



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ANÁLISIS PROLIFERATIVO E INMUNOCITOQUÍMICO DE
CÉLULAS PRIMARIAS DE ODONTOMA COMPUESTO Y
COMPLEJO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

BOGDÁN RAMÓN NAVARRO BUSTOS

TUTOR: Dr. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

ASESORES: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN
Dra. ELBA ROSA LEYVA HUERTA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1. Odontogénesis	6
3.2. Tumores odontogénicos	7
3.2.1. Definición y etiología	8
3.2.2. Clasificación y epidemiología	8
3.2.3. Odontoma	10
3.2.3.1 Epidemiología del Odontoma	11
3.2.3.2 Características Clínicas	11
3.2.3.3 Características Imagenológicas	12
3.2.3.4 Características Histológicas	15
3.2.3.5 Pronóstico y Tratamiento	16
3.3 Cultivo celular primario	18
4. DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES EN TO	21
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
6. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	24
7. OBJETIVOS	25
7.1. Objetivo general	25
7.2. Objetivos específicos	25
8. HIPÓTESIS	26
9. VARIABLES	27
9.1. DEPENDIENTES	27
9.2. INDEPENDIENTES	27
10. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES	28
11. RECURSOS	30
11.1 Equipo e Infraestructura	30
11.2 Humanos	30
12. MATERIALES Y MÉTODOS	31
12.1 Materiales	31

12.2 Métodos	31
12.2.1 Espécimen/ muestra	32
12.2.2 Determinación del crecimiento celular	33
12.2.3 Inmunocitoquímica	34
12.2.4 Análisis de resultados	35
12.2.5 Consideraciones Bioéticas	35
13. RESULTADOS	36
13.1 Datos clínicos y obtención de la muestra	36
13.2 Ensayo de proliferación MTT	37
13.3 Inmunocitoquímica	38
14. DISCUSIÓN	41
15. CONCLUSIÓN	43
16. ANEXOS	44
16.1 Consentimiento informado	44
16.2 Carta representante comité de investigación y ética	45
17. BIBLIOGRAFÍA	46

1. RESUMEN

El odontoma es un tumor odontogénico tipo hamartoma, clasificado en compuesto y complejo. Su etiología es desconocida asociada a mutaciones genéticas, síndromes y hasta traumatismos. El objetivo de este trabajo es la obtención y caracterización inmunocitoquímica de una línea celular estable de odontoma compuesto y complejo. MATERIALES Y METODOS: Se obtuvieron dos muestras de pacientes adultos uno con diagnóstico de odontoma compuesto y otro de complejo que acudieron a la Clínica de Patología y Medicina Bucal de la DEPEI de la Facultad de Odontología. Se realizó cultivos primarios para obtener la línea celular estable para determinar su crecimiento celular e inmunofenotipo (actina; sc-8432, CK 1/3; sc-81714, vimentina sc-32322, Sox2 sc-365823 y NGFRp75 sc-365823) a través del ensayo MTT e inmunocitoquímica. Se obtuvo la media y desviación estándar. Se empleo células de ligamento periodontal como control. RESULTADOS: Se obtuvieron una línea celular estables tanto de odontoma compuesto como de complejo. En sus análisis de crecimiento por MTT se comprobó que el odontoma compuesto presento mayor proliferación. Al realizar la inmunocitoquímica observamos que el odontoma compuesto presentó mayor expresión de actina, CK1-3 y vimentina, mientras que en el odontoma complejo predominó la expresión de Sox2 y NGFRp75. CONCLUSIÓN: En base a nuestros resultados podemos concluir que las líneas celulares primarias de odontoma compuesto y complejo son viables, observando mayor viabilidad en las células derivadas del compuesto. El perfil inmuocitoquímico siguiere que las células de odontoma compuesto tienen un linaje ectomesenquimal y las células de odontoma complejo mayoritariamente ectodérmico con mayor proporción de células madre.

2. INTRODUCCIÓN

Los odontomas son considerados un tumor odontogénico con características de hamartoma, debido a su cualidad de presentar tanto células ectodérmicas como mesenquimales, tales como ameloblastos, odontoblastos, cementoblastos y fibroblastos, las cuales cuentan con la capacidad de generar tejidos mineralizados como esmalte, dentina y cemento ya sea en una forma ordenada o desordenada. Su estudio como entidad patológica cuenta con una complicación compartida por otros tumores odontogénicos, esta complicación es el desconocimiento de su mecanismo de su formación o patogenia. Esta dificultad se puede solucionar si se emplea una estrategia in vitro o in vivo, sin embargo, estos modelos experimentales son carentes o limitados. Ciertos modelos animales en murinos (ratones) han sido postulados, sin embargo, las diferencias en los tipos y modelo de dentición difiodoncia de los humanos contra la hipsodoncia de los roedores genera dudas, por lo cual otra alternativa viable es la generación de líneas celulares estables con las características clonogénicas y de diferenciación propias para un odontoma humano. En el laboratorio de Patología Bucal de la División de estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI), la captación y concentración de odontomas representa del 45 a 30% de todos los tumores odontogénicos, lo cual lo convierte en unos de los tumores más frecuentes. El investigar al odontoma no solo se justifica en base a su prevalencia, sino también a lo que ya se menciona, esto es la falta de conocimiento de cuál fue su origen o subtipificación a compuesto o complejo. La posibilidad de comprender el desarrollo y obtener materia prima para el estudio de su patogenia, coloca al odontoma como tópico de investigación dentro de la biología y patología bucal. En este estudio se analizará la conducta en relación a proliferación y inmunoexpresión comparando al odontoma compuesto y complejo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Odontogénesis

La odontogénesis o formación de los dientes está regulada por las interacciones epitelio-mesenquimales.^{1,2} En la actualidad, este proceso es considerado un modelo importante en la investigación por sus alcances en la regeneración tisular. El proceso de odontogénesis en el humano comienza a partir del establecimiento de la lámina dental derivada del epitelio bucal embrionario a través de su proliferación e invaginación en el mesénquima embrionario. Posteriormente, dicha lámina se alarga y sus extremos dejan excrecencias que forman un brote o botón, el cual es la primera etapa de la odontogénesis. En la siguiente etapa o de casquete, las células se multiplican agrandando dicha estructura y diferenciando células del ectomesenquima y papila dental. En la tercera etapa o de campana se establecen patrones morfológicos de cúspides y la diferenciación del órgano del esmalte (epitelio externo, interno, retículo estrellado y estrato intermedio). El órgano del esmalte da lugar a la formación del esmalte e induce la diferenciación de odontoblastos y formación de dentina. Posteriormente se forma un folículo dental maduro que participa en la erupción dental, mientras que la raíz se formará a partir de la vaina epitelial de Hertwig por la diferenciación de cementoblastos y producción de dentina a partir de los odontoblastos.²

Cada tejido dental mineralizado difiere en su composición orgánica e inorgánica así como en las vías moleculares implicadas. Actualmente se sabe que el TGF β , FGF y las vías de señalización Shh y Wnt son necesarias en distintas ocasiones para el desarrollo del diente y que su supresión da como resultado un frenado del desarrollo dental.^{3,4} El esmalte es formado principalmente por dos etapas. La etapa 1 o de secreción es cuando el grosor del esmalte alcanza su máxima formación, la etapa 2 o de maduración es cuando el material orgánico del esmalte es remplazado por cristales de hidroxiapatita.⁵

Los ameloblastos son células especializadas responsables de formar el esmalte, como ya se menciono existen vías moleculares encargadas de la formación de este tejido. Actualmente se considera que los ciclos circadianos y ciertos genes y moléculas como la melatonina, enamulina, per2 y amelogenina, son participantes en la formación de las estrías de Retzius y cruzadas, las cuales indican el desarrollo y maduración del esmalte.⁵

En la dentina al igual que el esmalte está regulada por el ciclo circadiano. Se conoce que la colágena es secretada como máximo 2 veces por día, en la mañana y en la noche, no obstante, se desconoce si el cemento y el ligamento periodontal son regulados por el ciclo circadiano ya que no hay evidencia que vincule la formación de estos tejidos.⁵

Se ha comprobado que algunas patologías derivan del aparato de la odontogénesis y de los restos de Malassez, Serres y órgano reducido del esmalte. Este es el caso de los tumores odontogénicos, que pueden estar dentro de las patologías de origen embrionario.⁵

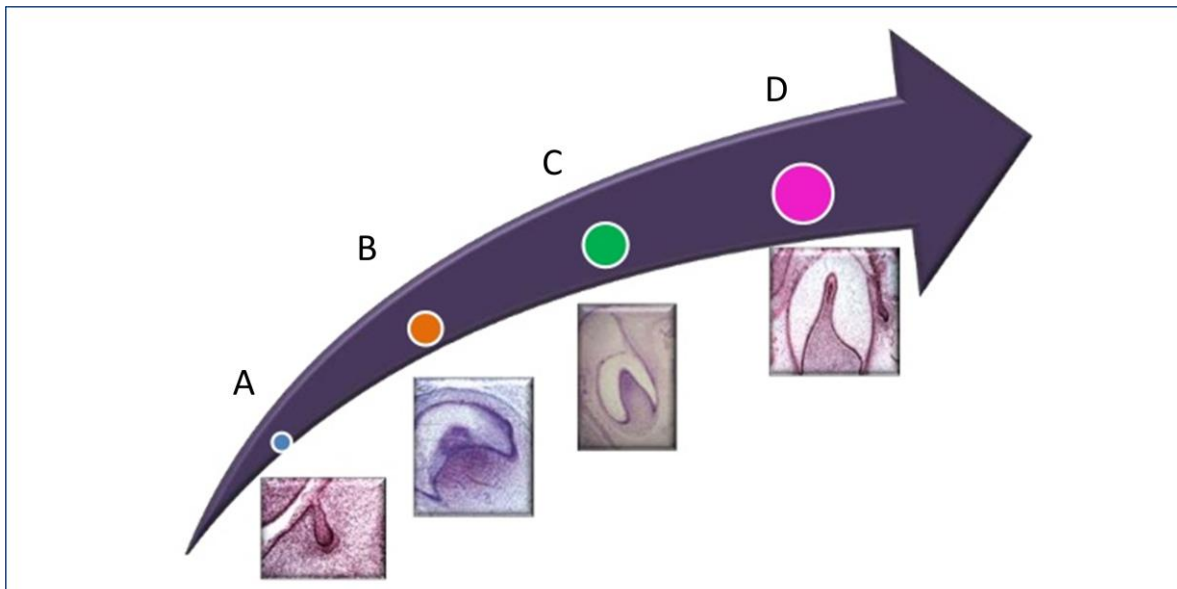


Imagen (1): odontogénesis embrionaria. A: etapa de yema, B: etapa de casquete, C: etapa de campana, D: etapa de folículo maduro. Fuente (www.pubmed.com), odontogenesis, embriología dentaria.

3.2 Tumores Odontogénicos

Los dientes pueden presentar alteraciones de tamaño, número, forma y estructura, así como desarrollar anomalías tumorales o neoplásicas. Los tumores odontogénicos son quizá los más importantes respecto a las repercusiones en la calidad de vida de un paciente, ya que su presencia no solo afecta al diente sino también a los macizos óseos del maxilar y mandíbula, sitios donde se lleva a cabo la odontogénesis.⁶

3.2.1 Definición y Etiología

Los tumores odontogénicos son un grupo de lesiones que surgen de los tejidos dentales y que pueden ir desde hamartomas a proliferaciones de tejido no neoplásico, neoplasias benignas, tumores malignos con potencial metastásico. Estos se pueden formar por células epiteliales y mesenquimales y por elementos de origen embrionario asociado a la odontogénesis, es decir, pueden derivar de restos de Malassez, Serres y órgano reducido del esmalte.⁷

3.2.2 Clasificación y epidemiología

Los tumores odontogénicos son un grupo de lesiones que derivan de los tejidos que forman al diente. Estos solamente se presentan en maxila y mandíbula y representan una situación patológica donde el epitelio primario puede ser localizado dentro de hueso. Como ya se ha mencionado este tipo de tumores son raros, lo cual dificulta su diagnóstico al ser poco familiares. La clasificación histológica de tumores odontogénicos incluye más de 30 entidades, pero pueden existir variaciones complicando un poco más esta clasificación. Esta clasificación está basada primariamente en su conducta (benigna o maligna), y después sobre su histomorfogénesis de la lesión. Como grupo, estos son derivados del epitelio, ectomesénquima y tejido mesénquimal la cual parte del aparato odontogénico. Estos tumores están divididos en lesiones derivadas solo del epitelio odontogénico, tumores derivados del mesénquima odontogénicos y algunos que están compuestos por ambos. Se considera que su apariencia y su clasificación depende del grado de interacción de los componentes epiteliales y mesenquimales, ya que a menudo se refiere que existe un cambio inductivo que resulta en un grado de citodiferenciación que recapitula las estructuras normales del aparato odontogénico o del órgano del esmalte.^{6,7}

La Organización Mundial para la Salud (OMS o WHO, por sus siglas en inglés) ha postulado la clasificación más reciente (en el año 2005) para los tumores odontogénicos, fundamentada en sus características histológicas.^{6,7}

Tabla 1. Clasificación de los tumores odontogénicos más comunes. OMS (Basada en la clasificación de 2005)
<p>-TUMORES BENIGNOS</p> <p>Derivados del epitelio odontogénico:</p> <p>Ameloblastoma</p> <p>Tumor odontogénico escamoso</p> <p>Tumor odontogénico epitelial calcificante</p> <p>Tumor odontogénico adenomatoide</p> <p>Queratoquiste odontogénico</p>
<p>Derivados del epitelio odontogénico y mesenquimatoso</p> <p>Fibroma ameloblástico</p> <p>Odontomas compuesto y complejo</p> <p>Quiste odontogénico calcificante</p>
<p>Derivados del mesenquima odontogénico</p> <p>Fibroma odontogénico</p> <p>Mixoma odontogénico</p> <p>Cementoblastoma</p>
<p>-TUMORES MALIGNOS</p> <p>Carcinomas odontogénicos</p> <p>Ameloblastoma maligno</p> <p>Carcinoma de células escamosas intraoseo primario</p> <p>Carcinoma odontogénico de células claras</p> <p>Carcinoma odontogénico de células fantasma</p>
<p>-Sarcomas odontogénicos</p> <p>Fibrosarcoma ameloblástico</p>
<p>Tomada de: Richard CK, Diagnostic Histopathology, 2009.</p>

Los tumores odontogénicos son relativamente raros. Diferentes instituciones han reportado distintas frecuencia, por ejemplo el departamento de patología oral y maxilofacial de la universidad de Sheffield indica que estos tumores representan el 1% de todas las lesiones,

estimando una incidencia de menos de 0.5 casos por cada 100 000 por año. Ellos mismo reportan que las lesiones intraoseas mas frecuentes son los quistes odontogénicos. En general se considera que la frecuencia de los tumores odontogénicos varia de país a país, pero en los países occidentales, el odontoma es el más común, representando alrededor del 70% del total.⁷ Este variabilidad puede observarse en algunos países, donde el tumor odontogénico mas frecuente es el ameloblastoma solido multiquistico (Hong Kong, Japon, Zimbabue y Nigeria), mientras que en otros (Estados Unidos de América, Brasil y Canadá) el tumor más frecuente es el odontoma, estas diferencias radican en los tipos de centros de concentración para cada región.^{5,6} En México, se ha reportado la prevalencia de los tumores odontogénicos, considerando al odontoma como el más frecuente, seguido por ameloblastomas, mixomas, tumores odontogénicos adenomatoides y quistes odontogénicos calcificantes.⁸

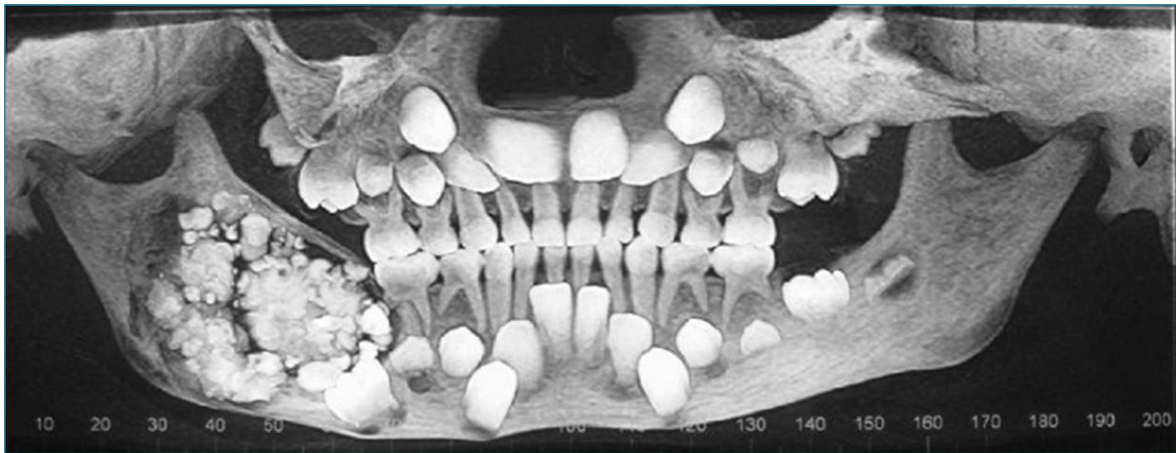


Imagen (3). Ej de tumor odontogénico. Odontoma complejo. Fuente www.pubmed.com (odontomas)

3.2.3. Odontoma

El término odontoma se refiere a un tumor benigno de origen odontogénico de carácter mixto, formado por células epiteliales y mesenquimales que se caracteriza por su crecimiento lento e indoloro. Es un hamartoma de tejido odontogénico formado por tejido epitelial y mesenquimatoso con diferentes subtipos que presenta tejidos y formaciones dentales deficientes asi como esmalte, dentina y cemento rodeados de tejido conectivo laxo.^{6,7}

El odontoma según la OMS se clasifica según por su composición y localización en compuesto y complejo. El odontoma compuesto se encuentra rodeado de un saco de células mesenquimatosas la cual hace formaciones de dentículos con una composición ordenada en el maxilar entre lateral y canino. El odontoma complejo es un tipo de tumor como una malformación (hamartoma) en esmalte y dentina y en ocasiones en cemento.^{6,7}

En las causas consideradas como responsables del desarrollo del odontoma se encuentran los traumatismos, infección, síndrome de Down, síndrome de Gardner, hiperactividad odontoblástica o mutación genética espontánea.⁹ Ida-Yonemochi y Cols. consideran a la alteración de la interacción epitelio-mesénquima como responsable, es decir, fallas en la comunicación entre el hueso alveolar y el folículo dental al observar que ratones con osteopetrosis desarrollaban estructuras similares a odontomas.¹⁰

3.2.3.1 Epidemiología del odontoma

En México, datos del laboratorio de patología bucal de la DEPEI, de la facultad de odontología de la UNAM sobre su prevalencia confirman la constancia del odontoma, ya que en 1981-2004 represento el 45% y del 2005 al 2007 el 30.8% de todos los tumores odontogénicos.¹¹

3.2.3.2 Características Clínicas

Sus características clínicas son lesiones de diversos tamaños, estos tumores pueden ir de milímetros hasta alcanzar dimensiones considerables. Usualmente son asintomáticos y pueden ser diagnosticados accidentalmente durante los exámenes radiográficos de rutina. Pueden causar retención, infección, impactación y retardo de la erupción de la dentición. En casos de aumento de tamaño tumoral se produce una expansión de corticales y la tumoración resulta palpable.^{12,13}

Clínicamente los odontomas se pueden observar como un aumento de volumen dependiendo de la localización, pero su característica más común de los odontomas es la retención de dientes permanentes, es decir; el odontoma compuesto puede hacer notar la ausencia clínica de lateral y canino de dientes permanentes ya que se encuentran retenidos en el hueso. Estos dientes son los más comunes ya que es la zona anatómica más frecuente de aparición del odontoma compuesto. El odontoma complejo por su formación desordenada tiene un crecimiento muy notable la cual se puede apreciar clínicamente además de hacer notar la ausencia de los molares ya que su formación comúnmente ocurre en la parte posterior de la mandíbula.^{13,14}

3.2.3.3 Características Imagenológicas

La imagenología es un auxiliar de diagnóstico esencial para los odontomas por su característica de ser completamente asintomáticos y de crecimiento lento. Los odontomas normalmente se descubren por medio de una radiografía convencional y de rutina y por lo general es por la ausencia clínica de los dientes en la zona afectada.

El odontoma presenta diferentes características según el estudio que se esté utilizando para complementar un diagnóstico. Esto nos permitirá ser precisos y postular un plan de tratamiento oportuno y detallado.¹⁵

Radiográficamente el odontoma compuesto presenta un halo radiolúcido que es el saco de células mesenquimatosas la cual está rodeando a los dentículos que forman la patología.

El odontoma compuesto se observa como una imagen mixta con múltiples radiopacidades que adoptan una configuración similar a dientes (dentículos), rodeados por un halo radiolúcido. Pueden contener pocas (2 o 3) o muchas (20 a 30) estructuras similares a dientes. Mientras que el odontoma complejo se observa como una masa radiopaca irregular, única o múltiple, con un halo radiolúcido. Las lesiones son uniloculares y están separadas del hueso normal por una línea nítida de corticación. No aparecen estructuras con aspecto de diente.¹⁵



Imagen (4). Odontoma compuesto formado entre raíces de dientes temporales lateral y canino. Fuente directa.

Las radiografías periapicales son para ver con precisión y exclusivamente la zona afectada por el odontoma.¹⁵



Imagen (5). Radiografías periapicales de odontoma compuesto. Fuente directa.

El odontoma complejo radiográficamente presenta un halo radiolúcido la cual rodea la patología en forma de masa radiopaca desordenada y generalmente en la parte posterior de la mandíbula.¹⁵

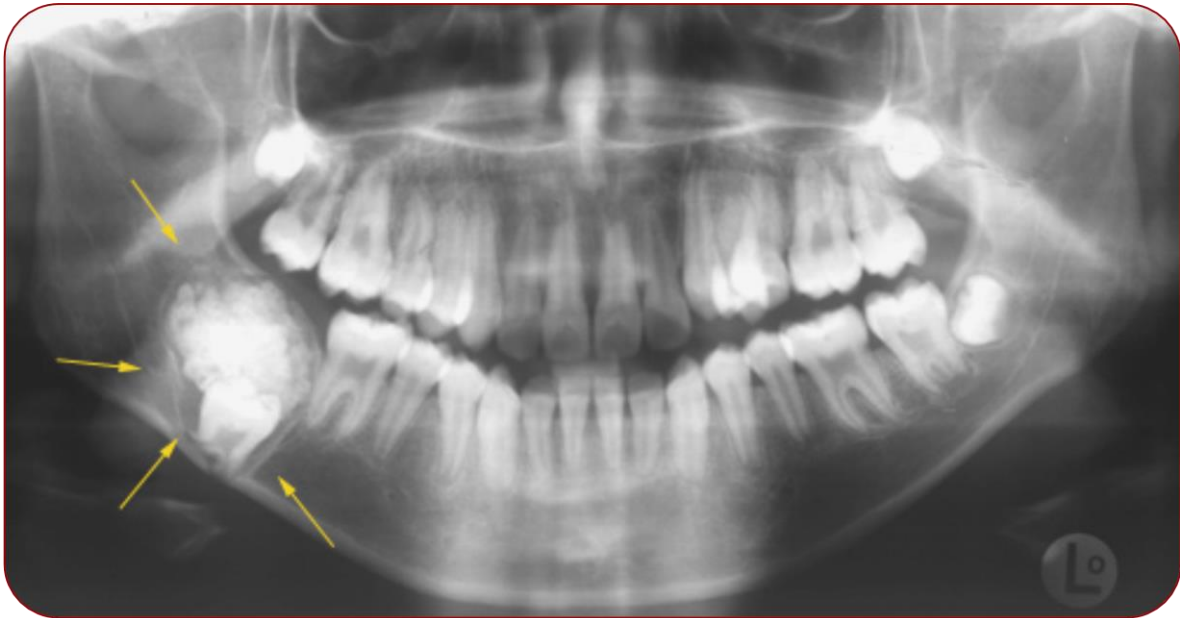


Imagen (6). Radiografía panorámica de odontoma complejo. Fuente directa.

La tomografía computarizada (TC) nos puede dar una mayor precisión al realizar la construcción de los cortes en 3D para saber que tan afectada esta la zona y si hay más tejidos y dientes adyacentes afectados en donde se encuentra el odontoma, además que nos permite planear un acto quirúrgico correcto.¹⁵



Imagen (7). Tomografía de odontoma compuesto. Fuente directa.

3.2.3.4 Características Histológicas

Histológicamente están compuestos por varias formaciones de tejido dentario entre los cuales encontramos esmalte, dentina, cemento y a veces pulpa. Suelen estar localizados entre las raíces de los dientes erupcionados, entre la dentición temporal y permanente.

Histológicamente en odontomas complejos maduros la cápsula de tejido blando consiste en un tejido conectivo laxo que contiene hebras o islas de epitelio odontogénico. En odontomas complejos en desarrollo la parte exterior consta de una zona rica de células de tejido blando con la formación de dentina y esmalte, no se asemeja a la morfología del diente. La lesión puede aparecer como una masa de dentina tubular primaria que encierra estructuras circulares u ovals con espacios vacíos de esmalte descalcificado maduro, matriz del esmalte, epitelio y tejido conectivo. La estructura del tejido dental duro puede variar. El cemento es escaso y la pulpa suele mostrar finas ramificaciones, con lo que la tumoración aparece perforada por pequeñas ramas de la pulpa que producen una imagen esponjosa.⁶

Los odontomas compuestos se componen esencialmente de los tejidos dentales maduros como el esmalte, dentina, cemento y tejido pulpar conformando dentículos. La mayor parte del tumor consiste en dentina que es normal en apariencia. Hay una cápsula fibrosa y una pequeña cantidad de tejido de soporte fibroso. En esta capsula se puede observar la presencia de “células fantasma”. Los odontomas compuestos en desarrollo muestran varios gérmenes dentales dismórficos en un tejido conectivo laxo texturizado con cordones e islas de epitelio odontogénico, gran parte de la matriz de esmalte se conserva a pesar de descalcificación.⁶

Particularmente el odontoma compuesto se observa con secciones de desarrollo inmaduro, que muestran la deformación de los gérmenes dentarios. En la textura del tejido conectivo se observan cuerdas e islas de epitelio odontogénico. Gran parte de la matriz de esmalte se conserva a pesar de su descalcificación.⁶

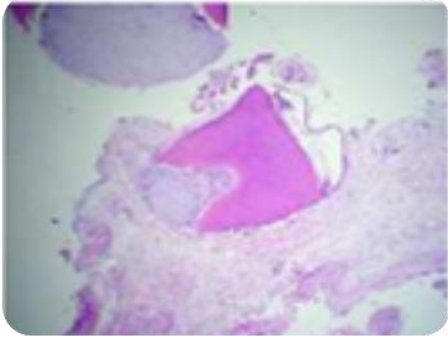


Imagen (8a). Histología de odontoma compuesto, donde se puede observar la formación de matriz de esmalte, dentina y cemento. Fuente directa.

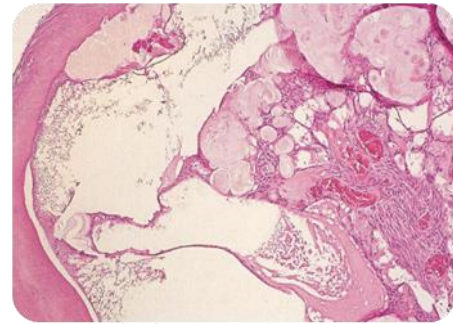


Imagen (8b). Histología de odontoma complejo. Fuente indirecta.

3.2.3.5 Pronóstico y Tratamiento

El diagnóstico oportuno del odontoma nos llevara a un pronóstico favorable para el paciente ya que depende de la etapa de crecimiento, edad y condición en la que se encuentre el paciente.

Normalmente los odontomas se descubren en la segunda década de la vida por las retenciones dentales que presentan las zonas afectadas. Por lo tanto la enucleación quirúrgica debe ser planeada correctamente para no afectar el crecimiento y desarrollo del paciente. Posterior a la enucleación se lleva a cabo la fase de mantenimiento que es sumamente importante, ya que en ella se lleva a cabo la remoción de placa, pulidos dentales y educación en la higiene dental para poder preservar los tejidos lo más sanos posible para continuar con el tratamiento ortodóntico.

Posteriormente se hace un estudio de ortopedia maxilar en la cual se planea un tratamiento ortopédico para poder reacomodar las piezas dentales para que el paciente tenga un crecimiento y desarrollo adecuado.

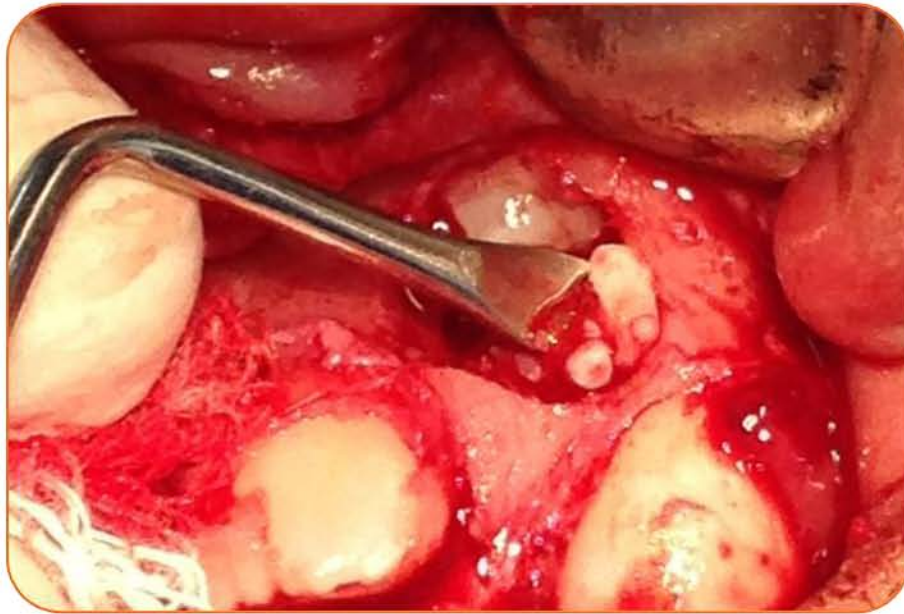


Imagen (9). Enucleación de odontoma compuesto. Fuente directa.



Imagen (10). Tratamiento ortodóntico posterior a la enucleación de odontoma compuesto en paciente de masculino de 10 años de edad. Fuente directa.

3.3 Cultivo celular primario

El cultivo celular es el proceso mediante el cual las células son cultivadas en medios controlados, las cuales se mantienen a una apropiada temperatura y mezcla de gases (habitualmente 37°C, 5% CO₂ y 95% O₂) en un incubadora celular. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo celular y la variación de las condiciones para un tipo celular concreto puede dar lugar a la expresión de diferentes fenotipos.¹⁶

Los cultivos celulares primarios imitan el estado fisiológico de las células in vivo y generan datos pertinentes que representan los sistemas vivos. Los cultivos primarios se componen de células que han sido recién derivados de un organismo vivo y se mantienen para el crecimiento in vitro. Las células primarias se pueden clasificar de acuerdo con el género, así como por especie o tipo de tejido. Los tipos de células que se encuentran más frecuentemente en cultivo de células primarias son células epiteliales, fibroblastos, queratinocitos, melanocitos, células endoteliales, células musculares, células hematopoyéticas y mesenquimales. Las células pueden aislarse a partir de sangre completa, órganos (hígado, corazón, riñón, etc.) u organismos completos. Debe recalcarse que cada tejido, órgano u organismo presenta sus propios problemas particulares, por lo que para cada procedencia se debe diseñar un método de aislamiento.¹⁶



Imagen (11). Cultivo celular. Fuente. www.pubmed.com (primary culture).

Una vez adaptado a condiciones de cultivo in vitro, las células primarias se someten a un número de divisiones celulares antes de entrar en senescencia. El número de veces que un cultivo celular primario puede ser pasado es mínimo debido al límite de Hayflick, los requerimientos nutricionales, condiciones de cultivo y la experiencia con la que se manipulan y se subcultivaron. En contraste, las líneas celulares que se han inmortalizado suelen someterse a la división celular ilimitada y tienen un infinito esperanza de vida. Los cultivos celulares primarios son comúnmente utilizados como herramientas in vitro en la investigación preclínica y biológica, así como los estudios de comunicación inter e intracelular.

El aislamiento y purificación de células de sangre periférica se puede conseguir fácilmente por centrifugación diferencial o mediante clasificación positiva utilizando bolas magnéticas. Por otro lado, el aislamiento de una población pura de células a partir de tejido primario es a menudo difícil de realizar, ya que dependerá de las necesidades de cada tipo celular.¹⁶



Imagen (12). Aislamiento de células primarias y pases de crecimiento.



Imagen (13). Incubación de pases de células primarias.

Las células primarias, son dependientes de anclaje, lo que significa que requieren una superficie con el fin de crecer adecuadamente in vitro. En la mayoría de los casos, las células primarias son cultivadas en un recipiente plano de plástico no-revestido lo que puede aumentar en gran medida el área de superficie. Se puede utilizar un medio de cultivo celular completo y compuesto por un medio basal suplementado con factores de crecimiento y citoquinas. Durante el establecimiento de cultivos primarios puede ser útil incluir un antibiótico en el medio de crecimiento para inhibir la contaminación. Estos pueden incluir una mezcla de gentamicina, penicilina, estreptomina y anfotericina. Sin embargo, no se aconseja el uso a largo plazo de antibióticos, ya que algunos reactivos, tales como anfotericina B, pueden ser tóxicos para las células con el tiempo.

La fase de mantenimiento comienza cuando las células se han unido a la superficie de la placa de cultivo. Por lo general ocurre alrededor de 24 horas después del inicio del cultivo.

Cuando las células han alcanzado el porcentaje deseado de confluencia celular y están proliferando activamente, es el momento de hacer un subcultivo. La confluencia celular se refiere al porcentaje del recipiente de cultivo habitado por células unidas. Por ejemplo: 100% de confluencia celular significa que el área de superficie está completamente cubierta por las células, mientras que el 50% de confluencia significa que más o menos la mitad de la superficie está cubierta. Es un parámetro importante para realizar un seguimiento y evaluar en cultivos celulares primarios porque los diferentes tipos de células requieren diferentes puntos finales de confluencia, momento en el que hay que subcultivar. ¹⁶

4. DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES EN TUMORES ODONTOGÉNICOS

Se ha postulado la generación de líneas celulares estables derivadas del odontoma como una alternativa para la investigación tanto de la odontogénesis como del desarrollo de tumores. Hatano y Cols. reportaron la obtención de una línea de células mesenquimales morfológicamente similares a fibroblastos derivados de un odontoma, las cuales presentaban una alta actividad de telomerasa, permitiéndoles una tasa de duplicación constante. A partir de subcultivos y selección de poblaciones celulares estables se determinó que estas células presentaban características osteogénicas y odontogénicas con capacidad de regenerar tejidos mineralizados así como inducir la formación de predentina.¹⁷⁻¹⁸ Estas células cuentan con propiedades para la formación de predentina, lo cual, puede ser consecuencia de la expresión de Wnt-1 y β -catenina, moléculas implicadas en el desarrollo de los dientes normales, formación de los dientes supernumerarios o regeneración de dientes permanentes en roedores.^{19,20} No obstante, una limitante de estos estudios fue la obtención particular de células mesenquimales, cuando el odontoma podría ofrecer células de linaje ectodérmico, es decir células con potencial ameloblástico, las células responsables de la formación de esmalte, tejido que aun representa un reto y anhelo en el área de la regeneración tisular. Si explotamos este potencial de celularidad y mineralización a través de la obtención de una línea celular estable caracterizando su genoma o proteoma podremos alcanzar la comprensión de las bases así como aplicarla en beneficio de la regeneración tisular.²¹⁻²⁶

Sox comprenden una familia de genes que están relacionados con el sexo de los mamíferos. Estos genes contienen de manera similar secuencias que codifican para el dominio HMG-box, que es responsable de la actividad de unión al ADN específica de secuencia. Genes Sox codifican reguladores transcripcionales implicados en la decisión del destino celular durante el desarrollo y el control de los diversos procesos de desarrollo.²⁷

Las citoqueratinas comprenden un grupo diverso de proteínas de filamentos intermedios que se expresan como pares en tanto tejido epitelial queratinizado y no queratinizado. Las citoqueratinas juegan un papel crítico en la diferenciación y el tejido especializado funciona para mantener la integridad estructural de las células epiteliales. Las citoqueratinas se han encontrado para ser marcadores útiles de la diferenciación del tejido epitelial que es directamente aplicable a la caracterización de tumores malignos.²⁸

Los filamentos intermedios del citoesqueleto constituyen un grupo diverso de proteínas que se expresan de una manera altamente específica de tejido. Los filamentos intermedios se construyen a partir de dos cadenas, α -helicoidal, las moléculas de doble arrollamiento dispuesto en un enrejado helicoidal imperfecta y han sido ampliamente utilizados como marcadores para distinguir tipos de células individuales dentro de un tejido y la identificación de los orígenes de los tumores metastásicos. Una de estas proteínas de filamentos intermedios, vimentina, es un marcador general de las células originarias del mesénquima.²⁹

Todas las células eucarióticas expresan actina, que a menudo constituye tanto como 50% de la proteína celular total. Los filamentos de actina pueden formar estructuras tanto estables y lábiles y son componentes cruciales de microvellosidades y el aparato contráctil de las células musculares. Mientras que los eucariotas inferiores, tales como levaduras, sólo tienen un gen de actina, eucariotas superiores tienen varias isoformas codificadas por una familia de genes. Al menos seis tipos de actina están presentes en tejidos de mamíferos y se dividen en tres clases. expresión α actina se limita a varios tipos de músculo, mientras que β y γ son los constituyentes principales de filamentos en otros tejidos.³⁰

Un marcador de reciente investigación es el NGFRp75, su fosforilación de tirosina de Trk por su ligando NGF es rápido, específico y se produce con cantidades picomolares del factor, lo que indica que la respuesta está mediada por cantidades fisiológicas de NGF, lo que sugiere participa en el mecanismo de transducción de señal primaria de NGF. Su presencia se ha asociado con células madre ectodérmicas.³¹

Estos marcadores han sido reportados para el análisis de ameloblastoma, tumor queratoquístico y tumor odontogénico epitelial calcificante; sin embargo su análisis en odontomas compuesto y complejo aún no existe reporte.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tumores odontogénicos son neoplasias que se desarrollan en la mandíbula o en el maxilar, originadas por tejido epitelial-mesénquimal. La gran mayoría son benignos y solo 5% presentan características malignas. Los odontomas son considerados como los más frecuentes. Se considera que los odontomas compuestos son los que tienen una mayor prevalencia frente al de los complejos. Sin embargo, el por que existe un desarrollo de estas dos entidades es controversial. ¿Cual es el motivo por el cual se puede estructurar dentículos y por qué en otras circunstancias se desarrolla de forma amorfa? La respuesta se haya dentro de la misma patología, es decir, si se logra analizar su componente celular se podría clarificar esta incógnita. Sin embargo, hasta la fecha el número de investigaciones sobre su composición y conducta celular son reducidas e incipientes. Lo cual nos sugiere que es un tema importante en la comprensión del desarrollo de este y otros tumores odontogénicos.

6. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La odontogénesis y sus alteraciones son temas complejos. Las investigaciones sobre el desarrollo de tumores odontogénicos han cubierto el aspecto histopatológico y en años recientes se han enfocado a la investigación sobre cambios celulares, moleculares y genéticos. Para el odontoma no existe excepción. La obtención de líneas celulares primarias de tumores odontogénicos tiene como finalidad el poder analizar su conducta a nivel celular, generar la materia prima suficiente para poder realizar los análisis moleculares y génicos subsecuentes necesarios. Por lo cual esta estrategia beneficia en gran medida al estudio de la patogenia del odontoma. La cuestión principal sería saber porque existen dos tipos de odontomas (compuesto y complejo) y que diferencia celular y/o molecular existe entre las células derivadas de estas entidades. El analizar la proliferación y expresión inmunohistoquímica de líneas celulares primarias de odontomas compuestos y complejo tendrá como propósito presentar que diferencias existen entre estos dos subtipos.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Obtención y caracterización del potencial proliferativo y perfil inmunocitoquímico de una línea celular estable de odontoma compuesto y complejo.

7.2 Objetivos específicos

Objetivo 1. Obtener una línea celular estable derivada del cultivo primario de odontoma compuesto y complejo.

Objetivo 2. Determinar el potencial de proliferación de células de líneas celulares estables derivadas de odontomas compuestos y complejos.

Objetivo 3. Determinar el perfil inmunocitoquímico de células de líneas celulares estables derivadas del cultivo primario de odontomas compuestos y complejos.

8. HIPÓTESIS

H₁. Se obtendrán células primarias estables derivadas de odontoma compuesto y complejo con potencial de proliferación y características inmunofenotípicas diferentes.

H₂. Se obtendrán células primarias estables derivadas de odontoma compuesto y complejo con potencial de proliferación y características inmunofenotípicas similares.

H₀. No se obtendrán células primarias del odontoma compuesto y complejo.

9. VARIABLES

9.1 Dependientes

- Tiempo de cultivo
- Densidad celular de cultivo

9.2 Independientes

- Inmunofenotipo
- Proliferación celular

10. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

Nombre de variable	Tipo de variable Cualitativa o cuantitativa.	Definición conceptual	Definición operativa ¿Cómo lo mido?
Tiempo de cultivo	Cuantitativa	Periodo en el cual, las células fueron sometidas en condiciones y concentraciones de cultivo apropiados en escala temporal.	0, 24, 48 y 72 Horas
Densidad celular de cultivo	Cualitativa	Concentración específica celular por área.	Medición a través de hematocitómetro (miles de células)
Proliferación celular	Cuantitativa	Aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular.	Análisis a través del ensayo MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas.
Inmunofenotipo	Cualitativa	Es la caracterización de las células según los marcadores	Se determinara a través de ensayo de inmunocitoquímica. Las

		antigénicos.	técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular.
--	--	--------------	--

11. RECURSOS

Este proyecto fué financiado mediante el programa PAPIIT IN223414.

11.1 EQUIPO E INFRAESTRUCTURA

Los ensayos y experimentos fueron realizados en el laboratorio de Patología Bucal Clínica y Experimental, contando con los siguientes equipos:

Agitador Orbital (Sea star Modelo: Sea star)

Auto Clave (All American, Modelo 25x, EU)

Baño María (Thermo scientific Modelo 2242 EU)

Báscula analítica (Adam Modelo: 17250 EU)

Campana de flujo laminar (Baker, Edge Gard, Maine, EU)

Centrífuga Universal (Sorvall, Modelo: 750044, CHINA)

Incubadora (Queue, Stabil Therm Modelo: QWJ300TABB, EU)

Lector de Placas (Chro-Mate Awareness Tecnology INC Modelo: 4300, EU)

Microscopio invertido (ZEISS Modelo: 37881, EU)

Refrigerador (Cool lab Modelo 3767 Hertz, EU)

11.2 HUMANOS

Asesor de cultivo celular

Asesor de inmunocitoquímica

12. MATERIALES Y METODOS

12.1 MATERIALES

Equipo de filtración al vacío (Corning 500ml Bottle Top Filter, EU)

Filtro (Corning Incorporate, 25 mm Syring Filter 431222 Alemania)

Hematocitómetro (Sigma – Aldrich, Bright-Line E.U)

Cajas Petri 100mm

Pipetas 10 ml, 5 ml, 1ml (Exacta Cruz TM Technology, INC.CHINA)

Micropipetas 1 μ l,- 10 μ l, 10 μ l-100 μ l, 100 μ l- 1000 μ l (Exacta Cruz, Tecnología)

Placas de cultivo celular (Corning incorporate, EU)

Puntas para micropipeta de 10 μ l-100 μ l, 100 μ l- 1000 μ l (Bio Centrix, EU)

Tubos 15 ml (UltraCruz, Santa Cruz biotechnology)

Tubos 50 ml (UltraCruz, Santa Cruz Tecnología)

Tubos de criopreservación

Tubos Ependorf

Probetas graduadas

Vasos de precipitado

Agua Desionizada

Solución de albúmina al 2%

Alcohol al 70%

Azul De Tripán

Anticuerpos Primarios: actina (SC-8432), SMA (SC-53015), CK 1/3 (SC-81714), vimentina (SC-32322), Sox2 (SC-365823) y NGFRp75 (SC-58567), son anticuerpos de SantaCruz Biotechnology, CA.

Medio de cultivo DMEM with 4.5g/L Glucose y L-Glutamine, without Sodium Pyruvate (sc -224478 Santa Cruz Biotechnology)

Mouse/Rabbit immunodetector HRP/ DAB (BSB 0003, BIO SB. EU)

MTT (Vibrant MTT Molecular Porbes, Invitrogen, EU)

Peróxido de hidrogeno al 3%

Suero Fetal bovino 500ml (Gibco Life technologies LOT: 1606662 EU)

Solución de PBS 1X, 10X

Tripsina 0.25%–EDTA 1X (Gibco Life technologies LOT: 1391607 EU)

Tritón al 20%

12.2 MÉTODOS

12.2.1 Espécimen/Muestra

Se tomó una muestra de tejido de pacientes con diagnóstico de odontoma compuesto y complejo (uno para cada subtipo), obtenidos de la Clínica de Patología y Medicina Bucal, así como de la clínica de cirugía maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la UNAM. Se realizó la resección quirúrgica, obteniendo dos fragmentos; uno para su análisis histopatológico el cual fue fijado en formol al 10% para ser procesado convencionalmente, realizando cortes de 4µm, tinción en H&E y análisis histopatológico.

El otro fragmento fue empleado para su cultivo primario. Posterior a su obtención quirúrgica, el fragmento fue lavado en solución salina fisiológica 0.9% NaCl. Seguido de este paso, la muestra fue inmersa en DMEM-F12 con SFB al 10% antibiótico/antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomycinina 100 µg/mL y anfotericina B 0.25 µg/mL). Posteriormente, este fragmento fue lavado con PBS-antibiotico/antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomycinina 100 µg/mL y anfotericina B 0.25 µg/mL) por 10 minutos. El espécimen fue diseccionado en fragmentos

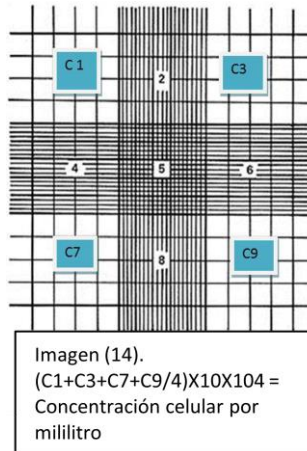
pequeños de 1x1 mm aproximadamente. Posteriormente los fragmentos fueron colocados en un tubo estéril para centrifuga de 15 ml, adicionando 3 ml de DMEM/Colagenasa IV al 0.25%, colocado a 37 °C durante 60 minutos aproximadamente, realizando agitación mecánica por inversión del tubo cada 15 minutos. Seguido de esto fue adicionado 9 ml de DMEM SFB 10% antibiótico/antimicótico para centrifugar a 1800 rpm por 3 minutos. El botón o pellet fue resuspendido en 3 ml de SFB 10% antibiótico/antimicótico para posteriormente ser colocado en una caja de cultivo de 25cm² a 37°C con 5% CO₂.

Se conservó en la caja y se incubó durante 7 días, retirando los fragmentos de tejido blando y duro (denticulos y masas) realizando el cambio de medio de cultivo fresco. Una vez obtenida la confluencia del 80%, se realizó el subcultivo. Se retiró el medio de cultivo presente para realizar el lavado con PBS/EDTA 0.04% a 37°C, se incubó con tripsina 0.25% durante 10 minutos, se colocó DMEM-SFB 10% antibiótico/antimicótico, se recuperó el contenido para centrifugar a 1800 rpm/3 minutos, el botón celular se subdividió en tres cajas. Las poblaciones celulares analizadas para los ensayos subsecuentes fueron las pertenecientes del tercer al decimo pase o subcultivo.

12.2.2 Determinación del crecimiento celular

Para determinar la proliferación celular se utilizó el ensayo de MTT (metiltiazoltetrazolio). Las células empleadas para este ensayo fueron células del odontoma compuesto, complejo y células de ligamento periodontal como muestra control (Proporcionadas por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez).

Las cajas de cultivo fueron tripsinizadas, llevando la solución a 1ml. Se realizó la cuantificación de proporción de células presentes a través de hemacitómetro (Cámara de Neubauer). Se tomaron 10µl del concentrado celular y 90 µl de Azul tripano. Se realizó el conteo de cuatro cuadrantes de la cámara, ajustando la proporción celular a un mililitro.



Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos a una concentración de 10, 000 células. Los tiempos de cultivo y medición únicos fueron a las 0, 24, 48 y 72 horas. Se utilizó el ensayo Vibrant MTT (Molecular Porbes, Invitrogen, EU) siguiendo las instrucciones del fabricante adicionando el reactivo a cada tiempo de medición. Brevemente, se adicionó 10 µl de la solución MTT, se incubó a 37°C por 4 horas, la reacción fue detenida adicionando 50µl de DMSO, incubando nuevamente por 10 minutos. La lectura de absorbancia fue realizada a una longitud de 545 nm en el lector de placas (ChroMate Awareness Tecnology Inc E.U). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

12.2.3 Inmunocitoquímica

Para el estudio de inmunocitoquímica se colocaron concentraciones celulares de 10 000 células por pozo, en cajas de 96 pozos, dejando 24 horas en incubación. Se retiró el medio de cada pozo, y se lavó con PBS 1X, posteriormente se colocó 100 ml de formaldehido a cada pozo, realizando 3 lavados de 3 minutos cada uno de PBS 1X, en seguida se retiró el PBS y se colocaron 100 µl de peróxido durante 30 minutos

Posteriormente se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno, se colocó 100 µl de albúmina durante 5 minutos, después se retiró la albúmina, se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno y se colocó 100 µl de tritón X-100 durante 5 minutos.

Se realizaron lavados de cada pozo y se incubó con anticuerpos primarios para actina (SC-8432), CK 1/3 (SC-81714), vimentina (SC-32322), Sox2 (SC-365823) y NGFRp75 (SC-58567) todos los anticuerpos fueron de la compañía Santa Cruz (Biotechnology, CA) y se dejaron en refrigeración durante toda la noche a 4 °C.

Después de la incubación se retiraron los anticuerpos primarios, realizando tres lavados de 3 minutos cada uno, después se agregó un anticuerpo secundario (Biolink) a cada pozo y se incubó durante 20 minutos, después se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 3 minutos cada uno.

Posteriormente se agregó HRP 100 μ l a cada pozo y se incubó durante 20 minutos, después se realizó 3 lavados con PBS 1X, se colocó Buffer Diaminobencidina (DAB) durante dos minutos, posteriormente se colocaron 100 μ l de Hematoxilina durante 1 minuto para después realizar 4 lavados de PBS 1X.

Finalmente se observaron las tinciones en el microscopio invertido y se tomaron fotos de cada pozo de 10x y 20 x, las cuales se llevaron a cabo con cámara Axiocam GmbH 105 color, y el programa ZEN 2012 Microscopy (Zeiss Germany). Las fotografías obtenidas en aumento de 10x en formato PGJ, fueron analizadas basándose en la intensidad de tinción por el software ImageJ (NIH, Bethesda MD, EE.UU.) Los ensayos fueron realizados por triplicado

12.2.4 Análisis de resultados

Tanto los resultados de proliferación como de inmucitoquímica fueron agrupados en una hoja de cálculo de Excel. La intensidad de inmunoexpresión se determinó a partir de un total de 100 puntos marcados en cada fotografía. Posteriormente se obtuvo la media del total de puntos marcados en la cuantificación, utilizando el programa de Excel. Posteriormente se realizó el análisis estadístico t de Student con un intervalo de confianza del 99%. Los resultados fueron considerados significativos cuando reportaron una $P \leq 0.01$.

12.2.5 Consideraciones bioéticas

Este estudio no representa riesgo alguno para pacientes, ya que se trabajó con especímenes quirúrgicos extraídos de pacientes. Empleando el consentimiento informado de la clínica de Medicina Bucal y Cirugía Maxilofacial.

13. RESULTADOS

13.1. Datos clínicos y obtención de la muestra

La muestra de odontoma compuesto fue obtenida de un paciente masculino de 43 años de edad. La zona anatómica de origen fue la parasinfis derecha. El estudio macroscópico indicó fragmentos de tejido duro que en conjunto midió 0.7 x 0.5 x 0.4 cm de forma y superficie irregular color amarillo, consistencia pétreo. En los cortes histológicos examinados se observan dos fragmentos de tejido duro uno compuesto por dentina dispuesto en túbulos en el cual se identifica tejido pulpar, matriz de esmalte, el otro fragmento compuesto por tejido óseo lamelar maduro vital, la cual se describe como "odontoma compuesto".

La muestra de odontoma complejo fue obtenida de una paciente femenina de 49 años. La zona anatómica de origen fue la región maxilar anterior. El análisis macroscópico indicó un espécimen multifragmentado de tejido duro que en conjunto midió 1.1 x 1.0 x 0.3 cm, el cual consto de cuatro cuerpos de color amarillo y consistencia pétreo. En los cortes histológicos examinados se observó dentina tubular cementoide, matriz de esmalte y tejido compatible con cemento.

Previo a la fijación se obtuvo un fragmento de cada muestra de tejido blando circundante, colocando en medio de cultivo DMEM/F12, con SFB 10% y antibiótico y antimicótico en caja de cultivo de 75cm². Durante una semana se conservó a 37 °C con 5% de CO₂ retirando los fragmentos sólidos de tejido remanente. A las tres semanas se observó confluencia realizando los subcultivos subsecuentes.

13.2 Ensayo de proliferación MTT

Los resultados de proliferación a través del ensayo MTT realizado con ligamento periodontal (LPD), odontoma complejo (OdCx) y odontoma compuesto (OdCm), en los tiempos de 0, 24, 48 y 72 hrs después. A las 0 hrs. se observó que las células LPD presentaron una menor viabilidad comparado a las células de OdCm y OdCx. A las 24hrs las células de OdCm presentaron mayor viabilidad o proliferación, seguidas por células LPD y OdCx, este patrón se observó a las 48 y 72 hrs, sin embargo, las células de OdCm mostraron descenso y aumento a las 48 y 72 hrs respectivamente, las células LPD y OdCx mantuvieron una relativa constancia a las 48 y 72 hrs (Imagen 15).

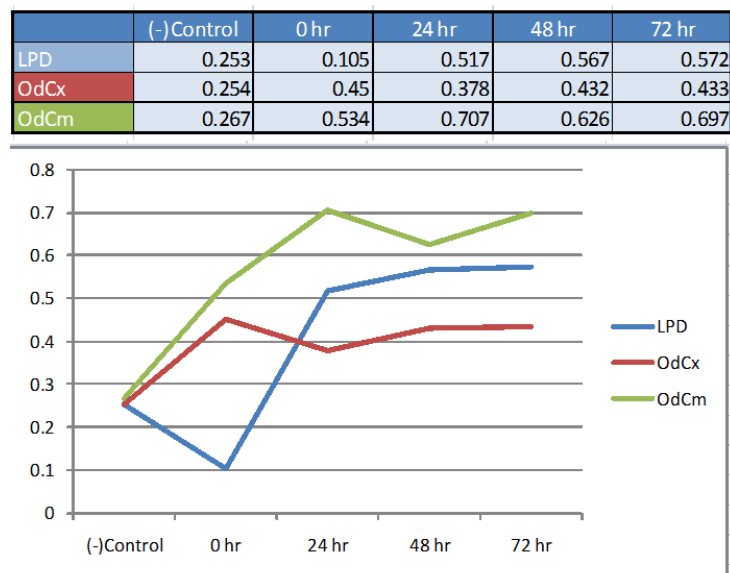


Imagen (15). Gráfica de inmunoexpresión de odontoma compuesto, odontoma complejo y ligamento periodontal.

Tabla 2. Análisis estadístico de proliferación. Comparativo de Odcm contra Odcx	
0 horas	.008*
24 horas	.020
48 horas	.001*
72 horas	.011
Estadísticamente significativo $P \leq 0.01$ *	

13.3 Inmunocitoquímica

Al realizar la inmunocitoquímica se obtuvieron los siguientes resultados. La inmunoexpresión que se presentó fue: Con actina el odontoma compuesto con mayor expresión con 60.29, con citoqueratina fue mayor en el odontoma compuesto con 60.29, con NGFR P75 el odontoma complejo con 22.3, con sox2 el ligamento periodontal y el odontoma complejo, obtuvieron un rango muy parecido gráficamente con 55.88 y 39.98 respectivamente y con vimentina el odontoma compuesto con 91.03.(imagen 16). en la imagen 17, 18 y 19 se puede observar la expresión.

	Actina	CK1-3	NGFR P75	SOX2	VIMENTINA
OdCm	60.29	60.29	6.49	34.89	91.03
OdCx	40.97	43.53	22.3	39.98	47.02
LPD	50.23	20.24	8.32	55.88	47.42

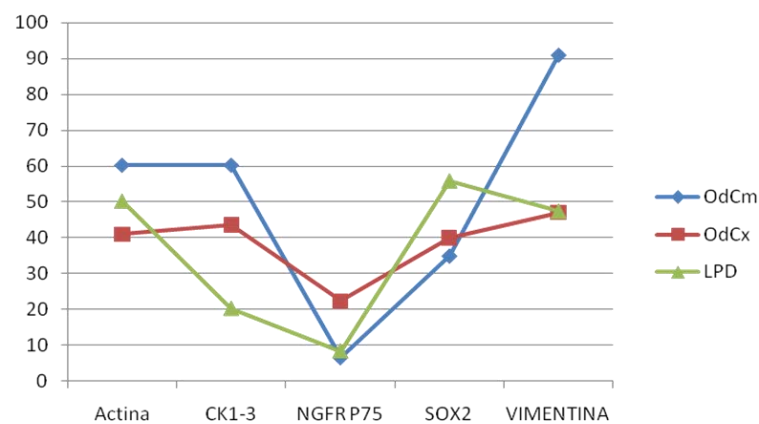


Imagen (16). Gráfica de inmunoexpresión de odontoma complejo, odontoma compuesto y ligamento periodontal. En donde se muestra que el odontoma compuesto tuvo una mayor proliferación en las primera 24 hrs.

Tabla 3. Análisis estadístico de inmunoexpresión. Comparativo de OdcM contra OdCx	
Actina	.221
NGFR-p75	.007*
Sox2	.027
Vimentina	.028
CkAE1/AE3	.007*
Estadísticamente significativo P ≤ 0.01 *	

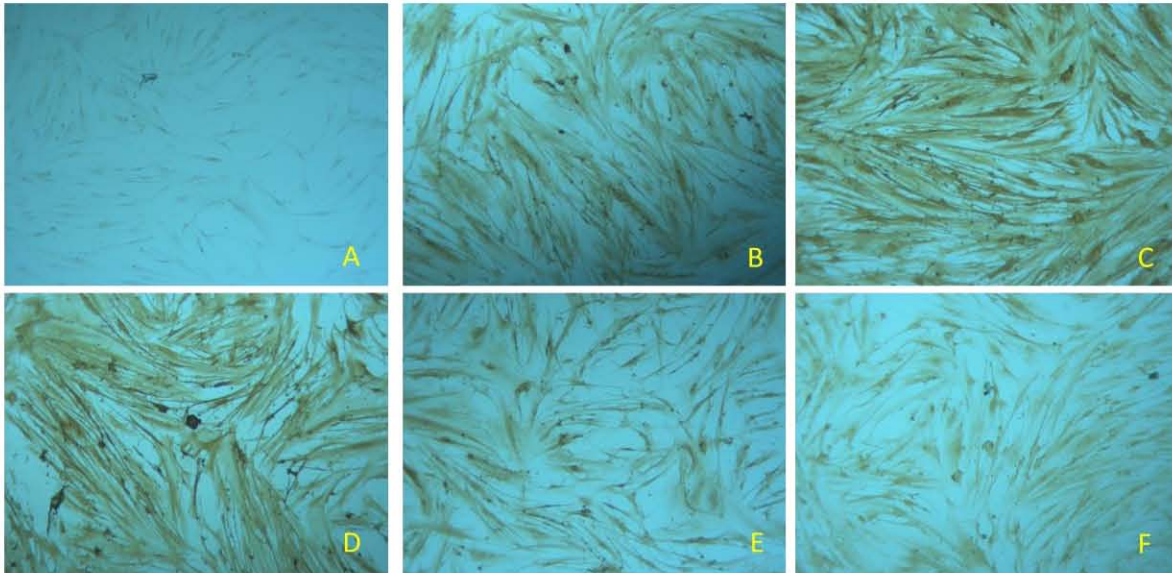


Imagen (17). Inmunoexpresión de células de odontoma complejo en citoplasma.
 A. control, B. citoqueratina, C. actina, D. vimentina, E. Sox2 y F. NGFR-p75. aumento objetivo de 10x.
 Fuente idrecta.

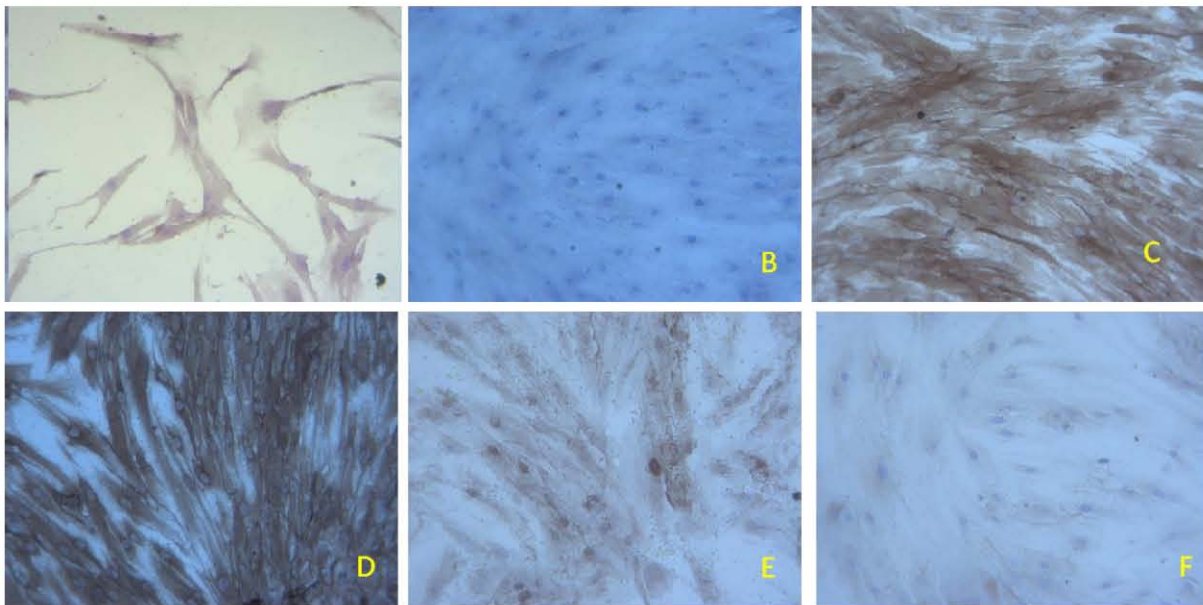


Imagen (18). Inmunoexpresión de proliferación de células de odontoma compuesto en citoplasma.
 A. control, B. citoqueratina, C. actina, D. vimentina, E. Sox2 y F. NGFR-p75. aumento objetivo de 10x.

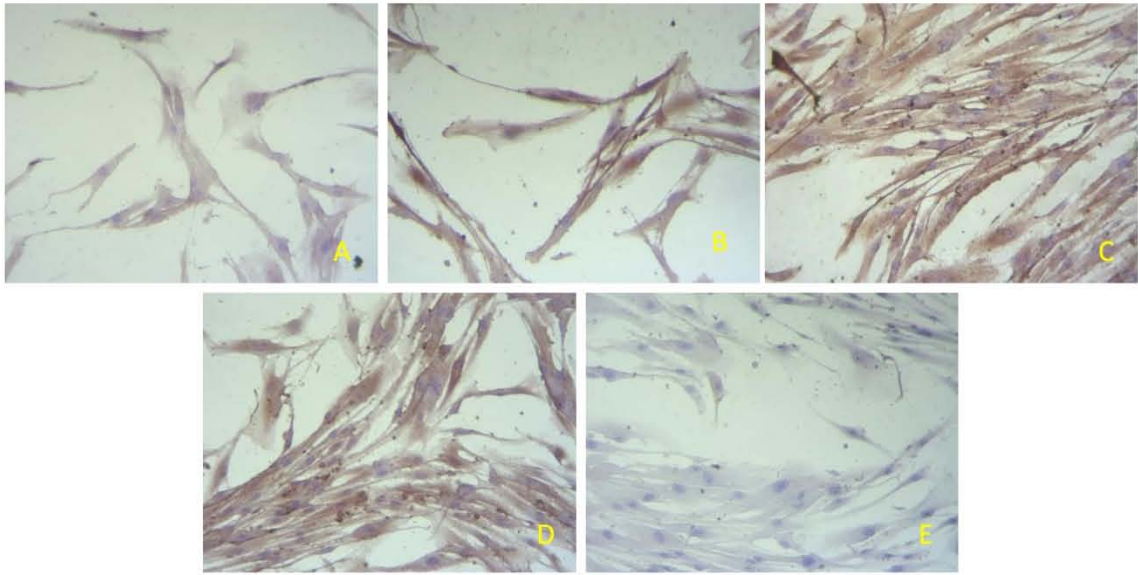


Imagen (19). Inmunoexpresión de proliferación de células de ligamento periodontal en citoplasma.
A. citoqueratina, B. actina, C. vimentina, D. sox2, E. NGFR-p75.
Fuente directa.

14. DISCUSIÓN

Los odontomas son un tipo de tumor odontogénico con características de hamartoma, tanto el subtipo compuesto como el complejo pueden ser asintomáticos y presentarse desde la segunda década de la vida afectando el crecimiento y desarrollo normal del paciente provocando retenciones dentales de dientes permanentes. En nuestros casos se observó edades de 43 y 49 años para el subtipo compuesto y el complejo respectivamente, afectó las regiones anteriores tanto de maxila como de mandíbula. Histológicamente se presentaron datos que concuerdan con los reportados en la literatura, donde se observó presencia de tejidos dentinales, cementoide, matriz de esmalte, tejido pulpar, dentículos, masas amorfas y hasta masas sólidas de consistencia pétreas. Hatano y colaboradores reportaron que los odontomas pueden ser diagnosticados aproximadamente a la edad de 16 años (2da década de la vida) y la mayoría de los casos son descubiertos antes de los 30 años, sin embargo, no se excluye que puedan diagnosticarse entre los 7-72 años de edad, lo cual concuerda con nuestros datos.²⁷ Las implicaciones para cada paciente son distintas, ya que entre más joven, el crecimiento se ve más involucrado, no así en los pacientes adultos, donde su crecimiento óseo llegó a término y quizá la mayor complicación sería la afección de otros dientes a través de resorciones radiculares y retenciones dentales. En nuestros pacientes no se reportó ninguna sintomatología, por lo cual el motivo para eliminarlos deriva de una indicación quirúrgica para determinar la naturaleza verdadera de la lesión.

Las investigaciones relacionadas con los odontomas van desde su estudio clínico, histológico, celular y molecular. Los cultivos primarios son un enfoque relativamente nuevo, ya que se conoce que pueden representar las características del espécimen como si se encontrara dentro del cuerpo mismo.¹⁶ El comprender por qué existen dos subtipos puede ser abordado desde analizar su capacidad de proliferación hasta analizar las diferencias en subtipos celulares.

Las líneas celulares obtenidas de odontoma compuesto, odontoma complejo y células de ligamento periodontal como control fueron analizadas a través del ensayo MTT para determinar la viabilidad y potencial de proliferación. Nuestros resultados sugirieron que el odontoma compuesto y complejo mostraron una mayor viabilidad a las 0 hrs comparado a las células del ligamento periodontal, modificando su conducta a las 24 hrs. El odontoma compuesto conservó una mayor proliferación de manera estable desde las 0 hrs a las 72 hrs comparada a las otras líneas. Aunque que las células derivadas de odontoma complejo presentaron una menor viabilidad comparado a las otras líneas, en ellas se observó una conducta estable desde las 24 horas. Estadísticamente

sólo observamos diferencias significativas a las 0 hrs y a las 48 hrs.

Hatano y Cols. reportaron que sus tres líneas de células derivadas de odontoma compuesto (las originales y dos hTER positivas) pueden ser viables hasta por 300 días, en este sentido su análisis de crecimiento celular indicó conductas muy similares dentro de un seguimiento de 4 días.¹⁷ Esto coinciden con nuestros resultados, donde al analizar la viabilidad hasta por 72 horas (3 días) notamos que el odontoma compuesto tenía estas características, no obstante, nuestro estudio sería la primera vez que se reporta un enfoque similar para odontomas complejos.

Nuestros resultados de inmunocitoquímica para las líneas celulares de odontoma compuesto, complejo y ligamento periodontal sobre la expresión de diferentes marcadores (Actina, Citoqueratina, Sox2, NGFRP75 y Vimentina), cada línea celular tuvo diferentes comportamientos en la expresión a cada marcador. La expresión de actina, CK1-3 y vimentina fue mayor en OdCm, la expresión de NGFR-p75 fue mayor en OdCx. Aunque Sox2 fue mayor en células de ligamento periodontal, en relación a las líneas de odontoma fue levemente mayor en OdCx. Amm y colaboradores aplicó diferentes marcadores para comprobar la inmunoexpresión en las células del (TOEC), citoqueratina 14, citoqueratina 16 y citoqueratina 17. Sus resultados sugirieron que las células del (TOEC) mostraron un comportamiento similar al tumor odontogénico queratoquístico al cual se le aplicó la misma técnica.³² Comparando su enfoque contra nuestros resultados observamos que el análisis de citoqueratinas es fundamental para determinar si la estirpe celular tiene características epiteliales. En nuestro estudio fueron las células de OdCm las que presentaron mayor expresión de este marcador, sugiriendo que existen células con esta estirpe. Nuestro análisis estadístico entre los dos tipos de odontoma presentó diferencias significativas en NGFR-p75 y CkAE1/AE3. No obstante al conjuntar la expresión de todos los marcadores para cada línea celular nuestros resultados sugieren que las células de OdCm tienen un perfil ectomesenquimal, mientras que las células de OdCx representan un perfil mayor de células madre ectodérmicas.

15. CONCLUSIÓN

En base a nuestros resultados podemos concluir que las líneas celulares primarias de odontoma compuesto y complejo son viables, observando mayor viabilidad en las células derivadas del compuesto, con diferencia significativa a las 0 y 48 hrs. Mientras que el perfil inmuocitoquímico sugiere que las células de odontoma compuesto tienen un linaje ectomesenquimal, y las células de odontoma complejo mayoritariamente ectodérmico con mayor proporción de células madre o progenitoras, con diferencia significativa en la expresión de NGFR-p75 y CkAE1/AE3.

Es muy importante darle seguimiento a la investigación básica del odontoma compuesto y complejo, ya que a partir de su análisis podríamos entender la patogénica, es decir como se producen los tumores odontogénicos y aplicar un tratamiento adecuado.

16. ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA BIOPSIA OSEA O DE PARTES BLANDAS

Usted tiene derecho a conocer el procedimiento al que va a ser sometido y las complicaciones más frecuentes que ocurren. Este documento intenta explicarle todas estas cuestiones; léalo atentamente y consulte con su médico todas las dudas que se le planteen.

Le recordamos que, por imperativo legal, tendrá que firmar, usted o su representante legal, familiar o persona vinculada de hecho, el Consentimiento informado para que podamos realizarle dicho procedimiento/tratamiento.

PACIENTE:

Yo de años de edad, con Historia clínica n° con domicilio en.....

REPRESENTANTE LEGAL, FAMILIAR O PERSONA VINCULADA DE HECHO

Yo:..... de..... años de edad, con domicilio en en calidad de del paciente (Representante legal, familiar o persona vinculada)

DECLARO:

Que el Dr/la Dra

Me han explicado que es conveniente proceder, en mi situación, a realizar el procedimiento/tratamiento quirúrgico de biopsia ósea o de partes blandas y he leído esta información que me ha entregado

PREOPERATORIO:

1. Antes de la cirugía será necesario realizarle algunas pruebas diagnósticas, como analítica, radiografías o electrocardiograma. También le indicaremos desde que hora debe permanecer en ayunas.
2. El propósito principal de la intervención consiste en el estudio anatomopatológico, inmunohistoquímico, bacteriológico y/o citogenético de la lesión.
3. La intervención puede precisar anestesia
4. La intervención consiste en la obtención de una muestra, parcial o global, de la lesión, bien mediante punción, o practicando una incisión.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Sr. Bogdán Ramón Navarro Bustos
P R E S E N T E

En atención a su solicitud de someter al Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología su proyecto de tesis, "Análisis proliferativo e inmunocitoquímico de células primarias de odontoma compuesto y complejo." Me permito informar a Ud. que dicho proyecto no requiere de autorización del mencionado comité, en consideración a que se utiliza material proveniente de especímenes quirúrgicos que son extraídos de pacientes que presentan este hamartoma y que deben ser extirpado. Cabe señalar que existe siempre un consentimiento informado firmado por el paciente en los servicios de Medicina Bucal y Cirugía Maxilofacial.

Ciudad Universitaria a 23 de Julio de 2015

ATENTAMENTE

Una firma manuscrita en tinta negra que parece ser "J. Portilla Robertson".

Dr. Javier Portilla Robertson
Coordinador del Comité de Investigación y Ética de la Facultad
de Odontología

17. BIBLIOGRAFIA

1. Soukup V, Epperlein HH, Horáček I, Cerny R. Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature*. 2008;455(7214):795-8.
2. Fraser GJ, Hulseley CD, Bloomquist RF, Uyesugi K, Manley NR, Streelman. An ancient gene network is co-opted for teeth on old and new jaws. *PLoS Biol*. 2009;7(2):e31.
3. Sakano M, Otsu K, Fujiwara N, Fukumoto S, Yamada A, Harada H. Cell dynamics in cervical loop epithelium during transition from crown to root: implications for Hertwig's epithelial root sheath formation. *J Periodontal Res*. 2013;48(2):262-7.
4. Jernvall J, Thesleff I. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development*. 2012;139(19):3487-97.
5. Zheng L, Ehardt L, Mc Alpm B, About I, Kim D, Papagerakis S, (Papagerakis P.). et al. The tick tack of Odontogenesis. *Experimental cell research*. 2014;325:83-89.
6. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds): *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*, IARC Press: Lyon 2005.
7. Richard C.K. Jordan, Paul M. Speight, *Diagnostic Histopathology*, Volume 15, Issue 6, June 2009, Pages 303–310).
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.
9. Shaked I, Peretz B, Ashkenazi M. Development of odontoma-like malformation in the permanent dentition caused by intrusion of primary incisor--a case report. *Dent Traumatol*. 2008;24(3):e395-7
10. Ida-Yonemochi H, Noda T, Shimokawa H, Saku T. Disturbed tooth eruption in osteopetrotic (op/op) mice: histopathogenesis of tooth malformation and odontomas. *J Oral Pathol Med*. 2002;31(6):361-73.

11. Gaitán-Cepeda LA, Quezada-Rivera D, Tenorio-Rocha F, Leyva-Huerta ER. Reclassification of odontogenic keratocyst as tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. *Oral Dis.* 2010;16(2):185-7.
12. Diana Araceli Dávila Hernández*.Enucleación de un odontoma compuesto mandibular. Comunicación de un caso clínico. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas Volumen 15, Núm. 2, abril-junio, 2010.*
13. García A. Odontogenic tumors in México: A collaborative retrospective study 349 casos. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;84(6):672-5.
14. De Oliveira BH, Campos V, Marcol S. Compound Odontoma- diagnosis and treatment: Three cases report. *Pediatr Dent* 2001;23(2):151-7.
15. Vázquez D, Gandini P, Gandini P. et al. Odontoma compuesto: Diagnóstico radiográfico y tratamiento quirúrgico de un caso clínico. *Av. Odontoestomatol* 2008; 24 (5): 307-312.
16. Guía para el cultivo celular primario. Ed. ATCC. Pag: 1-3. 2012.
17. Hatano H, Kudo Y, Ogawa I, Shimasue H, Shigeishi H, Ohta K, Higashikawa K, Takechi M, Takata T, Kamata N. Establishment of mesenchymal cell line derived from human developing odontoma. *Oral Dis.* 2012;18(8):756-62.
18. Song JS, Stefanik D, Damek-Poprawa M, Alawi F, Akintoye SO. Differentiation and regenerative capacities of human odontoma-derived mesenchymal cells. *Differentiation.* 2009;77(1):29-37.
19. Scheller EL, Chang J, Wang CY. Wnt/beta-catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation. *J Dent Res.* 2008;87(2):126-30.
20. Järvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J, Thesleff I. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(49):18627-32.
21. Chibon F. Cancer gene expression signatures - the rise and fall? *Eur J Cancer.* 2013;49(8):20009
22. Carinci F, Volinia S, Rubini C, Fioroni M, Francioso F, Arcelli D, Pezzetti F, Piattelli A. Genetic profile of clear cell odontogenic carcinoma. *J Craniofac Surg.* 2003;14(3):356-62.

23. Carinci F, Francioso F, Rubini C, Fioroni M, Tosi L, Pezzetti F, Venturoli L, Volinia S, Piattelli A. Genetic portrait of malignant granular cell odontogenic tumour. *Oral Oncol.* 2003;39(1):69-77.
24. Carinci F, Palmieri A, Delaiti G, Rubini C, Fioroni M, Martinelli M, Pezzetti F, Scapoli L, Piattelli A. Expression profiling of ameloblastic carcinoma. *J Craniofac Surg.* 2004;15(2):264-9.
25. DeVilliers P, Suggs C, Simmons D, Murrah V, Wright JT. Microgenomics of ameloblastoma. *J Dent Res.* 2011;90(4):463-9.
26. Carinci F, Francioso F, Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Evangelisti R, Arcelli D, Tosi L, Pezzetti F, Carinci P, Volinia S. Genetic expression profiling of six odontogenic tumors. *J Dent Res.* 2003;82(7):551-7.
27. Sox-2 (E-4): SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. <http://www.scbt.com/es/datasheet-365823-sox-2-e-4-antibody.html>.
28. pan- Cytokeratin (AE1/AE3): SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. <http://www.scbt.com/es/datasheet-81714-pan-cytokeratin-ae1-ae3-antibody.html>
29. Vimentin (RV202): SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. <http://www.scbt.com/es/datasheet-32322-vimentin-rv202-antibody.html>
30. Actin (C-2): SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. <http://www.scbt.com/es/datasheet-8432-actin-c-2-antibody.html>
31. NGFR p75 (NGFR5): SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. <http://www.scbt.com/es/datasheet-58567-ngfr-p75-ngfr5-antibody.html>.
32. Amm HM, Rollins DL, Ren C, Dong J, DeVilliers P, Rivera H, et. al. Establishment and characterization of a primary calcifying epithelial odontogenic tumor cell population. *J Oral Pathol Med* (2014) 43: 183–190.