.* 2015) (Figura 6).

Con respecto al tamaño, los MOs pueden ser muy extensos y afectar hasta la mitad ó más del maxilar o de la mandíbula, incluyendo la rama y el cóndilo (Lo Muzio *et al.* 1996). La corteza aparece adelgazada debido a la expansión y puede perforarse en una etapa más tardía de la progresión del tumor (Li *et al.* 2006, Noffke *et al.* 2007).



Figura 5: Variabilidad del MO en radiografía convencional (ortopantomografía).

En 2007 Noffke y *cols.* en un estudio de 30 casos de MOs realizado en Sudáfrica (Noffke *et al.* 2007) señalaron que el 16% de los mixomas

mandibulares cruzaban la línea media, lo que no coincide con las apreciaciones de Simón *y cols.* quienes en un estudio de 33 casos de MOs realizado en Tanzania, previamente señalaban que este era un suceso muy raro (Simón *et al.* 2004). En el estudio de Noffke *y cols.* (Noffke *et al.* 2007) también informan que los mixomas situados en el maxilar superior no cruzan la sutura media palatina y señalan que el 82% de los mixomas odontogénicos del maxilar superior invadían el seno maxilar y que incluso el 18% afectaba tanto al seno maxilar como a la cavidad nasal (Noffke *et al.* 2007).

Los bordes en los tumores maxilares vistos en la radiografía convencional (RC) generalmente son difusos (Peltola *et al.* 1994, Lo Muzio *et al.* 1996, Simón *et al.* 2004); sin embargo, por medio de la tomografía computarizada (TC) tanto las lesiones de maxilar como las mandibulares presentan los bordes bien definidos (Koseki *et al.* 2003).

Las tecnologías avanzadas de imagen como la tomografía computarizada y la resonancia magnética (RM), subsanan las limitaciones de la radiología convencional (RC) (Kheir *et al.* 2013), ya que se tiene la posibilidad de detectar el hueso adyacente, el tejido blando que envuelve al tumor y la extensión exacta de la lesión (Zhang *et al.* 2007).

Con respecto a las diferencias entre éstas tecnologías, la TC tiene una clara ventaja sobre la RC, particularmente si las lesiones afectan el maxilar, donde existe una mayor complejidad anatómica (MacDonald-Jankowski *et al.* 2004) (Figura 6). Por otra parte, la TC puede mostrar no sólo la extrusión de la lesión a través de perforaciones de la corteza (con o sin contraste), sino

también su yuxtaposición con la superficie exterior de la misma (MacDonald-Jankowski *et al.* 2004). La mayor resolución de la TC con respecto a la RC puede revelar la presencia de una corteza adelgazada pero intacta, lo cual puede justificar una resección local, que es generalmente el tratamiento de elección (MacDonald-Jankowski *et al.* 2004), y es por ello que la TC es especialmente útil en las lesiones grandes y adyacentes a áreas de manejo difícil, tal como la zona maxilar posterior (MacDonald-Jankowski *et al.* 2004). No hay detalles de las descripciones de la densidad tumoral en las imágenes de TC (Koseki *et al.* 2003).

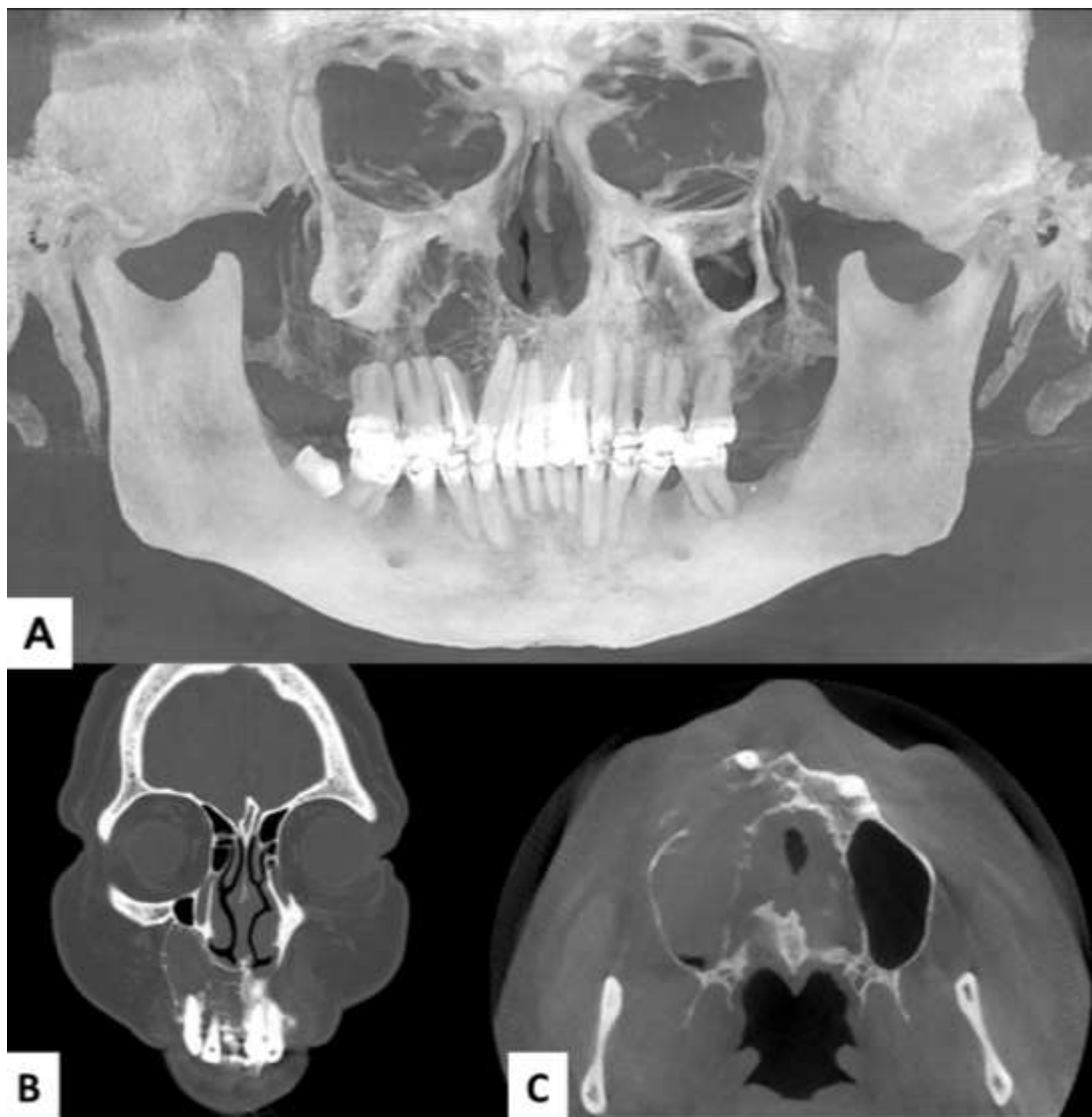


Figura 6: A- Vista Panorámica Simulada en Proyección de Máxima intensidad (MIP) que muestra una lesión de densidad mixta, no delimitada, ubicada en el primer cuadrante. B-Corte coronal de CBCT en donde se reconoce lesión de densidad mixta que sobrepasa la línea media y que adelgaza y abomba ligeramente la cortical externa del maxilar superior y de la fosa nasal ipsilateral. C- Corte Axial de CBCT.

Con respecto a la RM, recientemente ha sido utilizada para diagnosticar y definir lesiones de tejidos blandos en la región oral y maxilofacial, debido a que es una modalidad muy útil para analizar la estructura interna de las lesiones, con contraste de tejido blando superior y facilidad multiplanar. En el año 2002, Asaumi y cols. concluyeron que la RM dinámica podría distinguir el ameloblastoma del MO y que podría ser una herramienta útil para el diagnóstico de mixomas (Asaumi *et al.* 2002), aunque Fujita y cols. sugieren que la presencia de la matriz extracelular entre el tejido estromal podría influenciar el comportamiento del medio de contraste y resulta difícil diferenciar el MO del fibroma odontogénico y de otros tumores (Fujita *et al.* 2013).

Desde el punto de vista radiográfico, el diagnóstico diferencial de los mixomas odontogénicos incluye a la mayor parte de las lesiones radiolúcidas de los maxilares, preferentemente a las multiloculares, tales como el ameloblastoma, el tumor odontogénico queratoquístico, la lesión central de células gigantes, el hemangioma central, el quiste óseo aneurismático y con menos frecuencia las lesiones metastásicas (Simón *et al.* 2004, Noffke *et al.* 2007). Cuando la densidad de la lesión se ve incrementada, el mixoma odontogénico puede ser fácilmente confundido con la displasia fibrosa o fibroma osificante, y si además el tumor perfora corticales con formación de

espículas radiadas, la apariencia radiográfica puede ser de rayos de sol e imitar la apariencia de un osteosarcoma (Zhang *et al.* 2007).

3.2.5. Aspectos histopatológicos generales

A) Aspecto macroscópico

El mixoma odontogénico se observa como una masa infiltrativa gelatinosa o brillante, blanco grisáceo con mínima o nula cápsula verdadera (Li *et al.* 2006) (Figura 7).



Figura 7: Aspecto macroscópico del mixoma odontogénico

B) Aspecto microscópico:

Histopatológicamente el MO se caracteriza por presentar una proliferación hipocelular de células fusiformes o con forma estrellada, embebidas en una abundante matriz extracelular basófila, lo que le confiere el típico aspecto mixoide, con cantidades variables de colágeno, el cual, si es abundante suele condicionar que a la lesión se le denomine ocasionalmente fibromixoma (Barker 1999, Martínez *et al.* 2008, Gomes *et al.* 2011) (Figura 8).

Los procesos citoplasmáticos de las células del MO son frecuentemente largos y se anastomosan con los de otras células. El núcleo es usualmente pequeño e hiper cromático; sin embargo, pueden presentarse células binucleadas y mitosis, aunque son usualmente escasas. Las células están embebidas en una matriz intercelular mixoide que se debe a la presencia de abundantes mucopolisacáridos, compuestos principalmente por ácido hialurónico (Barker 1999).

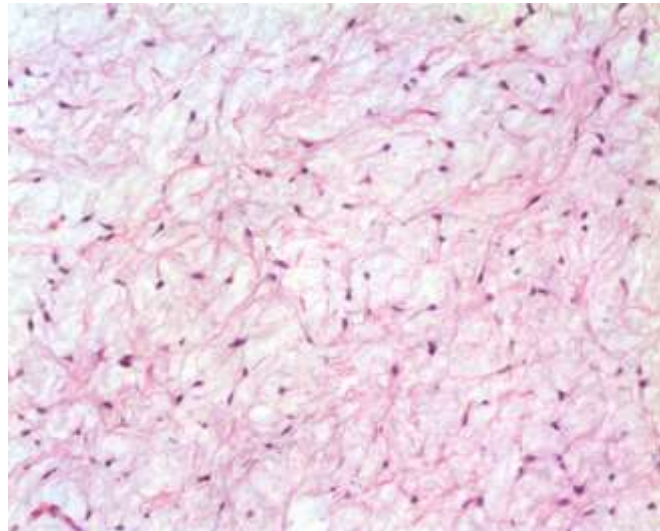


Figura 8: Aspecto histopatológico característico del mixoma odontogénico. Proliferación hipocelular de células fusiformes embebidas en una abundante matriz extracelular basófila (H & E 10x).

La vascularidad en el MO es mínima, aunque pueden aparecer numerosos capilares delicados, al igual que ocasionales nidos e islas de epitelio, lo cual no es un requisito necesario para el diagnóstico (Schmidt-Westhausen *et al.* 1994, Barker 1999, Simón *et al.* 2004).

3.2.6. La matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) del MO está compuesta por 4 clases de moléculas: colágeno, glicoproteínas estructurales no colagénicas, elastina y glicosaminoglicanos proteoglicanos. Los colágenos de tipo I, III y V pertenecen al tipo de colágeno de formación fibrilar, mientras que el colágeno tipo IV es menor, pero es un constituyente de la matriz extracelular que forma microfibrillas que sirven como anclaje flexible de interconexión entre las fibras de colágeno entre sí y con otras células (Schmidt-Westhausen *et al.* 1994).

La composición específica varía en cada caso, lo que contribuye a modificar la apariencia edematosa, facilitando la difusión de los metabolitos y la formación de redes permisivas para el crecimiento y la migración (Gomes *et al.* 2011).

Las proteínas de la matriz extracelular del MO juegan un rol importante en el crecimiento y en la diferenciación celular por interacción de las células de la matriz y los fenómenos inductivos. Además, influyen en el comportamiento biológico del tumor (Schmidt-Westhausen *et al.* 1994).

Los resultados de un estudio sobre las proteínas de la matriz del MO, realizado por Schmidt-Westhausen y cols. (Schmidt-Westhausen *et al.* 1994), ha mostrado principalmente positividad para el colágeno I y III, siendo el colágeno IV raramente encontrado en los MOs. En el mismo estudio, la fibronectina, la undulina y la tecnasina presentaron un patrón de tinción mucho más débil que en la mucosa oral (Schmidt-Westhausen *et al.* 1994).

En el trabajo de Zhao y cols. (Zhao *et al.* 1999) en donde se estudió la caracterización de las mucosustancias de 15 MOs, la matriz mixoide mostró

reacciones variables para los proteoglicanos y glicosaminoglucanos, fue positiva para condroitinsulfato (CS-6), ácido hialurónico (HA), proteoglicano –M (PG-M) y fueron negativas para keratan-sulfato (KS) y heparan-Sulfato (HS) (Zhao *et al.* 1999).

La matriz mixoide es positiva para Azul Alcian, pero puede ser PAS negativo o muy débilmente positivo (Barker 1999, Allen *et al.* 2000, Li *et al.* 2006).

3.2.7. Aspectos inmunohistoquímicos

Se han realizado varios estudios inmunohistoquímicos en el MO, tratando de determinar el posible origen de esta curiosa lesión.

A través de la revisión de la literatura hemos encontrado que las células tumorales presentan positividad para vimentina, HHF35, desmina, transferrina, ferritina, antitripsina α -1 (ACT α -1), y antitripsina α -1 (At α -1). Además fueron variablemente positivas para actina de músculo liso (SMA), orosomucoide-1 (ORM-1), factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), metaloproteinasa de matriz 1 (MMP-1), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), fibronectina, colágeno tipo I, condroitín sulfato 6 (CS6), condroitín sulfato 4 (CS4), dermatán sulfato (DS), ácido hialurónico (HA), proteoglicanos (PGS), tenascina, triptasa y receptor activador nuclear del coeficiente kappa B (RANK), ligando del receptor activador nuclear del coeficiente kappa B (RANK-L), osteoprotegerina (OPG) (Figura 9) (Takahashi *et al.* 1991, Schmidt-Westhausen *et al.* 1994, Lo Muzio *et al.* 1995, Barker 1999, Zhao *et al.* 1999, , Jaeger *et al.* 2000, Kimura *et al.* 2001, Bast *et al.* 2003, Andrade *et al.* 2008,

Martínez *et al.* 2008, Miyagi *et al.* 2008, Nonaka *et al.* 2009, Bologna *et al.* 2015).

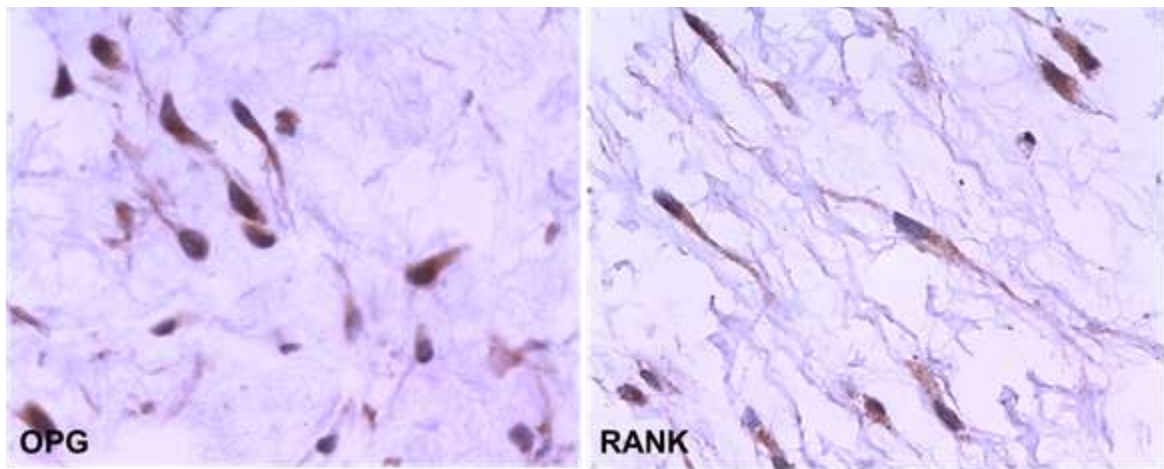


Figura 9: Nótese inmunexpresión para OPG y RANK en células tumorales (40x).

Por otra parte, los MOs son negativos para citoqueratina 1 (CK-1), citoqueratina 8 (CK-8), citoqueratina 18 (CK-18), grupo de diferenciación 68 (CD-68), enolasa neuronal específica (NSE), proteína ácida glial fibrilar (FGAP), proteína S-100, familia del regulador apoptótico Bax (Bax) y Bak (Bak), metaloproteínasa de matriz 3 (MMP-3), metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9), keratan-sulfato (KS), heparan-sulfato (HS) (Takahashi *et al.* 1991, Lo Muzio *et al.* 1996, Zhao *et al.* 1999, Jaeger *et al.* 2000, Kimura *et al.* 2001, Bast *et al.* 2003, Martínez *et al.* 2008) (Figura 10).

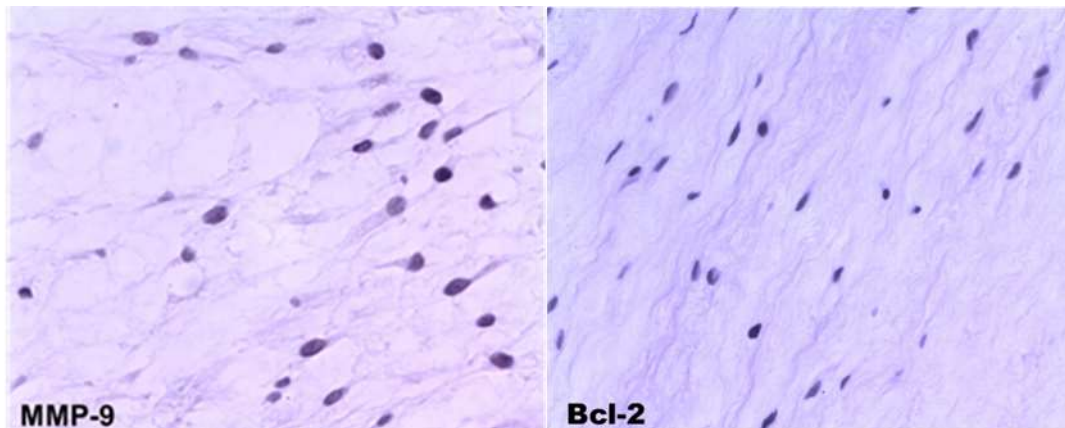


Figura 10: Se reconoce inmunoexpresión negativa para MMP-9 y Bcl-2 (40x).

En un porcentaje muy bajo son positivos para p53 (5-10%), Ki-67 (1%), proteína del linfoma de células B-2 (Bcl-2) (2-5% en epitelio) y proteína del linfoma de células B-X (Bcl-X) (10,4%) (Bast *et al.* 2003, Iezzi *et al.* 2007) (Figura 10).

Existe controversia sobre la frecuencia de restos de epitelio odontogénico observables en este tumor. En el estudio de Martínez y cols. (Martínez *et al.* 2008), se evaluaron 62 casos de MO y encontraron 5 casos positivos (8%) en laminillas evaluadas en H&E, cifra que se incrementó al evaluar con CK AE1/AE3 y CK-14 (24.2%). Sin embargo, al utilizar CK-19, considerado un marcador afín al epitelio odontogénico, solo se identificaron en el 4,8% (Martínez *et al.* 2008). Por otra parte, fue reportada la presencia de células cebadas en 45 de los 62 casos analizados en el trabajo de Martínez y cols. (72%) (Figura 11).

Hallazgos inmunohistoquímicos		
Positivos	Negativos	Baja positividad
Vimentina	HHF35	p-53
Desmina	PAS	Ki-67
transferrina	CK-1	Bcl-2
Ferritina	CK-8	Bcl-x
ORM-1	CK-18	
VEGF	CD-68	
MMP-1	MMP-9	
MMP-2	MMP-3	
Fibronectina	S-100	
Colágeno tipo 1	Bax	
Tenascin	Bak	
Triptasa	HS	
RANK/RANK-L/OPG	Prot. ácida glial fibrilar	
Actina musculo liso	KS	
	Enolasa neuronal específica	

Figura 11: Resultados inmunohistoquímicos descritos en el MO en diferentes estudios.

3.2.8. Diagnóstico diferencial

El mixoma odontogénico puede ser confundido microscópicamente con tejido normal no neoplásico, además de con otras neoplasias malignas y benignas. Los folículos dentales normales que rodean a la corona de un diente sin erupcionar, la papila dental que madura dentro de la pulpa del diente y el tumor odontogénico primordial pueden fácilmente ser incorrectamente diagnosticados como mixoma odontogénico o fibroma odontogénico (Barker 1999, Mosqueda *et al.* 2014) (Figura 12 A).

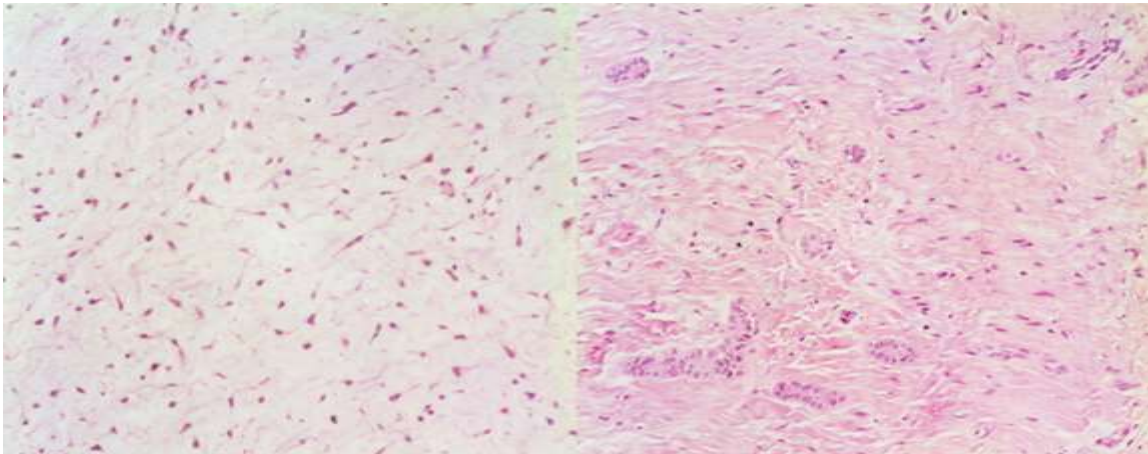


Figura 12 A: Aspecto histopatológico diferencial entre el mixoma odontogénico (izquierda) y el folículo dentario (derecha) (H&E 10x).

Una buena información clínica con su adecuada correlación radiográfica son esenciales para alcanzar el diagnóstico. Las características histopatológicas de forma aislada son insuficientes para tener un diagnóstico definitivo. Tanto el folículo dental como la papila dental pueden tener un componente mixoide prominente y los folículos pueden contener cordones de epitelio odontogénico similares a los encontrados en tumores odontogénicos (Barker 1999).

Generalmente los folículos dentales contienen más colágena que los mixomas y presentan un revestimiento interno, al menos parcial, de epitelio reducido del órgano del esmalte, que no se ve en los mixomas (Barker 1999) (Figura 12)

La papila dental o futura pulpa está compuesta casi enteramente por tejido mixoide con áreas periféricas demostrando odontoblastos columnares y ocasionalmente, producción de dentina (Barker 1999).

El tumor odontogénico primordial está compuesto por tejido fibroso hipocelular, con un mínimo estroma colagenoso, que contiene una cantidad variable de fibroblastos. En algunas zonas muestra tejido ectomesenquimatoso rico en células y en otras sólo áreas mixoides. La periferia del tumor se encuentra revestida por un epitelio columnar o cuboidal que asemeja el epitelio interno del órgano del esmalte. El tumor está rodeado por una delgada capsula fibrosa. Estas dos últimas características son típicas de este tumor y no aparecen en los MOs (Mosqueda *et al.* 2014) (Figura 12B).

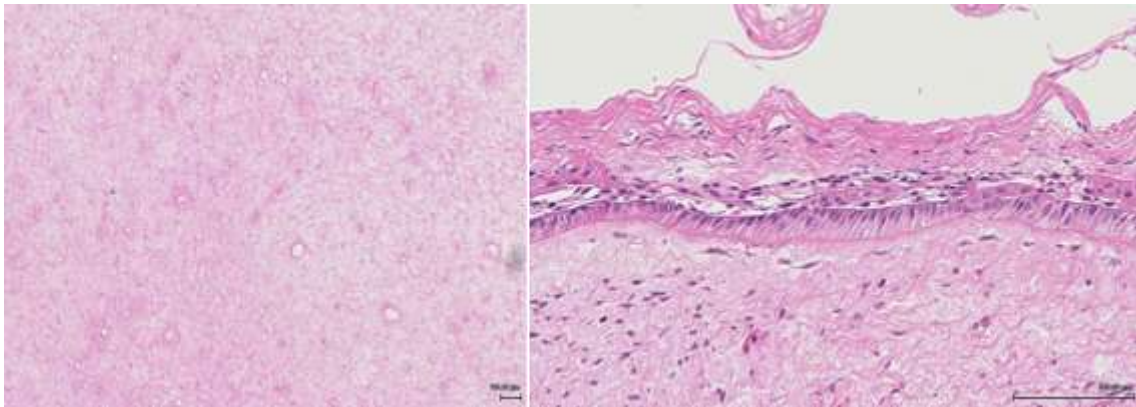


Figura 12B: Aspecto histopatológico del tumor odontogénico primordial. A la derecha el componente mesenquimal (H&E 10x) y a la izquierda el epitelio (H&E 25x).

3.2.9. Aspectos terapéuticos

El tratamiento de elección recomendado para los mixomas odontogénicos consiste en la cirugía radical o la escisión marginal conservadora, dependiendo del tamaño del tumor (Simón *et al.* 2004).

El curetaje es el tratamiento de elección para los mixomas pequeños de acuerdo con algunos autores (Schmidt-Westhausen *et al.* 1994), pero el rango de recurrencia posterior tras este procedimiento ha sido reportado en el orden del 10 al 33%, con una media del 25% (Schmidt-Westhausen *et al.* 1994).

El seguimiento radiológico postterapéutico debe de ser mantenido por muchos años, ya que han sido reportadas recurrencia hasta 15 años después de la cirugía (Schmidt-Westhausen *et al.* 1994, Lo Muzio *et al.* 1996).

Para los mixomas de gran tamaño, la enucleación con curetaje del hueso que lo rodea ha presentado una menor tasa de recurrencias, según algunos estudios (Barker 1999, Simon *et al.* 2004). Sin embargo, la resección puede ser necesaria cuando los bordes son poco definidos, especialmente en las lesiones del maxilar superior (Barker 1999, Simon *et al.* 2004).

3.3. El crecimiento neoplásico en el MO

El crecimiento neoplásico del MO parece estar determinado tanto por la actividad de las células tumorales como por los componentes del microambiente tumoral, incluyendo las células inflamatorias y los microvasos presentes en el mismo (Guzmán *et al.* 2012). Esto es debido a que, al igual que en los tejidos normales, los tumores requieren un suministro adecuado de oxígeno, metabolitos y una manera eficaz para eliminar los residuos tanto para

el mantenimiento de la viabilidad del tejido como para su crecimiento (Hande *et al.* 2011, Guzmán *et al.* 2012). Estos mecanismos se favorecen por la angiogénesis, que se define como el proceso por el cual son producidos nuevos vasos sanguíneos desde los vasos pre-existentes, tales como los capilares y vénulas post capilares (Maltby *et al.* 2009, Raica *et al.* 2009, Hande *et al.* 2011).

La angiogénesis es un proceso complejo y fundamental, que comprende múltiples etapas en las que están implicadas la remodelación de la matriz extracelular (MEC), la migración y proliferación de las células endoteliales, así como la morfogénesis de nuevos microvasos (Maltby *et al.* 2009, Hande *et al.* 2011). Folkman (Folkman 1971) mostró que el crecimiento tumoral es dependiente de la angiogénesis y que la inhibición de la misma podría ser terapéutica. Además, se predijo que los tumores no podrían crecer más allá de 1-2 mm de diámetro, sin que se formen vasos sanguíneos o capilares nuevos (microvasculatura) (Maltby *et al.* 2009, Hande *et al.* 2011).

Bajo condiciones fisiológicas, un equilibrio de factores pro y anti-angiogénicos prevalece en los microambientes tisulares; sin embargo, en condiciones patológicas como el crecimiento tumoral, existe una angiogénesis excesiva (Guzmán *et al.* 2012). Por ello se ha propuesto, que tanto la angiogénesis como la inflamación están involucrados en la evolución de algunos tumores, incluyendo los odontogénicos (Maltby *et al.* 2009, Guzmán *et al.* 2012, Gadbail *et al.* 2013).

Se sabe que los vasos sanguíneos tumorales presentan muchas anomalías estructurales y funcionales (Maltby *et al.* 2009). Ellos son irregulares en tamaño, forma, patrón de ramificación y no muestran las características reconocibles de arteriolas, capilares y vénulas. Las células endoteliales asociadas al tumor proliferan 50-200 veces más rápido que las células endoteliales normales. Los vasos presentan un endotelio estructuralmente defectuoso, que muestra discontinuidades o espacios que permiten y facilitan la permeabilidad de las macromoléculas y el tráfico de las células tumorales en el torrente sanguíneo. La membrana basal que envuelve a las células endoteliales y los pericitos de los vasos del tumor puede tener capas adicionales que no tienen ninguna asociación aparente con las células (Maltby *et al.* 2009). Los pericitos están estrechamente asociados con las células endoteliales, tienen forma anormal y capas adicionales de la membrana basal (Maltby, *et al.* 2009).

La cuantificación *in situ* de la densidad de los microvasos (DMV) por inmunohistoquímica es un forma habitual para evaluar la angiogénesis y se ha utilizado en diferentes tipos de tumores (Yao *et al.* 2007, Hande *et al.* 2011, Jamshidi *et al.* 2014). Por ello se han desarrollado diferentes moléculas como marcadores de la angiogénesis, tales como VEGF, CD-31, CD-34, factor de Von Willebrand, y CD-105, también llamado endoglina (Yao *et al.* 2007, Hande *et al.* 2011, Jamshidi *et al.* 2014).

La angiogénesis tumoral, la formación de nuevos vasos sanguíneos peritumorales e intratumorales, son eventos necesarios para el crecimiento y la metástasis de los tumores sólidos, y son considerados como uno de los eventos más

importantes que se producen en el proceso neoplásico (Saad *et al.* 2004, Yao *et al.* 2007).

Varios estudios (Saad *et al.* 2004, Ribatti *et al.* 2012) han reportado en una variedad de tumores malignos, una asociación entre el aumento de la angiogénesis y un aumento de la incidencia de metástasis, con la consiguiente disminución de la supervivencia (Saad *et al.* 2004, Ribatti *et al.* 2012).

El papel del estroma en la progresión tumoral es otra área importante de la investigación actual y se ha convertido en un potencial objetivo para la intervención terapéutica (Gadbail *et al.* 2013).

Varios factores estromales, como los factores de crecimiento y los angiogénicos, componentes de la MEC y las proteinasas, desempeñan un papel importante en la invasión, el crecimiento y la progresión de los tumores (Gadbail *et al.* 2013).

Tras el descubrimiento de los factores angiogénicos y sus inhibidores, la angiogénesis saltó de los estudios experimentales a los de aplicación clínica. Por ello la angiogénesis asociada a los tumores es considerada actualmente una prioridad en Oncología, lo cual está basado en numerosas evidencias que muestran una reducción significativa en el crecimiento del tumor después de realizar terapia antiangiogénica (Gadbail *et al.* 2013).

3.4. Marcadores inmunohistoquímicos

3.4.1. Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son un grupo de endopeptidasas dependientes del Zinc, que son sintetizadas por las células del tejido conectivo tales como los fibroblastos, osteoblastos, y odontoblastos (Miyagi *et al.* 2008), como enzimas latentes y son activadas por liberación de dominios propeptídicos (Rosenthal *et al.* 2006, Kessenbrock *et al.* 2010). Algunos estudios (Kanbe *et al.* 1999) refieren que también pueden ser activadas por las células cebadas.

Las MMPs se encargan de la degradación y remodelación de varios componentes de la matriz extracelular en distintos procesos fisiológicos, tales como la embriogénesis, la reparación o cicatrización de heridas, los procesos inflamatorios, el inicio de la reabsorción ósea, así como en condiciones patológicas tales como la invasión tumoral y la producción de metástasis (Thomas *et al.* 1999, Kumamoto *et al.* 2002, Bast *et al.* 2003, De Vicente *et al.* 2005, Rosenthal *et al.* 2006, Dantas da Silveira *et al.* 2007, Hohberger *et al.* 2008, Miyagi *et al.* 2008, Ribeiro *et al.* 2009, Kessenbrock *et al.* 2010, Nadalin *et al.* 2012, Varun *et al.* 2012). Por todo ello, son unos elementos clave en la comunicación molecular entre el tumor y el estroma (Kessenbrock *et al.* 2010).

En condiciones fisiológicas las metaloproteinasas son pobremente expresadas por los tejidos (Miyagi *et al.* 2008, Ribeiro *et al.* 2011).

Las MMPs permiten la angiogénesis tumoral, ya que dejan que las células endoteliales invadan la membrana basal para formar nuevos vasos (Varun *et al.* 2012), y son capaces de degradar los colágenos tipo IV, V, VII, X,

XI y XIV, gelatinina, elastina, proteoglicanos, fibronectina, por lo que tienen un importante papel en la progresión del cáncer (Varun *et al.* 2012).

Más de 25 tipos de MMPs han sido identificadas, y su clasificación está basada en el sustrato que degradan y en su estructura molecular (Figura 13) (Ribeiro *et al.* 2011).

Las MMPs se dividen en dos grandes grupos: solubles y asociadas a membrana. Las solubles son las colagenasas (MMP-1, 8 y 13), las gelatinasas (MMP-2 y 9), estromelisininas (MMP-3 y 10) matrilisininas (MMP-7 y 26) y un grupo heterogéneo de MMPs (MMP-12, 19, 20, 21, 23, 27 y 28). Las MMPs asociadas a membrana están representadas por las MMPs 14, 15, 16, 17, 24 y 25 (Thomas 1999, De Vicente *et al.* 2005, Ribeiro *et al.* 2011). Estas son secretadas y difundidas a través de la matriz extracelular (MEC), a excepción de las metaloproteinasas asociadas a membrana que están ancladas en la superficie de las células (Rosenthal *et al.* 2006).

Clasificación de las Metaloproteinasas	
Colagenasas	MT-MMPS
MMP-1	MMP-14
MMP-8	MMP-15
MMP-13	MMP-16
Gelatinasas	MMP-17
MMP-2	MMP-24
MMP-9	MMP-25
Estromelisinina	Otras MMPs
MMP-3	MMP-18
MMP-10	MMP-19
MMP-11	MMP-20
MMP-12	MMP-21
Matrilisinas	MMP-23
MMP-7	MMP-27
MMP-26	MMP-28

Figura 13: Clasificación de las metaloproteinasas de acuerdo a Ribeiro y *co/s.* 2011.

Dentro de la familia de las metaloproteinasas, las más estudiadas en nuestro campo son las gelatinasas, porque se han relacionado con la invasión de los tumores odontogénicos. La gelatinasa A se expresa en muchas células normales tales como los fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y condrocitos. La gelatinasa B es producida por queratinocitos, macrófagos, células epiteliales, fibroblastos, células plasmáticas y linfocitos (Saad *et al.* 2004, Henriques *et al.* 2011, Varun *et al.* 2012). Altas concentraciones de

gelatinasas son encontradas en tumores invasivos y esto permite a las células tumorales invadir el tejido normal (Saad *et al.* 2004, Miyagi *et al.* 2008).

La expresión de ambas gelatinasas ha sido investigada en numerosos tumores y se ha demostrado una asociación con un fenotipo invasivo y potencial de metástasis en células tumorales (Kumamoto *et al.* 2003, Nonaka *et al.* 2009). En el germen dentario, estas enzimas son expresadas principalmente en las células mesenquimales y se cree que regulan específicamente la remodelación de la membrana basal durante la morfogénesis dental (Kumamoto *et al.* 2003). Kumamoto *y cols.* encontraron reactividad para MMP-2 y 9 en los componentes mesenquimales en gérmenes dentarios (Kumamoto *et al.* 2003). Además, Ribeiro *y cols.* reconocen que pueden jugar un papel importante en la biomineralización del esmalte y la dentina pero con baja expresión en procesos fisiológicos (Ribeiro *et al.* 2011).

Varios estudios (Li *et al.* 1997, Kubota *et al.* 2002, Kumamoto *et al.* 2003, Pinheiro *et al.* 2004, Silveira *et al.* 2007, Cavalcante *et al.* 2008, Freitas *et al.* 2009, Nonaka *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2011) han demostrado la participación de las MMPs en la progresión de las lesiones odontogénicas (Li *et al.* 1997, Kubota *et al.* 2002, Kumamoto *et al.* 2003, Pinheiro *et al.* 2004, Silveira *et al.* 2007, Cavalcante *et al.* 2008, Freitas *et al.* 2009, Nonaka *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2011). La MMP-2 fue positiva en células estromales del ameloblastoma en contacto con tejido óseo, sugiriendo que esta gelatinasa es capaz de digerir la matriz ósea y contribuir a la invasión tumoral (Saad *et al.* 2004). La función de la MMP-2 sería facilitar el crecimiento local del tumor a través del hueso que lo rodea,

proporcionando una ventaja adicional sobre el tejido adyacente (Bast *et al.* 2003).

Por otro lado, la MMP-9 juega un papel importante en la degradación de la membrana basal, debido a su capacidad para degradar su componente principal que es el colágeno IV (De Vicente *et al.* 2005, Henriques *et al.* 2011).

Según el estudio de Henriques *y cols.* la mayor expresión de MMP-9 en los tumores odontogénicos sugiere una posible participación de esta proteína en la proliferación y diferenciación celular, y puede explicar la mayor reabsorción ósea, mayor potencial de invasión, y un peor pronóstico de los tumores odontogénicos, en comparación con los quistes dentígeros y los quistes radiculares (Henriques *et al.* 2011).

Varios estudios (Souza *et al.* 2002, Mott *et al.* 2004, Ribeiro *et al.* 2009) han enfatizado la acción y la importancia de las MMPs en el crecimiento de los procesos patológicos de origen diverso (Souza *et al.* 2002, Mott *et al.* 2004, Ribeiro *et al.* 2009). El mecanismo de crecimiento e invasión y potencial destructivo de algunos tumores odontogénicos también pueden estar influenciados por la secreción de MMPs. Alaeddini *y cols.* sugirieron que para una mejor comprensión del comportamiento biológico de estas lesiones, es necesario estudiar los componentes de la MEC para identificar las diferencias en la distribución y la expresión de estas proteínas entre lesiones indolentes quísticas y tumores más agresivos (Alaeddini *et al.* 2009). Por lo tanto, una expresión exuberante de las MMPs en algunos tumores odontogénicos podría estar relacionada con una mayor agresividad.

La actividad de las MMPs está regulada por múltiples pasos, incluyendo la transcripción, la activación y la inhibición (Varun *et al.* 2012). Esta compleja regulación de la actividad de las MMPs es necesaria, dado que la actividad de las proteinasas liberadas sin trabas por células inflamatorias pueden dar lugar a daños en los tejidos y la perpetuación de la respuesta inflamatoria en las enfermedades inflamatorias crónicas y cáncer (Kessenbrock *et al.* 2010).

La investigación sobre la acción de las MMPs ha demostrado que además de participar en la degradación de la matriz extracelular en la tumorigénesis, también participan en la adhesión, proliferación celular, etc., lo que hace que su actividad sea mucho más compleja de lo que se consideraba inicialmente (Saad *et al.* 2004). Por ejemplo, degradan los receptores de MMPs que participan en la adhesión celular, desenmascaran sitios críticos de interacción, activan factores de crecimiento, y actúan sobre los componentes de la MEC u otras proteínas para descubrir actividades biológicas ocultas que pueden afectar a la proliferación celular, la migración y la angiogénesis (Saad *et al.* 2004).

Algunos investigadores (Bast *et al.* 2003, Nonaka *et al.* 2009) han estudiado la expresión de estas proteínas en los mixomas odontogénicos, y específicamente existen dos estudios que son contradictorios entre sí. En primer lugar Bast *y cols.* (2003) observaron que el 90% de las células neoplásicas fueron inmunoreactivas a MMP-2, pero fueron negativas para MMP-9, por lo que atribuyen la agresividad del tumor a la sobreexpresión de MMP-2. Sin embargo, en el trabajo de Nonaka *y cols.* (2009), se sugiere la existencia de un mecanismo coordinado entre MMP-1, MMP-2 y MMP-9 en la

degradación de la MEC, ya que existiría una secuencia de eventos proteolíticos en esta neoplasia odontogénica benigna, empezando con la acción de MMP-1 sobre el colágeno tipo I (que es abundante en la matriz ósea que rodea al tejido neoplásico), siguiendo por la acción auxiliar de la MMP-2 que degrada el mismo sustrato y finalmente culminando con la acción combinada de esta y la MMP-9 (Bast *et al.* 2003, Nonaka *et al.* 2009).

Por todos estos antecedentes contradictorios, se sigue investigando a las gelatinasas en relación con el comportamiento invasivo del mixoma odontogénico (Bast *et al.* 2003, Nonaka *et al.* 2009).

3.4.2. Proteína CD-105

CD-105 es una glicoproteína de la membrana celular, homodimérica, componente del complejo receptor del factor de crecimiento TGF- β 1. Es una citoquina pleiotrópica que modula la angiogénesis mediante la regulación de diferentes funciones celulares, incluyendo la proliferación, la diferenciación y la migración (Saad *et al.* 2004, Yao *et al.* 2007, Hande *et al.* 2011, Gadbaill *et al.* 2013, Jamshidi *et al.* 2014)

Este marcador es un indicador de la proliferación de las células endoteliales y está regulada su sobreexpresión durante la angiogénesis (Jamshidi *et al.* 2014).

La expresión de CD-105 es una de las características más visibles de nueva formación de vasos sanguíneos; su expresión es negativa o insignificante en los vasos sanguíneos previamente formados, en el endotelio

de los vasos de los tejidos normales y en las células endoteliales de los vasos linfáticos (Saad *et al.* 2004, Yao *et al.* 2007, Hande *et al.* 2011).

Algunos estudios (Saad *et al.* 2004, Yao *et al.* 2007, Hande *et al.* 2011, Jamshidi *et al.* 2014), han demostrado que el anticuerpo CD-105 tiene mayor especificidad para vasos del tumor y se ha comparado con los otros marcadores endoteliales tales como: CD-31, CD-34 y el factor VIII. (Saad *et al.* 2004, Yao *et al.* 2007, Hande *et al.* 2011, Jamshidi *et al.* 2014). Esta mayor especificidad fue demostrada en el estudio de Jamshidi *y cols.* (2014) en el que hallaron diferencias significativas entre el ameloblastoma plexiforme y el uniuístico al realizar el estudio con CD-34, y ausencia de esa diferencia al utilizar CD-105. También hubieron diferencias en el estudio de Miyata *y cols.* (2013) en el que compararon CD-31, CD-34 y CD-105, viendo que este último identifica con mayor precisión la neoangiogenesis tumoral.

La tasa de progresión del tumor está asociada con un aumento intratumoral de la densidad microvascular (DMV), una medida histomorfológica de angiogenesis tumoral (Saad *et al.* 2004, Hande *et al.* 2011). La medición de la DMV es considerada ampliamente como un dato predictor del crecimiento tumoral, la aparición de metástasis y que se correlaciona con la agresividad y con la supervivencia de los pacientes (Saad *et al.* 2004, Hande *et al.* 2011).

No existe una metodología estandarizada para medir la angiogenesis/DMV. Algunos investigadores (Hande *et al.* 2011, Miyata *et al.* 2013, Dumitrescu *et al.* 2015) han utilizado analizadores de imagen y/o software específicos, otros lo han realizado por medio de contaje manual en

microfotografías de 10 áreas a 200x (Weidner *et al.* 1999, Yao *et al.* 2007, Nanashima *et al.* 2009, De Andrade Santos *et al.* 2011, Bologna *et al.* 2015) o de 3 a 5 áreas a 400x (Weidner *et al.* 1999, Jamshini *et al.* 2014). Estas diferencias hacen difícil la reproducibilidad y la comparación entre los estudios previos.

En nuestro trabajo optamos utilizar el método propuesto por Vered y cols. (Vered *et al.* 2006), con la gradilla propuesta por Bologna y cols (Bologna *et al.* 2011), ya que consideramos que cumple con los criterios de objetividad precisados y porque se trata de un método reproducible y al alcance de todos los laboratorios donde se pretenda estudiar contaje celular en inmunohistoquímica.

El crecimiento tumoral incluye no sólo el aumento de los vasos sanguíneos en número, sino también el cambio de moléculas de proteína en la composición de las células endoteliales (Saad *et al.* 2004, Hande *et al.* 2011).

La angiogénesis se ha investigado extensamente en diversos tumores, tales como carcinoma de mama, carcinoma colorrectal y carcinoma hepatocelular, así como en diversas lesiones orales como carcinoma oral de células escamosas, liquen plano oral y en algunas lesiones odontogénicas, y de hecho ha demostrado ser de importancia pronóstica en algunos de ellos y podría ser un potente objetivo para el desarrollo de terapéutica antiangiogénica en los casos recurrentes de tumores odontogénico (Guzmán *et al.* 2012, Gadbail *et al.* 2013). No hemos encontrado trabajos de investigación sobre angiogénesis en mixomas odontogénicos.

3.4.3. Marcadores para células cebadas

Otro componente celular importantes de los mixomas odontogénicos son las células cebadas, debido a su probable participación en el crecimiento y la expansión tumoral (Brown *et al.* 2008).

En la mayoría de las secciones histológicas, las células cebadas aparecen como células redondas o alargadas con un diámetro que oscila entre 8 y 20 micras y son fácilmente reconocibles por microscopía de luz por su positividad con la tinción con azul de toluidina (Maltby *et al.* 2009).

Las células cebadas se distinguen generalmente como las que contienen solo triptasa y las que contienen tanto quimasa como triptasa (Maltby *et al.* 2009). La mayoría de los estudios (Chatterjee *et al.* 2008, Martínez *et al.* 2008, Farahani *et al.* 2010, De Assis Caldas Pereira *et al.* 2012, De Noronha Santos Netto *et al.* 2012, Pyziak *et al.* 2013, Bracks *et al.* 2014, Kouhsoltani *et al.* 2015) utilizan el anticuerpo triptasa para identificar las células cebadas (Chatterjee *et al.* 2008, Martínez *et al.* 2008, Farahani *et al.* 2010, De Assis Caldas Pereira *et al.* 2012, De Noronha Santos Netto *et al.* 2012, Pyziak *et al.* 2013, Bracks *et al.* 2014, Kouhsoltani *et al.* 2015).

La función específica de estas células es aún desconocida, aunque se ha sugerido que los productos de su degranulación, probablemente cumplan un importante papel en el aumento de la destrucción de la matriz extracelular de la cápsula fibrosa, estimulando también la producción de citocinas, lo que a su vez facilita la expansión y el crecimiento de las lesiones (Galli *et al.* 2005, Chatterjee *et al.* 2008, Beaven 2009). También se ha informado acerca de la

capacidad que poseen estas células para secretar múltiples factores que pudieran impulsar el crecimiento, como por ejemplo las MMPs, tripsina, quimasa, TNF- α , varios tipos de IL (IL-3, 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 16), algunas quimocinas, así como diversos mediadores lipídicos, sustancias que colaboran con la destrucción de la matriz extracelular, promoviendo la inflamación y el potencial angiogénico de las lesiones (Lohi *et al.* 1992, Fang *et al.* 1996, Blair *et al.* 1997, DeClerck 2000, Galli *et al.* 2005, Caughey *et al.* 2007, Okayama *et al.* 2007, Beaven 2009, Nechushtan *et al.* 2010).

Las células cebadas aparecen como elementos importantes en el desarrollo de tumores y en su progresión (Ribatti *et al.* 2012). Su reclutamiento temprano en el microambiente del tumor y las múltiples funciones que son capaces de expresar, justifican el creciente interés por estas células en el campo de la investigación. Existen en la literatura numerosos trabajos (Ribatti *et al.* 2012, Pyziak *et al.* 2013) sobre el compromiso de estas células, en diferentes entornos tumorales, principalmente en tumores hematológicos (Ribatti *et al.* 2012).

En algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, el colorrectal y el cervico-uterino, entre otros, las células cebadas han demostrado tener importantes efectos proangiogénicos y de inducción en el crecimiento tumoral (Ribatti *et al.* 2012, Pyziak *et al.* 2013).

La presencia de las células cebadas que liberan tripsina cerca de sitios de germinación de capilares, sugiere una asociación entre las células cebadas

y la angiogénesis. Sin embargo, su papel en el desarrollo de vasos sanguíneos aún no se ha definido (Blair *et al.* 1997).

Los posibles efectos en el crecimiento tumoral se pueden clasificar en: los directos sobre las células tumorales, tales como la citotoxicidad mediada por células cebadas, o los indirectos tales como, que estas células promueven la angiogénesis, la remodelación de tejidos del entorno vecino y el reclutamiento de células inmunes (Maltby *et al.* 2009).

Diferentes estudios (Chatterjee *et al.* 2008, Martínez *et al.* 2008, Farahani *et al.* 2010, De Assis Caldas Pereira *et al.* 2012, De Noronha Santos Netto *et al.* 2012, Pyziak *et al.* 2013, Bracks *et al.* 2014, Kouhsoltani *et al.* 2015) han evaluado la presencia de células cebadas en lesiones de los maxilares, tanto quísticas como tumorales por medio de la utilización del anticuerpo tripstasa.

En el trabajo de Martínez y cols. (2008), estos autores hallaron que el 72% de los MOs presentaban células cebadas, así como en el 96% de las muestras del trabajo de De Assis Caldas Pereira y cols (2012). En estos dos estudios se menciona que aunque el papel de las células cebadas en los MOs es aún desconocido, estas células podrían contribuir a la degradación y remodelado de la matriz extracelular, así como participar en la producción y liberación de enzimas proteolíticas que favorecen la migración de las células tumorales y endoteliales facilitando de ese modo la invasión y el crecimiento tumoral (Martínez *et al.* 2008, De Assis Caldas Pereira *et al.* 2012). Además, las células cebadas participan en el proceso de remodelado óseo en lesiones

odontogénicos mediante la degranulación de las enzimas en la vecindad del tejido óseo presente en estas lesiones, lo que también contribuye en el crecimiento y expansión (De Assis Caldas Pereira *et al.* 2012).

De Assis Caldas Pereira *y cols.* (2012), estudiaron 45 tumores odontogénicos (TO), de los cuales 5 (11,1%) eran MO. En este trabajo se encontró que los MOs presentaron el promedio más bajo de células (1,3 \pm 0.26), en comparación con el ameloblastoma sólido y el tumor odontogénico queratoquístico (De Assis Caldas Pereira *et al.* 2012).

En un reciente estudio realizado por Kouhsoltani *y cols.* (2015), se evaluó la correlación entre las células cebadas y la expresión de CD-31 para clarificar el rol de estas células en el crecimiento de los tumores odontogénicos. De 48 TO, 7 eran MOs (14,58%), en los cuales se reconoció una baja densidad de células cebadas y no se encontraron diferencias significativas con respecto a la expresión de CD-31 (Kouhsoltani *et al.* 2015).

La posible implicación de las células cebadas en la biología del tumor ha estimulado la producción de medicamentos o procedimientos experimentales que conducen a la inhibición de la función de estas células, y así dan lugar a la regresión del tumor (Maltby *et al.* 2009). En efecto, las células cebadas podrían actuar como una nueva diana para el tratamiento adyuvante de los tumores a través de la inhibición selectiva de la angiogénesis, la remodelación tisular y la remoción de moléculas tumorales, lo que permite la secreción de citoquinas citotóxicas y la prevención de la supresión inmune mediada por ellos (Ribatti *et al.* 2011).

La importancia de las funciones de las células cebadas en el entorno tumoral sólo está empezando a ser revelada y es importante reconocer que estas funciones probablemente varían en función del tipo de tumor, de la etapa de su desarrollo y de las interacciones con otras células en el microambiente tumoral (Maltby *et al.* 2009).

3.4.4. El sistema molecular RANK /RANK-L /OPG

El descubrimiento de la función del sistema molecular en la osteoclastogénesis compuesto por el receptor del activador nuclear coeficiente kappa B (RANK), el receptor activador del factor nuclear ligando kappa B (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG), ha proporcionado importantes avances en el conocimiento de la biología del hueso (Soluk Tekkesin *et al.* 2011).

La proteína RANK es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, que actúa como activador central del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), que controla la transcripción de ADN, y es el receptor de señalización para RANK-L (Soluk Tekkesin *et al.* 2011); que se expresa en osteoclastos maduros y sus precursores (Da Silva *et al.* 2008, Sun *et al.* 2015) (Figura 14).

La proteína RANK-L es una proteína homotrimérica y está típicamente unida a la membrana de osteoblastos, osteocitos y células T activadas. La proteína RANK-L se une a RANK en la superficie de preosteoclastos y estimula el desarrollo y la activación de los osteoclastos (Wittrant *et al.* 2004, Soluk Tekkesin *et al.* 2011) (Figura 14).

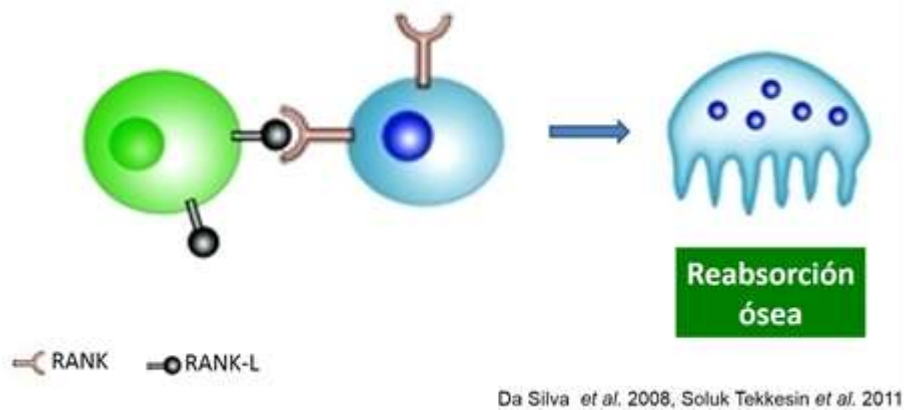


Figura 14: Diagrama esquemático que muestra la interacción de la proteína RANK-L , presente en los osteoblastos, que se une a la proteína RANK en la superficie de preosteoclastos y de esta manera estimula el desarrollo y la activación de los osteoclastos, lo que produce la reabsorción ósea.

La proteína OPG, miembro de la superfamilia del receptor 11B (TNFRSF11B), es secretada por los osteoblastos, además por muchos otros tipos de células incluyendo las células del corazón, del riñón, del hígado y del bazo (Andrade *et al.* 2008, Soluk Tekkesin *et al.* 2011). La proteína OPG es un receptor soluble para RANK-L que inhibe la pro-osteoclastogénesis, por medio de la interacción entre RANK-L y RANK, inhibiendo de ese modo la reabsorción ósea. Por lo tanto, el equilibrio entre la OPG y RANK-L regula la formación y la reabsorción ósea (Figura 15).

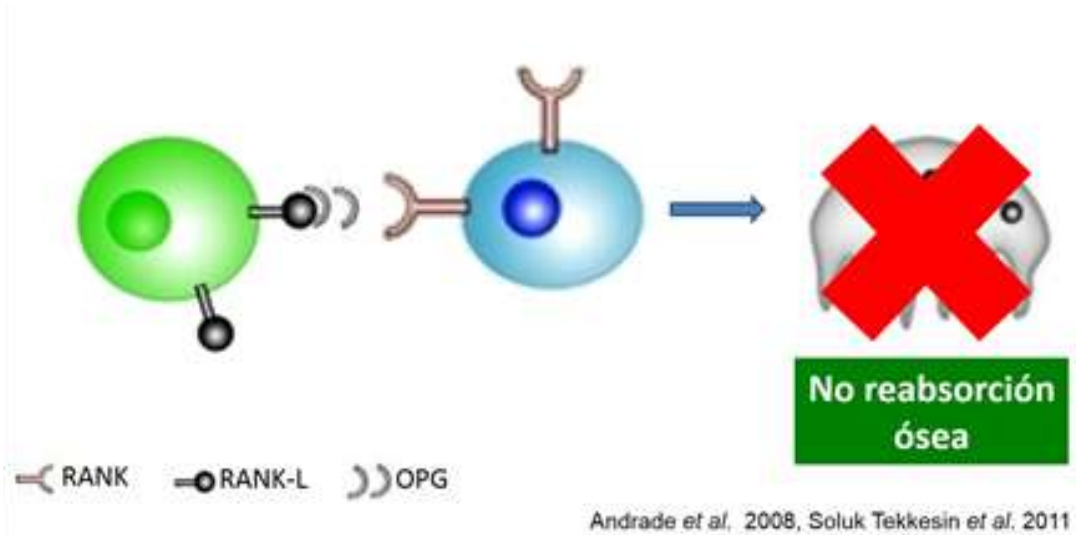


Figura 15: Diagrama esquemático de la participación de OPG en la interacción entre RANK presente en los osteoclastos y precursores y RANK-L localizada en la membrana de los osteoblastos, lo que impide la reabsorción ósea.

El desequilibrio en el sistema de RANK-L / OPG ha sido descrito en la patogénesis de diversos tumores óseos malignos primarios y secundarios (Soluk Tekkesin *et al.* 2011). Por otra parte, pueden estar implicados en la regulación del sistema inmunológico, la calcificación arterial y un número de enfermedades óseas metabólicas (Soluk Tekkesin *et al.* 2011).

De esta manera, se ha demostrado que el sistema RANK,/RANK-L/OPG puede estar anormalmente regulado en diversas patologías osteolíticas, incluyendo lesiones neoplasias y no neoplásicas odontogénicas, donde una mayor expresión RANK-L o disminución de los niveles de OPG juegan un papel importante en la destrucción ósea asociada al tumor (Da Silva *et al.* 2008).

Se ha estudiado el papel de los factores reguladores de osteoclastos en la progresión de algunas lesiones odontogénicas, tales como ameloblastomas, tumores odontogénicos queratoquísticos, quistes radiculares y quistes dentígeros (Soluk Tekkesin *et al.* 2011). Se han detectado OPG y RANK-L en

odontoblastos, ameloblastos, células de la pulpa, y del ligamento periodontal y su expresión ha demostrado que desempeñan un papel importante en la osteoclastogénesis y la resorción ósea, tanto en la formación de un diente y en la erupción (Rani *et al.* 2000, Wise *et al.* 2000, Kumamoto *et al.* 2004, Da Silva *et al.* 2008).

En el trabajo de Da Silva *y cols.* (2008), también se observó una reducción significativa en el contenido de RANK/ RANK-L/ OPG en los folículos dentales. En contraste, resultados previos demostraron una mayor expresión de RANK-L en los folículos dentales en comparación con ameloblastomas (Kumamoto *et al.* 2004), indicando en éstos últimos, la capacidad de regulación disminuída del metabolismo óseo, debido a la transformación neoplásica del epitelio odontogénico (Kumamoto *et al.* 2004).

Además de la función del sistema RANK/RANKL/OPG en la resorción ósea, la evidencia actual indica que las interacciones entre los miembros de la familia TNF y sus receptores específicos son influyentes en varias funciones, incluyendo la regulación de las células inmunes, la inhibición de la apoptosis, además de la diferenciación celular y proliferación (Da Silva *et al.* 2008). Por lo tanto, estos aspectos deben estudiarse más a fondo en los tumores odontogénicos (Da Silva *et al.* 2008).

El descubrimiento y caracterización de la vía de señalización RANK/RANK-L/OPG y la comprensión de su papel en la patogénesis de la pérdida ósea ha sido el fundamento para el desarrollo de fármacos con la capacidad de modular la osteoclastogénesis inducida por RANK (Da Silva *et al.*

2008). La interferencia con RANK-L mediante la administración sistémica de OPG podría dar lugar a evitar la reabsorción ósea (Da Silva *et al.* 2008). Por lo tanto, conocer si en el mecanismo de crecimiento del MO están involucradas alteraciones en esta vía, nos sugeriría el desarrollo de posibles blancos terapéuticos para intervenir en la prevención de fenómenos osteolíticos generados en este tipo de tumor.

3.4.5. Proteína Bcl-2

La proteína Bcl-2 pertenece al grupo de proteínas antiapoptóticas que regulan la muerte celular programada. La sobreexpresión se encuentra en la fase temprana de la carcinogénesis epitelial y en la mayoría de los tumores humanos, tales como las neoplasias hematopoyéticas malignas, tumores sólidos de intestino, mama, pulmón y piel, así como en etapas tempranas del desarrollo dentario (Krajewski *et al.* 1998, Kalibović Govorko *et al.* 2010 , Soluk Tekkeşin *et al.* 2012).

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada o muerte fisiológica, juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis dentro de todos los organismos multicelulares, y en el control de la renovación de las células en los tejidos normales y neoplásicos en cooperación con la proliferación celular (Soluk Tekkeşin *et al.* 2012). Debido a que la proteína Bcl-2 es un regulador crítico de la apoptosis, ésta juega un papel clave en las primeras etapas de la tumorigénesis oral (Sindura *et al.* 2013).

Es de suponer que una mejor comprensión de los mecanismos moleculares contribuya a un mejor conocimiento de la evolución de los tumores odontogénicos y al desarrollo de nuevos procedimientos terapéuticos (Florescu *et al.* 2012). La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en tumores odontogénicos, y en este caso en los mixomas odontogénicos, ayudaría a entender mejor su mecanismo de invasión y a la vez su comportamiento clínico (Metgud *et al.* 2013). Sin embargo, al día de hoy existen pocos trabajos que han estudiado las proteínas relacionadas con la apoptosis y el índice apoptótico en tumores odontogénicos y quistes, entre los que podemos resaltar los trabajos hechos en ameloblastomas y sus variantes (Mitsuyasu *et al.* 1997, Florescu *et al.* 2012, Soluk Tekkeşin *et al.* 2012, Sindura *et al.* 2013, Metgud *et al.* 2013) y en el TOQQ (Galvão *et al.* 2013, Metgud *et al.* 2013, Sindura *et al.* 2013), en los cuales se relaciona el aumento de expresión de esta proteína con un comportamiento clínico agresivo.

En los MOs la expresión de esta proteína es controvertida, ya que Bcl-2 fue positiva hasta el 6,5% de los tumores estudiados en el trabajo de Bast y *cols.* (2003) y negativa en los trabajos de Iezzi y *cols.* (2007) y Martínez y *cols.* (2008).

El mixoma odontogénico es una neoplasia que puede ser utilizada como un buen modelo para analizar si los procesos de invasión y crecimiento están relacionados o no con la angiogénesis, o con alguna falla de los mecanismos apoptóticos. Es de esperar que la expresión de las proteínas involucradas en estos procesos sea diferente en los mixomas odontogénicos en comparación con los folículos dentales, debido a que éstos últimos tienen un crecimiento

limitado, mientras que el MO es una neoplasia benigna agresiva e infiltrativa, en la cual se cree que un mecanismo de invasión y progresión sea la desregulación de esta vía y no precisamente la proliferación tumoral, aunque también pueden existir otros factores coadyuvantes que al estimular la reabsorción ósea mediante la activación de los osteoclastos, permitan que estas lesiones tengan la posibilidad de expandirse.

4. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

4. PACIENTES, MATERIALES Y METODOS

4.1. Pacientes

Hemos realizado un estudio observacional, trasversal retrospectivo, en 36 muestras (almacenadas en bloques de parafina) de biopsias de pacientes diagnosticados de mixoma odontogénico y folículo dentario.

Fueron incluidas muestras tisulares de 18 pacientes cuyo diagnóstico histopatológico correspondió a mixoma odontogénico (MO), provenientes del Laboratorio de Patología Oral de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco (México) y del Servicio de Diagnóstico en Patología bucal y maxilofacial “Peribact” (México).

En todos los casos se registraron los principales datos clínicos de edad, sexo, localización anatómica, evolución hasta el diagnóstico, tamaño tumoral mayor, síntomas y hallazgos radiográficos (reabsorción dentaria, perforación cortical, desplazamiento dentario, etc.).

Las muestras correspondieron a 10 (55,5%) mujeres y 8 (44,4%) con una edad media de 32,83 años (rango 10-53).

Se incluyeron como control 18 casos correspondientes a folículos dentarios (FD) libres de inflamación, diagnosticados en el Servicio de Diagnóstico en Patología bucal y maxilofacial “Peribact” (México), de los cuales se obtuvieron los datos clínicos relativos a edad, sexo y localización.

Estas muestras correspondieron a 9 (50%) mujeres y 9 (50%) con una edad media de 14,4 años (rango 9-22).

Este estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco.

4.1.1. Criterios de selección para los MOs

- Casos con lesiones que cumplieran con los criterios histopatológicos diagnósticos propuestos por la Organización Mundial de la Salud para el diagnóstico de Mixoma Odontogénico (Buchner *et al.* 2005): lesión formada por una proliferación hipocelular de células fusiformes o estelares dispersas en una abundante matriz extracelular basófila con cantidades variables de colágeno.

4.1.2. Criterios de exclusión para los MOs

- Casos con lesiones con características histopatológicas similares, tales como: tumor odontogénico primordial, excluido por poseer cápsula y revestimiento periférico compuesto por un epitelio columnar o cuboidal que asemeja el epitelio interno del esmalte (Mosqueda *et al.* 2014); folículo dentario hiperplásico, descartado por la presencia en su cara interna de revestimiento total o parcial de epitelio reducido del esmalte y otras lesiones con componente mesenquimatoso mixoide como: neurofibroma, condrosarcoma e histiocitoma fibroso maligno mixoide (Barnes *et al.* 2005)

- Casos que no contaran con suficiente tejido como para obtener cortes suficientes para realizar las diversas reacciones inmunohistoquímicas propuestas.

- Casos que mostrasen fenómenos inflamatorios en toda la muestra.

- Casos con muestras que, después de realizar las técnicas de inmunohistoquímica, sufrieran algún daño tisular que no permitiera su evaluación.

4.1.3. Criterios de inclusión y exclusión para los FDs

- Se incluyeron aquellos casos con lesiones con características histopatológicas de Folículos dentarios constituídos por tejido conectivo fibroso laxo, con áreas mixoides de extensión variable y con cantidades variables de colágeno, epitelio de revestimiento interno, al menos parcialmente, restos epiteliales odontogénicos y calcificaciones dispersas en cantidad variable (pero pueden estar ausentes) (Barker 1999).
- Se incluyeron los casos que aparecían radiográficamente como una radiolucidez semicircular rodeando a un diente retenido (Kim *et al.* 1993).
- Se excluyeron aquellos casos que no contaran con suficiente tejido como para obtener cortes suficientes para realizar las diversas reacciones inmunohistoquímicas propuestas.
- Se excluyeron aquellos casos que mostraban fenómenos inflamatorios.
- Se excluyeron aquellos casos con muestras que, después de realizar las técnicas de inmunohistoquímica, sufrieran algún daño tisular que no permitiera su evaluación.

Los MOs fueron clasificados en relación al tamaño tumoral mayor radiológico en el momento del diagnóstico, considerando como mixomas odontogénicos pequeños (MOP) (N=4) a los que median hasta 3 cm, y

mixomas odontogénicos grandes (MOG) a los que eran mayores a 3 cm (N=13). De un MO, no se conocían datos referentes al tamaño.

4.2. Materiales

Los materiales utilizados en nuestro estudio fueron:

- Formol tamponado (HYCEL[®])
- Alcohol Absoluto (Merck Cat. N°: 100983.1000)
- Xilol (HYCEL[®])
- Parafina Thermo scientific (Histo plast[®])
- EDTA 1X ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{O C}_{10} \text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma NC:E-5134)
- Solución de Citrato 1X (Bio SB) (Inmuno DNA RETREIVER 20X)
- Portaobjetos Polysine[®] Slides
- Cubreobjetos (Automart-Star)
- Hematoxilina de Gill[®]
- Carbonato de Litio saturado (Golden Bell)
- Medio permanente resinoso Entellan[®]
- Diluyente S2022, Dako[®], Carpinteria, Ca, EEUU
- Sistema de visualización Mouse Rabil Immunodetector (Bio SB[®])
- 3,3 diaminobenzidina (DAB) Dako[®]
- Buffer fosfato salino (PBS) Dako[®]
- Peroxido de Hidrógeno 30 vol.

4.3. Infraestructura

Para poder llevar a cabo los estudios inmunohistoquímicos se utilizó la siguiente infraestructura:

- Estufa Selecta Incubat[®]

- Deshidratador de tejidos Leica TP 1020[®]
- Microscopio Olympus CX31[®]
- Micrótopo Leica RM 2125[®]
- Software Image J[®]
- Olla de microondas (Nordic Ware Microwave Tender Cooker)
- Sequenza[™] slide Rack

4.4. Anticuerpos

Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron los anticuerpos metaloproteinasa 2 (MMP-2), metaloproteinasa 9 (MMP-9), triptasa, endoglina o CD-105, receptor activador nuclear del coeficiente kappa B (RANK), ligando del receptor activador nuclear del coeficiente kappa B (RANK-L), osteoprotegerina (OPG) y proteína del linfoma de células B- 2 (Bcl-2), siguiendo sus respectivas especificaciones (Figura 16).

Anticuerpo	Clon	Marca comercial	Dilución	Tiempo de incubación	Tipo de Tinción
MMP-2	4D3	Santacruz®	1/50	45'	Citoplasmática
MMP-9	2C3	Santacruz®	1/50	45'	Citoplasmática
CD105	Policlonal	Bio SB®	1/50	45'	Citoplasmática
Triptasa	AA1	Dako®	1/50	30'	Citoplasmática
OPG	Policlonal	Gene Tex®	1/150	45'	Citoplasmática y de membrana
RANK	Policlonal	Gene Tex®	1/500	45'	Citoplasmática y de membrana
RANK-L	Policlonal	Gene Tex®	1/800	45'	Citoplasmática y de membrana
Bcl2	Policlonal	Dako®	1 /100	45'	Citoplasmática

Figura 16: Anticuerpos utilizados en el estudio, con sus respectivas especificaciones

4.5. Métodos

4.5.1. Procedimiento histológico

Para el análisis histopatológico se siguió un procedimiento convencional de fijación, deshidratación, inclusión en parafina y tinción con hematoxilina y eosina.

A. Fijación de las muestras

a. Todas las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% durante 24 horas, en un volumen aproximado de 20/1 con respecto al tamaño de la muestra.

B. Deshidratación de las muestras e inclusión en parafina

Este procedimiento se realizó en un equipo procesador de tejidos, Leica TP 1020[®] que consta de 12 vasos con diferentes soluciones de alcoholes crecientes (60°,70°,80°,96°, absoluto y alcohol/xilol), xiloles y parafina a 58°.

a. En el primer paso se realizó la deshidratación de las muestras en alcoholes crecientes, comenzando con alcohol al 60% durante 1 hora, seguido de una hora en alcohol de 70 y 80%, dos horas en alcohol de 96% y una hora por cada vaso en alcohol absoluto.

b. Seguidamente las muestras pasaron a los vasos de xilol de 1 hora cada uno, eliminando el alcohol de la muestra y permitiendo la penetración de la parafina (entre 57 y 59 grados centígrados). Tras la inclusión se realizó el molde orientando adecuadamente la muestra.

C. Tinción con Hematoxilina y Eosina

- a. Se realizaron cortes de 3 μm que fueron montados en portaobjetos para ser teñidos con hematoxilina y eosina según un procedimiento estandarizado.
- b. Las laminillas se desparafinaron en una estufa a 60°C durante 30 minutos.
- c. Se eliminó el exceso de parafina en xilol durante 5 minutos y luego se procedió a hidratar en alcoholes decrecientes finalizando con agua (tren de hidratación y deshidratación).
- d. Tinción con hematoxilina Gill® durante 5-10 minutos y posterior lavado con agua corriente por tres baños
- e. El virado se realizó con carbonato de Litio saturado.
- f. Posteriormente se realizó la tinción con eosina-floxina, realizando 15 baños sucesivos.
- g. Deshidratación en alcoholes crecientes.
- h. Montaje en medio permanente resinoso Eukitt®, previa eliminación del exceso de alcohol con xilol.

Procedimiento inmunohistoquímico

Para el análisis inmunohistoquímico de las biopsias con los distintos anticuerpos, se siguió un procedimiento convencional cualitativo y cuantitativo, con algunas pequeñas modificaciones dependiendo de cada anticuerpo.

Se realizaron cortes del tejido a 2 μm , que fueron montados en portaobjetos especiales Polysine® Slides (electro cargados).

- a. Se fundió la parafina durante 30 minutos a 60 grados en una estufa, posteriormente se realizó un baño de 5 minutos en xilol y se hidrataron las laminillas con alcohol decreciente hasta llegar a agua destilada.
- b. El desenmascaramiento antigénico se realizó con calor y presión. El proceso se efectuó en olla para microondas (Nordic Ware Microwave Tender Cooker®), con un precalentamiento previo de 5 minutos.
- c. Se rellenaron los vasos de coplin de polipropileno en los que se introdujo soluciones de pH alto (EDTA 1X) o pH bajo (solución de citrato 1X), esta elección dependía de las pruebas que se realizaron previamente con los anticuerpos. El calentamiento de la olla a presión se efectuó en un horno microondas por un periodo aproximado de 8-10 min y tras alcanzar una presión uniforme (señalada por el silbido de la olla), se contabilizó 1 minuto hasta proceder al apagado del microondas. Posteriormente se dejó enfriar la olla a temperatura ambiente hasta que bajó la válvula (8 min).
- d. Lavados con PBS 1X durante 5 minutos.
- e. Inhibición de la peroxidasa endógena con 0,09% de H₂O₂ durante 10 minutos.
- f. Lavados con PBS 1X durante 5 minutos.
- g. Se montaron las laminillas (portaobjetos) sobre los cubridores (*coverplates*) previamente humedecidos con agua destilada para producir una superficie mojada, esto para la realización de la técnica de inmunohistoquímica por capilaridad. Se montaron los *coverplates* sobre bastidores (*racks*) para

mantener las laminillas en posición vertical (para provocar flujo por capilaridad). Se realizó la prueba de agua, que consiste en verificar que todos los *coverplates* estén bien colocados, que no haya pérdida de líquido y que éstos tengan la misma velocidad y el mismo tiempo de contacto con las respectivas muestras.

h. Lavados con PBS 1X durante 5 minutos.

i. Se hizo la incubación del anticuerpo primario en cámaras de humedad (Sequenza™ Slide Rack®). Dilución de los anticuerpos con el diluyente S2022 (DAKO®, Carpintería, Ca, EEUU). El tipo de anticuerpo, marca comercial, dilución y tiempo de incubación aparecen en la Figura 16.

j. Lavados con PBS 1X durante 5 minutos.

k. Revelado del proceso con el sistema de visualización Mouse Rabil Immunodetector (BioSB®).

l. Lavados con PBS 1X durante 5 minutos.

m. La reacción se reveló con 3,3 diaminobenzidina-hidroclorídico (DAB) produciendo un precipitado de color marrón.

n. Lavados con PBS 1X durante 5 minutos.

o. Se contrastaron las secciones con hematoxilina de Gill® durante 1 minuto y montaje en un medio permanente (Eukitt®).

4.5.2. Valoración

Se realizó la valoración cualitativa y semicuantitativa de los aspectos histológicos e inmunohistoquímicos utilizando un microscopio Olympus® (CX31).

Se escogieron 5 campos representativos en cada caso, que fueron fotografiados a 40x.

La totalidad de las fotos de las lesiones fueron analizadas por tres observadores independientes y se realizó la estandarización de los mismos, alcanzándose un índice kappa de 0,88.

4.5.2.1. Valoración histológica

Se valoraron las características de los MOs y los FDs en la totalidad de las muestras, escogiendo los 5 campos representativos de la cada lesión. Se tomó en cuenta que debía existir ausencia de inflamación en la zona de la toma de fotografía.

4.5.2.2. Valoración inmunohistoquímica

En todos los casos se realizó una valoración semicuantitativa de la expresión de cada marcador por medio de 5 campos representativos de la lesión que se presentaban capturados por medio de las 5 fotografías, utilizando el software Image J®.

A. Anticuerpo CD-105

Para el análisis de la DMV, mediante el uso de CD-105, se utilizó el método de Vered y cols. (2006) con la gradilla propuesta por Bologna y cols. (2011).

La evaluación de la tinción de esta proteína se realizó con ayuda de una cámara digital (Olympus® CX 31) por medio de la cual se tomaron cinco microfotografías de las zonas más representativas a 40x. Los archivos fueron descargados en un ordenador personal y se guardaron como archivos JPEG. Posteriormente se colocó encima de la fotografía una gradilla de 6x6 y en cada cuadro de la gradilla se unió una línea horizontal con una línea vertical, formando con esta unión, un punto de conteo (Figura 17). En los casos en los que la pared o luz del vaso interceptaba en más de un punto, se consideraba solamente un punto positivo. De esta manera se obtuvo la DMV tanto en los MOs como en los FDs.

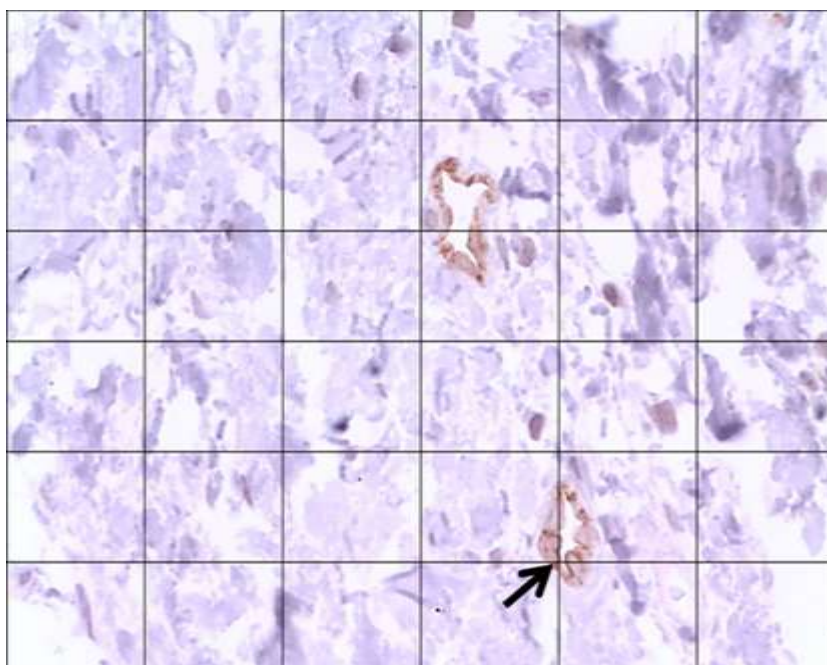


Figura 17:
Valoración vascular con CD-105. Nótese la flecha que indica un conteo positivo, localizado en la unión de una línea horizontal con una línea vertical coincidente con la pared de un vaso sanguíneo (40x).

B. Anticuerpos: MMP-2, MMP-9, RANK, RANK-L, OPG, Bcl-2 y Triptasa

Se seleccionaron cinco campos al azar de secciones representativas de los MOs y FDs.

El cálculo de las células positivas en el estroma se realizó a un aumento de 10x, que representa un área de 5,3 mm². Con la ayuda de una cámara digital (Olympus CX31[®]), se tomaron microfotografías de las zonas representativas a 40x. Luego de tomar las microfotografías, estos archivos fueron descargados en un ordenador personal y se guardaron como archivos JPEG. Cada archivo fue abierto con el uso del programa Microsoft Power Point[®] y con el uso de la función tabla se construyó una gradilla de 6x6, que se superpuso en la imagen de cada microfotografía. La gradilla fue agrandada y adaptada al tamaño de cada microfotografía. En cada imagen el inicio del conteo celular se realizó desde el marco superior izquierdo y se culminó en el marco superior derecho, siguiendo un mismo orden, utilizando el método de Bologna *y cols.* (Bologna *et al.* 2011) (Figura 18). Se realizó el contaje manual del número de células positivas y negativas en cada recuadro de la gradilla.

Los resultados fueron resumidos empleando estadísticos descriptivos. Para obtener una buena representatividad en la evaluación de los resultados de la valoración inmunohistoquímica, se realizó la estandarización de criterios de cada examinador contra la de los otros dos patólogos.

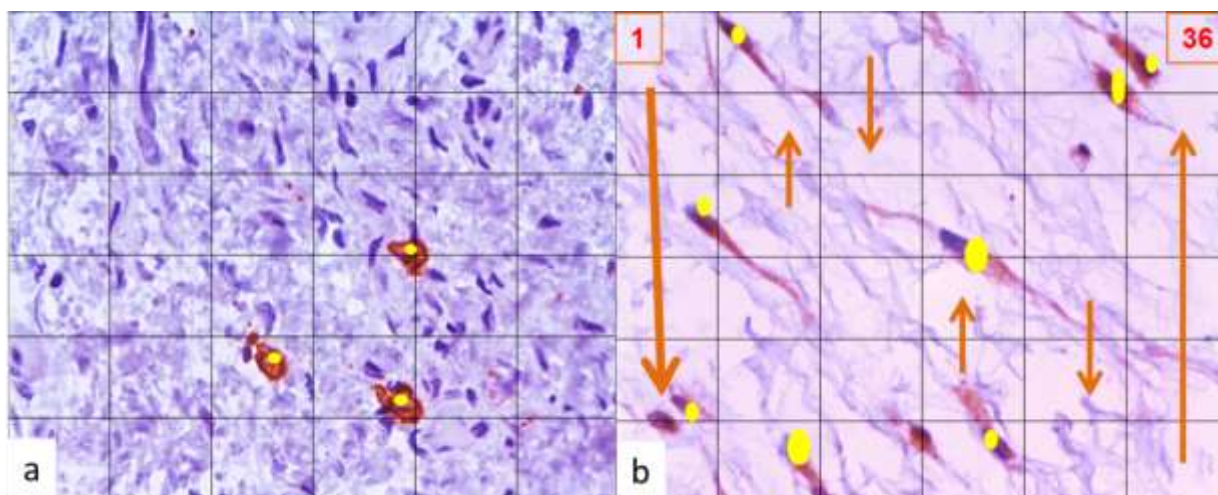


Figura 18:a) Positividad citoplasmática en tres células cebadas, las cuales han sido punteadas para registro del hallazgo (Triptasa 40x). b) Positividad citoplásmica en 8 células punteadas para su registro, y la secuencia seguida para el registro celular, iniciando en la cuadrilla 1 (ángulo superior izquierdo de la fotografía) y terminando en la cuadrilla 36 (ángulo superior derecho) (Bcl-2 40x).

4.6. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis estadístico descriptivo y comparativo, utilizando la aplicación informática SPSS® versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL, EEUU).

Las variables cuantitativas se describieron como medias, medianas, porcentajes y rangos. Las variables categóricas se describieron en números absolutos y porcentajes.

El contraste de asociación de las variables categóricas se efectuó mediante la prueba de X^2 de Pearson, y cuando las frecuencias esperadas eran inferiores a 5 se utilizó el test exacto de Fisher. Se analizó la correlación de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos mediante la correlación de Spearman. La comparación de los niveles medios de expresión de los anticuerpos en los grupos analizados, se llevó a cabo mediante el test de U de

Mann Whitney. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con valores de $p < 0,05$.

4.7. Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las principales bases bibliográficas y bibliotecas virtuales disponibles en Internet, como Medline, National Library of Medicine (Pubmed) o Scielo con las palabras claves: mixoma odontogénico, folículo dental, tumores odontogénicos, angiogénesis tumoral, crecimiento neoplásico, MMP-2, MMP-9, triptasa, endogлина (CD105), RANK, RANK-L, OPG, y Bcl-2.

A partir de estas búsquedas se obtuvieron más de 935 referencias bibliográficas, de las cuales se seleccionaron las directamente relacionadas con este trabajo. Para determinar el orden en la bibliografía de este trabajo hemos utilizado el sistema Reference Manager Professional Edition Versión 11© 2000, empleando el formato Vancouver.

5. RESULTADOS

RESULTADOS

5.1. Hallazgos clínicos

A) Mixomas odontogénicos

Los 18 casos de MO que se estudiaron correspondían en 10 (55,5 %) a mujeres y en 8 (44,4%) a hombres, y presentaban una edad media en el momento del diagnóstico de 32,83 años ($\pm 13,2$), un mínimo de 10 y un máximo de 53 años (Figura 19).

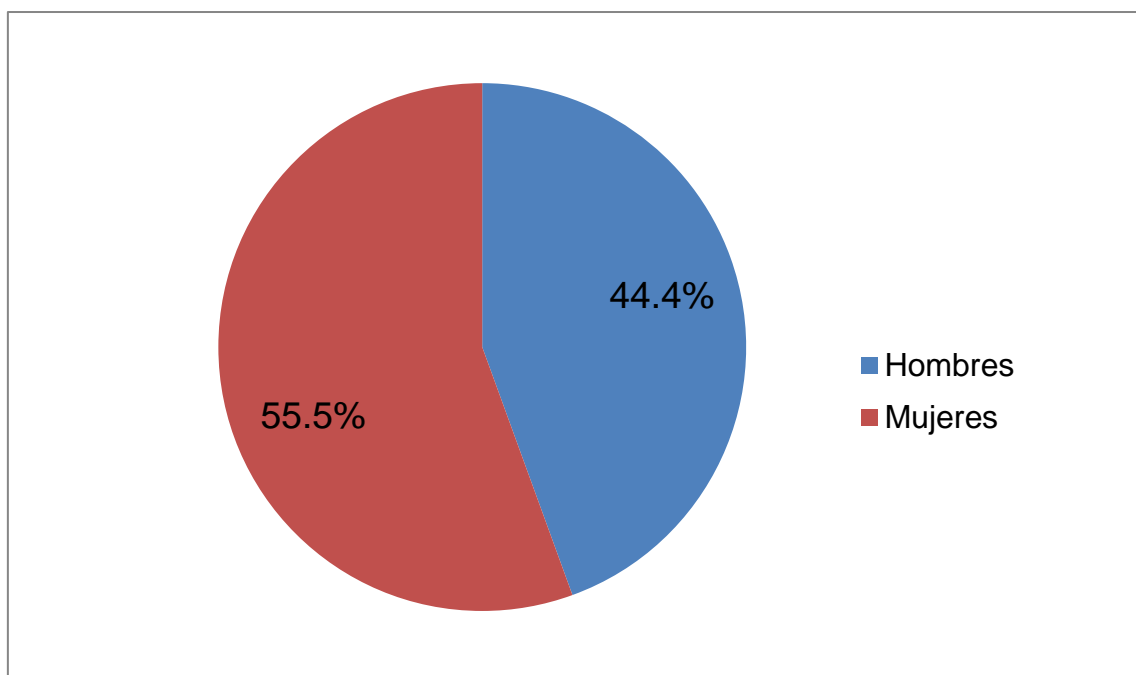


Figura 19: Distribución por género de los mixomas odontogénicos estudiados

La localización de los tumores fue en 9 casos (50%) en el maxilar superior y en 9 (50%) en la mandíbula. Los casos mandibulares se situaban específicamente: 1 caso (11,1%) en el ángulo mandibular, 2 (22,2%) en el ángulo y la rama mandibular, 4 (44,4%) en el cuerpo mandibular, 1 (11,1%) en

el cuerpo, ángulo y rama mandibular y 1 (11,1%) en el cuerpo y el ángulo (Figura 20).

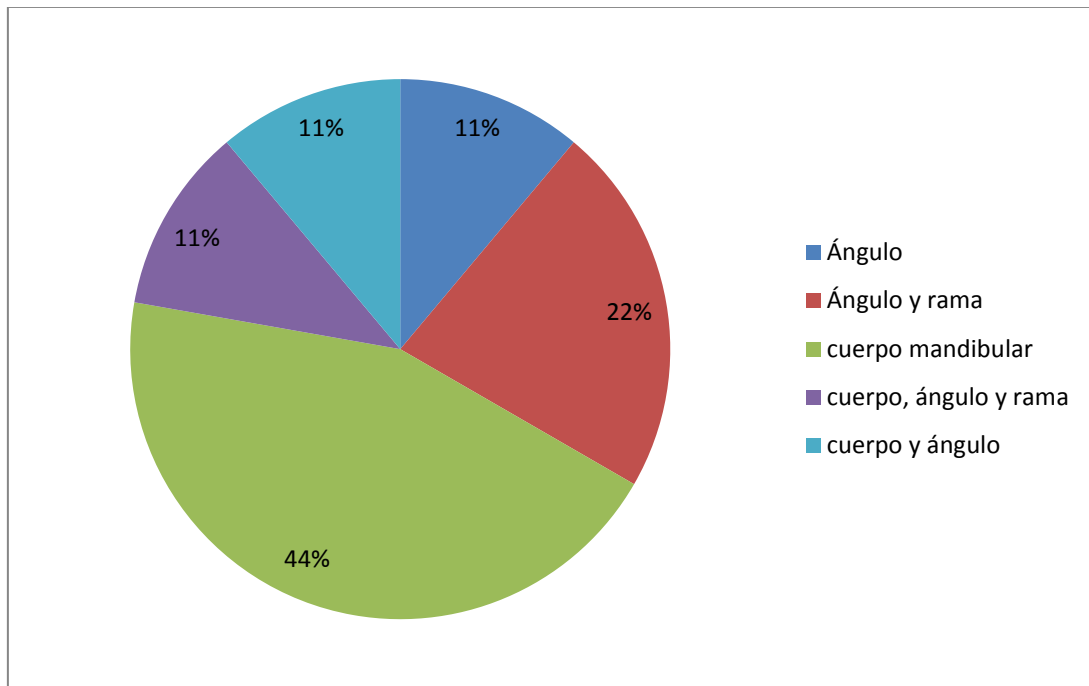


Figura 20: Localización de las muestras de los MOs mandibulares

En relación con el tamaño, se dividió a las neoplasias en dos categorías: los MOs menores de 3 cm, denominados mixomas odontogénicos pequeños (MOP) y los mayores de 3 cm, denominados mixomas odontogénicos grandes (MOG).

Atendiendo a esta división, 4 casos (22,2%) correspondían a MOP y 13 (72,22%) a MOG. En un caso no se pudieron obtener datos reales sobre el tamaño del tumor (NR) (Figura 21).

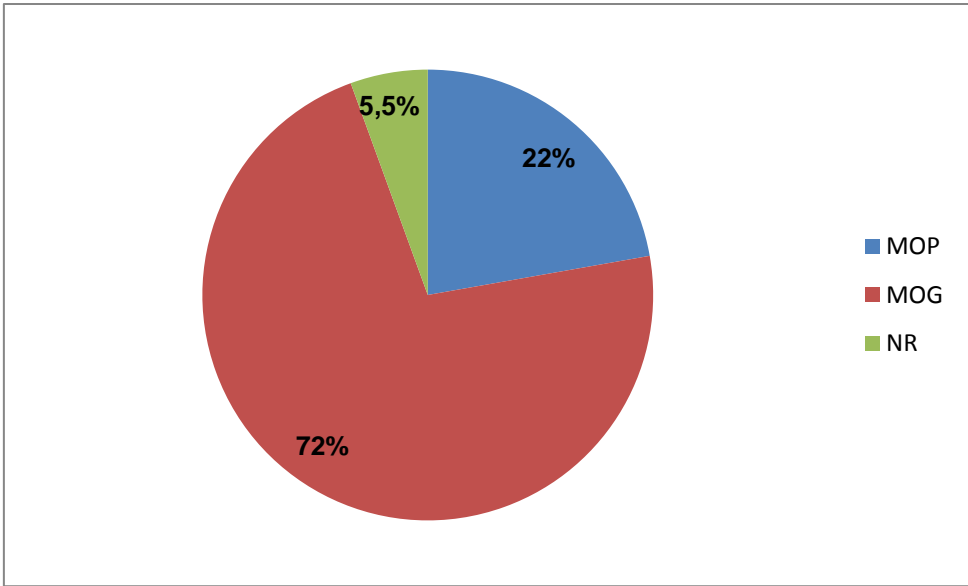


Figura 21: Tamaño de las muestras de los MOs.

Respecto de los datos clínicos en el momento del diagnóstico, 1 caso (5,5%) se presentó con dolor, 1 caso (5,5%) era asintomático, 2 casos (11,2%) mostraron dolor y expansión, 14 casos (77,8%) presentaban expansión y ningún caso parestesia (Figura 22).

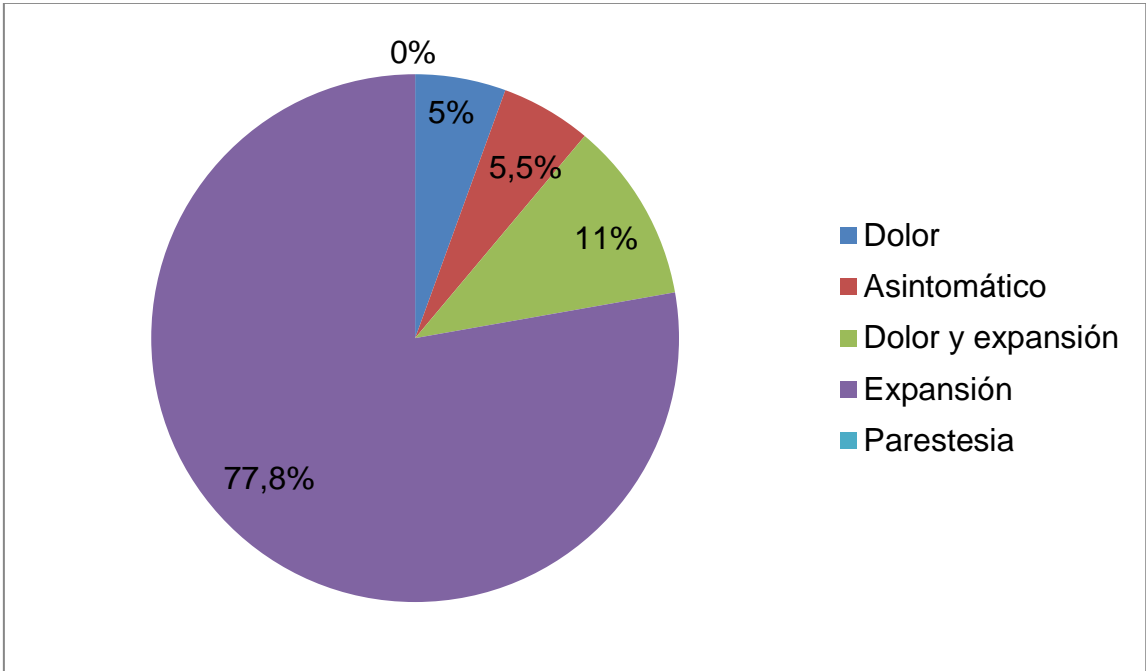


Figura 22. Datos clínicos en el momento del diagnóstico de los MOs.

En relación con la reabsorción dentaria solo fue observada en un caso (5,5%), siendo negativa en 14 casos (77,77%) y no referida en 3 casos (16,66%). Con respecto al desplazamiento dentario hubo desplazamiento en 11 casos (61,11%), siendo visible sólo en 4 casos (22,2%) y no reconocida en 3 casos (16,66%), con respecto a la perforación cortical fue observada en 6 casos (33,33%), siendo negativa en 8 casos (44,44%) y sin datos (S/D) en 3 casos (16,66%) (Figura 23).

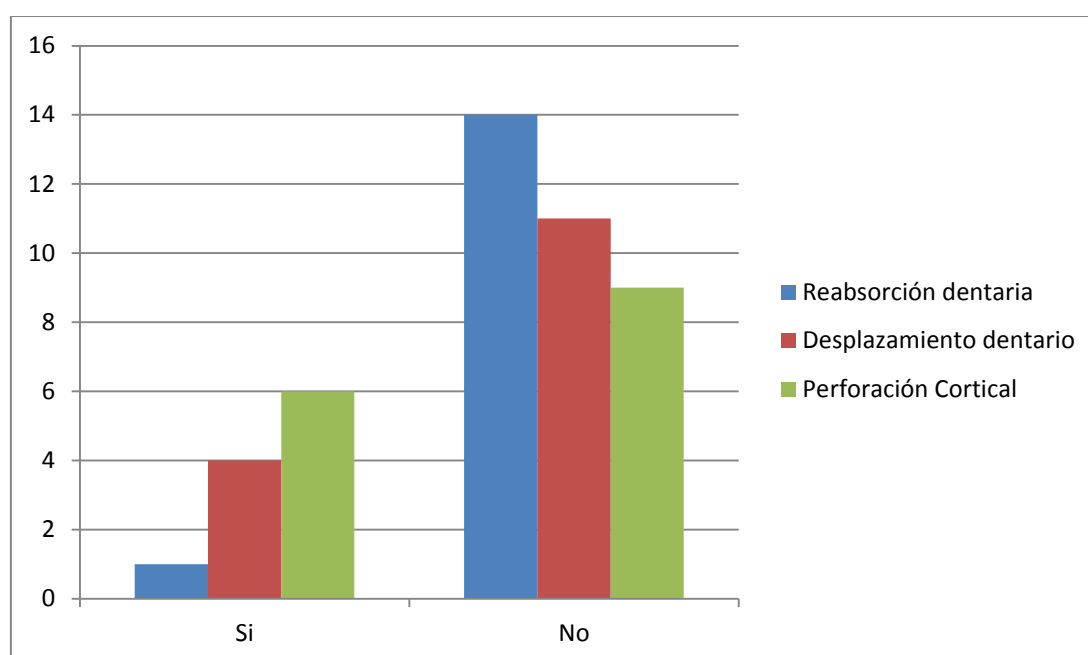


Figura 23: Presencia/ausencia de los hallazgos radiológicos.

B) Folículos dentarios

El grupo control lo forman un total de 18 pacientes que presentaron folículos dentarios. De los 18 pacientes 9 (50%) eran mujeres y 9 (50%) hombres, con una edad media de 14,4 años ($\pm 3,9$), un mínimo de 9 y un máximo de 22 años.

La localización de los FDs fue en 10 casos en el maxilar superior, de los cuales 6 (33,3%) estaban en la zona anterior y 4 (22,2%) en la zona posterior, y 7 casos en la mandíbula, siendo 1 (5,5%) en la zona anterior, 6 (33,3%) en la zona posterior, y 1 sin datos de localización precisa (Figura 24).

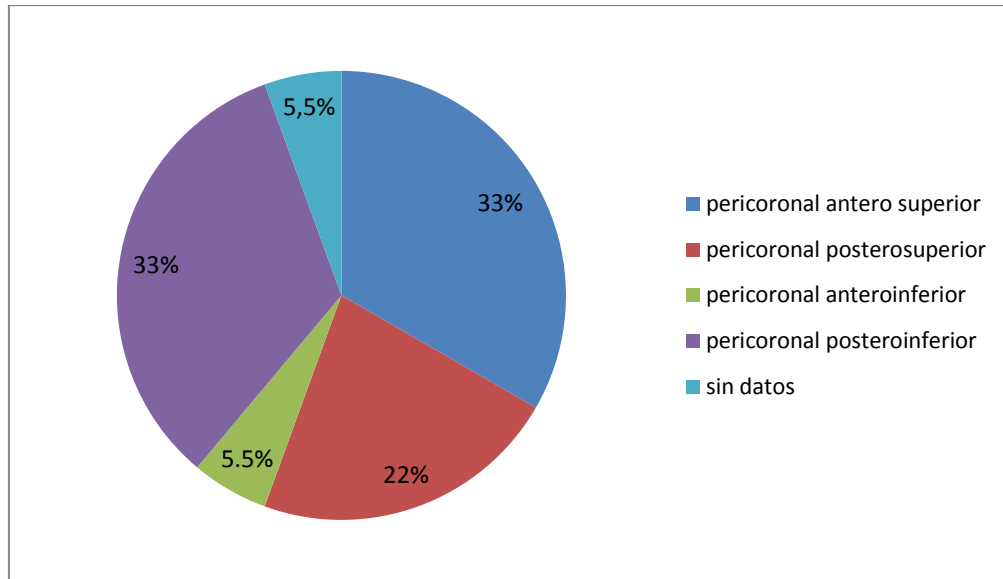


Figura 24: Localización de los folículos dentarios.

5.2. Aspectos histopatológicos de los mixomas odontogénicos

En los mixomas odontogénicos se apreció la presencia de colágeno maduro en 8 muestras (44,4%). Se reconocieron islas epiteliales en un caso (5,5%) y sin que fueran reconocidas en 17 casos (94,4%).

En relación con la presencia de hueso residual y de mineralizaciones, pudimos observarlas en 11 casos (61,1%) (Figura 25).

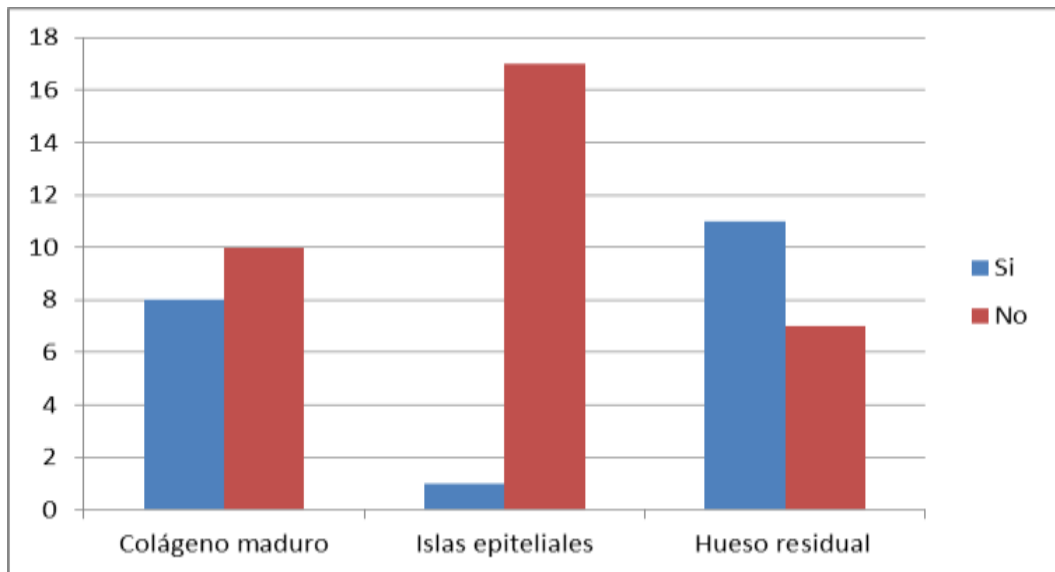


Figura 25: Hallazgos histológicos en MOs

5.3. Resultados inmunohistoquímicos

Los hallazgos inmunohistoquímicos con respecto a los MOs y los FDs aparecen recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1: Datos cualitativos y cuantitativos de la expresión de algunas proteínas estudiadas. FD: folículo dentario ; MO: mixoma odontogénico

	FD	MO	Valor de p
MMP-2			
Positivo (n (%))	17 (94,44)	16 (88,88)	0,546
Negativo (n (%))	1 (5,55)	2 (11,11)	
Promedio (\pm SD)	54,24 (\pm 22,85)	48,28 (\pm 24,07)	0,226
Mediana	63,69	53,94	
MMP-9			
Positivo (n (%))	5 (27,77)	10 (55,55)	0,091
Negativo (n (%))	13 (72,22)	8 (44,44)	
Promedio (\pm SD)	6,05 (\pm 11,01)	19,35 (\pm 19,88)	0,019
Mediana	0	14,49	
OPG			
Positivo (n (%))	18 (100)	17 (94,44)	0,31
Negativo (n (%))	0	1 (5,55)	
Promedio (\pm SD)	75,13 (\pm 17,37)	60,32 (\pm 29,55)	0,064
Mediana	80,41	67,33	
RANK			
Positivo (n (%))	16 (88,88)	14 (77,77)	0,691
Negativo (n (%))	2 (11,11)	4 (22,22)	
Promedio (\pm SD)	35,55 (\pm 22,84)	17,25 (\pm 16,39)	0,022
Mediana	39,86	13,5	
RANK-L			
Positivo (n (%))	14 (77,77)	12 (66,66)	0,457
Negativo (n (%))	4 (22,22)	6 (33,33)	
Promedio (\pm SD)	30,77 (\pm 23,48)	20,70 (\pm 21,02)	0,192
Mediana	30,52	14,38	
Bcl-2			
Positivo (n (%))	4 (22,22)	10 (55,55)	0,083
Negativo (n (%))	14 (77,77)	8 (44,44)	
Promedio (\pm SD)	7,29 (\pm 15,15)	12,39 (\pm 14,35)	0,171
Mediana	0	5,4	

5.3.1. Expresión de MMP-2

La expresión de MMP-2 tanto en los folículos dentarios (FD) como en los mixomas odontogénicos (MO) fue positiva en el 91,66 %, siendo positiva en 17 (94,44%) casos de MO y en 16 (88,88%) de FD (Figura 26). El promedio de células fue mayor en los FD, con un promedio de 54,24 ($\pm 22,85$) y una mediana de 63,69. Sin embargo, no se reconocen diferencias significativas entre ambos grupos ($p= 0,226$) (Tabla 1).

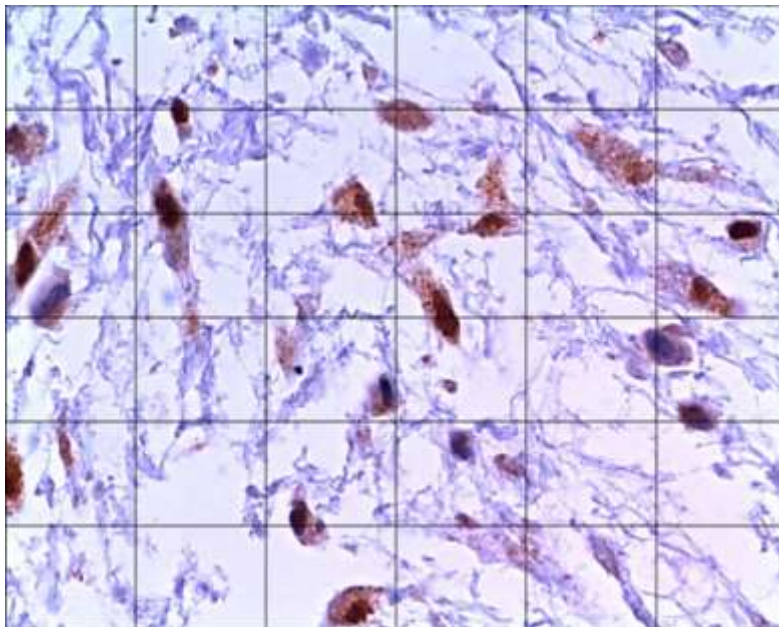


Figura 26: Se reconoce inmunexpresión de MMP-2 en células tumorales (40x)

Al dividir los MOs en menores y mayores a 3cm, los MOP tuvieron un mayor promedio de células positivas, siendo éste 55,07 ($\pm 11,05$) y con una mediana de 53,94. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos de mixomas ($p= 0,785$) (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados de promedio y mediana de la expresión de MMP-2 en MOP y MOG. MOP: mixoma odontogénico pequeño, MOG: mixoma odontogénico grande.

Promedio y mediana de células positivas a MMP-2				
Tipo de lesión	Número de casos	MMP-2 (%)		
		Promedio (\pm DE)	Mediana	P
MOP	4	55,07 (\pm 11,05)	53,94	0,785
MOG	13	46,91 (\pm 27,67)	56,6	

5.3.2. Expresión de MMP-9

Se reconoció expresión de MMP-9 en 10 casos de MO (55,55%) y en 5 FD (27,77%). (Figura 27). El promedio de células fue mayor en los MO (19,35 \pm 19,88) y la mediana fue de 14,49. Se reconocieron diferencias significativas entre MO y FD ($p= 0,019$). Los resultados se muestran en el gráfico 1 y en la Tabla 1.

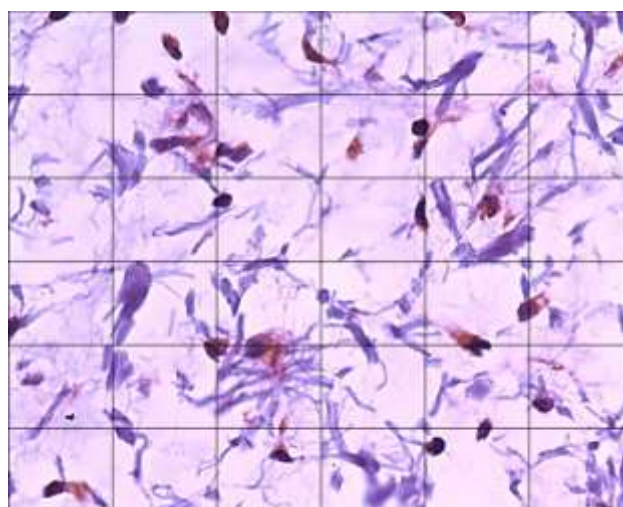


Figura 27: Se reconoce inmunoexpresión de MMP-9 en células del MO (40x).

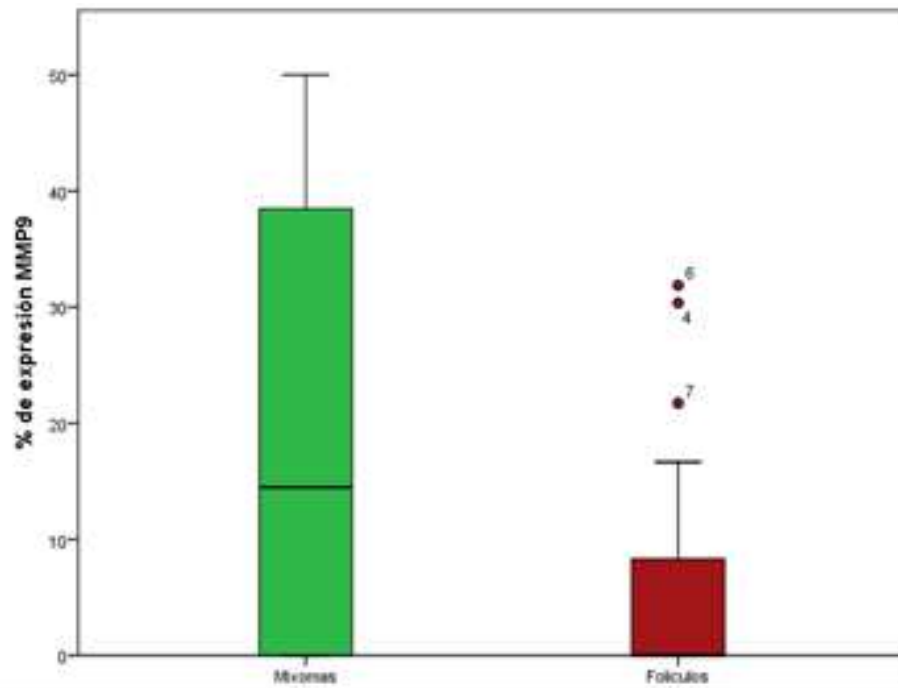


Gráfico 1: Porcentaje de expresión del anticuerpo MMP-9 en los grupos analizados.

Al dividir los MOs en MOPs y MOGs, los MOPs tuvieron mayor promedio de células positivas, siendo éste de 32,76 ($\pm 22,92$) células y con una mediana de 40,53. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre esta subdivisión ($p= 0,163$). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados de promedio y mediana de la expresión de MMP-9 en MOP y MOG. MOP: mixoma odontogénico pequeño, MOG: mixoma odontogénico grande.

Promedio y mediana de células positivas a MMP-9				
Tipo de lesión	Número de casos	MMP-9 (%)		
		Promedio (\pm DE)	Mediana	P
MOP	4	32,76 (\pm 22,92)	40,53	0,163
MOG	13	13,75 (\pm 17,44)	2,85	

El análisis de correlación entre MMP-2 y MMP-9 muestran ausencia de correlación lineal ($r: 0,005$; $p= 0,976$).

5.3.3. Expresión de OPG

La expresión de OPG fue considerada como positiva cuando se observó que el citoplasma y la membrana celular expresaron dicho anticuerpos (Figura 28). La expresión de OPG fue positiva tanto en los FD como en los MOs en el 97,22 % de los casos totales, siendo positiva en 17 (94,44%) casos de MOs y en 18 (100%) de FDs. El promedio de células fue mayor en los FDs (75,13%) con una mediana de 80,4, sin embargo no se reconocieron diferencias significativas entre ambas entidades ($p= 0,064$) (Tabla 1).

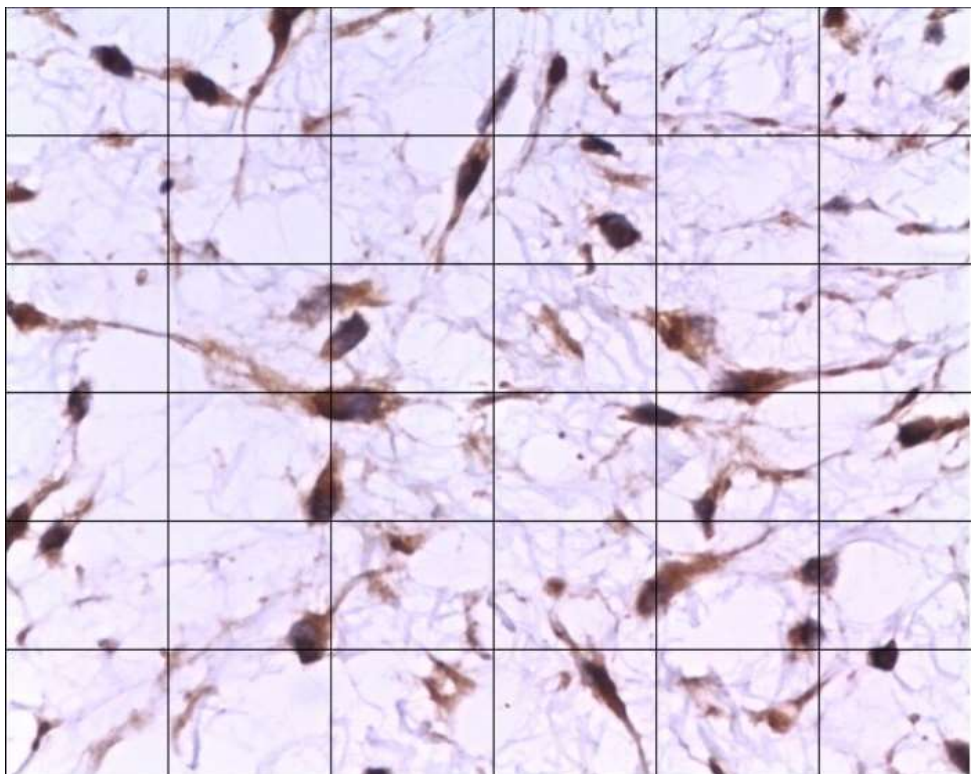


Figura 28: Se reconoce inmunexpresión de OPG en células del MO (40x).

La Tabla 4 muestra los resultados de MOP y de MOG, en donde se reconoce un mayor promedio de células positivas en los MOPs, teniendo un promedio de 77,01 ($\pm 3,45$) y una mediana de 77,55. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estos mixomas ($p= 0,296$).

Tabla 4: Resultados de promedio y mediana de la expresión de OPG en MOP y MOG. MOP: mixoma odontogénico pequeño, MOG: mixoma odontogénico grande.

Promedio y mediana de células positivas a OPG				
Tipo de lesión	Número de casos	OPG (%)		
		Promedio (\pm DE)	Mediana	P
MOP	4	77.01 (\pm 3.45)	77.55	0.296
MOG	13	55.04 (\pm 33.34)	52	

5.3.4. Expresión de RANK

La expresión de RANK fue considerada como positiva cuando se observó que el citoplasma y la membrana celular expresaron dicho anticuerpos (Figura 29). La expresión de RANK fue positiva en MO y en FD en el 83,33 %, siendo 14 (77,7%) casos de MO y 16 (88,8%) de FD (Tabla 1). El promedio de células positivas fue mayor en los FDs ($35,55 \pm 22,84$) y la mediana fue de 39,86 frente a los de los MOs, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,022$) (Tabla 1) (Gráfico 2).

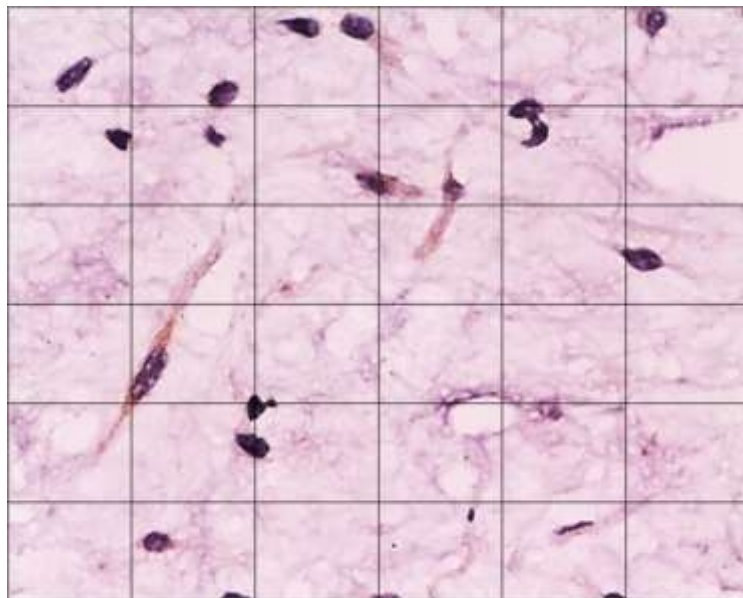


Figura 29: Se reconoce inmunoexpresión de RANK en células del MO (40x).

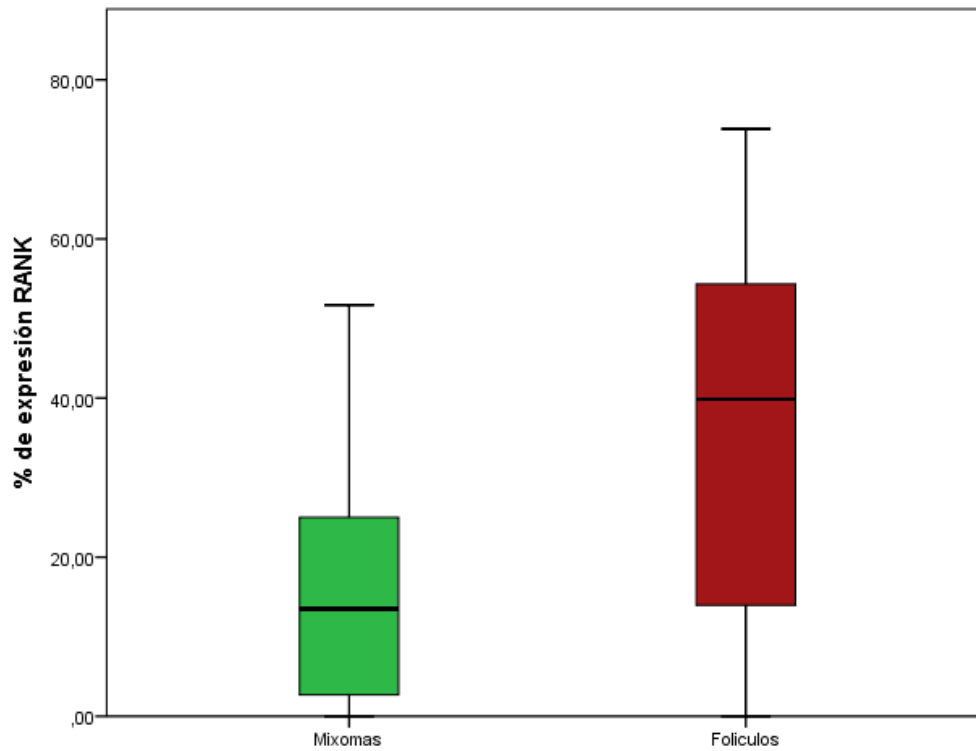


Gráfico 2: Porcentaje de expresión del anticuerpo RANK en los grupos analizados.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de los MOP y MOG, en donde se reconoce a los MOPs, como los que presentan un mayor número de células positivas, con un promedio de $38,07 \pm 17,76$ y una mediana de 44,21, dando diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tamaños para este anticuerpo ($p=0,032$). (Tabla 5). (Gráfico 3)

Tabla 5: Resultados de promedio y mediana de la expresión de RANK en MOP y MOG. MOP: mixoma odontogénico pequeño, MOG: mixoma odontogénico grande.

Promedio y mediana de células positivas a RANK				
Tipo de lesión	Número de casos	RANK (%)		
		Promedio (\pm DE)	Mediana	p
MOP	4	38.07 (\pm 17.76)	44.21	0.032
MOG	13	10.25 (\pm 9.96)	12.24	

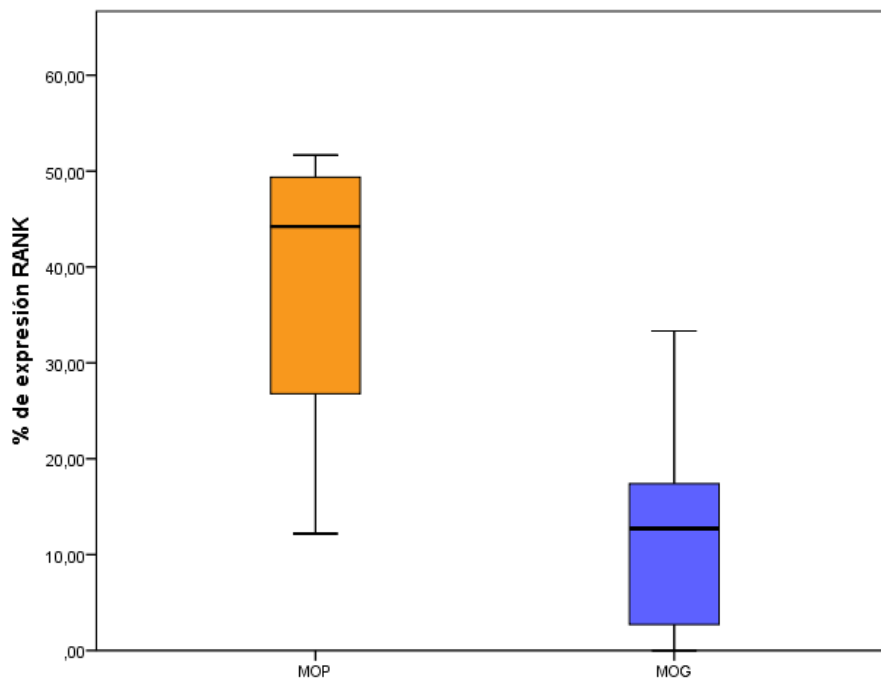


Gráfico 3: Porcentaje de expresión del anticuerpo RANK en MOP y MOG.

5.3.5. Expresión de RANK-L

La expresión de RANK-L fue considerada como positiva cuando se observó que el citoplasma y la membrana celular expresaron dicho anticuerpo (Figura 30). La expresión de RANK-L fue positiva en MO y FD en el 72,22% de los casos, siendo positiva en 12 (66,66%) MO y en 14 (77,77%) FD. El promedio de células positivas fue mayor en los FDs siendo este 30,77 (\pm 23,48) con una mediana de 30,52 (Tabla 1). Sin embargo, no se reconocieron diferencias significativas entre ambas entidades ($p > 0.05$).

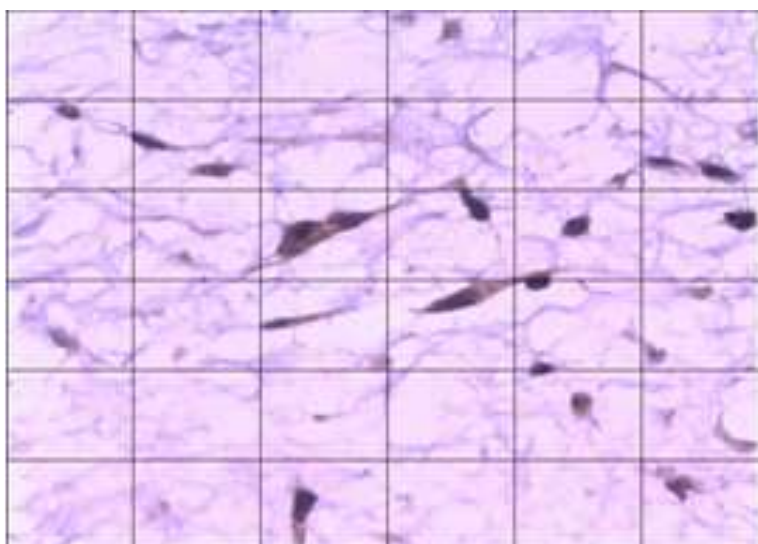


Figura 30: Se reconoce inmunexpresión de RANK-L en células del MO (40x).

En la Tabla 6 se muestra los resultados de los MOP y MOG, en donde se reconoce un promedio mayor de células positivas en los MOPs, siendo éste de 32,29 (\pm 21,32) y con una mediana de 29,14. En este caso tampoco se reconocieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos subgrupos ($p > 0,05$).

Tabla 6: Resultados de promedio y mediana de la expresión de RANK-L en MOP y MOG. MOP: mixoma odontogénico pequeño, MOG: mixoma odontogénico grande.

Promedio y mediana de células positivas a RANK-L				
Tipo de lesión	Número de casos	RANK-L (%)		
		Promedio (\pm DE)	Mediana	P
MOP	4	32.29 (\pm 21.32)	29.14	0.202
MOG	13	16.03 (\pm 20.66)	11.36	

Existe una alta correlación positiva entre RANK, RANK-L y OPG (Figuras 31). Entre RANK y RANK-L existe una alta correlación lineal positiva (Figura 31 a) y entre OPG y RANK (Figura 31b) o RANKL (Figura 31 c) en vez de observarse una correlación lineal, observamos una correlación logarítmica.

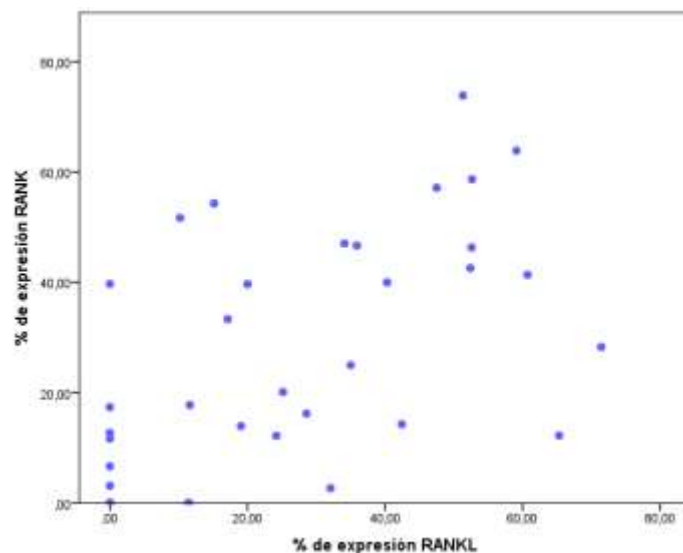


Figura 31 a: Se reconoce alta correlación lineal RANK y RANK-L.

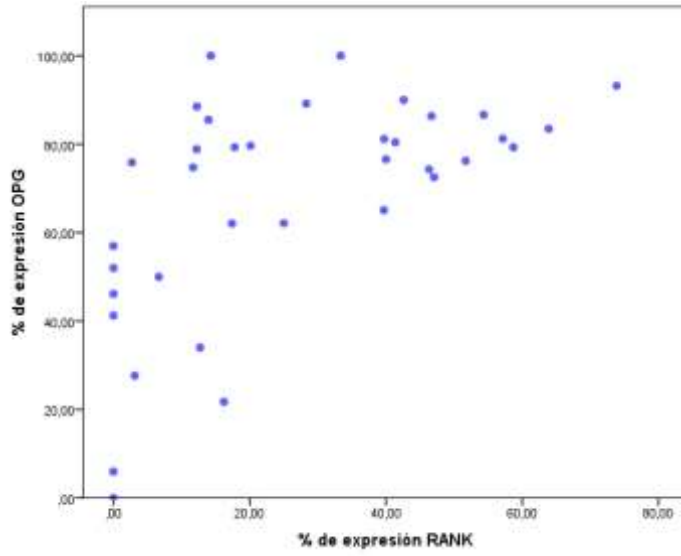


Figura 31 b: Se reconoce una correlación logarítmica entre OPG y RANK.

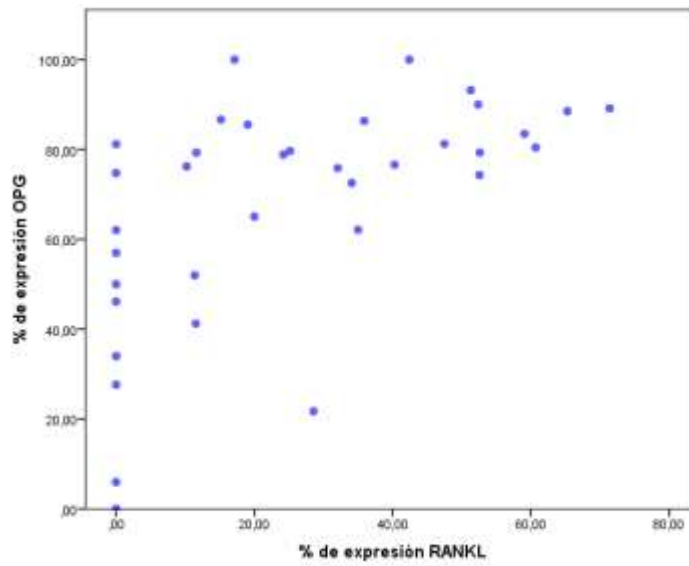


Figura 31 c: Se reconoce una correlación logarítmica entre OPG y RANK-L.

5.3.6. Expresión de Bcl-2

La expresión de Bcl-2 fue considerada como positiva cuando se observó en el citoplasma y en la membrana celular (Figura 32). La expresión de Bcl-2 fue positiva en el 38,88% de todos los casos. Siendo positiva en 4 FDs (22,22%) y en 10 MOs (55,55%). En la Tabla 1 se reconoce un mayor promedio de células positivas en los MOs ($12,39 \pm 14,35$) con una mediana de 5,4; aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

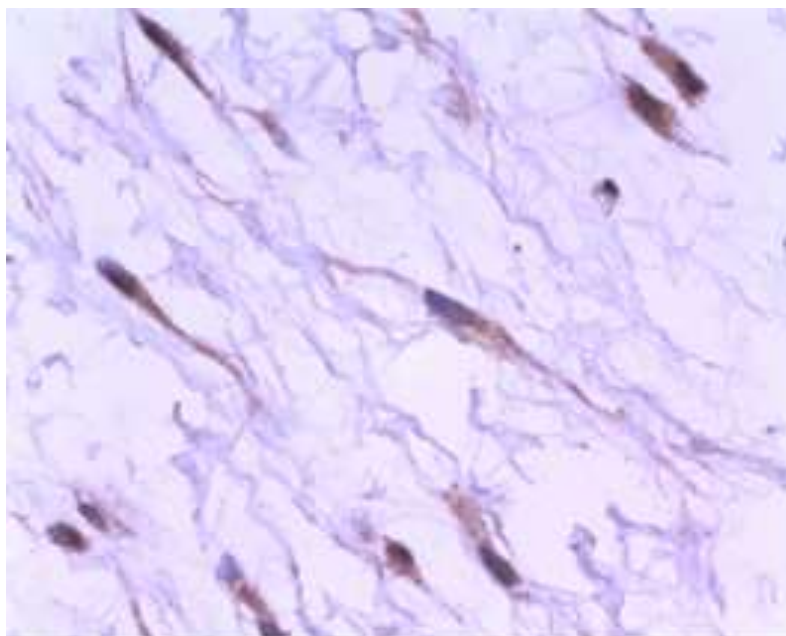


Figura 32: Se reconoce inmunoexpresión de Bcl-2 en células del MO (40x).

En la Tabla 7, se muestra el promedio y la mediana de las células positivas para Bcl-2, divididas en los grupos MOPs y MOGs. Se reconocen que los MOPs, tienen un mayor promedio ($21,93 \pm 12,69$) con una mediana de 26. No obstante, estas diferencias no resultaron significativas ($p = 0,163$) (Tabla 7).

Tabla 7: Resultados de promedio y mediana de la expresión de Bcl-2 en MOP y MOG. MOP: mixoma odontogénico pequeño, MOG: mixoma odontogénico grande.

Promedio y mediana de células positivas a Bcl-2				
Tipo de lesión	Número de casos	Bcl-2 (%)		
		Promedio (\pm DE)	Mediana	P
MOP	4	21,93 (\pm 12,69)	26,11	0,163
MOG	13	10,41 (\pm 14,29)	0	

5.3.7. Expresión de CD-105

La expresión de CD-105 fue positiva en el citoplasma de las células endoteliales (Figura 33), en el 77,14% de los casos, tratándose de 17 FD y 10 MO (Tabla 9). Se aprecia que los FDs tuvieron un promedio mayor de células positivas ($6,33 \pm 5,31$), con una mediana de 5,5. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p= 0,001$) (Tabla 8) (Gráfico 4).

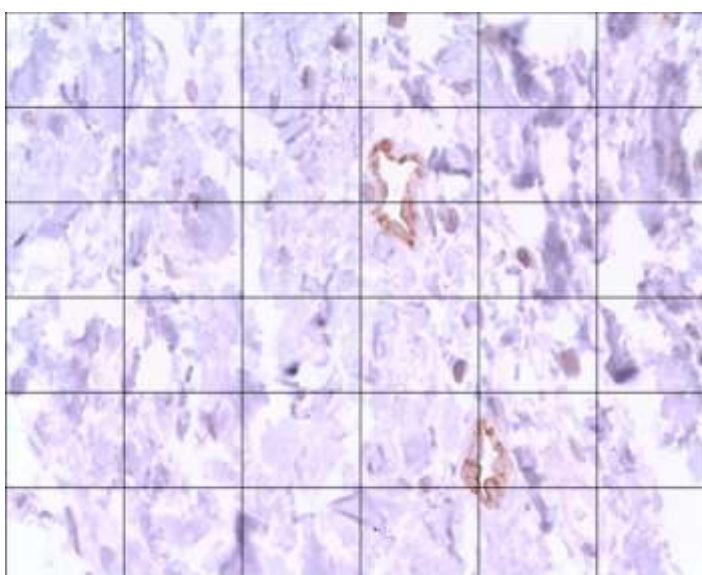


Figura 33: Se reconoce inmunopresión de CD-105 en células endoteliales del MO (40x).

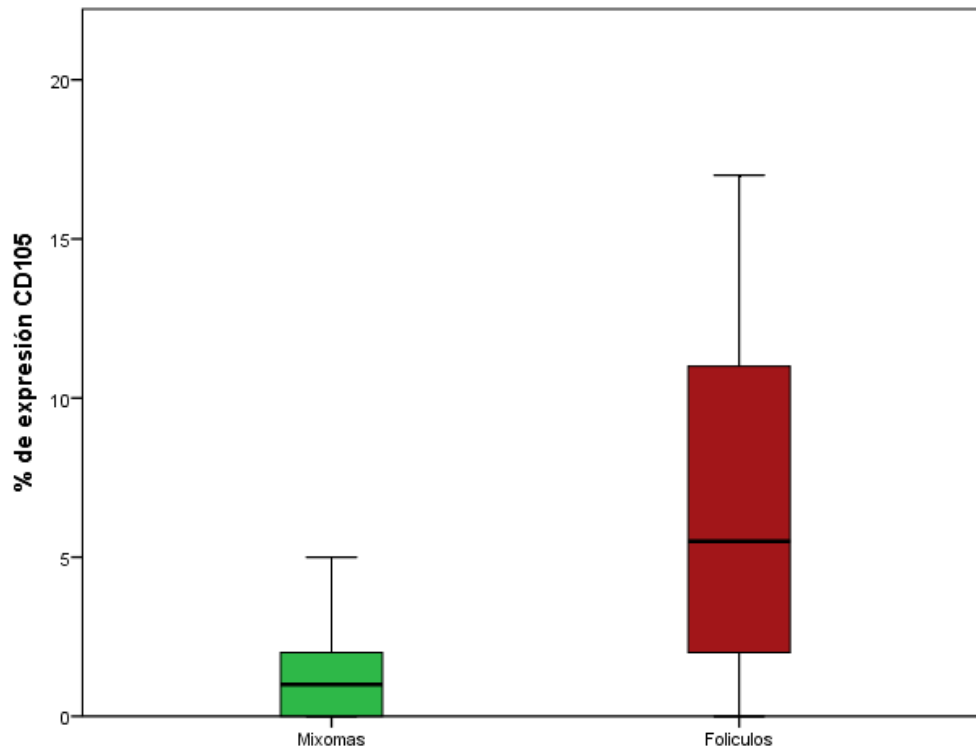


Gráfico 4: Porcentaje de expresión del anticuerpo CD-105 en los grupos analizados.

Tabla 8: Resultados de promedio y mediana de la expresión de CD-105 en MO y FD. FD: folículo dentario, MO: mixoma odontogénico.

Promedio y mediana de la expresión de CD-105						
	Número de casos	Expresión		Promedio (\pm DE)	Mediana	p
		Positivo (%)	Negativo(%)			
MO	17	10 (58,82)	7 (41,17)	1,47 (\pm 1,58)	1	0,001
FD	18	17 (94,44)	1 (5,55)	6,33 (\pm 5,31)	5,5	

En la Tabla 9 observamos el promedio y mediana de los MOP y MOG, en donde los MOPs fueron ligeramente superiores a los MOGs (2,00±1,63), pero sin que las diferencias fueran estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabla 9).

Tabla 9: Resultados de promedio y mediana de la expresión de CD-105 en MOP y MOG. MOP: mixoma odontogénico pequeño, MOG: mixoma odontogénico grande.

Promedio y mediana de células positivas a CD-105				
Tipo de lesión	Número de casos	CD-105 (%)		
		Promedio (\pm DE)	Mediana	P
MOP	4	2,00 (\pm 1,63)	2	0,521
MOG	13	1,42 (\pm 1,62)	1	

5.3.8. Densidad Microvascular

Con respecto a la densidad microvascular (DMV) de ambas lesiones, los FD presentaron mayor DMV media (1,27), que los MO (0,29). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estas dos lesiones ($p = 0,001$) Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Resultados del promedio y la mediana de la DMV en MO y FD. MO: mixoma odontogénico, FD: folículo dentario.

Tipo de lesión	Número de casos	DMV				p
		Mínimo	Máximo	Media de DMV	Mediana	
MO	17	0	0,8	0,29 ($\pm 0,32$)	0,2	0,001
FD	18	0	3,4	1,27 ($\pm 1,06$)	1,1	

Asimismo, al dividir los MOs en MOP y MOG, no encontramos diferencias significativas en relación con la DMV y el tamaño de las lesiones ($p > 0,05$) (Tabla 11), pero si entre MOG y los FDs ($p = 0,009$) (Tabla 11) (Gráfico 5).

Tabla 11: Resultados de promedio y mediana de la DMV en MOP, MOG. y FD.

MOP: mixoma odontogénico pequeño, MOG: mixoma odontogénico grande,

FD: folículo dentario.

Tipo de lesión	Número de casos	DMV			
		Mínimo	Máximo	Media de DMV	Mediana
MOP	4	0	0,8	0,4 ($\pm 0,33$)	0,4
MOG	12	0	1	0,28 ($\pm 0,32$)	0,2
FD	18	0	3,4	1,27 ($\pm 1,06$)	1,1

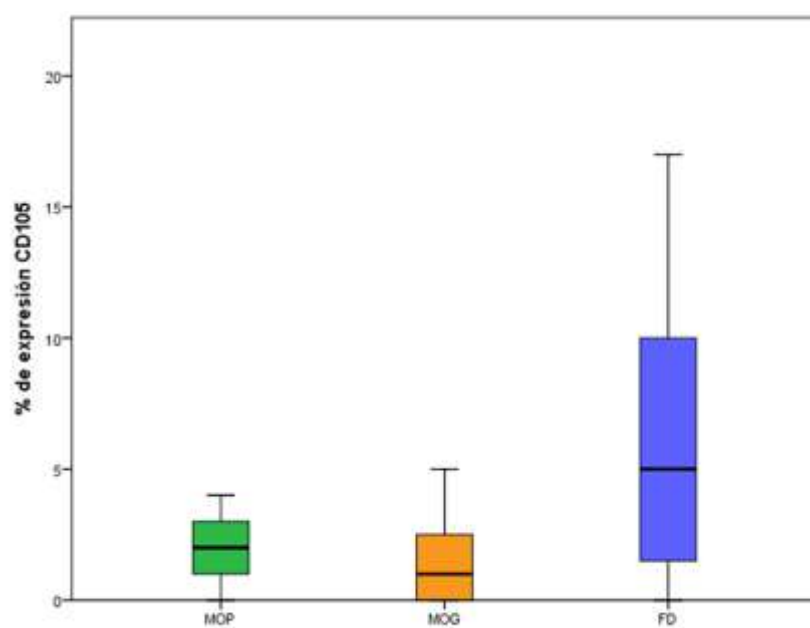


Gráfico 5: Porcentaje de expresión del anticuerpo CD-105 en MOP, MOG y FD.

5.3.9. Expresión de Triptasa

Las células cebadas fueron consideradas positivas cuando presentaban inmunexpresión de triptasa en el citoplasma (Figura 34).

Fue positiva en el 68,57% de los casos, siendo estos en 14 FD y en 10 MO. En la Tabla 12, se identifica el promedio de las células positivas para cada grupo. Se encontró que el MO presentó un promedio mayor de células cebadas ($6,28 \pm 9,47$), con una mediana de 2, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabla 12).

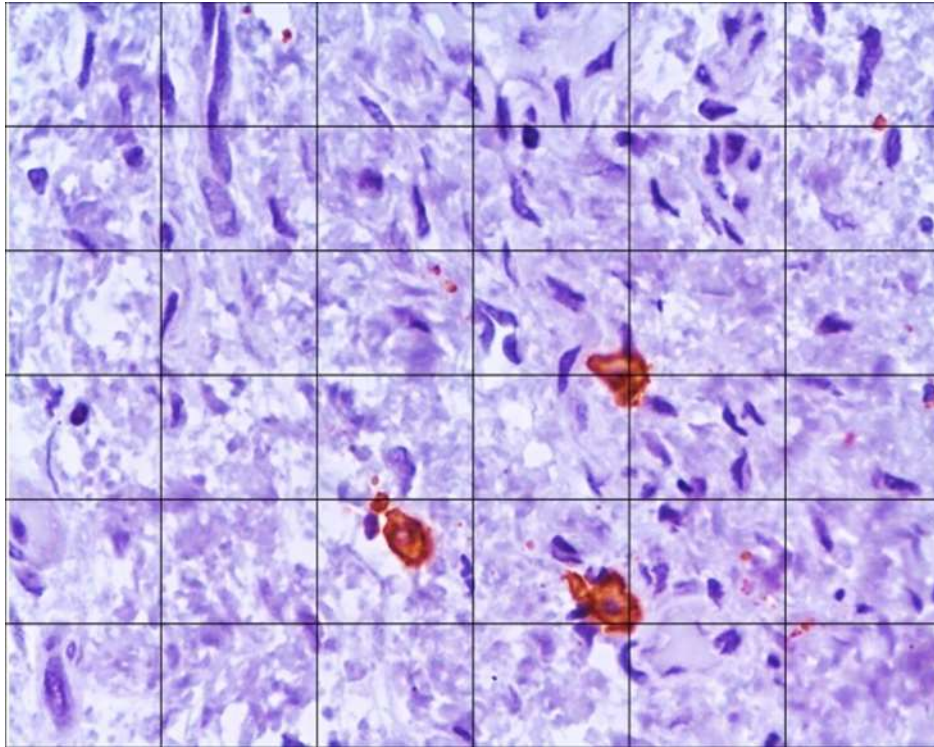


Figura 34: Se reconoce inmunoeexpresión de triptasa en células cebadas presentes en el MO (40x).

Tabla 12: Resultados de promedio y mediana de la expresión de triptasa en MO y FD. MO: mixoma odontogénico, FD: folículo dentario.

Tipo de lesión	Número de casos	Promedio y mediana de células positivas a Triptasa				
		Positivo (%)	Negativo (%)	Triptasa (%)		
				Promedio (\pm DE)	Mediana	p
MO	17	10 (58,82)	7 (41,17)	6,28 (\pm 9,47)	2	0,462
FD	18	14 (77,77)	4 (22,22)	4,78 (\pm 4,49)	4,5	

Al dividir los MO en MOPs y MOGs, tuvieron mayor promedio de células positivas los MOGs, siendo de 6,62 ($\pm 9,03$). No se observan diferencias significativas entre estos subgrupos ($p= 0,871$). Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13: Resultados de promedio y mediana de la expresión de triptasa en MOP y MOG. MOP: mixoma odontogénico pequeño, MOG: mixoma odontogénico grande.

Promedio y mediana de expresión de Triptasa				
Tipo de lesión	Número de casos	Triptasa (%)		
		Promedio (\pm DE)	Mediana	p
MOP	4	5,75 ($\pm 9,03$)	2	0,871
MOG	12	6,62 ($\pm 10,30$)	2	

Al llevar a cabo el análisis de correlación entre CD-105 y triptasa, observamos que hay una ausencia de correlación lineal entre ambos marcadores ($r: -0,063$; $p= 0,723$).

6. DISCUSIÓN

6.1. En relación con los aspectos clinicopatológicos de los mixomas odontogénicos

En relación con los aspectos clínico patológicos generales, nuestros resultados difieren ligeramente de los recogidos en la literatura, ya que la mayor parte de nuestros pacientes se encontraban entre la 3ª y la 4ª décadas, no entre la 2ª y 3ª décadas como mencionan la mayoría de los autores (Barker *et al.* 1999, Simón *et al.* 2004, Buchner *et al.* 2006, Li *et al.* 2006, Martínez *et al.* 2008).

El rango de edad en el momento del diagnóstico, presento un mínimo de 10 y un máximo de 53 años, con predilección por el sexo femenino con una relación 1,2 a 1, aunque no tan marcada como la reportada en la literatura (White *et al.* 1975, Peltola *et al.* 1994, Mosqueda *et al.* 1997, Barker *et al.* 1999, Oschsenius *et al.* 2002, Buchner *et al.* 2006, Noffke *et al.* 2007, Martínez *et al.* 2008). Es probable que estas diferencias pueden estar relacionadas con el tamaño de la muestra, sin descartar que puedan existir diferencias étnico-geográficas, pero para confirmarlo se requeriría ampliar el número de casos (White *et al.* 1975, Peltola *et al.* 1994, Barker *et al.* 1999, Oschsenius *et al.* 2002, Buchner *et al.* 2006, Noffke *et al.* 2007).

Casi una cuarta parte de nuestros casos correspondían a pacientes menores de 16 años, que es un porcentaje mayor al reportado por Keszler y cols. (1995) en un estudio, realizado en Argentina, en donde de 80 pacientes con diagnóstico de MO, solo 10 (12,5%) eran menores de 16 años. Pensamos que este hallazgo podría estar relacionado con el hecho de que al estar la

población en México conformada predominantemente por el grupo joven, existirían más posibilidades de diagnosticar estas neoplasias en este grupo etario, lo que requiere ser confirmado mediante estudios realizados en poblaciones de estructura etaria similar.

Aunque se ha señalado que el MO es infrecuente en personas mayores de 50 años, en nuestra muestra aparecen 2 casos (Keszler *et al.* 1995, Noffke *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007), los cuales correspondían a lesiones mayores de 3 cm, lo que podría sugerir que probablemente tuviesen mucho tiempo de evolución hasta ser diagnosticadas.

La localización más común del MO es la mandíbula, con los 2/3 de los casos reportados en dicha localización; sin embargo, en nuestro estudio no se ha encontrado así, situándose el 50% en mandíbula y el 50% en el maxilar (White *et al.* 1975, Peltola *et al.* 1994, Barker *et al.* 1999, Simón *et al.* 2004, Buchner *et al.* 2006, Jing *et al.* 2007, Noffke *et al.* 2007).

La zona molar y la región de la rama mandibular son por lo general las zonas más frecuentemente afectadas a nivel mandibular, como ocurre en nuestra muestra, en la que el 44,4% de los casos estuvieron localizados en el cuerpo mandibular (Simón *et al.* 2004, Noffke *et al.* 2007, Kheir *et al.* 2013).

Por lo general, los MOs son tumores de lento crecimiento y asintomáticos, a pesar de poseer un gran potencial de infiltración y destrucción ósea, causando expansión cortical y un alto nivel de recurrencia (Lo Muzio *et al.* 1995, Barker *et al.* 1999, Mac Donald-Jankowski *et al.* 2002, Noffke *et al.* 2007). En nuestro estudio la media del tiempo de evolución fue alta, de 29,9

meses, lo que podría indicar que muchos pacientes acuden al especialista cuando la lesión ya interfiere con alguna función o cuando influye en la estética orofacial, pero no lo hace cuando no nota alguna alteración. Estos resultados se relacionan con la sintomatología presente en el momento del diagnóstico, ya que solo el 5,5% de los MOs fueron asintomáticos, mostrando el resto deformidad, con dolor, perforación ósea, etc., datos que apoyan nuestra opinión anterior y la de otros autores (Li *et al.* 2006, Simón *et al.* 2004).

Como mencionan una mayoría de los autores (Peltola *et al.* 1994, Lo Muzio *et al.* 1996, Simón *et al.* 2004), esta neoplasia odontogénica puede mostrar aspectos radiográficos muy variados. El aspecto predominante en nuestra muestra, fue la de una radiolucidez con trabeculado interno, coincidiendo con lo descrito por la mayoría de los autores (Peltola *et al.* 1994, Lo Muzio *et al.* 1996, Simón *et al.* 2004).

Otras características radiológicas frecuentemente descritas en ésta neoplasia son el desplazamiento dentario (47,8 - 80%) y la reabsorción radicular (10 - 13%) (Peltola *et al.* 1994, Barker *et al.* 1999, Kimura *et al.* 2001, Li *et al.* 2006, Noffke *et al.* 2007, Kheir *et al.* 2013). En el presente estudio, la reabsorción radicular fue poco frecuente (6,6%), y teniendo en cuenta que la mayor parte de nuestros casos eran lesiones mayores de 3 cm, pensamos que se trata mayoritariamente de tumores que han presentado un crecimiento lento y progresivo, lo que daría menos opciones para que se produjese la reabsorción.

En relación a las características histopatológicas presentes en los MOs, en el trabajo de Martínez *y cols.* (2008), se menciona que solo el 8% presentaban islas epiteliales; lo que coincide con nuestro trabajo donde aparecieron solo en el 5,5%, y corroboran otros autores (Barker 1999, Simón *et al.* 2004). Este hallazgo refuerza el dato de que las islas epiteliales pueden estar presentes en los MOs, pero no son imprescindibles para su diagnóstico (Barker 1999, Simón *et al.* 2004, Martínez *et al.* 2008).

6.2. En relación a la participación de las células cebadas y MMPs

Las células cebadas son un componente importante en los MOs, y aunque su función específica es aún desconocida, se ha sugerido que probablemente los productos de su degranulación cumplan un importante papel en la destrucción de la matriz extracelular, estimulando también la producción de citocinas, lo que a su vez facilitaría la expansión y el crecimiento de estas lesiones (Galli *et al.* 2005, Chatterjee *et al.* 2008, Martínez *et al.* 2008, Beaven 2009).

Varios estudios han registrado la presencia de estas células en un rango que va del 72 al 100% de los MOs estudiados (Martínez *et al.* 2008, De Assis Caldas Pereira *et al.* 2012, Kouhsoltani *et al.* 2015). Al evaluar la densidad celular, la media de positividad para estas células fue más baja en comparación con la registrada en otros tumores odontogénicos, como los ameloblastomas sólidos y unicísticos, TOA, TOEC y el TOQQ (De Assis Caldas Pereira *et al.* 2012, Kouhsoltani *et al.* 2015). En nuestra investigación, hemos observado

presencia de células cebadas en el 58,82% de los casos, con una media de densidad celular de 1,2. No hubo diferencias significativas con los FDs y su frecuencia fue independiente del tamaño de los MOs.

En la mayoría de los tumores humanos, un incremento en el número de células cebadas se asocia a una mayor vascularización inducida por la producción y liberación de enzimas proteolíticas y factores de crecimiento, tales como tripsina, quimotripsina, Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Interleucina 8 (IL-8) y Heparina (Maltby *et al.* 2009, Ribatti *et al.* 2012, Kouhsoltani *et al.* 2015). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado una asociación ni correlación positiva con la DMV, sino que por el contrario, hemos observado que un mayor número de células cebadas, se correspondía con un menor número de vasos. Esta discrepancia podría ser explicada en el hecho de que, en los demás estudios (Miyata *et al.* 2013, Jamshidi *et al.* 2014, Kouhsoltani *et al.* 2015) no se evaluaron neoangiogénesis, y no se menciona que las muestras estudiadas estaban libres de inflamación. Al medir en nuestro trabajo la DMV a través de la expresión de CD-105, marcador más específico de neoangiogénesis que el CD-31 (Miyata *et al.* 2013, Jamshidi *et al.* 2014, Kouhsoltani *et al.* 2015)

Este análisis nos permite obtener información relativa a la participación de la producción vascular como elemento de crecimiento tumoral y la demanda de neovascularización del MO de acuerdo a su tamaño. Otros marcadores solamente nos permiten obtener datos cuantitativos sobre el número de elementos vasculares presentes en el tejido. Otro aspecto que consideramos

importante es el referido a la metodología utilizada para determinar la DMV, la que en el caso de los otros estudios con CD-105, no coincide con el método que hemos utilizado en este trabajo (Vered *et al.* 2006, Bologna *et al.* 2011).

Dado que el número de células cebadas encontrado en la mayor parte de los trabajos sobre MOs es muy pequeño, consideramos que es poco probable que estas células sean la fuente principal de los factores promotores de neoangiogénesis, pero bien podrían participar en el crecimiento del MO mediante la producción de MMPs, ya que se ha demostrado que la triptasa de dichas células tiene la capacidad de activar la producción de MMPs en procesos alérgicos y no alérgicos (Lohi *et al.* 1992, Fang *et al.* 1996, DeClerck 2000), ocasionando un sinergismo entre las células neoplásicas y las del estroma en la producción de MMPs, lo cual colabora con el aumento de la degradación de la membrana extracelular, favoreciendo de este modo la expansión (Lohi *et al.* 1992, Fang *et al.* 1996, DeClerck 2000).

La MMP-2 y la MMP-9 son las metaloproteinasas que más frecuentemente se asocian al fenotipo invasor de algunas lesiones tumorales (Saad *et al.* 2004, Miyagi *et al.* 2008).

La MMP-2 ha sido estudiada en numerosos tumores y se cree que su función sería la de facilitar el crecimiento local del tumor a través del hueso que lo rodea, proporcionando así, una ventaja adicional sobre el tejido adyacente (Bast *et al.* 2003).

La MMP-9, por su parte, se sabe que desarrolla un papel importante en la degradación de la membrana basal, actuando sobre su componente principal, el colágeno tipo IV (De Vicente *et al.* 2005, Henriques *et al.* 2011).

Se han realizado algunos estudios (Bast *et al.* 2003, Miyagi *et al.* 2007, Nonaka *et al.* 2009) con el objeto de conocer la expresión de MMP-2 y MMP-9 en los MOs. En el 2003 Bast *y cols.*, encontraron positividad para MMP-2 en el 90% de los tumores en contraste con tan solo 10% de los controles. Del mismo modo la expresión totalmente negativa para MMP-9, tanto en los MOs como en los controles (Bast *et al.* 2003). Posteriormente, Miyagi *y cols.* (2007) encontraron inmunopositividad para MMP-2 en el 100% de los MOs, y para MMP-9 en el 66%. Finalmente Nonaka *y cols.* (2009), observaron la expresión de MMP-2 en el 58,3% de los mixomas, con ausencia de inmunoexpresión de MMP-9 en la mayoría de los mismos (66,6%).

En nuestro trabajo hemos encontrado un porcentaje de positividad para MMP-2 similar al de los otros estudios (Bast *et al.* 2003, Miyagi *et al.* 2007). No obstante, no hemos hallado diferencias significativas entre los MOs y los FDs, lo que difiere con lo reportado por Bast *y cols.* (2003). Creemos que esta diferencia podría deberse tal vez a que en este trabajo (Bast *et al.* 2003) se utilizaron como control papilas y folículos dentales, sin discriminarlos al analizar sus resultados. Sin embargo, si coincidimos con los resultados obtenidos por De Oliveira Ramos *y cols.* (2014), quienes utilizaron como grupo control folículos dentarios y en los que la MMP-2 fue positiva en el 100% (De Oliveira Ramos *et al.* 2014).

En nuestro estudio fueron positivos para MMP-9 el 55,5% de los MOs. El promedio de células positivas para MMP-9 significativamente menor en los FDs (6,06) que en los MOs (19,35) ($p= 0,019$). Este resultado nos indicaría que la proteína MMP-9 podría desempeñar un importante papel en los mecanismos de crecimiento y/o invasión que se producen en los MOs.

Las diferencias que existen en relación con la expresión de MMP-9 observada en otros estudios (Bast *et al.* 2003, Miyagi *et al.* 2007) podrían estar relacionada con las diferentes metodologías y técnicas empleadas. Además, en el trabajo de Miyagi *y cols.* (2007) solo se estudiaron 3 casos, una muestra muy pequeña para reconocer datos comparables.

Al dividir a los MOs por tamaño, hemos reconocido diferencias significativas, aunque los pequeños presentaron un mayor promedio de células positivas tanto para MMP-2 como para MMP-9. Esta mayor inmunexpresión coincide con los resultados obtenidos con algunos de los inmunomarcadores que hemos estudiado (Bcl-2, OPG, RANK, RANK-L). Además, también indicaría, como mencionan Nonaka *y cols.* (2009) que en los MOs la eficiente degradación de la matriz estaría coordinada por un mecanismo efectuado entre varias MMPs.

Estos resultados nos animan a mejorar nuestro trabajo, aumentando el número de muestras y ampliando el panel de anticuerpos, e incluso complementándolo mediante la utilización de técnicas moleculares que midan la latencia y actividad de estas proteínas y no solo la presencia de las mismas.

Todavía se desconoce el nivel de expresión de MMPs requerido para señalarlas como responsables importantes de la destrucción perilesional y promotoras del crecimiento tumoral. Nuestro estudio no ha encontrado asociación entre la presencia de células cebadas y la expresión de MMP-2, ni de MMP-9, por lo cual coincidimos con Maltby y *co/s.* (2009), que señalan el desconocimiento existente sobre la importancia de las funciones de las células cebadas en el entorno tumoral y que estas funciones probablemente varían en función del tipo de tumor, la etapa en la que se encuentra y las posibles interacciones con otras células del microambiente tumoral.

6.3. En relación con la expresión de OPG/RANK/RANK-L

En estudios previos (Wittrant *et al.* 2004, Da Silva *et al.* 2008, Andrade *et al.* 2008), se ha demostrado que el sistema RANK/RANK-L/OPG está anormalmente regulado en varias enfermedades osteolíticas, incluyendo lesiones neoplásicas y no neoplásicas odontogénicas, donde una mayor expresión de RANK-L o una disminución de los niveles de OPG parecen jugar un papel importante en la destrucción ósea (Da Silva *et al.* 2008).

El proceso de osteolisis tumoral se ha asociado a modificaciones en los niveles de RANK-L y OPG, por ejemplo en el mieloma múltiple, en algunas formas de osteosarcoma o en las metástasis osteoblásticas de pacientes con adenocarcinoma prostático, así como de una manera especialmente interesante en algunos tumores odontogénicos, como el ameloblastoma, el

tumor odontogénico queratoquístico y el tumor odontogénico epitelial calcificante (Wittrant *et al.* 2004, Andrade *et al.* 2008).

En 2008 Andrade y *cols.*, realizaron el primer estudio que sugería que la alteración de la vía de señalización RANK/RANK-L/OPG podría estar relacionada con la pérdida ósea presente en diversos tumores odontogénicos (Andrade *et al.* 2008). Entre las lesiones estudiadas se incluyeron 7 MOs, de los cuales 4 exhibían una mayor expresión de RANK-L (57,1%) con respecto a la de OPG (42,9%). Este resultado contrasta con lo observado en nuestro estudio, en donde fue mucho mayor la expresión para OPG (94,4%) que para RANK-L (66,6%).

Aunque no hemos encontrado diferencias significativas del porcentaje de expresión en relación con el tamaño de los tumores, los MOG han mostrado un descenso en la expresión de OPG y RANK-L, lo que podría sugerir que al aumentar el tamaño de los MOs se reduciría su actividad osteoclastogénica. Estos resultados podrían estar relacionados con los hallazgos clínicos, ya que esta neoplasia odontogénica a diferencia de otras, produce una menor expansión y crece lentamente a través del hueso medular.

Las diferencias con otros estudios (Andrade *et al.* 2008, Da Silva *et al.* 2008), estarían relacionados con el tamaño de la muestra, la metodología empleada en la evaluación del inmunomarcador, el estadio (tamaño) de las lesiones en el momento del diagnóstico y la presencia de inflamación.

Por otra parte, hemos observado que los FDs presentan un mayor promedio mayor de células positivas para RANK, RANK-L y OPG que los MOs,

pero las diferencias solo fueron significativas con respecto a RANK, la cual es independiente del tamaño de los MOs. Además, hemos encontrado una fuerte asociación entre la expresión de RANK-L y OPG en los MOs, y entre la expresión de RANK y RANK-L en los FDs. Estos hallazgos nos sugieren que la modificación producida en esta vía sería uno de los mecanismos por los cuales esta neoplasia, benigna pero agresiva, puede crecer e invadir el tejido adyacente de manera menos activa a medida que va alcanzando un mayor tamaño.

Nuestros hallazgos, al igual que los reportados por Andrade y cols. (2008) indican que la mayoría de los tumores odontogénicos presentan variaciones en la expresión de RANK-L y OPG, que serían dependientes muy probablemente del tipo de tumor, de la etapa de crecimiento y de su tamaño. Estas circunstancias son las que Da Silva y cols. (2008) interpretan como estadios activos e inactivos del crecimiento tumoral y etapas de interferencia con la osteolisis tumoral (Da Silva *et al.* 2008).

Consideramos que para poder comparar los diversos estudios que han evaluado los mismos anticuerpos, es necesario contar con un método más estandarizado, que sea objetivo y reproducible en todos los casos, ya que las diferencias encontradas en algunos trabajos (Andrade *et al.* 2008, Qian *et al.* 2010, De Matos *et al.* 2013) podrían deberse a los diferentes criterios de evaluación, muestreo, condiciones de la técnica o a las condiciones del tejido. Esta es la principal razón por la que hemos utilizado el método propuesto por Bologna y cols. (2011) mediante el cual se puede realizar de una manera objetiva el conteo celular (Bologna *et al.* 2011). La importancia de poder

evaluar de una manera estandarizada la expresión de los componentes de esta vía de señalización reside en obtener datos objetivos que nos pueden permitir medir en un futuro el efecto de posibles acciones terapéuticas destinadas a reducir el tamaño o el crecimiento tumoral. En este sentido Qian y cols. (2010), encontraron que OPG suprime tanto la osteoclastogénesis inducida por el ameloblastoma como la reabsorción ósea causada por los osteoclastos, por lo que De Matos y cols.(2013), han sugerido que OPG podría ser usada como terapéutica en los ameloblastomas para detener la pérdida de hueso y de esta forma minimizar la destrucción ósea antes del manejo quirúrgico (Andrade *et al.* 2008).

6.4 En relación con la expresión de Bcl-2

Las células neoplásicas cuentan con varios mecanismos para obtener una ventaja de crecimiento sobre el tejido normal, los cuales se pueden traducir en un incremento de la tasa de división celular o en una disminución de la tasa de apoptosis (Iezzi G *et al.* 2007). La expresión anormal de ciertas proteínas reguladoras del ciclo celular y /o de los genes asociados a la apoptosis pueden resultar en promover la expansión clonal que conduce a una neoplasia (Bast *et al.* 2003, Iezzi *et al.* 2007).

En los MOs la expresión de estas proteínas, y en particular de Bcl-2 es controvertida, ya que esta fue positiva en el 6,5% de los tumores estudiados por Bast y cols. (2003), negativa en el trabajo de Iezzi y cols. (2007) y menor del 1% para Martínez y cols. (2008); mientras que en nuestro estudio hemos reconocido expresión en el 55,5% de los tumores. Esta discrepancia podría

explicarse en el hecho de que aunque en todos los estudios se evaluó a la misma neoplasia, no se utilizó la misma metodología de conteo celular y el anticuerpo se empleó a diferentes concentraciones. Todo ello refuerza la necesidad de conseguir un método estándar para poder valorar esta inmunexpresión y de esa manera comparar los trabajos bajo las mismas condiciones.

En nuestro trabajo los folículos dentarios y los mixomas odontogénicos muestran una tasa de expresión celular similar; lo que estaría de acuerdo con el dato de que, los MOs poseen una ventaja de crecimiento sobre el tejido que lo rodea (Bast *et al.* 2003). Se ha postulado que la producción de proteínas antiapoptóticas, asociada a una disminución de la tasa de muerte celular, podrían motivar una alteración de los mecanismos apoptóticos y favorecer así el crecimiento (Bast *et al.* 2003). Se ha demostrado un incremento de células Bcl-2 positivas en los MOs hasta cinco veces superior al tejido control (Bast *et al.* 2003). Sin embargo, en el estudio de Iezzi *y cols.* (2007), Bcl-2 fue negativa en el estroma, pero resultó positiva entre el 2 y el 5 % de las células epiteliales dispersas en el MO. Por ello sugieren, que a pesar de considerarse al epitelio odontogénico de los MOs un componente inactivo, el crecimiento del tumor podría estar relacionado con el componente epitelial (Iezzi *et al.* 2007). No obstante y de acuerdo con nuestros resultados, y a lo observado en series grandes de MOs (Martínez *et al.* 2008), la frecuencia de los restos de epitelio en este tipo de tumor es muy baja (menor a 25%), por lo que la hipótesis sugerida por Iezzi *y cols.* (2007) resulta inaceptable.

En nuestro estudio se reconoció positividad de Bcl-2 en el 55,5% de los MOs y en el 22,2% en células de los FDs. Estas diferencias no fueron significativas, aunque apoyan la hipótesis de Bast y cols. (2003) en cuanto a que se reconoce una tendencia que sugiere que esta sobreexpresión podría tener que ver con el proceso de crecimiento de la neoplasia.

Además de los datos que sugieren que la proteína Bcl-2 podría estar involucrada en los mecanismos de invasión y en el comportamiento clínico agresivo, nos llama la atención que, los MOP presentan una expresión de Bcl-2 hasta dos veces superior a lo registrado en los MOG. Estos resultados nos podrían indicar que la falta de regulación de los mecanismos apoptóticos estén involucrados en la invasión inicial del tumor y que al alcanzar un mayor tamaño, serían otros factores los que influirían en mayor medida en el crecimiento, expansión e invasión tumoral.

6.5. En relación a la expresión de la proteína CD-105 y la densidad microvascular

El crecimiento de un tumor requiere de un aporte sanguíneo adecuado, el cual provee de oxígeno, metabolitos y de los factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular.

La angiogénesis es el proceso de formación y desarrollo de nuevos capilares sanguíneos desde vasos preexistentes y en condiciones patológicas este proceso contribuye al crecimiento tumoral así como al desarrollo de metástasis (Guzmán *et al.* 2012).

Diversos estudios (Hande *et al.* 2011, De Andrade Santos *et al.* 2011, Gadbail *et al.* 2011, Jamshidi *et al.* 2014), han evaluado la angiogénesis tumoral y la DMV en tumores odontogénicos mediante la expresión de CD-105, señalando que este marcador es más específico que otros marcadores endoteliales para identificar la neoangiogénesis. En nuestro conocimiento este es el primer estudio que evalúa con CD-105, la angiogénesis tumoral en los MOs.

El incremento de la DMV se considera un indicador del crecimiento tumoral y del desarrollo de metástasis, por lo que se la ha relacionado con la supervivencia, así como con la agresividad de algunos tumores (Saad *et al.* 2004, Hande *et al.* 2011). Además, se ha sugerido que podría servir para evaluar el efecto antineoplásico de una potencial terapéutica antiangiogénica, incluso en los casos de tumores odontogénicos recurrentes o de mayor agresividad (Gadbail *et al.* 2011).

Consideramos que en la medición de la angiogénesis a través de la DMV, es importante lograr estandarizar la metodología, utilizando el método que sea más adecuado y reproducible, y que nos permita comparar los diferentes estudios (Gadbail *et al.* 2011, De Andrade Santos *et al.* 2011, Jamshidi *et al.* 2014). En nuestro trabajo hemos utilizado el método de Vered y cols. (2006) por ser el más sencillo y fácil de utilizar, y que hemos completado con la gradilla propuesta por nuestro grupo (Bologna *et al.* 2011), y que creemos cumple los criterios necesarios de objetividad y reproducibilidad.

En nuestro estudio hemos observado que aunque los MOs presentan una estructura histomorfológica similar a los FDs, los tumores muestran una DMV significativamente menor. Estos resultados apoyarían observaciones previas de nuestro grupo (Bologna *et al.* 2015) en cuanto que la angiogénesis no parece jugar un papel importante en los mecanismos responsables del crecimiento y agresividad de esta neoplasia, a diferencia de lo que aparentemente sucede en otros tumores (De Andrade Santos *et al.* 2011, Jamshidi *et al.* 2014).

Al comparar la DMV entre los MOP y MOG, y aunque no hemos encontrado diferencias significativas, sí se observa una menor DMV en las neoplasias más grandes, lo que apoyaría su escaso papel.

El MO presenta una reducida capacidad de proliferación celular (Bast *et al.* 2003, Iezzi *et al.* 2007, Martínez *et al.* 2008), por lo que se ha postulado que su crecimiento se base principalmente en su capacidad hidrofílica, que le permite incrementar la presión hidrostática e inducir la generación de mecanismos de resorción ósea (Slootweg *et al.* 1985, Bast *et al.* 2003, Martínez *et al.* 2008, Andrade *et al.* 2008). Al respecto, un estudio de nuestro grupo (Bologna *et al.* 2015) ha revelado la presencia de la proteína orosomucoide-1 en el MO, sugiriendo que su sobreexpresión podría ser un factor importante en la configuración estructural viscosa y mucoide clásica del MO, que es en parte la que facilita su invasividad dentro del trabeculado óseo.

El proceso de neovascularización participaría en el mantenimiento de la homeostasis de los componentes celulares y extracelulares de este particular tipo de tumor.

7. CONCLUSIONES

1.- Los mixomas odontogénicos muestran una expresión significativamente mayor de la metaloproteinasa de matriz-9, que los folículos dentarios, lo que sugiere que esta enzima podría jugar un papel importante en los mecanismos de crecimiento y/o invasión de esta neoplasia.

2.- No se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de las proteínas metaloproteinasa de matriz-2, triptasa y Bcl-2 entre los mixomas odontogénicos y los folículos dentarios, lo que sugiere la necesidad de realizar estudios moleculares que midan la latencia y actividad de estas proteínas en los tejidos evaluados y no solo su presencia, para confirmar nuestros resultados.

3.- Se reconoce una asociación significativamente mayor de la proteína RANK con OPG en los mixomas odontogénicos, y entre las proteínas RANK/RANK-L en los folículos dentarios. Estos hallazgos podrían sugerir que la modificación producida en esta vía de señalización sería uno de los mecanismos por los cuales esta neoplasia benigna puede crecer e invadir tejido adyacente de manera menos activa a medida que alcanza su mayor tamaño.

4.- Los mixomas odontogénicos presentan una densidad microvascular significativamente menor que los folículos dentarios, diferencia que se mantiene independientemente del tamaño de la neoplasia. Por ello consideramos que la neoangiogénesis no representa un elemento crucial en el crecimiento tumoral de los mixomas odontogénicos y apoyaría la existencia de otros mecanismos por los cuales progresa esta neoplasia.

5.- Se observa una baja densidad de células cebadas, tanto en los mixomas odontogénicos como en los folículos dentarios, sin que existan diferencias

significativas. Este dato explicaría que resulta poco probable que estas células sean la fuente principal de factores promotores de neoangiogénesis como mecanismo de invasión en los mixomas odontogénicos.

6.- Los mixomas odontogénicos poseerían una baja actividad angiogénica y osteoclastogénica en relación a los folículos dentarios, por lo que dichos mecanismos potenciales de crecimiento no estarían relacionadas con el tamaño ni con las características clínicas de los tumores.

7.- Es importante evaluar de manera estandarizada la expresión inmunohistoquímica de diversos marcadores celulares y extracelulares, para poder contar con elementos objetivos que nos permitan comparar entre distintos tipos de lesiones e indagar, en un futuro, el efecto de acciones terapéuticas destinadas a reducir el tamaño o el crecimiento de lesiones neoplásicas agresivas como el mixoma odontogénico.

8. BIBLIOGRAFÍA

A

- Ajayi OF, Ladeinde AL, Adeyemo WL, Ogunlewe MO. Odontogenic tumors in Nigerian children and adolescents- a retrospective study of 92 cases. *World J Surg Oncol*. 2004; 27; 2: 39.
- Alaeddini M, Salah S, Dehghan F, Eshghyar N, Etemad-Moghadam S. Comparison of angiogenesis in keratocystic odontogenic tumours, dentigerous cysts and ameloblastomas. *Oral Dis*. 2009; 15(6):422-7.
- Amaral FR, Mateus GC, Bonisson LA, de Andrade BA, Mesquita RA, Horta MC *et al*. Cell proliferation and apoptosis in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *Braz Dent J*. 2012; 23(2): 91-6.
- Andrade FR, Sousa DP, Mendonça EF, Silva TA, Lara VS, Batista AC. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106(4): 548-55.
- Aquilino RN, Tuji FM, Eid NL, Molina OF, Joo HY, Neto FH. Odontogenic myxoma in the maxilla: A case report and characteristics on CT and MR. *Oral Oncol Extra*. 2006; 42: 133–36.
- Araki M, Kameoka S, Matsumoto N, Komiyama K. Usefulness of cone beam computed tomography for odontogenic myxoma. *Dentomaxillofac Radiol*. 2007; 36(7): 423-7.
- Asami J, Matsuzaki H, Hisatomi M, Konouchi H, Shigehara H, Kishi K. Application of dynamic MRI to differentiating odontogenic myxomas from ameloblastomas. *Eur J Radiol*. 2002; 43(1): 37-41.

B

- Barker BF. Odontogenic myxoma. *Semin Diagn Pathol.* 1999; 16 (4): 297-301.
- Basnaker M, Sr S, Bnvs S. Expression of Endoglin (CD-105) and Microvessel Density in Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(9): 91-4.
- Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 284 -327.
- Bast BT, Pogrel MA, Regezi JA. The expression of apoptotic proteins and matrix metalloproteinases in odontogenic myxomas. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61(12):1463-6.
- Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, Ren S, Schwartz LB, Tonnesen MG *et al.* Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest.* 1997; 99 (11): 2691-700.
- Bologna Molina R, Mosqueda Taylor A, Domínguez Malagón H, Salazar-Rodríguez S, Tapia G, González González R *et al.* Immunolocalization of VEGF-A and orosomucoid-1 in odontogenic myxoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2015; 56(2): 465-73.
- Bologna Molina R, Damián Matsumura P, Molina Frechero N. An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology.* 2011; 59(4): 801-3.

- Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473(2): 139-46.
- Bracks IV, Armada L, Gonçalves LS, Pires FR. Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts. *J Endod*. 2014; 40(1): 63-8.
- Brown JM, Wilson TM, Metcalfe DD. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38(1):4-18.
- Buchner A, Odell EW. Odontogenic myxoma/myxofibroma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press; 2005. p. 316-317.
- Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 64(9): 1343-52.

C

- Caughey GH. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev*. 2007; 217:141-54.
- Chatterjee S, Mahajan S, Boaz K, George T. Quantitative role of mast cells in odontogenic cystic enlargement. *Braz J Oral Sci*. 2008; 7(27): 1662–5.

D

- Da Silva TA, Batista AC, Mendonça EF, Leles CR, Fukada S, Cunha FQ. 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(3): 333-41.
- Da Costa DO, Maurício AS, De Faria PA, Da Silva LE, Mosqueda Taylor A, Lourenço SD. Odontogenic tumors: a retrospective study of four Brazilian diagnostic pathology centers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012; 17(3): 389-94.
- Da Costa DO, Maurício AS, De-Faria PA, Da Silva LE, Mosqueda Taylor A, Lourenço SD. Odontogenic tumors: a retrospective study of four Brazilian diagnostic pathology centers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012; 17(3): 389-94.
- De Andrade Santos PP, De Aquino AR, Oliveira Barreto A, De Almeida Freitas R, Galvão HC, De Souza LB. Immunohistochemical expression of nuclear factor κ B, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(4): 476-83.
- De Assis Caldas Pereira F, Gurgel CA, Ramos EA, Vidal MT, Pinheiro AL, Jurisic V *et al.* Distribution of mast cells in benign odontogenic tumors. *Tumour Biol.* 2012; 33(2): 455-61.
- De Clerck YA. Interactions between tumour cells and stromal cells and

proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer*. 2000; 36(10):1258-68.

- De Matos FR, De Moraes M, Das Neves Silva EB, Galvão HC, De Almeida Freitas R. Immunohistochemical detection of receptor activator nuclear κ B ligand and osteoprotegerin in odontogenic cysts and tumors.. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 71(11):1886-92.
- De Noronha Santos Netto J, Pires FR, Da Fonseca EC, Silva LE, De Queiroz Chaves Lourenço S. Evaluation of mast cells in periapical cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med*. 2012; 41(8): 630-6.
- 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; 43(4): 282-8
- De Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Hernández Vallejo G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2005; 41(3): 283-93.

F

- Fang KC, Raymond WW, Lazarus SC, Caughey GH. Dog mastocytoma cells secrete a 92-kD gelatinase activated extracellularly by mast cell chymase. *J Clin Invest*. 1996; 97:1589-96.
- Farahani SS, Navabazam A, Ashkevari FS. Cel cebadas: Comparison

of mast cells count in oral reactive lesions. *Pathol Res Pract.* 2010; 15; 206(3): 151-5.

- Florescu A, Simionescu C, Ciurea R, Pitru A. P53, Bcl-2 and Ki67 immunoexpression in follicular solid ameloblastomas. *Rom J Morphol Embryol.* 2012; 53(1): 105-9.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182–6.
- Fujita M, Matsuzaki H, Yanagi Y, Hara M, Katase N, Hisatomi M, *et al.* Diagnostic value of MRI for odontogenic tumours. *Dentomaxillofac Radiol.* 2013; 42(5): 20120265

G

- Gadbail AR, Hande A, Chaudhary M, Nikam A, Gawande M, Patil S, *et al.* Tumor angiogenesis in keratocystic odontogenic tumor assessed by using CD-105 antigen. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40(3): 263-9.
- Gadbail AR, Mankar Gadbail MP, Hande A, Chaudhary MS, Gondivkar SM, Korde S, *et al.* Tumor angiogenesis: role in locally aggressive biological behavior of ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Head Neck.* 2013; 35(3): 329-34.
- Galvão HC, Gordón-Núñez MA, Batista de Amorim RF, Freitas Rd, De Souza LB. Immunohistochemical expression of protein 53, murine double minute 2, B-cell lymphoma 2, and proliferating cell nuclear antigen in odontogenic cysts and keratocystic odontogenic tumor. *Indian J Dent Res* 2013; 24: 369-74.

- García Muñoz A, Rodríguez MA, Bologna Molina R, Cázares Raga FE, Hernández Hernández FC, Farfán Morales JE, *et al.* The orosomucoid 1 protein (α 1 acid glycoprotein) is overexpressed in odontogenic myxoma. *Proteome Sci.* 2012; 10(1): 49.
- Gomes CC, Diniz MG, Duarte AP, Bernardes VF, Gomez RS. Molecular review of odontogenic myxoma. *Oral Oncol.* 2011; 47(5):325-8.
- Guerrisi M, Piloni MJ, Keszler A. Odontogenic tumors in children and adolescents. A 15-year retrospective study in Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; 12(3): 180-5.
- Gupta B, Ponniah I. The pattern of odontogenic tumors in a government teaching hospital in the southern Indian state of Tamil Nadu. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110(1): 32-9.
- Guzmán Medranoa R, Arreola Rosalesc RL, Shibayamaa M, Silva-Olivaresa DA, Bologna Molinad R, Rodríguez MA. Tumor-associated macrophages and angiogenesis: A statistical correlation that could reflect a critical relationship in ameloblastoma. *Pathol Res Pract.* 2012; 208: 672– 676.

H

- Hande AH, Gadbail AR, Sonone AM, Chaudhary MS, Wadhwan V, Nikam A. Comparative analysis of tumour angiogenesis in solid multicystic and unicystic ameloblastoma by using CD 105 (endoglin).

Arch Oral Biol. 2011; 56(12): 1635-40.

- Henriques AC, Vasconcelos MG, Galvão HC, de Souza LB, De Almeida Freitas R. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 112(4): 468-75.
- Hisatomi M, Asaumi J, Konouchi H, Yanagi Y, Matsuzaki H, Kishi K. Comparison of radiographic and MRI features of a root-diverging odontogenic myxoma, with discussion of the differential diagnosis of lesions likely to move roots. Oral Dis. 2003; 9(3): 152-7.
- Hohberger L, Wuertz BR, Xie H, Griffin T, Ondrey F. TNF-alpha drives matrix metalloproteinase-9 in squamous oral carcinogenesis. Laryngoscope. 2008; 118(8): 1395-9.
- Hunter KD, Speight PM. The diagnostic usefulness of immunohistochemistry for odontogenic lesions. Head Neck Pathol. 2014; 8(4): 392-9.

I

- Iezzi G, Piattelli A, Rubini C, Artese L, Fioroni M, Carinci F. MIB-1, Bcl-2 and p53 in odontogenic myxomas of the jaws. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2007; 27(5): 237-42.

J

- Jaeger M, Santos J, Domingues M, Ruano R, Araújo N, Caroli A, *et al.*

A novel cell line that retains the morphological characteristics of the cells and matrix of odontogenic myxoma. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29(3): 129-38.

- Jamshidi S, Zargaran M, Baghaei F, Shojaei S, Zare Mahmoodabadi R, Dehghan A, *et al.* An Immunohistochemical Survey to evaluate the expression of CD105 and CD34 in ameloblastoma and odontogenic Keratocyst. *J Dent (Shiraz).* 2014; 15 (4): 192-8.
- Jing W, Xuan M, Lin Y, Wu L, Liu L, Zheng X, *et al.* Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 36(1): 20-5.
- Jordan RC, Daniels TE, Greenspan JS, Regezi JA. Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part II: immunohistochemical and immunofluorescent methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93(1): 56-74.

K

- Kalibović Govorko D, Bečić T, Vukojević K, Mardešić-Brakus S, Biočina-Lukenda D, Saraga-Babić M. Spatial and temporal distribution of Ki-67 proliferation marker, Bcl-2 and Bax proteins in the developing human tooth. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(12): 1007-16.
- Kanbe N, Tanaka A, Kanbe M, Itakura A, Kurosawa M, Matsuda H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol.* 1999; 29(8): 2645-9.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators

of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010; 141(1): 52-67.

- Keszler A, Dominguez FV, Giannunzio G. Myxoma in childhood: an analysis of 10 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995; 53(5): 518-21.
- Kheir E, Stephen L, Nortje C, Van Rensburg LJ, Titinchi F. The imaging characteristics of odontogenic myxoma and a comparison of three different imaging modalities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013; 116(4): 492-502.
- Kim J, Ellis GL. Dental follicular tissue: misinterpretation as odontogenic tumors. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993; 51(7): 762- 7.
- Kimura A, Hasegawa H, Satou K, Kitamura Y. Odontogenic myxoma showing active epithelial islands with microcystic features. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 59(10):1226-8.
- Koseki T, Kobayashi K, Hashimoto K, Arijji Y, Tsuchimochi M, Toyama M, *et al*. Computed tomography of odontogenic myxoma. *Dentomaxillofac Radiol*. 2003; 32(3):160-5.
- Kouhsoltani M, Halimi M, Dibazar S. A positive correlation between immunohistochemical expression of CD31 and mast cell tryptase in odontogenic tumors. *Pol J Pathol*. 2015; 66(2):170-5.
- Kumamoto H, Ooya K. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(1):46-52
- Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical

detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(2): 114-20.

L

- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93(2): 165-76.
- Ladeinde AL, Ajayi OF, Ogunlewe MO, Adeyemo WL, Arotiba GT, Bamgbose BO *et al.* Odontogenic tumors: a review of 319 cases in a Nigerian teaching hospital. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(2): 191-5.
- Li TJ, Sun LS, Luo HY. Odontogenic myxoma: a clinicopathologic study of 25 cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130(12): 1799-806.
- Lo Muzio L, Nocini P, Favia G, Procaccini M, Mignogna MD. Odontogenic myxoma of the jaws: a clinical, radiologic, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 82(4): 426-33.
- Lohi J, Harvima I, Keski-Oja J. Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin. *J Cell Biochem.* 1992; 50:337-49.
- Luo HY, Li TJ. Odontogenic tumors: a study of 1309 cases in a Chinese population. *Oral Oncol.* 2009; 45(8): 706-11.
- Luo HY, Yu SF, Li TJ. Differential expression of apoptosis-related

proteins in various cellular components of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35(8): 750-5.

M

- MacDonald Jankowski DS, Yeung R, Li T, Lee KM. Computed tomography of odontogenic myxoma. *Clin Radiol.* 2004; 59(3): 281-7.
- MacDonald Jankowski DS, Yeung R, Lee KM, Li TK. Odontogenic myxomas in the Hong Kong Chinese: clinico-radiological presentation and systematic review. *Dentomaxillofac Radiol.* 2002; 31(2): 71-83.
- Maltby S, Khazaie K, McNagny KM. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1796(1): 19-26.
- Martínez Mata G, Mosqueda Taylor A, Carlos Bregni R, De Almeida OP, Contreras Vidaurre E, Vargas PA *et al.* Odontogenic myxoma: clinico-pathological, immunohistochemical and ultrastructural findings of a multicentric series. *Oral Oncol.* 2008; 44(6): 601-7.
- Mitsuyasu T, Harada H, Higuchi Y, Kimura K, Nakamura N, Katsuki T *et al.* Immunohistochemical demonstration of bcl-2 protein in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26(8): 345-8.
- Miyagi SP, Hiraki KR, Martins MD, Marques MM. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic myxoma in vivo and in vitro. *J Oral Sci.* 2008; 50(2):187-92.
- Miyata Y, Sagara Y, Watanabe S, Asai A, Matsuo T, Ohba K *et al.* CD105 is a more appropriate marker for evaluating angiogenesis in

urothelial cancer of the upper urinary tract than CD31 or CD34. *Virchows Arch.* 2013; 463(5): 673-9.

- Morsczeck C. Molecular mechanisms in dental follicle precursor cells during the osteogenic differentiation. *Histol Histopathol.* 2015; 30(10): 1161-9.
- Mortellaro C, Berrone M, Turatti G, Rimondini L, Brach Del Prever A, Canavese F et al. Odontogenic tumors in childhood: a retrospective study of 86 treated cases. Importance of a correct histopathologic diagnosis. *J Craniofac Surg.* 2008; 19(4): 1173-6.
- Mosqueda Taylor A. New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008; 13(9): 555-8.
- Mosqueda Taylor A, Ledesma Montes C, Caballero Sandoval S, Portilla Robertson J, Ruíz Godoy Rivera LM, Meneses García A. Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84(6): 672-5
- Mosqueda Taylor A, Pires FR, Aguirre Urizar JM, Carlos Bregni R, De la Piedra Garza JM, Martínez-Conde R, *et al.* Primordial odontogenic tumour: clinicopathological analysis of six cases of a previously undescribed entity. *Histopathology.* 2014; 65(5): 606-12.

N

- Nechushtan H. The complexity of the complicity of mast cells in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(5): 551-4.
- Noffke CE, Raubenheimer EJ, Chabikuli NJ, Bouckaert MM.

Odontogenic myxoma: review of the literature and report of 30 cases from South Africa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(1): 101-9.

- Nonaka CF, Augusto Vianna Goulart Filho J, Cristina da Costa Miguel M, Batista de Souza L, Pereira Pinto L. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 in odontogenic myxoma and dental germ papilla. *Pathol Res Pract.* 2009; 205(7): 458-65.
- Nonaka CF, Cavalcante RB, Nogueira RL, de Souza LB, Pinto LP. Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(3): 230-7.

O

- Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Peñafiel C, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31(7): 415-20.
- Okayama Y, Ra C, Saito H. Role of mast cells in airway remodeling. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19(6): 687-93.
- Osterne RL, Brito RG, Alves AP, Cavalcante RB, Sousa FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111(4): 474-81.
- Özcan A, Yavan İ, Günhan Ö. Immunohistochemical characteristics of

cystic odontogenic lesions: a comparative study. Turk Patoloji Derg. 2015; 31(2): 104-10.

P

- Peltola J, Magnusson B, Happonen RP, Borrmann H. Odontogenic myxoma a radiographic study of 21 tumours. Br J Oral Maxillofac Surg. 1994; 32(5): 298-302.
- Pyziak L, Stasikowska Kanicka O, Danilewicz M, Wągrowka Danilewicz M. Immunohistochemical analysis of mast cell infiltrates and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. Pol J Pathol. 2013; 64(4): 276-80.

R

- Raica M, Cimpean AM and Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. Eur J Cancer. 2009; 45(11): 1924-34.
- Razavi SM, Tabatabaie SH, Hoseini AT, Hoseini ET, Khabazian A. A comparative immunohistochemical study of Ki-67 and Bcl-2 expression in solid ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. Dent Res J (Isfahan). 2012; 9(2): 192-7.
- Razavi SM, Torabinia N, Mohajeri MR, Shahriyary S, Ghalegolab S, Nouri S. Expression of Bcl-2 and epithelial growth factor receptor proteins in keratocystic odontogenic tumor in comparison with dentigerous cyst and ameloblastoma. Dent Res J (Isfahan). 2015; 12(4): 342-7.
- Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth.

Biochim Biophys Acta. 2012; 1822(1): 2-8.

- Ribeiro BF, Ferreira de Araújo CR, Dos Santos BR, De Almeida Freitas R. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 7, 9, and 26 in the calcifying cystic odontogenic tumor. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 112(5): 609-15.
- Ribeiro BF, Iglesias DP, Nascimento GJ, Galvão HC, Medeiros AM, Freitas RA. Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. Oral Dis. 2009; 15(7): 472-7.
- Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. Head Neck. 2006; 28(7): 639-48.

Q

- Qian Y, Huang HZ. The role of RANKL and MMP-9 in the bone resorption caused by ameloblastoma. J Oral Pathol Med. 2010; 39(8): 592-8.

S

- Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. Mod Pathol. 2004; 17(2): 197-203.
- Saghravanian N, Jafarzadeh H, Bashardoost N, Pahlavan N, Shirinbak I. Odontogenic tumors in an Iranian population: a 30-year evaluation. J Oral Sci. 2010; 52(3): 391-6.
- Schmidt-Westhausen A, Becker J, Schuppan D, Burkhardt A, Reichart PA. Odontogenic myxoma--characterisation of the extracellular matrix

(ECM) of the tumour stroma. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994; 30B (6): 377-80.

- Sekerci AE, Nazlim S, Etoz M, Deniz K, Yasa Y. Odontogenic tumors: a collaborative study of 218 cases diagnosed over 12 years and comprehensive review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015; 20(1): 34-44.
- Servato JP, Prieto Oliveira P, De Faria PR, Loyola AM, Cardoso SV. Odontogenic tumours: 240 cases diagnosed over 31 years at a Brazilian university and a review of international literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013; 42(2): 288-93.
- Siar CH, Tsujigiwa H, Ishak I, Hussin NM, Nagatsuka H, Ng KH. 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(1): 83-91.
- Simon EN, Merckx MA, Vuhahula E, Ngassapa D, Stoelinga PJ. Odontogenic myxoma: a clinicopathological study of 33 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(4): 333-7.
- Sindura C, Babu C, Mysorekar V, Kumar V. Study of immunohistochemical demonstration of Bcl-2 protein in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2013; 17(2): 176-80.
- Siriwardena BS, Tennakoon TM, Tilakaratne WM. Relative frequency of odontogenic tumors in Sri Lanka: Analysis of 1677 cases. *Pathol Res Pract.* 2012; 208(4): 225-30.

- Slootweg PJ, Van den Bos T, Straks W. Glycosaminoglycans in myxoma of the jaw: a biochemical study. *J Oral Pathol.* 1985; 14(4): 299-306.
- Soluk Tekkeşin M, Mutlu S, Olgaç V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg.* 2012; 28(1): 49-55.
- Sriram G, Shetty RP. Odontogenic tumors: a study of 250 cases in an Indian teaching hospital. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(6): 14-21.
- Sun H, Li Q, Zhang Y, Bi Y, Li X, Shu Y, *et al.* Regulation of OPG and RANK-L expressed by human dental follicle cells in osteoclastogenesis. *Cell Tissue Res.* 2015; 362(2): 399-405

T

- Takahashi H, Fujita S, Okabe H. Immunohistochemical investigation in odontogenic myxoma. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20(3): 114-9.
- Tekkesin MS, Mutlu S, Olgac V. The role of RANK/RANKL/OPG signalling pathways in osteoclastogenesis in odontogenic keratocysts, radicular cysts, and ameloblastomas. *Head Neck Pathol.* 2011; 5(3): 248-53.
- Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* 1999; 35(3): 227-33.

V

- Varun BR, Bindu JN, Sivakumar TT, Anna PJ. Matrix metallo proteinases and their role in oral diseases: a review. *Oral Maxillo Path Journal* 2012; 3: 186- 191.
- Vered M, Buchner A, Dayan D. Giant cell granuloma of the jawbones--a proliferative vascular lesion? Immunohistochemical study with vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35(10): 613-9.

W

- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991; 324(1): 1-8.
- White DK, Chen S, Mohnac AM, Miller AS. Odontogenic myxoma. A clinical and ultrastructural study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1975; 39(6): 901-17.
- Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, *et al.* RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1704(2): 49-57.
- Wright JM, Odell EW, Speight PM, Takata T. Odontogenic tumors, WHO 2005: where do we go from here? *Head Neck Pathol.* 2014; 8(4): 373-82.

Y

- Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y, Ding Y. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci.* 2007; 37(1): 39-48.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 3597-602.

Z

- Zhang J, Wang H, He X, Niu Y, Li X. Radiographic examination of 41 cases of odontogenic myxomas on the basis of conventional radiographs. *Dentomaxillofac Radiol.* 2007; 36(3): 160-7.
- Zhao M, Lu Y, Takata T, Ogawa I, Miyauchi M, Mock D *et al.* Immunohistochemical and histochemical characterization of the mucosubstances of odontogenic myxoma: histogenesis and differential diagnosis. *Pathol Res Pract.* 1999; 195(6): 391-7.

