



**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE FGF2, FGFR1,
Ki67 Y CD105 EN AMELOBLASTOMAS CONVENCIONALES Y CARCINOMAS
AMELOBLÁSTICOS**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN PATOLOGÍA Y MEDICINA BUCAL

P R E S E N T A

STEPHANIE SÁNCHEZ MEJORADA

Comité tutorial:

Co-Director: M. en C. Adalberto Abel Mosqueda Taylor

Co-Director: Dr. Ciro Dantas Soares

Asesora: Dra. María Esther Irigoyen Camacho

Asesor: Dr. Juan Carlos Cuauhtémoc Hernández Guerrero

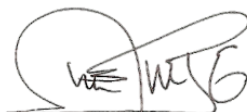
Ciudad de México, febrero 2024

La Maestría en Patología y Medicina Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad de CONAHCYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el registro 5020

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Xochimilco aprobó la ICR que presentó:

STEPHANIE SÁNCHEZ MEJORADA

Comité Tutorial:



Co-Director: M. en C. Adalberto Abel Mosqueda Taylor

Co-Director: Dr. Ciro Dantas Soares

Asesora: Dra. María Esther Irigoyen Camacho

Asesor: Dr. Juan Carlos Cuauhtémoc Hernández Guerrero

Jurado:

Dra. Irma Gabriela Anaya Saavedra (Presidenta)

Dra. Velia Aydée Ramírez Amador (Secretaria)

Mtra. Marcela Vázquez Garduño (Vocal)

Dra. Ana María Cano Valdez (Vocal)

ÍNDICE	Pág.
Abreviaturas	V
Índice de Cuadros	VI
Índice de Figuras	VII
Resumen	VIII
1. Marco teórico	1
1.1. Odontogénesis	1
1.2. Tumores odontogénicos	1
1.2.1. Ameloblastoma	2
1.2.2. Carcinomas odontogénicos	6
1.2.2.1. Carcinoma ameloblástico	6
1.3. Marcadores inmunohistoquímicos seleccionados para esta investigación	9
1.3.1. Familia de los factores de crecimiento fibroblástico y sus receptores	9
1.3.1.1. FGF2 y FGFR1	11
1.3.2. Marcador de proliferación celular Ki67	15
1.3.3. Marcador de angiogénesis CD105	19
2. Planteamiento del problema	21
3. Justificación	22
4. Objetivos	23
5. Método	24
6. Resultados	30
7. Discusión	37
8. Conclusiones	43
9. Perspectivas	44
10. Referencias	45
Anexos	51
Anexo 1 (Instrumento de recolección de datos)	51
Figuras	52

Abreviaturas

AC	Ameloblastoma convencional
BRAF V600E	Mutación en la que se reemplaza valina por ácido glutámico en el residuo 600 del gen BRAF
CA	Carcinoma ameloblástico
CD105	Cúmulo de diferenciación 105 / Endoglina
CD34	Cúmulo de diferenciación 34
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF2	Factor de crecimiento fibroblástico 2
FGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico
FGFRs	Receptores de factores de crecimiento fibroblástico
FGFs	Factores de crecimiento fibroblástico
H&E	Hematoxilina y eosina
IHQ	Inmunohistoquímica
MAPK	Vía de proteína quinasa activada por mitógeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TO	Tumores odontogénicos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Índice de cuadros	Pág.
Cuadro 1. Clasificación Histológica de Tumores Odontogénicos de la OMS (2017)	3
Cuadro 2. Características histopatológicas de AC y CA de acuerdo con la Clasificación Histológica de Tumores de Cabeza y Cuello de la OMS (2017)	8
Cuadro 3. Panel de marcadores inmunohistoquímicos	26
Cuadro 4. Clasificación, escala de medición y operacionalización en las variables dependientes e independientes.....	28
Cuadro 5. Características clínicas de los 42 individuos con diagnóstico de ameloblastoma convencional y carcinoma ameloblástico incluidos	32
Cuadro 6. Relación entre localización y sexo en AC y CA	33
Cuadro 7. Puntajes y porcentaje de expresión de FGF2, FGFR1, Ki67 y CD105 en AC y CA	34
Cuadro 8. Asociación de FGF2 y FGFR1 con Ki67 en AC y CA	35
Cuadro 9. Asociación de FGF2 y FGFR1 con CD105 en AC y CA	36

Índice de figuras	Pág.
Figura 1. Análisis inmunohistoquímico utilizando el software de visualización Aperio ImageScope	52
Figura 2. Expresión de FGF2 en casos de AC y CA	53
Figura 3. Expresión de FGFR1 en casos de AC y CA	54
Figura 4. Expresión de CD105 en casos de AC y CA	55
Figura 5. Expresión de Ki67 en casos de AC y CA	56

Resumen

Introducción: Las similitudes clínicas e histopatológicas del ameloblastoma convencional (AC) y el carcinoma ameloblástico (CA), tales como comportamiento agresivo, crecimiento invasivo, patrones histomorfológicos compartidos de AC, son algunos datos que pueden dificultar el diagnóstico diferencial entre estas neoplasias.

Objetivo: Comparar la expresión inmunohistoquímica FGF2, FGFR1, Ki67 y CD105 entre AC y CA, con el fin de evaluar su posible uso como auxiliares para su diagnóstico.

Material y método: Estudio observacional y retrolectivo que incluyó 35 AC y 7 CA de instituciones de México, Guatemala y Brasil, en los cuales se comparó la inmunoexpresión de los marcadores y su asociación con características clínico-patológicas. Se emplearon pruebas de X^2 y de rangos de Wilcoxon para comparar los resultados de la inmunohistoquímica entre los tipos de lesiones.

Resultados: No se observó predilección por sexo, la localización más frecuente fue la mandíbula y las medianas de edad fueron 48 años para AC y 28 para CA. Los CA presentaron mayor expresión de FGFR1 ($p=0.0002$), Ki67 ($p<0.0001$) y CD105 ($p=0.007$) con respecto a AC y en AC se observó asociación entre el incremento de FGF2 y FGFR1 y el incremento de Ki67 y CD105.

Discusión: La comparación de la inmunoexpresión de FGFR1, Ki67 y CD105 mostró mayor expresión en CA que en AC, lo cual confirma la diferencia en cuanto a proliferación celular, angiogénesis y actividad tumoral que pueden presentar estas lesiones. Además, la asociación de mayor expresión de estos marcadores con comportamiento agresivo, mayor riesgo de recurrencia y metástasis y disminución de la supervivencia brindarían un panorama de la actividad tumoral.

Conclusiones: Las diferencias en la inmunoexpresión de FGFR1, CD105 y Ki67 entre AC y CA constituyen un apoyo para establecer el diagnóstico diferencial y las asociaciones positivas entre FGF2 y FGFR1 con Ki67 y CD105 podrían servir como predictores de mayor actividad tumoral.

Palabras clave: ameloblastoma; carcinoma ameloblástico; inmunohistoquímica; tumores odontogénicos.

1. Marco Teórico

1.1. Odontogénesis

La odontogénesis es un proceso de interacciones celulares secuenciales, coordinadas y recíprocas entre el epitelio proveniente del ectodermo y el ectomesénquima de las células de la cresta neural. Es un proceso en el cual intervienen múltiples moléculas de señalización, incluidas proteínas morfogenéticas óseas, factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), así como proteínas Sonic Hedgehog (Shh) y Wnt, las cuales participan en la activación de distintas vías de señalización que funcionan de manera sinérgica y/o antagónica en la inducción de la histogénesis y la morfogénesis, y que dan como resultado la formación de los dientes (Cobourne, 1999; Zhang y cols., 2005; Gonçalves y cols., 2017; Du y cols., 2018).

El potencial odontogénico se presenta de manera inicial en el epitelio que reviste el estomodeo, el cual expresa FGFs para estimular la migración de las células de la cresta neural del primer arco branquial y promover su disposición en forma de arcada en el sitio donde se desarrollarán los futuros gérmenes dentales, los cuales presentaran las características específicas de cada diente gracias a la expresión de una combinación única de genes homeobox y la transcripción de proteínas río abajo (Cobourne, 1999; Zhang y cols., 2005; Gonçalves y cols., 2017).

1.2. Tumores odontogénicos

Los tumores odontogénicos (TO) derivan de los tejidos epiteliales, ectomesenquimatosos y mesenquimatosos implicados en la odontogénesis, clasificados así por parte de la Organización Mundial de la Salud en la 4ª edición de la Clasificación Histológica de Tumores de Cabeza y Cuello como podemos observar en el Cuadro 1.

Los TO son un grupo heterogéneo de lesiones no neoplásicas y neoplásicas, las cuales constituyen menos del 1% de todos los tumores de región bucal y maxilofacial, y aunque la mayoría son benignos, algunos pueden mostrar un comportamiento agresivo y una tasa de recurrencia alta (Bologna y cols., 2015; Lee y cols., 2015; El-Naggar y cols., 2017). Esta situación es particularmente cierta en los casos de ameloblastoma, e incluso en ocasiones suele ser difícil diferenciar esta neoplasia de su contraparte maligna, el carcinoma ameloblástico (Bologna y cols., 2008; Carreón y cols., 2015; Sánchez y cols., 2017; Martínez y cols., 2017; Fonseca y cols., 2018).

1.2.1. Ameloblastoma

El ameloblastoma (Am) es la neoplasia odontogénica epitelial benigna más común, es localmente agresiva, con patrón de crecimiento invasivo y recurrencia estimada de 60-80% en los primeros 5 años posteriores al tratamiento, la cual está asociada principalmente a escisión quirúrgica incompleta (Reichart y cols., 1995; El-Naggar y cols., 2017; Hendra y cols., 2020). Esta neoplasia se origina de la lámina dental y su patogénesis se ha asociado a mutaciones, principalmente en los genes que participan en la vía de señalización MAPK (90% de los casos), siendo BRAF V600E el más común (60-80%), seguido de KRAS, NRAS, HRAS, y FGFR2 (Sweeney y cols., 2014; Brown y cols., 2014; Fregnani y cols., 2017; Gonçalves y cols., 2017; El-Naggar y cols., 2017; Duarte y cols., 2019). La mutación en BRAF-V600E se ha asociado al desarrollo de Am a edades más tempranas, y con predominio en la mandíbula (Fregnani y cols., 2017; Sweeney y cols., 2014).

Cuadro 1. Clasificación Histológica de Tumores Odontogénicos de la OMS (2017)

Carcinomas odontogénicos

Carcinoma ameloblástico

Carcinoma intraóseo primario

Carcinoma odontogénico esclerosante

Carcinoma odontogénico de células claras

Carcinoma odontogénico de células fantasma

Carcinosarcoma odontogénico

Sarcomas odontogénicos

Tumores odontogénicos epiteliales benignos

Ameloblastoma

Ameloblastoma uniuístico

Ameloblastoma extraóseo/periférico

Ameloblastoma metastatizante

Tumor odontogénico escamoso

Tumor odontogénico epitelial calcificante

Tumor odontogénico adenomatoide

Tumores odontogénicos mixtos epiteliales y mesenquimales benignos

Fibroma ameloblástico

Tumor odontogénico primordial

Odontoma

Odontoma compuesto

Odontoma complejo

Tumor dentinogénico de células fantasma

Tumores odontogénicos mesenquimales benignos

Fibroma odontogénico

Mixoma/Mixofibroma odontogénico

Cementoblastoma

Fibroma cemento-osificante

Durante la odontogénesis los principales reguladores de la vía MAPK son los FGFs y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), donde específicamente el receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR1) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) son necesarios para la diferenciación de los ameloblastos (Cobourne, 1999; Du y cols., 2018). En Am se ha observado sobreexpresión de FGF2, FGFR1, FGFR2 y EGF, además de que FGF7 y FGF10 participan en la proliferación celular en esta neoplasia a través de la vía MAPK (Gonçalves y cols., 2017; Fonseca y cols., 2018). Adicionalmente a las mutaciones en la vía MAPK, también se han descrito mutaciones en la vía Hedgehog, PI3K (PIK3CA) y WNT (CTNNB1) (Brown y cols., 2014; Sweeney y cols., 2014). En la vía Hedgehog se han observado mutaciones somáticas en SMO, asociadas principalmente a Am localizados en el maxilar, con patrón histológico plexiforme y recurrencias tempranas (Sweeney y cols., 2014; Fregnani y cols., 2017).

El Am presenta los subtipos sólido/multiquístico, unikuístico, extraóseo/periférico y metastatizante, de los cuales el sólido/multiquístico es el más común y actualmente se denomina ameloblastoma convencional (AC) (Vered y Wright, 2022). El AC no presenta predilección por sexo y suele presentarse más comúnmente entre la 4ª y 5ª décadas de la vida (rango de 8 a 92 años) (El-Naggar y cols., 2017). Se localiza con mayor frecuencia en mandíbula en comparación con maxilar (5:1), principalmente en la zona posterior del cuerpo, el ángulo y la rama de la mandíbula (El-Naggar y cols., 2017; Effiom y cols., 2018; Duarte y cols., 2019; Hendra y cols., 2020). El AC clínicamente produce aumento de volumen que presenta un crecimiento progresivo, el cual puede provocar movilidad dental, maloclusión, disminución de la apertura bucal e invasión a los tejidos adyacentes. En cuanto a sus características radiográficas, el AC se presenta como una radiolucidez uni o multilocular con borde corticado. Se puede observar expansión y adelgazamiento de corticales, así como reabsorción radicular (Reichart y cols., 1995; El-Naggar y

cols., 2017). El AC se caracteriza histológicamente por presentar dos patrones morfológicos principales: folicular y plexiforme. El tipo folicular consiste en islas de epitelio odontogénico que presentan en su periferia una capa de células cuboidales a columnares con núcleos polarizados e hipercromáticos dispuestas en empalizada, mientras que las células centrales son angulares, se disponen libremente, y recuerdan al retículo estrellado del órgano del esmalte. El tipo plexiforme presenta islas y cordones anastomosados de células periféricas cubicas a columnares con núcleo polarizado e hipercromático dispuestas en empalizada, con zonas centrales de espesor variable con aspecto de retículo estrellado. Otros subtipos histológicos que puede presentar el AC son el acantomatoso, el basaloide, el desmoplásico y el de células granulares (Reichart y cols., 1995; El-Naggar y cols., 2017; Effiom y cols., 2018; Kreppel y Zöller, 2018; Hendra y cols., 2020).

El diagnóstico de AC se realiza principalmente mediante la correlación de la histomorfología con las características clínicas y radiográficas; sin embargo, en algunos casos este diagnóstico se apoya con el uso de marcadores inmunohistoquímicos. Los AC son positivos para citoqueratinas CK5, CK14 y CK19 (Martínez y cols., 2017, Fregnani y cols., 2017). Se ha utilizado Syndecan-1 que es una molécula transmembrana que participa en la adhesión entre células y su interacción con la matriz extracelular, para la evaluación las diferencias en su expresión entre los tipos de AC y con CA, así como su relación con el marcador de proliferación celular Ki67, observando aumento en la expresión de Syndecan-1 y bajo índice de Ki67 en AC y Am, en contraste con una evidente disminución de Syndecan-1 y alto índice de Ki67 en CA, concluyendo que la pérdida de la expresión de Syndecan-1 está relacionada con incremento de la proliferación celular asociada a la disminución en la adhesión celular, incrementando el riesgo de invasión celular y metástasis, por lo que la evaluación de Syndecan-1 y Ki67 permitiría predecir la agresividad tumoral (Bologna y cols., 2008; Bologna y cols., 2009). De igual manera se han estudiado FGF2 y

FGFR1, cuya expresión citoplasmática en células tumorales se ha relacionado con una mayor tasa de recurrencia (Fonseca y cols., 2018).

1.2.2. Carcinomas odontogénicos

Los tumores odontogénicos malignos (TOM) representan menos del 6% de todos los tumores odontogénicos (Fonseca y cols., 2016). Aunque la etiopatogenia es desconocida, se tiene claro que algunos se desarrollan *de novo* a partir de restos de tejido odontogénico y otros a partir de quistes o tumores odontogénicos benignos preexistentes. Dependiendo del tejido a partir del cual se desarrollen, los TOM se pueden clasificar en carcinomas, carcinosarcomas o sarcomas (Mosqueda y cols., 2003; Lee y cols., 2015; El-Naggar y cols., 2017).

En la 4ª edición de la Clasificación Histológica de Tumores de Cabeza y Cuello de la OMS publicada en 2017 (Cuadro 1), los carcinomas odontogénicos (CO) se subdividen en: carcinoma ameloblástico (CA), carcinoma intraóseo primario NOS (CIP), carcinoma odontogénico esclerosante (COE), carcinoma odontogénico de células claras (COCC) y carcinoma odontogénico de células fantasma (COCF) (El-Naggar y cols., 2017). Vered y Wright reportan que esta subdivisión de los carcinomas odontogénicos se mantendrá para la 5ª edición de esta clasificación (Vered y Wright, 2022).

1.2.2.1. Carcinoma ameloblástico

El carcinoma ameloblástico (CA) es el carcinoma odontogénico más común y es considerado la contraparte maligna del Am. Es una neoplasia maligna rara (cerca del 2% de los tumores odontogénicos), con comportamiento muy agresivo que se desarrolla principalmente entre los 40 y 50 años, y puede ocurrir como lesión *de novo* o secundaria en pacientes con diagnóstico previo

de Am. Esta neoplasia muestra predilección por el sexo masculino y se localiza con mayor frecuencia en la zona posterior de la mandíbula en una proporción 2:1 respecto al maxilar (Mosqueda y cols., 2003; Fonseca y cols., 2016; El-Naggar y cols., 2017; Melián y cols., 2022).

Clínicamente se presenta como una lesión de crecimiento rápido, expansiva, que provoca la perforación de las corticales e infiltra a tejidos blandos adyacentes, la cual puede causar dolor y/o parestesia. Radiográficamente se observa una lesión radiolúcida, infiltrativa y con frecuencia muestra bordes mal definidos con focos radiopacos y puede provocar reabsorción radicular (Fonseca y cols., 2016; El-Naggar y cols., 2017; Melián y cols., 2022).

El CA histológicamente presenta características típicas de un AC con patrón folicular o plexiforme, acompañadas de características citológicas de malignidad en proporciones variables, tales como pleomorfismo celular, aumento de la relación núcleo-citoplasma, hipercromatismo nuclear, incremento en la actividad mitótica y presencia de mitosis aberrantes, así como invasión vascular y del espacio perineural, y focos de necrosis. Se pueden observar zonas con pérdida de los patrones histológicos, con formación de láminas, nidos o trabéculas gruesas, en las cuales se pierden las áreas que recuerdan al retículo estrellado, la polaridad inversa de las células periféricas en empalizada, y puede haber zonas con diferenciación escamosa con formación de perlas de queratina. También se ha reportado la presencia de células claras, lo cual se ha relacionado con un comportamiento más agresivo (El-Naggar y cols., 2017; Fonseca y cols., 2018).

El diagnóstico de CA en ocasiones puede ser difícil, y para ello se consideran las características clínicas e histopatológicas. El AC es la principal neoplasia a considerar al momento del diagnóstico, ya que el CA suele presentar áreas que asemejan al AC con características sutiles de

malignidad e incluso ser asintomáticos (38% de los casos) y con tiempo de evolución largo (Melián y cols., 2022), por lo que se han utilizado múltiples marcadores inmunohistoquímicos para intentar diferenciar estas lesiones, principalmente en casos de AC que muestran índices de proliferación celular altos sin evidencia histológica suficiente de malignidad, sin que hasta ahora se hayan podido establecer parámetros claros para su diferenciación inequívoca.

Cuadro 2. Características histopatológicas de AC y CA de acuerdo con la Clasificación Histológica de Tumores de Cabeza y Cuello de la OMS (2017)

<i>Ameloblastoma Convencional</i>	<i>Carcinoma ameloblástico</i>
<ul style="list-style-type: none"> – Patrón folicular: islas con capa periférica de células cuboidales a columnares con núcleos polarizados e hipercromáticos dispuestas en empalizada y células centrales angulares, dispuestas libremente similares al retículo estrellado del órgano del esmalte. – Patrón plexiforme: islas y cordones anastomosados de células periféricas cubicas a columnares en empalizada con núcleo polarizado e hipercromático, con zonas centrales similares al retículo estrellado. 	<ul style="list-style-type: none"> – Presencia zonas con patrón histológico de un ameloblastoma (folicular/plexiforme). – Pleomorfismo celular. – Aumento de la relación núcleo-citoplasma. – Hipercromatismo nuclear. – Incremento de la actividad mitótica y mitosis anormales. – Invasión vascular. – Invasión perineural. – Necrosis tumoral.

En CA se ha observado marcada sobreexpresión en los marcadores de proliferación celular MCM2, MCM3 y Ki-67, así como en los marcadores de expresión de proteínas de genes supresores de tumores p53 y p63, en comparación con AC (Carreón y cols., 2015; Martínez y cols., 2017). En CA se ha observado expresión homogénea en citoqueratinas (CK) AE1/AE3, 14 y 15, sobreexpresión en CK5 y CK18 y positividad en CK8, la cual es negativa en AC (Fonseca y cols., 2018; Melián y cols., 2022). Por otro lado, al analizar marcadores vasculares, tanto linfáticos como sanguíneos, se ha observado en CA una disminución significativa en la expresión de podoplanina (62% AC y 20% CA) y un incremento en la microdensidad vascular obtenida a partir de CD105 en comparación con AC (118 AC y 213 CA) (Sánchez y cols., 2017).

La tasa de recurrencia local es de hasta el 40%, asociada al abordaje quirúrgico y a la utilización de tratamientos coadyuvantes y aproximadamente un tercio de los pacientes con CA desarrollan metástasis, principalmente a pulmones. La supervivencia a 5 años es de alrededor de 70% y la media de supervivencia en años es de 17.6, la cual disminuye notablemente en lesiones localizadas en el maxilar (El-Naggar y cols., 2017; Fonseca y cols., 2018; Melián y cols., 2022; Vered y Wright, 2022).

1.3. Marcadores inmunohistoquímicos seleccionados para esta investigación

1.3.1. Familia de los factores de crecimiento fibroblástico y sus receptores

La familia de los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) comprende 18 miembros y 4 proteínas análogas, cada uno formado a partir de un conjunto de péptidos homólogos que actúan como potentes factores angiogénicos y reguladores de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Los FGFs se dividen en dos grupos de subfamilias, un grupo de acción paracrina-autocrina y otro de acción endocrina. Cada uno de estos grupos requiere de un cofactor

para poder llevar a cabo la dimerización y activación de su receptor. En el caso de las subfamilias de acción paracrina-autocrina, estas requieren de proteoglicanos heparán sulfato (HSPG) mientras los de acción endocrina utilizan la enzima α/β -klotho (Aigner y cols., 2002; Katoh y Katoh, 2006; Hardy y cols., 2011; Katoh y Nakagama, 2013; Hallinan y cols., 2015; Ipenburg y cols, 2016; Jing y cols., 2016; Gonçalves y cols., 2017).

Los receptores de factores de crecimiento fibroblástico (FGFRs) son receptores transmembrana de la familia de las inmunoglobulinas, las cuales presentan en la región extracelular tres dominios Ig (D1-D3) y un dominio citoplasmático de tirosina quinasa. Los FGFs se unen a FGFRs gracias al complejo de proteínas de acoplamiento FRS2/FRS3-SHP2-GRB2, lo cual les permite transducir sus señales, fosforilar moléculas aguas abajo y participar en las vías de señalización RAS~MAPK (crecimiento y diferenciación celular), PI3K~AKT (supervivencia, proliferación y diferenciación celular, así como la tumorigénesis regulada por FGF), PI3K~aPKC (control de polaridad celular) y WNT (migración y diferenciación celular), por lo que cumplen un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y fetal, así como durante la odontogénesis (Aigner y cols., 2002; Katoh y Katoh, 2006; Hardy y cols., 2011; Katoh y Nakagama, 2013; Hallinan y cols., 2015; Jing y cols., 2016; Ipenburg y cols, 2016; Gonçalves y cols., 2017).

Los FGFs se encuentran fuertemente ligados al heparan sulfato de la matriz extracelular, el cual influye en su actividad biológica al interactuar con moléculas de adhesión, inhibidores de proteasas y enzimas para que los FGFs se puedan unir a FGFRs, y de esta manera logren su activación. Para esto también es necesaria la presencia de la proteína de unión FGF-BP, que forma un enlace no covalente irreversible con los FGFs para prevenir su degradación y actividad

mitogénica (Zhang y cols., 2001; Aigner y cols., 2002; Zhang y cols., 2005). Los FGFs están regulados por genes Sprouts, los cuales actúan como inhibidores endógenos (Du y cols., 2018).

Durante la odontogénesis los FGFs regulan el tamaño y forma de los dientes, así como el número y el sitio en el que se desarrollarán (Du y cols., 2018). Entre sus principales funciones está la activación de RAS/MAPK y PI3K/AKT aguas abajo y su función como factores quimiotácticos que influyen en la migración de las células mesenquimatosas al expresar FGF4 y disminuir la expresión de FGF8, aunado con la regulación a la baja de E-cadherina para permitir la migración, proliferación y diferenciación celular a lo largo de los estadios de la odontogénesis (Hardy y cols., 2011; Du y cols., 2018). Los FGF también son los encargados de regular la diferenciación de los ameloblastos mediante la expresión de FGF4, FGF9 y FGFR1 en los preameloblastos y FGFR1 y FGF2 en el retículo estrellado, y para la diferenciación de los odontoblastos se expresan FGF10 y FGFR1 en los preodontoblastos y FGF3 en el mesénquima de la papila dental (Zhang y cols., 2005; Du y cols., 2018). El incremento de FGF se asocia con la interrupción de la formación, y con anomalías en la morfología o en la estructura del esmalte (Du y cols., 2018). Diversos estudios han mostrado que las mutaciones, traslocaciones o pérdida de regulación de FGFs y/o FGFRs que surgen como resultado de la activación aberrante u oncogénica de RTK se asocian con la proliferación celular, evasión de la muerte celular, incremento en la angiogénesis y aumento de la invasividad, lo cual favorece la metástasis (Katoh y Nakagama, 2013; Tanner y Grose, 2015; Mariz y cols., 2019).

1.3.1.1. FGF2 y FGFR1

El factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) se encuentra ampliamente distribuido en tejidos embrionarios, tejidos adultos normales y tejidos tumorales. De manera inicial FGF2 se localiza en la membrana basal, debido a su alta afinidad por el heparan sulfato, y la proteína de unión

FGF-BP permite su activación y movilización a través de la matriz extracelular (Zhang y cols., 2001; Aigner y cols., 2002; Hallinan y cols., 2016). El FGF2 transduce señales a través del receptor de factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGFR1) y actúa como un factor proangiogénico, de proliferación y diferenciación celular, así como en la reparación de tejidos (Katoh y Katoh, 2006).

En la mucosa de la cavidad bucal, el FGF2 presenta expresión citoplasmática en las capas basal y parabasales del epitelio, mientras el FGFR1 muestra expresión nuclear en las capas superiores. La desregulación en la vía FGF2-FGFR1 se ha identificado en distintos tipos de neoplasias benignas, trastornos potencialmente malignos y neoplasias malignas (carcinoma bucal de células escamosas, carcinomas de glándulas salivales, ameloblastoma y carcinoma ameloblástico) y se ha correlacionado con carcinogénesis, disminución de la diferenciación celular, incremento en el potencial invasivo y peor pronóstico (Katoh y Nakagama, 2013; Mariz y cols., 2018; Fonseca y cols., 2018; Mariz y cols., 2019). Se ha reportado que tanto FGF2 como FGF10 interactúan con TGF β y participan en la transición epitelio mesénquima y en el cambio de FGFR2 a FGFR1, lo que permite que las células sean más sensibles a FGF2, además se ha observado que FGF2 actúa junto con VEGF en la angiogénesis y linfangiogénesis tumoral, lo cual podría incrementar el potencial de metástasis (Jing y cols., 2016).

Respecto a TO, se han realizado diversos estudios con FGF2 y FGFR1 debido a su asociación con vías de señalización relacionadas al desarrollo de estos tumores. Específicamente en Am, la sobreexpresión de estas proteínas en las células epiteliales tumorales se ha asociado con mayor proliferación celular y con incremento en el riesgo de recurrencia (So y cols., 2001; Fonseca y cols., 2018).

La interacción entre FGF y la vía MAPK ha sido estudiada debido a su participación en múltiples procesos celulares normales y patológicos. Esta interacción comienza con la dimerización y activación del FGFR, e inicia su señalización al unirse a las proteínas activadoras GRB2 y SHP2, las cuales reclutan a SOS1/2 que son factores de intercambio de nucleótidos de guanosina que se encargan de convertir la GDP-Ras en GTP-Ras (Ras activada), enviando así señales que activan RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, TIAM-1/RAC y RALGDS/Ral. Cuando Ras activa RAF (RAF-1, ARAF, BRAF y CRAF), este lleva a cabo la activación de MEK1/2 el cual, también a través de la fosforilación, activa a ERK1/2, la que activa y fosforila moléculas diana como ETS (JUN y ELK1), el cual es un factor de transcripción que promueve la progresión del ciclo y la proliferación celulares (Jing y cols., 2016; Du y cols., 2018).

Múltiples neoplasias benignas y malignas se han asociado con alteraciones genéticas presentes a lo largo de la vía MAPK, como es el caso de los gliomas y astrocitomas, cuyo desarrollo se asocia con frecuencia con la activación de la vía MAPK mediante alteraciones genéticas que incluyen mutaciones BRAFV600E y en FGFR1 (Pathak y cols., 2017; Trisolini y cols., 2019; Ellison y cols., 2019). En pacientes con astrocitoma se ha observado mutación en FGFR1 coexistente con BRAFV600E en tumores esporádicos con comportamiento agresivo, y es importante mencionar que, además se observó sobreexpresión inmunohistoquímica de FGFR1 aun en ausencia de alteraciones genéticas relacionadas tanto con BRAF como con FGFR1 (Pathak y cols., 2017). Se ha buscado estudiar la presencia de estas mutaciones con el fin de encontrar candidatos a las terapias dirigidas contra BRAF y FGFR1 (Trisolini y cols., 2019). Esto es importante ya que tanto en los AC como en los CA se presentan alteraciones genéticas en la vía MAPK, principalmente de BRAFV600E, y se han observado alteraciones en la expresión inmunohistoquímica de FGFR1 en Am (Sweeney y cols., 2014; Brown y cols., 2014; Fregnani y

cols., 2017; Gonçalves y cols., 2017; El-Naggar y cols., 2017; Fonseca y cols., 2018; Duarte y cols., 2019).

Distintos estudios han analizado el efecto de inhibidores de la vía MAPK en AC, utilizando inhibidores de BRAFV600E, inhibidores de MEK, o con terapias combinadas, las cuales han sido aprobadas por la FDA (Brown y cols., 2014; Kaye y cols., 2015; Faden y Algarzi, 2017; Fernandes y cols., 2018). Brown y cols., en 2014 analizaron el efecto *in vitro* de Vemurafenib en una línea celular de ameloblastoma AM-1 con la mutación BRAF V600E, el cual demostró tener un efecto inhibitor respecto a los grupos control (Brown y cols., 2014). Posteriormente Kaye y cols en 2015 publicaron un estudio en el que se aplicó terapia combinada con Dabrafenib y Trametinib (inhibidores BRAF/MEK) en un paciente con AC mandibular con mutación BRAF V600E con múltiples recurrencias y metástasis pulmonar, al cual se le realizó seguimiento con PET/TC a las 8 y 20 semanas, observando reducción del tamaño del tumor y desaparición de la masa tumoral pulmonar (Kaye y cols., 2015). Por otro lado, Faden y Algarzi (2017) probaron la efectividad de Dabrafenib como monoterapia en una paciente de 83 años con AC con múltiples recurrencias previamente tratadas con terapia quirúrgica conservadora, la cual, debido a comorbilidades médicas, no fue candidata a tratamiento quirúrgico, por lo que se decidió iniciar el tratamiento inhibitor de BRAFV600E al identificarse la mutación. El tratamiento comenzó con 75mg dos veces al día con una reducción del 50% al mes, después de lo cual se observó una reducción de la masa tumoral sostenida hasta los 12 meses. Esto los llevo a sugerir que la dosis mínima efectiva podría estar muy por debajo de la dosis aprobada por la FDA (Faden y Algarzi., 2017). Fernandes y cols., en 2018 también reportaron el uso de monoterapia con inhibidores de BRAFV600E, esta vez con Vemurafenib en una paciente de 29 años con AC con múltiples recurrencias previamente tratadas quirúrgicamente y con radioterapia desde 1997 hasta 2016,

cuando se inició el tratamiento inhibitor, observando una reducción progresiva y sostenida de la masa tumoral hasta el último estudio en 2017 (Fernandes y cols., 2018).

Debido a que las mutaciones y amplificaciones de FGFR se encuentran en una variedad de neoplasias benignas y malignas y que se han relacionado con la patogénesis, comportamiento biológico y la progresión de estas neoplasias, se están realizando estudios clínicos en la búsqueda de crear agentes dirigidos a FGFR, principalmente para el tratamiento de cáncer. Ejemplos de ello son el cediranib, que es una multi-tirosina quinasa inhibidora de FGFR que está en evaluación de fase II para el cáncer endometrial recurrente; el TKI258 y el AZD-4547 que muestran actividad antitumoral en el carcinoma de células renales; el Lucitanib utilizado en el tratamiento de tumores sólidos avanzados, y A114 y A117, inhibidores de FGFR1 que también han mostrado actividad antitumoral. Estos inhibidores dirigidos a FGFR han mostrado supresión del crecimiento tumoral, sin embargo, se ha observado resistencia tumoral intrínseca, duración media de la inhibición de pocos meses y resistencia tumoral a través de la regulación positiva de la señalización mediante otros miembros de los FGFs (Katoh y Nakagama, 2014; Jing y cols., 2016; Fonseca y cols., 2018).

1.3.2. Marcador de proliferación celular Ki67

El Ki67 es una proteína nuclear expresada constitutivamente en células de mamíferos en proliferación, identificada por Johannes Gerdes y cols., en 1991 en la ciudad de Kiel en Alemania al utilizar un anticuerpo monoclonal de ratón generado en 1983 a partir de la inmunización de ratones con núcleos de una línea celular de linfoma Hodgkin, tomando su nombre de las dos primeras letras del nombre de la ciudad y el número 67 del clon original en la placa de 96 pocillos, descubriendo también que esta proteína se expresaba durante las fases activas del ciclo

celular y estaba ausente en células inactivas (Scholsen y Gerdes, 2000; Juríková y cols., 2016; Sobecki y cols., 2016).

En 1993 Schulder y cols., publicaron la estructura primaria completa, ya que hasta ese momento se sabía que había dos isoformas (una de 320 y otra de 359 KD), ambas con un dominio Forkhead amino terminal (FHA N-terminal); son provenientes de un ARNm compuesto por una región central de 16 repeticiones de Ki67 transcrito de un solo gen, el cual es considerado uno de los más grandes en mamíferos (Scholsen y Gerdes, 2000; Sobecki y cols., 2016; Sun y Kaufman, 2018). Posteriormente se definió que el ARNm de Ki67 era codificado por el gen MKI67 y que su estructura central está constituida por múltiples repeticiones en tándem, además de que la proteína Ki67 posee dos dominios de unión a la proteína fosfatasa 1 (PP1), un dominio conservado (CD) y un extremo rico en leucina y arginina carboxilo terminal (LR-C-terminal) que junto con el dominio FHA permiten la unión de Ki67 a la cromatina (Sobecki y cols., 2016; Sun y Kaufman, 2018).

En la actualidad, gracias a los avances en la biología molecular se ha logrado determinar con cierta claridad la participación de Ki67 en la proliferación celular y su interacción con otros elementos indispensables para la progresión del ciclo celular. Se sabe que después de la ruptura de la envoltura nuclear, durante la fase G1 se da la transcripción de MKI67, la activación de factores de transcripción como E2F, B-MYB, FOXM1 y MuvB, y la inactivación de la proteína retinoblastoma (Rb), lo cual permite la traducción de la proteína Ki67 al final de la fase G1, la cual se posiciona en focos dentro del nucleoplasma para después formar parte del componente fibrilar denso del nucléolo que contiene múltiples copias del gen pre-ARNr-45S necesario para formar los cromosomas (Juríková y cols., 2016; Miller y cols., 2018; Uxa y cols., 2021). Durante

la fase S aumentan los niveles de Ki67, localizándose de manera difusa en el nucléolo y el nucleoplasma (Sobecki y cols., 2016; Juríková y cols., 2016). Finalmente, la proteína KIF23 permite que Ki67 logre su máxima expresión en las fases G2 y M, en las que Ki67 unido a la proteína fosfatasa 1 actúa como surfactante y forma una malla fina alrededor de la cromatina en condensación llamada capa pericromosómica que actúa como andamio para el resto de los elementos que participan en la división celular (Sobecki y cols., 2016; Juríková y cols., 2016; Sun y Kaufman, 2018; Uxa y cols., 2021). Al final de la mitosis Ki67 queda dispersa en el nucleoplasma, posteriormente el complejo represor transcripcional DREAM junto los supresores de tumores p53 y p21, y la proteína retinoblastoma (Rb) regulan a la baja la transcripción de MKI67 y la degradación de Ki67 se da a través del proteosoma, por lo que en la fase G1 temprana y en la fase G0 la proteína Ki67 ya no se encuentra presente en la célula (Juríková y cols., 2016; Miller y cols., 2018; Sobecki y cols., 2016; Uxa y cols., 2021).

En conclusión, se sabe que la proteína Ki67 participa en la biogénesis ribosómica, regula el ciclo celular, organiza la heterocromatina, participa en la separación y movilidad de los cromosomas mitóticos gracias a la estabilización y mantenimiento del huso mitótico y es fundamental en el ensamblaje de la capa pericromosómica (Sobecki y cols., 2016; Juríková y cols., 2016; Miller y cols., 2018; Sun y Kaufman, 2018; Uxa y cols., 2021). También se ha observado que la sobreexpresión de Ki67 lleva a la formación de heterocromatina ectópica, mientras que la disminución puede provocar alteraciones en la expresión génica, la asimetría de las células hijas y la interrupción de la nucleogénesis (Sobecki y cols., 2016).

El término “marcador de proliferación celular” define a un antígeno que debe estar continuamente presente durante el ciclo celular de todos los tipos celulares y la transición de

cualquier parte del ciclo a la no proliferación debe ir seguida de su rápida desaparición, características que cumple Ki67 (Scholsen y Gerdes, 2000; Bologna y cols., 2013). MIB1 es el anticuerpo monoclonal de elección para detectar el antígeno Ki67 mediante inmunohistoquímica, y el índice de marcaje obtenido permite determinar la fracción de crecimiento de una población celular determinada (Scholsen y Gerdes, 2000; Bologna y cols., 2013; Juríková y cols., 2016). Ki67 como marcador de proliferación celular ha servido como factor diagnóstico, pronóstico y predictor temprano de la eficacia de tratamientos enfocados en evitar la división celular en diferentes neoplasias. En especial en cáncer se ha correlacionado con el estadio tumoral, el estatus ganglionar y el riesgo de recurrencia y metástasis, principalmente en cáncer de mama, cáncer de próstata y mieloma múltiple (Scholsen y Gerdes, 2000; Andrade y cols., 2013; Juríková y cols., 2016; Miller y cols., 2018).

Ki67 ha sido comparado con otros marcadores de proliferación celular como Germina, MCM2 MCM3 y PCNA, y ha mostrado ser muy sensible, principalmente al comparar AC con CA (Bologna y cols., 2008; Bologna y cols., 2009; Torres y cols., 2009; Bologna y cols., 2013), aunque no se ha determinado un punto de corte entre ambas lesiones. Se ha observado que MCM2 y MCM3 pueden ser más sensibles que Ki67, sin embargo, hay escasos estudios al respecto (Carreón y cols., 2015; Juríková y cols., 2016). Por otro lado, Torres y cols. estudiaron la relación entre Ki67 y MCM2 en distintos grados de displasia y carcinoma escamocelular en mucosa bucal, y observaron que la relación podría utilizarse para determinar no sólo el índice de células en proliferación, sino también cuáles células a pesar de estar en reposo cuentan con los requerimientos para iniciar la misma, lo cual serviría como predictor de malignización (Torres y cols., 2009).

1.3.3. Marcador de angiogénesis CD105

La endogлина humana, también conocida como CD105, es una glucoproteína transmembrana homodimérica formada por subunidades unidas por disulfuro. CD105 es un factor proangiogénico inducido por hipoxia que actúa como receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Se encuentra presente en células endoteliales angiogénicas, predominantemente en endotelio microvascular, mientras que es escasa en células endoteliales linfáticas. También puede expresarse altamente en sincitiotrofoblastos y débilmente en fibroblastos, células estromales y hematopoyéticas (Duff y cols., 2003; Fonsatti y cols., 2003; Nassiri y cols., 2011). La interacción entre TGF- β y CD105 provoca la fosforilación de las proteínas SMAD que actúan como integrador de señales para modular la expresión génica. TGF- β está asociado a proliferación, migración y adhesión celular, cicatrización, hematopoyesis y angiogénesis, así como ser inductor de la inflamación y supresor tumoral (Duff y cols., 2003; Fonsatti y cols., 2003).

La angiogénesis comprende la formación de vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, los que mediante cambios morfogénicos degradan la membrana basal y forman brotes y ramificaciones de células endoteliales con formación de luz vascular, anastomosis de los vasos y reclutamiento de células murales que formarán vasos sanguíneos maduros (Duff y cols., 2003; Nassiri y cols., 2011; Ollauri y cols., 2020). Ollauri y cols., proponen que la sobreexpresión continua de CD105 promueve que las células endoteliales se mantengan activas (angiogénesis continua) y no permite la estabilización del endotelio y la formación de vasos maduros, lo cual provoca extravasación de eritrocitos, favorece el desarrollo de metástasis y por lo tanto se asocia a un peor pronóstico (Ollauri y cols., 2020).

La angiogénesis es esencial para la proliferación celular, el crecimiento tumoral, la recurrencia y la metástasis, por lo que el estudio de la densidad de la microvasculatura se ha realizado de manera habitual para evaluar el pronóstico de un tumor. CD105 se ha estudiado en diversas neoplasias malignas, tales como el carcinoma de mama, carcinoma hepatocelular y carcinoma escamocelular bucal, y se ha observado sobreexpresión en endotelio venoso y arterial de vasos peri e intratumorales, lo cual se ha asociado a una disminución en la supervivencia y un peor pronóstico (Duff y cols., 2003; Nassiri y cols., 2011).

La proteína CD105 se ha estudiado en una gran variedad de quistes y TO. Gadbail y cols., observaron sobreexpresión de CD105 en queratoquiste odontogénico, lo cual se relacionó con un comportamiento localmente agresivo y alta tasa de recurrencia (Gadbail y cols., 2011). Por su parte, González y cols., estudiaron mixomas odontogénicos y los compararon con folículos dentales y observaron una baja expresión de CD105 en los mixomas mayores a tres cm, lo cual es compatible con el comportamiento distinto de esta neoplasia en comparación con otros TO y con el folículo dental, ya que en las fases tardías del mixoma la angiogénesis no juega un papel relevante (González y cols., 2016). Los resultados de los estudios que comparan CD105 con otros marcadores endoteliales como CD34, CD31 y factor VIII, mostraron que éste es capaz de marcar vasos nuevos y no es reactivo a las células endoteliales de los vasos sanguíneos maduros atrapados dentro de un tumor, además de que presenta mayor especificidad para evaluar la microdensidad vascular intratumoral, por lo cual es utilizado para evaluar actividad y pronóstico en tumores (Nassiri y cols., 2011; González y cols., 2016).

2. Planteamiento del problema

El AC es una neoplasia benigna que presenta un comportamiento localmente agresivo, con patrón de crecimiento invasivo, alta tasa de recurrencia y ocasionalmente presenta patrones histomorfológicos que sugieren mayor agresividad los cuales pueden dificultar el diagnóstico diferencial con respecto al CA, que es considerado su contraparte maligna, debido a que ambas lesiones comparten muchas características clínico-patológicas sugestivas de neoplasia maligna, tales como la capacidad de infiltración y destrucción de tejidos vecinos, cierto grado de hiper celularidad y puede haber incremento en el número de mitosis. Por otro lado, la muy baja incidencia de casos reportados de CA no ha permitido la realización de estudios que nos proporcionen herramientas de diagnóstico para poder diferenciarlas con certeza.

De manera similar a lo observado en otros tumores, los marcadores inmunohistoquímicos pueden ser útiles como herramientas diagnósticas y para conocer mejor la histomorfogénesis de algunas lesiones con comportamiento incierto. La sobreexpresión de factores activadores de la vía MAPK como FGF2 y FGFR1 se ha asociado con disminución de la diferenciación celular, comportamiento agresivo y mal pronóstico para el paciente. La proteína Ki67 es un marcador de proliferación celular que ha demostrado ser de utilidad en la identificación de malignidad, comportamiento agresivo y mal pronóstico. Por otro lado, CD105 como marcador de angiogénesis en diversas neoplasias se ha considerado como un indicador de agresividad, alta tasa de recurrencia, mayor riesgo de metástasis, disminución de la supervivencia y mal pronóstico. Estos marcadores no han sido plenamente estudiados en la comparación entre AC y CA, por lo que el presente estudio pretende explorar si la inmunoexpresión de estos marcadores podría ser relevante para establecer con mayor precisión su diagnóstico.

3. Justificación

Las similitudes clínicas e histopatológicas del AC y el CA, pueden dificultar el diagnóstico diferencial de estas neoplasias, lo cual tiene una implicación directa en la elección de tratamiento y el pronóstico, afectando de manera directa la calidad de vida de los afectados.

Se han estudiado múltiples marcadores inmunohistoquímicos con el fin de identificar aquellos que permitan encontrar diferencias que ayuden a determinar el diagnóstico de AC o CA con mayor precisión, sin que se haya podido encontrar hasta la fecha alguno que en particular permita establecer con claridad dicha separación. La comparación y asociación de la inmunoexpresión de marcadores relacionados con la activación de la vía MAPK, con la angiogénesis y con la proliferación y diferenciación celular tales como FGF2, FGFR1, Ki67 y CD105 en AC y CA podría aportar elementos que permitan realizar el diagnóstico diferencial entre estas dos entidades y de esta forma contribuir al avance en la comprensión de su histogénesis y su comportamiento biológico.

4. Objetivos

Objetivo general

Comparar la expresión inmunohistoquímica de los marcadores FGF2, FGFR1, el marcador de proliferación celular Ki67 y el marcador de angiogénesis CD105 entre AC y CA.

Objetivos específicos

- Caracterizar y comparar la expresión inmunohistoquímica de los marcadores de crecimiento fibroblástico FGF2 y FGFR1 entre AC y CA.
- Caracterizar y comparar la expresión inmunohistoquímica del marcador de proliferación celular Ki67 entre AC y CA.
- Caracterizar y comparar la microdensidad vascular a través de la expresión inmunohistoquímica del marcador de angiogénesis CD105 entre AC y CA.
- Conocer la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de los marcadores FGF2 y FGFR1, con la expresión de los marcadores Ki67 y CD105 en AC.
- Conocer la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de los marcadores FGF2 y FGFR1, con la expresión de los marcadores Ki67 y CD105 en CA.

5. Método

Diseño del estudio

Estudio de corte transversal, observacional y retrolectivo, en el que se incluyeron lesiones con diagnóstico de AC y CA, obtenidas de los archivos del Laboratorio de Patología Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, del Servicio de Patología Bucal PERIBACT en la Ciudad de México, el Centro Clínico de Cabeza y Cuello de Guatemala y del Laboratorio Getulio Sales Diagnósticos en Natal, Río Grande del Norte, Brasil.

Criterios de inclusión

- Muestras tisulares con diagnóstico histopatológico de AC y CA confirmado mediante la revisión de laminillas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), y que cumplen los criterios establecidos en la cuarta edición de la Clasificación Histológica de Tumores de Cabeza y Cuello de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (El-Naggar y cols., 2017).

Criterios de exclusión

- Casos de ameloblastomas no convencionales (uniquísticos, periféricos o metastatizantes).

Criterios de eliminación

- Casos en los que no se contó con las condiciones requeridas para la realización de las reacciones de inmunohistoquímica.

Procedimientos de laboratorio

Se revisaron los archivos de los servicios incluidos en el estudio y se incluyeron un total de 42 casos, de los cuales 35 correspondieron a AC y 7 a CA. De los bloques de parafina se obtuvieron nuevos cortes a 4 μ que fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E), con los cuales los diagnósticos fueron confirmados por dos patólogos bucales basándose en los criterios establecidos en la cuarta edición de la Clasificación Histológica de Tumores de Cabeza y Cuello de la Organización Mundial de la Salud (OMS) descritos con anterioridad en el Cuadro 2 (El-Naggar y cols., 2017). En los casos en los que no hubo concordancia en el diagnóstico entre los patólogos, el diagnóstico definitivo fue realizado por consenso. La concordancia inter-observador no fue evaluada.

La base de datos fue elaborada en el programa de Microsoft® Office Excel, a partir de los datos de la ficha de recolección diseñada para el estudio (Anexo 1), la cual incluye edad, sexo, localización de la lesión, así como el diagnóstico histopatológico de la lesión y los resultados de las reacciones de inmunohistoquímica.

Técnicas de inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica de los marcadores FGF2, FGFR1, Ki67 y CD105 fue realizada en el Laboratorio Getulio Sales Diagnósticos en Natal, Río Grande del Norte, Brasil, con métodos previamente descritos (Fonseca y cols., 2018; Sánchez y cols., 2017; Bologna y cols., 2009).

A partir de bloques de parafina de tejidos fijados con formalina al 10% se obtuvieron secciones de 3 µm de espesor de cada uno de los bloques preparados para realizar la técnica IHQ mediante el método indirecto de polímeros EnVision™ FLEX+, High pH (Dako K8012) en el equipo Dako® Autostainer Plus, utilizando los anticuerpos especificados en el Cuadro 1, así como controles internos y externos para todos los casos.

La recuperación antigénica se realizó previa desparafinación y rehidratación, en el equipo Dako® PT Link con el reactivo Target Retrieval Solution, High pH (Dako® K8004). El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó durante 5 minutos mediante el reactivo de bloqueo de peroxidasa EnVision™ FLEX (Dako® DM821), y se realizó la incubación del suero primario durante 20 minutos. Posteriormente se aplicó el polímero EnVision™ FLEX/HRP (Dako® DM822) durante 20 minutos, para después realizar el revelado durante 5 minutos con EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (Dako® DM827). Finalmente se hizo contraste con hematoxilina de Harris en cada uno de los portaobjetos, los cuales se deshidrataron y montaron en el equipo cubreobjetos Tissue-Tek® Film®.

Cuadro 3. Panel de marcadores inmunohistoquímicos utilizados en el presente estudio.

Anticuerpo	Clon	Fabricante	Dilución	Control	Inmunomarcación
FGF2	G-2	BIO SB®	1:50	COCE	Citoplasmática/ Nuclear
FGFR1		BIO SB®	1:50	COCE	Citoplasmática/ Membranal/ Nuclear
Ki67	MIB-1	DAKO®	1:100	Tonsila	Nuclear
CD105	SN6h	DAKO®	1:30	Tonsila	Membranal

Análisis inmunohistoquímico

El análisis inmunohistoquímico se realizó mediante la utilización de microscopio óptico con la obtención de imágenes de alta resolución asistidas por computadora de las laminillas teñidas con H&E y con las tinciones inmunohistoquímicas de los marcadores seleccionados mediante el empleo del escáner de portaobjetos Aperio Scanscope CS (Aperio Technologies Inc., Vista, California, EE. UU.).

La evaluación de la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos se realizó por medio de la selección de un campo en el que se observaron los criterios histopatológicos diagnósticos representativos de cada lesión a 100x (Cuadro 2), de los cuales se obtuvo una fotomicrografía a 400x, misma que fue guardada en archivo TIF. Posteriormente, mediante la utilización del software de visualización de portaobjetos para patología Aperio ImageScope v12.2.2.5015 (Aperio Technologies Inc.) se aplicó un algoritmo específico para evaluar el score o porcentaje de inmunoexpresión de cada marcador. Gracias a estos algoritmos el software permite la identificación de píxeles, núcleos y membranas teñidas, y determina la intensidad de esta tinción mostrando cuatro categorías: negatividad en color azul, tinción débil positiva en amarillo, tinción positiva moderada en color naranja y en color rojo la tinción fuertemente positiva. La cuantificación de células teñidas y el análisis de la intensidad permiten obtener un porcentaje de expresión en el caso de la cuantificación nuclear o un puntaje de expresión (SCORE) con valores de 0 (negatividad), 1+, 2+ y 3+, tal como se observa en la Figura 1 (Leica BIOSYSTEMS, 2021).

Para el análisis de los marcadores FGF2 y FGFR1 se aplicó el algoritmo Positive pixel count v9 que permite obtener un puntaje de expresión mediante la suma del porcentaje de cada categoría de intensidad multiplicado por la intensidad utilizando una fórmula previamente determinada

([puntuación tumoral = (porcentaje débil × 1) + (porcentaje moderado × 2) + (porcentaje fuerte × 3)] (Soares y cols., 2017). Para el análisis de Ki67 se aplicó el algoritmo IHC nuclear v1 que calcula la tinción nuclear total de las células tumorales, con el cual se obtuvo el porcentaje de expresión positiva para determinar el índice proliferativo (Soares y cols., 2017), mientras que para el análisis de CD105 se utilizó el algoritmo IHC membrana v1 obteniendo un puntaje de expresión membranar en células endoteliales de los vasos sanguíneos para determinar la microdensidad vascular.

Variables de estudio

Las variables fueron clasificadas en dependientes e independientes y se describen en el Cuadro 4, incluyendo el tipo de variable, la escala de medición y como fue evaluada (operacionalización).

CUADRO 4. Clasificación, escala de medición y operacionalización en las variables dependientes e independientes

Variable	Tipo de variable	Escala de medición	Operacionalización
<i>Dependientes</i>			
FGF2	Cuantitativa	Discreta	Puntaje de expresión
FGFR1	Cuantitativa	Discreta	Puntaje de expresión
Ki67	Cuantitativa	Continua	Porcentaje de expresión
CD105	Cuantitativa	Discreta	Puntaje de expresión
<i>Independientes</i>			
Edad	Cuantitativa	Discreta	Años
Sexo	Cualitativa	Nominal	Femenino, Masculino
Localización de lesión	Cualitativa	Nominal	Mandíbula, Maxilar
Tipo de lesión	Cualitativa	Nominal	AC ¹ , CA ²

¹AC: ameloblastoma convencional; ²CA: carcinoma ameloblástico

Análisis estadístico

La información de las variables del estudio se presenta como la mediana y la distancia intercuartilar (Q_1-Q_3) para las variables continuas que no presentaron una distribución normal. Para estudiar las asociaciones entre los inmunomarcadores y el tipo de lesión se realizó la prueba de X^2 para pruebas de independencia para las variables categóricas y para variables continuas sin distribución gaussiana se empleó la prueba de Wilcoxon Rank Sum Test. El valor crítico para las pruebas de hipótesis fue $p \leq 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico JMP, versión 15 en el análisis de datos.

Consideraciones bioéticas

De acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, esta investigación se considera sin riesgo (categoría I) ya que emplea técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio (Diario Oficial de la Federación [DOF], 05/10/2023, art.17). La presente investigación respeta la confidencialidad de los datos clínicos de las muestras de los individuos de estudio involucrados, los cuales se utilizan con fines estadísticos y no podrán relacionarse con éstos de alguna manera. Los resultados de esta investigación son compartidos con la sociedad y la comunidad científica internacional, ya que los hallazgos pueden ayudar a definir de forma más precisa el diagnóstico de AC y CA, y dan pie a proponer nuevas preguntas de investigación y realizar trabajos principalmente en el campo de la inmunohistoquímica, para dar respuesta a las mismas.

6. Resultados

El presente estudio incluyó 42 muestras tisulares de AC y CA, de las cuales 35 correspondieron a AC (83.3%) y 7 a CA (16.7%). La mediana de edad fue 48 (Q₁-Q₃: 37.5-59) años para AC y 28 años (Q₁-Q₃: 22-65) para CA (Cuadro 5). En ambas lesiones la localización más frecuente fue la mandíbula. En mujeres no se observaron tumores en maxilar, mientras en hombres representaron el 38.1% ($p=0.02$) de AC y el 33.3% de CA (Cuadro 6).

En el Cuadro 7 se muestran los resultados del análisis de las reacciones inmunohistoquímicas realizadas, en el cual se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión para FGFR1 ($p=0.0002$), Ki67 ($p=<0.0001$) y CD105 ($p=0.007$) entre AC y CA. El puntaje de expresión más frecuente para el FGF2 fue 1 en ambos tipos de lesiones (Figura 2), mientras que para el receptor FGFR1 fue de 1 (74.3%) en AC y de 3 (42.86%) en CA (Figura 3). En la Figura 4 se observa que el puntaje de expresión más frecuente de CD105 para la evaluación de la densidad microvascular en AC fue 0 (68.6%) y 2 en los casos de CA (57.1%). La mediana en los porcentajes de expresión de Ki67 en los casos de AC fue de 0.7% (Q₁-Q₃: 0.2 - 1.9) y de 22.1% (Q₁-Q₃: 8.7 – 52.7) en CA (Figura 5), lo cual revela marcadas diferencias en el índice de proliferación celular entre estas lesiones.

El análisis de la relación entre FGF2 y FGFR1 con Ki67 en AC y CA arrojó una asociación estadísticamente significativa entre FGF2 y Ki67 únicamente para los casos de AC ($p=0.016$), en el que a mayor puntaje de expresión de FGF2 se observa mayor índice de proliferación celular, tal como se muestra en el Cuadro 8. En AC se destaca que al incrementar el puntaje de expresión de FGFR1 se observa incremento en el índice de proliferación celular.

En el Cuadro 9 se muestra el análisis de la relación entre FGF2 y FGFR1 con CD105 en AC y CA, en el que observamos una asociación estadísticamente significativa entre estos marcadores en los casos de AC ($p=0.015$ y $p=0.029$, respectivamente). Cuando el puntaje de CD105 es 0 la mayoría de los casos presentan FGF2 y FGFR1 con puntaje de 1, al igual que el 100% de los casos con CD105 con puntaje de 1, mientras que la mayoría de los casos con CD105 con puntaje de 2 presentaron un puntaje de expresión de 2 para FGF2 y FGFR1, mostrando una evidente relación entre este factor y su receptor con la densidad microvascular en AC.

Cuadro 5. Características clínicas de los 42 individuos con diagnóstico ameloblastoma convencional y carcinoma ameloblástico incluidos en este trabajo

	AC n=35		CA n=7		P
	n	(%)	n	(%)	
<i>Sexo</i>					
Femenino	14	(40)	4	(57.1)	0.405^a
Masculino	21	(60)	3	(42.9)	
<i>Mediana en edad (Q₁-Q₃)</i>	48 (38 – 59)		28 (22 – 65)		0.244^b
<i>Localización</i>					
Mandíbula	27	(77.1)	6	(85.7)	0.600^a
Maxilar	8	(22.9)	1	(14.3)	

^a Prueba Chi-cuadrada Likelihood Ratio; ^b Wilcoxon Rank Sum Test; Q₁-Q₃: intervalo intercuartil; AC: ameloblastoma convencional; CA: carcinoma ameloblástico

Cuadro 6. Relación entre localización y sexo en AC y CA

	Femenino n=18	Masculino n=24	P
	n (%)	n (%)	
AC			
Mandíbula	14 (100)	13 (61.9)	0.012^a
Maxilar	0 (0)	8 (38.1)	
CA			
Mandíbula	4 (100)	2 (66.7)	0.429^a
Maxilar	0 (0)	1 (33.3)	

^aPrueba exacta de Fisher; AC: ameloblastoma convencional; CA: carcinoma ameloblástico

Cuadro 7. Puntajes y porcentaje de expresión de FGF2, FGFR1, Ki67 y CD105 en AC y CA

	AC n=35		CA n=7		P
	n	(%)	n	(%)	
FGF2					
0	0	(0)	0	(0)	0.136^a
1	32	(91.4)	5	(71.4)	
2	3	(8.6)	2	(28.6)	
3	0	(0)	0	(0)	
FGFR1					
0	0	(0)	0	(0)	0.0002^a
1	26	(74.3)	2	(28.6)	
2	9	(25.7)	2	(28.6)	
3	0	(0)	3	(42.9)	
Ki67					
<i>Mediana (Q₁-Q₃)</i>	0.7	(0.2 - 1.9)	22.1	(8.7 - 52.7)	<0.0001^b
CD105					
0	24	(68.6)	2	(28.6)	0.007^a
1	8	(22.9)	1	(14.3)	
2	3	(8.6)	4	(57.1)	
3	0	(0)	0	(0)	

^a Prueba Chi-cuadrada Likeihood Ratio; ^b Wilcoxon Rank Sum Test; Q₁-Q₃: intervalo intercuartil; AC: ameloblastoma convencional; CA: carcinoma ameloblástico

Cuadro 8. Asociación de FGF2 y FGFR1 con Ki67 en AC y CA

	Media de Ki67 (n)	P
AC		
FGF2 puntaje de expresión		
1	1.1 (32)	0.016^a
2	3.2 (3)	
FGFR1 puntaje de expresión		
1	1.2 (26)	0.650^a
2	1.5 (9)	
CA		
FGF2 puntaje de expresión		
1	32.1 (5)	0.491^a
2	19.8 (2)	
FGFR1 puntaje de expresión		
1	31.9 (2)	0.693^a
2	37.2 (2)	
3	20.5 (3)	

^aOneway Anova; AC: ameloblastoma convencional; CA: carcinoma ameloblástico

Cuadro 9. Asociación de FGF2 y FGFR1 con CD105 en AC y CA

	Puntaje de expresión CD105			P
	n (%)			
AC				
FGF2	0	1	2	
1	23 (95.8)	8 (100)	1 (33.3)	0.015^a
2	1 (4.2)	0 (0)	2 (66.7)	
FGFR1				
1	17 (70.8)	8 (100)	1 (33.3)	0.029^a
2	7 (29.2)	0 (0)	2 (66.7)	
CA				
FGF2	0	1	2	
1	2 (100)	0 (0)	3 (75)	0.143^a
2	0 (0)	1 (100)	1 (25)	
FGFR1				
1	1 (50)	0 (0)	1 (25)	0.403^a
2	1 (50)	0 (0)	1 (25)	
3	0 (0)	1 (100)	2 (50)	

^a Prueba Chi-cuadrada Likelihood Ratio; AC: ameloblastoma convencional; CA: carcinoma ameloblástico

7. Discusión

La comparación de la expresión inmunohistoquímica entre AC y CA de los marcadores FGFR1, Ki67 y CD105 arrojó diferencias estadísticamente significativas, observando mayor expresión de estos marcadores en los casos de CA con respecto a los de AC. Esto confirma la existencia de diferencias en cuanto a proliferación celular, angiogénesis y actividad tumoral que pueden presentar estas lesiones y nos brinda nuevas herramientas que podrían orientar el diagnóstico diferencial de las mismas.

El estudio realizado por Nakao y cols. (2013) es el primer antecedente sobre la inmunoexpresión y el posible papel de FGFR1 en AC, en el cual definieron que FGF7 y FGF10 a través de la activación de FGFR1 y FGFR2 estimulan la activación de la vía MAPK permitiendo la fosforilación de ERK 1 y 2, promoviendo así la proliferación celular para el desarrollo y crecimiento del AC (Nakao y cols., 2013). Posteriormente, Fonseca y cols., en 2018 estudiaron la expresión de FGF2 y FGFR1 en AC y observaron aumento en la expresión de FGFR1 en pacientes mayores de 35 años y que su expresión simultánea con FGF2 está asociada a los casos de recurrencia, y sugirieron que esto se debe posiblemente a su participación en la transducción de señales intracelulares como las que participan en la activación de la vía MAPK que regula procesos biológicos como la proliferación, diferenciación y migración celular y en la angiogénesis (Fonseca y cols., 2018). En el presente estudio se observó que los casos de CA presentaron mayor puntaje de expresión de FGFR1 con respecto a AC, lo cual sugiere que este receptor podría estar involucrado en la patogénesis de estas lesiones mediante la interacción con otras moléculas de la vía MAPK, y no necesariamente con FGF2, ya que como observamos en nuestros resultados, FGF2 presentó un puntaje de expresión similar en ambas lesiones, con ligera variación en la tinción, pero sin diferencias significativas, lo que sugiere que este factor podría no

estar relacionado con la patogenia de estas lesiones, sino que su expresión estaría únicamente relacionada con el proceso de diferenciación odontogénica, principalmente en la diferenciación de ameloblastos, gracias a la inducción de los mediadores necesarios para esta diferenciación al interactuar con FGFR1 en el retículo estrellado, lo que en el caso de la odontogénesis ocurre durante el estadio de campana tardía (Cobourne, 1999; So y cols., 2001; Du y cols., 2018). Estos hallazgos en conjunto con la identificación de mutaciones en BRAF y RAS confirman la importancia de la vía MAPK en AC y CA (So y cols., 2001; Sweeney y cols., 2014; Brown y cols., 2014; Pathak y cols., 2017; Fregnani y cols., 2017; Gonçalves y cols., 2017; Fonseca y cols., 2018; Mariz y cols., 2018; Trisolini y cols., 2019; Ellison y cols., 2019; Duarte y cols., 2019).

El marcador de proliferación celular Ki67 ha sido ampliamente estudiado, principalmente para sustentar el diagnóstico, así como para fines de clasificación y estadificación de algunas neoplasias malignas (de Andrade y cols., 2013; Basilio y Pannain, 2015; Juriková y cols., 2016). Nuestro estudio mostró una diferencia estadísticamente significativa al comparar las medianas en el porcentaje de expresión de AC y CA; lo que coincide con otros reportes (Yoon y cols., 2011; Bologna y cols., 2013; Sánchez y cols., 2017; Martínez y cols., 2017). En AC se ha reportado que más del 80% de los casos presentan bajos índices de proliferación celular (menores a 5%), y se ha señalado que los casos que presentan mayor índice de proliferación se han asociado a pacientes del sexo femenino y a tumores mandibulares mayores a 5 cm, multiloculares y recurrentes (Bologna y cols., 2008; Carreón y cols., 2015). Por otro lado, los índices de proliferación en CA son comúnmente superiores al 10%, con medianas de expresión entre 23 y 53% (Bologna y cols., 2008; Hye-Jung y cols., 2011; Carreón y cols., 2015; Fregnani y cols., 2017; Martínez y cols., 2017; Melián y cols., 2022). El estudio de Ki67 para la evaluación del índice de proliferación

celular en lesiones de la región bucal se ha realizado en displasias epiteliales, carcinoma de células escamosas, nevos, melanomas, AC y CA, y ha demostrado ser más sensible para el registro de la actividad proliferativa celular que otros marcadores; sin embargo, al analizar la expresión conjunta con algunos otros marcadores como MCM2, MCM3 y PCNA, se ha observado que en conjunto con MCM2 se podría obtener la tasa de proliferación celular y no solo el número de células que entraron al ciclo celular, lo cual daría mayor certeza a la evaluación del crecimiento tumoral (Torres y cols., 2009; Bologna y cols., 2013; De Andrade y cols., 2013; Carreon y cols., 2015). En el presente estudio observamos que los casos de AC con mayor porcentaje de Ki67 mostraron un mayor puntaje de expresión de FGF2, lo cual podría sugerir una relación entre estos marcadores como indicadores de mayor actividad tumoral. En CA no se observó esta misma asociación, lo cual podría estar relacionado al escaso número de casos de CA incluidos en nuestro estudio, por lo que para confirmar la validez de dicha asociación se tendría que analizar el papel de FGF2 con Ki67 específicamente en esta lesión. A pesar de los resultados significativos en este y otros estudios en lo que se refiere al uso de Ki67 para el diagnóstico, es importante mencionar que no ha sido posible establecer los índices de proliferación exactos que nos permitan diferenciar entre benignidad y malignidad, y específicamente en casos de AC y CA no se ha podido determinar un punto de corte que permita diferenciarlos claramente, lo cual nos confirma que, aunque para el diagnóstico de estas lesiones la evaluación del índice de proliferación celular es de gran valor, este debe ir acompañado de la evaluación de marcadores asociados con el desarrollo, crecimiento y agresividad de la neoplasia, entre otras características, los cuales en conjunto podrían establecer con mayor precisión el diagnóstico diferencial de estas lesiones.

El marcador de angiogénesis CD105 para la evaluación de la densidad microvascular ha sido poco estudiado en AC y CA (Sánchez y cols., 2017). En el presente estudio observamos mayor densidad microvascular en CA con respecto a AC con diferencias significativas, lo cual coincide con lo reportado por Sánchez y cols., en 2017, en donde compararon la densidad microvascular mediante el análisis de la expresión inmunohistoquímica de CD105 en casos de AU, AC y CA, y encontraron que la densidad microvascular en los casos de AC era mayor en comparación con los casos de AU, mientras que la diferencia entre AC y CA era notablemente mayor (118 vasos/mm² y 213 vasos/mm², respectivamente), lo que permite suponer que el aumento en la densidad microvascular en CA se asocia a una mayor angiogénesis y posiblemente también a un mayor potencial de metástasis (Sánchez y cols., en 2017). En este trabajo encontramos una asociación significativa entre la expresión de CD105 con FGF2 y FGFR1 en AC, en donde a menor puntaje de expresión de estos últimos se presenta menor expresión de CD105, mientras que al aumentar su puntaje se observó una tendencia al aumento de CD105, el cual se sabe que actúa como receptor del TGF- β , mismo que incrementa la sensibilidad celular para el reconocimiento de FGF2 por parte de FGFR1, y actúa como un factor proangiogénico potente, e interactúa con VEGF para promover la proliferación y migración de células endoteliales, y así incrementar la angiogénesis y lifangiogénesis tumoral (Jing y cols., 2016; Nassiri y cols., 2011). La ausencia de resultados similares en CA a los observados en AC, podrían estar relacionados con el escaso número de casos analizados, ya que estudios previos en CA han mostrado sobreexpresión de VEGF y otros marcadores relacionados con angiogénesis y lifangiogénesis (Akl y cols., 2016; Jing y cols., 2016; Sánchez y cols., en 2016; Sánchez y cols., en 2017), sin embargo, se requiere la realización de estudios donde se efectuó la evaluación de marcadores que intervengan en distintas fases de la angiogénesis lo cual podría esclarecer su relación con el desarrollo y comportamiento de AC y CA.

Estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de FGFR1, Ki67 y CD105 se ha asociado al comportamiento tumoral agresivo, mayor riesgo de recurrencia, disminución de la diferenciación celular, mayor riesgo de metástasis y peor pronóstico en distintos tipos de tumores, tales como carcinoma escamocelular bucal, carcinomas de cabeza y cuello, nevos y melanomas orales, cáncer pulmonar, tumores gastrointestinales, astrocitomas, gliomas, y diversos tumores odontogénicos (Nassiri y cols., 2011; Gadobail y cols., 2011; Bologna y cols., 2013; Basilio-de-Oliveira y Pannain., 2015; Carrerón y cols., 2015; González y cols., 2016; Pathak y cols., 2016; Jing y cols., 2016; Sánchez y cols., 2017; Fonseca y cols., 2018; Mariz y cols., 2019; Trisolini y cols., 2019). En el presente estudio esta relación se confirma al observar mayor expresión de estos marcadores en CA en comparación con su expresión en AC, por lo que la evaluación de estos marcadores en conjunto podría ayudar a orientar el diagnóstico diferencial entre ambas lesiones y las asociaciones entre estos marcadores podrían servir como indicadores del comportamiento tumoral.

Dentro de las limitaciones de este trabajo se encuentran el escaso número de casos de CA que conformaron nuestra muestra, lo que puede resultar en una baja potencia del estudio y haga posible que existan diferencias que no fueron identificadas con la muestra analizada; sin embargo, esta limitación es una constante en la mayoría de los estudios de CA debido a la baja frecuencia de esta lesión a nivel internacional. Otra limitante fue la falta de datos clínicos completos y de seguimiento en la mayoría de los casos, lo que suele estar asociado a las características propias de un estudio retrospectivo, en el que no hay control sobre el registro completo de la información en cada caso, y al hecho de que existen variaciones debidas a que dichos casos provienen de instituciones de distintos países. A pesar de lo anterior, los hallazgos de la presente investigación destacan la importancia de la evaluación conjunta de marcadores de

precursores y activadores de la vía MAPK, índices de proliferación celular y densidad microvascular, como herramientas útiles que ayudan a una mejor definición del diagnóstico diferencial entre AC y CA.

8. Conclusiones

Los casos de CA presentaron mayor expresión de FGFR1, CD105 y Ki67 en comparación con los casos de AC, lo cual brinda elementos para realizar de mejor manera el diagnóstico diferencial entre ambas y nos permite evidenciar la relación entre la expresión de estos marcadores y la mayor capacidad de angiogénesis y proliferación celular que puede presentar el CA.

Los resultados significativos encontrados al evaluar la asociación entre la inmunoexpresión de FGF2 y Ki67, así como las asociaciones entre la inmunoexpresión de FGF2 y FGFR1 con CD105 en los casos de AC podrían servir como indicadores del comportamiento tumoral, pero destaca la conveniencia de evaluar otros marcadores relacionados con la activación y regulación de la vía MAPK específicamente en procesos de angiogénesis y proliferación celular.

La importancia del diagnóstico de estas lesiones tiene una implicación directa en el pronóstico, la elección del tratamiento y la calidad de vida para el paciente, principalmente al momento de establecer el diagnóstico definitivo, por lo que éste debe realizarse cuidadosamente, considerando inicialmente las características clínico-patológicas y posteriormente la utilización de estos y otros marcadores que han mostrado resultados significativos orientados a determinar si una lesión presenta un comportamiento biológico más agresivo.

9. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo servirán de base para el desarrollo de estudios en los que se evalúen a mayor profundidad, por ejemplo, las asociaciones observadas entre la inmunexpresión de los marcadores FGF2, FGFR1, Ki67 y CD105 con la presencia de mutación BRAFV600E en AC y CA con el fin determinar si podrían ser utilizados como indicadores de comportamiento agresivo o incluso como predictores de transformación maligna, ya que la presencia de esta mutación se asocia con comportamiento menos agresivo y los resultados podrían justificar la utilización de terapias dirigidas, como el caso de los inhibidores de FGFR1 o inhibidores de BRAFV600E.

10. Referencias

- Aigner A, Ray PE, Czubyko F, Wellstein A. Immunolocalization of an FGF-binding protein reveals a widespread expression pattern during different stages of mouse embryo development. *Histochem Cell Biol.* 2002;117:1-11.
- Akl MR, Nagpal P, Ayoub NM, Tai B, Prabhu SA, Capac CM, Gliksman M, Goy A, Suh KS. Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. *Oncotarget.* 2016;7:44735-44762.
- Basilio-de-Oliveira RP, Pannain VL. Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol.* 2015;21:6924-30.
- Bologna R, Mosqueda A, Lopez E, Almeida OP, Carrasco D, Garcia F, Farfan JE, Irigoyen ME, Damián P. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol.* 2008;44:805-11.
- Bologna R, Mosqueda A, Lopez E, de Almeida OP, Carrasco D, Farfán JE, Molina N, Damián P. Comparative expression of syndecan-1 and Ki-67 in peripheral and desmoplastic ameloblastomas and ameloblastic carcinoma. *Pathol Int.* 2009;59:229-33.
- Bologna R, Mosqueda A, Molina N, Mori AD, Sánchez G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18:e174-9.
- Brown NA, Rolland D, McHugh JB, Weigelin HC, Zhao L, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS, Betz BL. Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20:5517-26.
- Carreón RG, Gonzalez R, Molina N, Bologna R. Immunoexpression of Ki-67, MCM2, and MCM3 in Ameloblastoma and Ameloblastic Carcinoma and Their Correlations with Clinical and Histopathological Patterns. *Dis Markers.* 2015;683087:1-8.
- Cobourne MT. The genetic control of early odontogenesis. *Br J Orthod.* 1999;26:21-8.
- de Andrade BA, León JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, de Almeida OP. Expression of minichromosome maintenance 2, Ki-67, and geminin in oral nevi and melanoma. *Ann Diagn Pathol.* 2013;17:32-6.
- Deng L, Wang R, Yang M, Li W, Zou L. Ameloblastic carcinoma: Clinicopathological analysis of 18 cases and a systematic review. *Head Neck.* 2019;41:4191-8.
- Diario Oficial de la Federación [DOF]. 02-04-2014, N. 2, tomo DCCXXVII, p. 89-95. (https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGS_MIS.pdf).

- Du W, Du W, Yu H. The Role of Fibroblast Growth Factors in Tooth Development and Incisor Renewal. *Stem Cells Int.* 2018;7549160.
- Duarte FF, Barbosa AM, Gardone J, Baptista GA, Santos AF, Goncalves M, et al. The importance of BRAF-V600E mutation to ameloblastoma metabolism. *J Oral Pathol Med.* 2019;48:307-14.
- Duff S, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential application. *FASEB J.* 2003;17:984-92.
- Effiom OA, Ogundana OM, Akinshipo AO, Akintoye SO. Ameloblastoma: current etiopathological concepts and management. *Oral Dis.* 2018;24:307-16.
- El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO Classification Head and Neck Tumours. 4TH edition. Lyon: IARC Press; 2017.
- Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW, Onar-Thomas A, Pfister SM, Reifenberger G, Louis DN. cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAFV600E mutation. *Acta Neuropathol.* 2019;137:683-687.
- Faden DL, Algazi A. Durable treatment of ameloblastoma with single agent BRAFi Re: Clinical and radiographic response with combined BRAF-targeted therapy in stage 4 ameloblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2016;109:djw190.
- Fernandes GS, Girardi DM, Bernardes JPG, Fonseca FP, Fregnani ER. Clinical benefit and radiological response with BRAF inhibitor in a patient with recurrent ameloblastoma harboring V600E mutation. *BMC Cancer.* 2018;18:887.
- Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M. Emerging Role of Endoglin (CD105) as a Marker of Angiogenesis with Clinical Potential in Human Malignancies. *Curr Cancer Drug Targets.* 2003;3:427-32.
- Fonseca FP, Monteiro Benites B, Soares CD, de Lima Morais TM, do Amaral-Silva GK, de Almeida OP, Soares FA, Fregnani ER. Prognostic importance of FGF2 and FGFR1 expression for patients affected by ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2018;47:417-424.
- Fonseca FP, Paes O, Agustin P, Goncalves F, Sirotheau F, Rebelo HA. Ameloblastic carcinoma (secondary type) with extensive squamous differentiation areas and dedifferentiated regions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;121:e154-61.
- Fregnani ER, Perez DE, Paes de Almeida O, Fonseca FP, Soares FA, Castro-Junior G, Alves FA. BRAF-V600E expression correlates with ameloblastoma aggressiveness. *Histopathology.* 2017;70:473-484.

- Gadbail AR, Hande A, Chaudhary M, Nikam A, Gawande M, Patil S, Tekade S, Gondivkar S. Tumor angiogenesis in keratocystic odontogenic tumor assessed by using CD-105 antigen. *J Oral Pathol Med.* 2011;40:263-9.
- Giridhar P, Mallick S, Upadhyay AD, Rath GK. Pattern of care and impact of prognostic factors in the outcome of ameloblastic carcinoma: a systematic review and individual patient data analysis of 199 cases. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017;274:3803-10.
- Goldenberg D, Sciubba J, Koch W, Tufano RP. Malignant Odontogenic Tumors: A 22-Year Experience. *Laryngoscope.* 2004;114:1770-4.
- Gonçalves M, Cavalieri C, Ferreira S, Machado G, Santiago R. Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncol.* 2017;72:165-73.
- González-Galván M, Aguirre-Urizar JM, Bologna-Molina R, Farfán-Morales JE, Gainza-Cirauqui ML, Marichalar-Mendia X, Mosqueda-Taylor A. Assessment of CD-105 as an Angiogenic Modulator in Odontogenic Myxomas and Dental Follicles. *Int J Surg Pathol.* 2016;24:315-9.
- Hallinan N, Finn S, Cuffe S, Rafee S, O’Byrne K, Gately K. Targeting the fibroblast growth factor receptor family in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2015;46:51-62.
- Hendra FN, Van Cann EM, Helder MN, Ruslin M, de Visscher JG, Forouzanfar T, de Vet HCW. Global incidence and profile of ameloblastoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2020;26:12-21.
- Hardy KM, Yatskievych TA, Konieczka J, Bobbs AS, Antin PB. FGF signalling through RAS/MAPK and PI3K pathways regulates cell movement and gene expression in the chicken primitive streak without affecting E-cadherin expression. *BMC Dev Biol.* 2011;21:11-20.
- Ipenburg NA, Koole K, Liem KS, van Kempen PM, Koole R, van Diest PJ, van Es RJ, Willems SM. Fibroblast Growth Factor Receptor Family Members as Prognostic Biomarkers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *Target Oncol.* 2016;11:17-27.
- Jing Q, Wang Y, Liu H, Deng X, Jiang L, Liu R, Song H, Li J. FGFs: crucial factors that regulate tumour initiation and progression. *Cell Prolif.* 2016;49:438-47.
- Juríková M, Danihel Ľ, Polák Š, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem.* 2016;118:544-52.
- Katoh M, Katoh M. FGF signaling network in the gastrointestinal tract (Review). *Int J Oncol.* 2006;29:163-8.

- Katoh M, Nakagama H. FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics. *Med Res Rev.* 2014;34:280-300.
- Kaye FJ, Ivey AM, Drane WE, Mendenhall WM, Allan RW. Clinical and radiographic response with combined BRAF-targeted therapy in stage 4 ameloblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014;107:378.
- Kreppel M, Zöller J. Ameloblastoma-Clinical, radiological, and therapeutic findings. *Oral Dis.* 2018;24:63-6.
- Lee RJ, Tong EL, Patel R, Go LA, Christensen RE. Epidemiology, prognostic factors, and management of malignant odontogenic tumors: an analysis of 295 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120:616-21.
- Leica BIOSYSTEMS. YS201155. Rev A. IMC-1232-REV-A.08-2021.
- Mariz BA, Soares CD, De Carvalho MG, Jorge J. FGF-2 and FGFR-1 might be independent prognostic factors in oral tongue squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2019;74:311-20.
- Mariz BA, Soares CD, Morais TM, Fonseca FP, De Carvalho MG, Jorge J. Expression of FGF-2/FGFR-1 in normal mucosa, salivary gland, preneoplastic, and neoplastic lesions of the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 2018;47:816-22.
- Martínez M, Mosqueda A, Carlos R, Pires FR, Delgado W, Neves R, Aldape B, Paes O. Comparative histological and immunohistochemical study of ameloblastomas and ameloblastic carcinomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22:e324-e332.
- Melián A, Donoso F, Fernández MA, Ortega AV, Mosqueda A. Carcinoma ameloblástico mandibular: un diagnóstico infrecuente y desafiante. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.* 2022;44:44-8.
- Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, Spencer SL. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep.* 2018;24:1105-1112.e5.
- Mosqueda A, Meneses A, Ruíz LM, Suárez ML, Luna K. Malignant odontogenic tumors. A retrospective and collaborative study of seven cases. *Med Oral.* 2003;8:110-21.
- Nakao Y, Mitsuyasu T, Kawano S, Nakamura N, Kanda S, Nakamura S. Fibroblast growth factors 7 and 10 are involved in ameloblastoma proliferation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol.* 2013;43:1377-84.
- Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro LV, Kovacs K, Lloyd RV. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res.* 2011;31:2283-90.

- Ollauri C, Núñez E, Egido C, Silva L, Díaz E, Rodríguez A, López JM, Pericacho M. Continuous endoglin (CD105) overexpression disrupts angiogenesis and facilitates tumor cell metastasis. *Angiogenesis*. 2020;23:231-247.
- Pathak P, Kumar A, Jha P, Purkait S, Faruq M, Suri A, Suri V, Sharma MC, Sarkar C. Genetic alterations related to BRAF-FGFR genes and dysregulated MAPK/ERK/mTOR signaling in adult pilocytic astrocytoma. *Brain Pathol*. 2017;27:580-589.
- Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995;31B:86-99.
- Safadi RA, Quda BF, Hammad HM. Immunohistochemical expression of K6, K8, K16, K17, K19, maspin, syndecan-1 (CD138), α -SMA, and Ki-67 in ameloblastoma and ameloblastic carcinoma: diagnostic and prognostic correlations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;121:402-11.
- Sánchez C, Bologna R, Mosqueda A, Paes O. Immunohistochemical Expression of GLUT-1 and HIF-1 α in Tooth Germ, Ameloblastoma, and Ameloblastic Carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2016;24:410-8.
- Sánchez C, Bologna R, Mosqueda A, Paes O. Immunohistochemical expression of podoplanin (D-40), lymphangiogenesis, and neoangiogenesis in tooth germ, ameloblastomas, and ameloblastic carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2017;46:618-24.
- Sánchez C, Pereira V, Sicco E, Suarez M, Tapia G, Carreón R, González R, Villarroel M, Meleti M, Molina N, Bologna R. Expression of caveolin-1 in tooth germ, ameloblastoma and ameloblastic carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2021;26:e238-e245.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311-22.
- So F, Daley TD, Jackson L, Wysocki GP. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2, and receptors FGFR2 and FGFR3 in the epithelium of human odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*. 2001;30:428-33.
- Soares CD, Borges CF, Sena M, Almeida OP, Stelini RF, Cintra ML, Graner E, Zecchin KG, Jorge J. Prognostic significance of cyclooxygenase 2 and phosphorylated Akt1 overexpression in primary nonmetastatic and metastatic cutaneous melanomas. *Melanoma Res*. 2017;27:448-456.
- Sobecki M, Mrouj K, Camasses A, Parisi N, Nicolas E, Llères D, Gerbe F, Prieto S, Krasinska L, David A, Eguren M, Birling MC, Urbach S, Hem S, Déjardin J, Malumbres M, Jay P, Dulic V, Lafontaine DLj, Feil R, Fisher D. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife*. 2016;5:e13722.

- Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018;127:175-86.
- Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho J, Neahring L, Kwei KA, Qu K, Gong X, Ng T, Jones CD, Varma S, Odegaard JI, Sugiyama T, Koyota S, Rubin BP, Troxell ML, Pelham RJ, Zehnder JL, Beachy PA, Pollack JR, West RB. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat Genet*. 2014;46:722-5.
- Tanner Y, Grose RP. Dysregulated FGF signalling in neoplastic disorders. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;53:126-35.
- Torres A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of MCM2, germinin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2009;100:1128-34.
- Trisolini E, Wardighi DE, Giry M, Bernardi P, Boldorini RL, Mokhtari K, Sanson M. Actionable FGFR1 and BRAF mutations in adult circumscribed gliomas. *J Neurooncol*. 2019;145:241-245.
- Uxa S, Castillo-Binder P., Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K. Ki-67 gene expression. *Cell Death Differ*. 2021;28:3357-70.
- Vered M, Wright JM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. *Head and Neck Pathol*. 2022;16:63–75.
- Yang R, Liu Z, Peng C, Cao W, Ji T. Maxillary ameloblastoma: Factors associated with risk of recurrence. *Head Neck*. 2017;39:996-1000.
- Yoon HJ, Jo BC, Shin WJ, Cho YA, Lee JI, Hong SP, Hong SD. Comparative immunohistochemical study of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112:767-76.
- Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res*. 2005;15:301-16.
- Zhang Z, Coomans C, David G. Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan-supported FGF2-FGFR1 Signaling. *J. Biol. Chem*. 2001;276:41921-9.

Anexos

Anexo 1.

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE FGF2, FGFR1, Ki67 Y CD105 EN AMELOBLASTOMAS CONVENCIONALES Y CARCINOMAS AMELOBLÁSTICOS

FICHA DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Sexo (Femenino ¹ , Masculino ²):	Edad:	Folio:
--	--------------	---------------

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOMORFOLÓGICAS

Diagnóstico (AC ¹ , CA ²):		Localización (Mandíbula ¹ , Maxilar ²):	
--	--	---	--

INMUNOHISTOQUÍMICA

Marcador	FGF2	FGFR1
Score de expresión citoplasmático y membranal		

Marcador	CD105
Score de expresión membranal	

Marcador	Ki67
Porcentaje de expresión nuclear	

Figuras

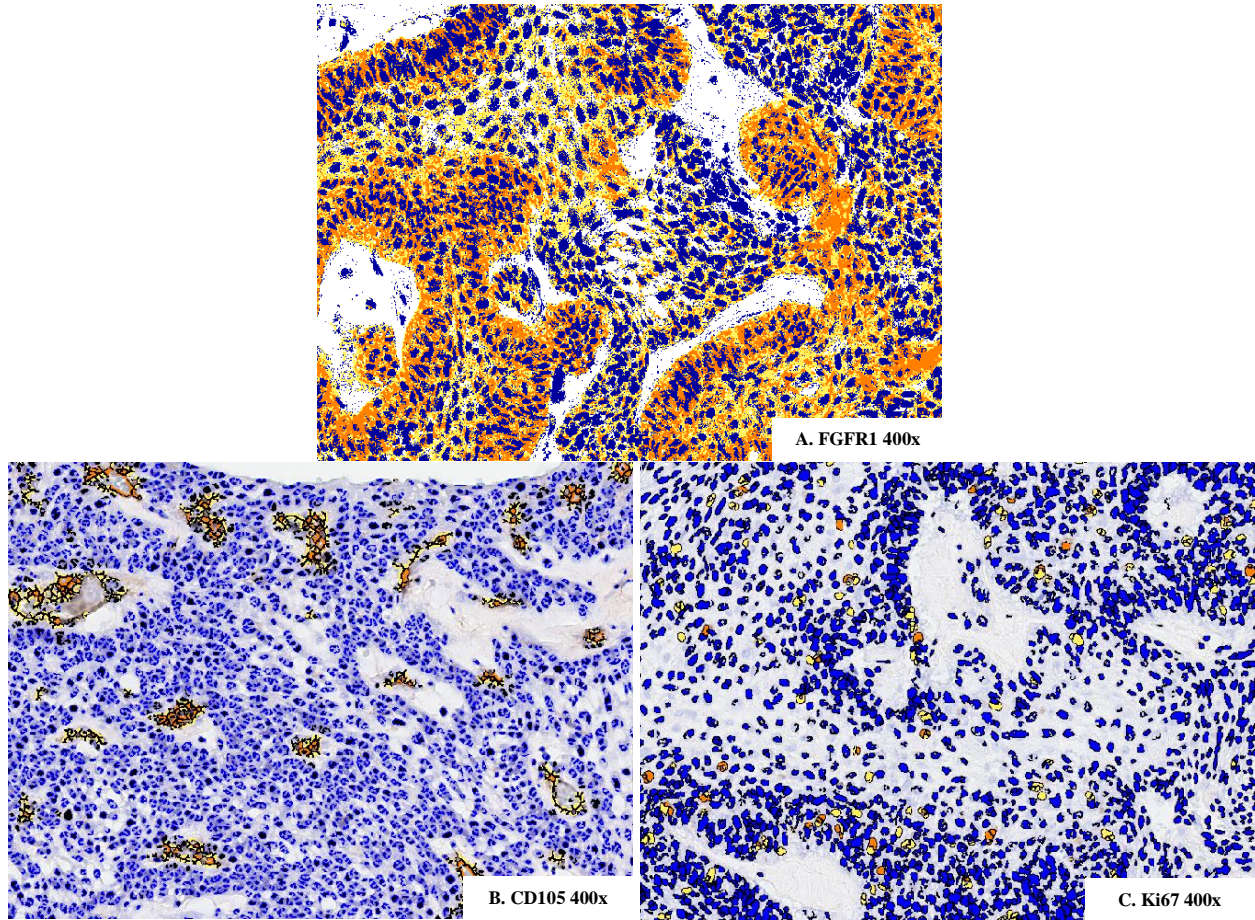


Figura 1. Análisis inmunohistoquímico utilizando el software de visualización Aperio ImageScope, el cual al aplicar algoritmos específicos para los distintos tipos de marcadores nos proporciona la distribución e intensidad de la expresión; esto nos permite identificar la negatividad en color azul, la positividad débil en amarillo, la positividad moderada en naranja y la fuerte positividad en rojo. Estas imágenes nos permiten observar ejemplos aplicando el algoritmo Positive pixel count v9 para el FGFR1 con expresión membranar y citoplasmática en las células tumorales (A), el algoritmo IHC membrane v1 para CD105 con expresión membranar en células endoteliales de vasos sanguíneos (B) y el algoritmo IHC nuclear v1 para Ki67 que presenta expresión nuclear de células tumorales en proliferación (C)

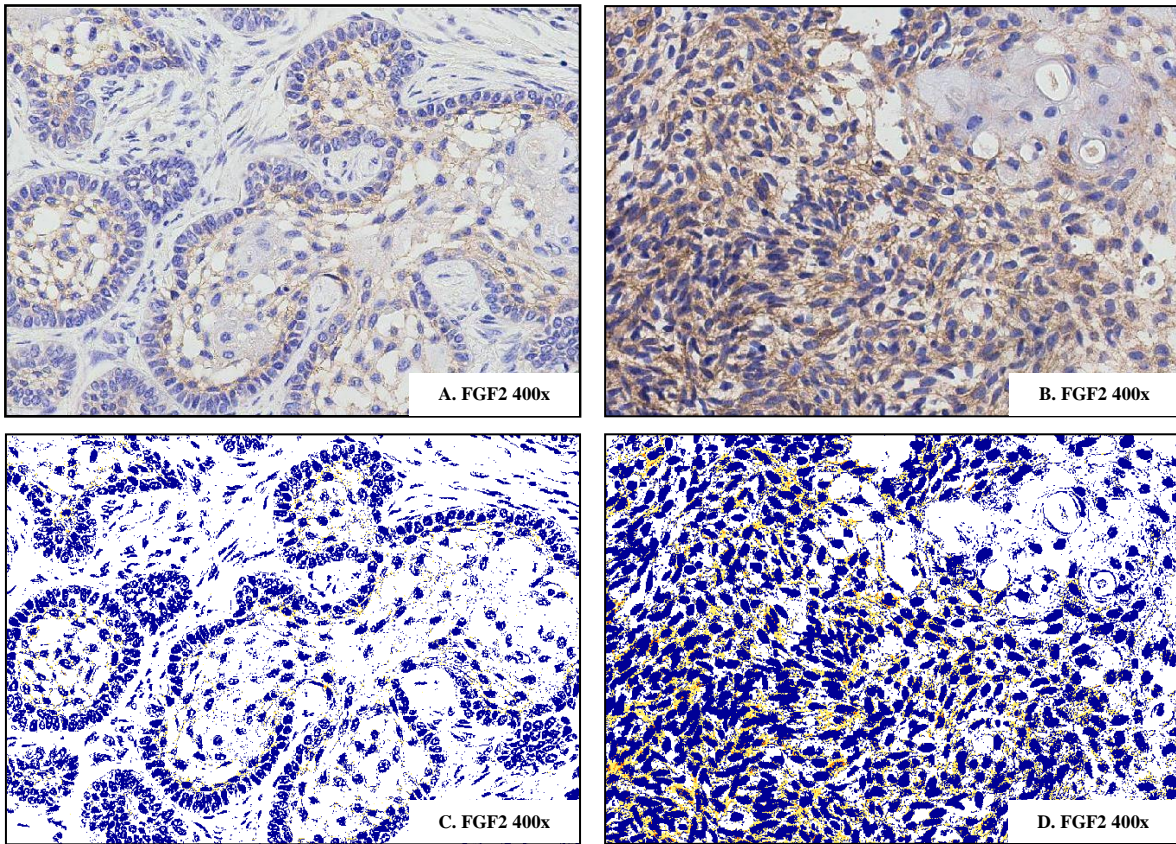


Figura 2. Casos de AC (A) y CA (B) en los que se observa similitud en la distribución e intensidad de la expresión de FGF2 en la membrana y el citoplasma de las células tumorales con un puntaje total de expresión de 1 para ambas lesiones. En C y D se destaca la mayor expresión en células similares al retículo estrellado y escasa expresión en células con diferenciación escamosa

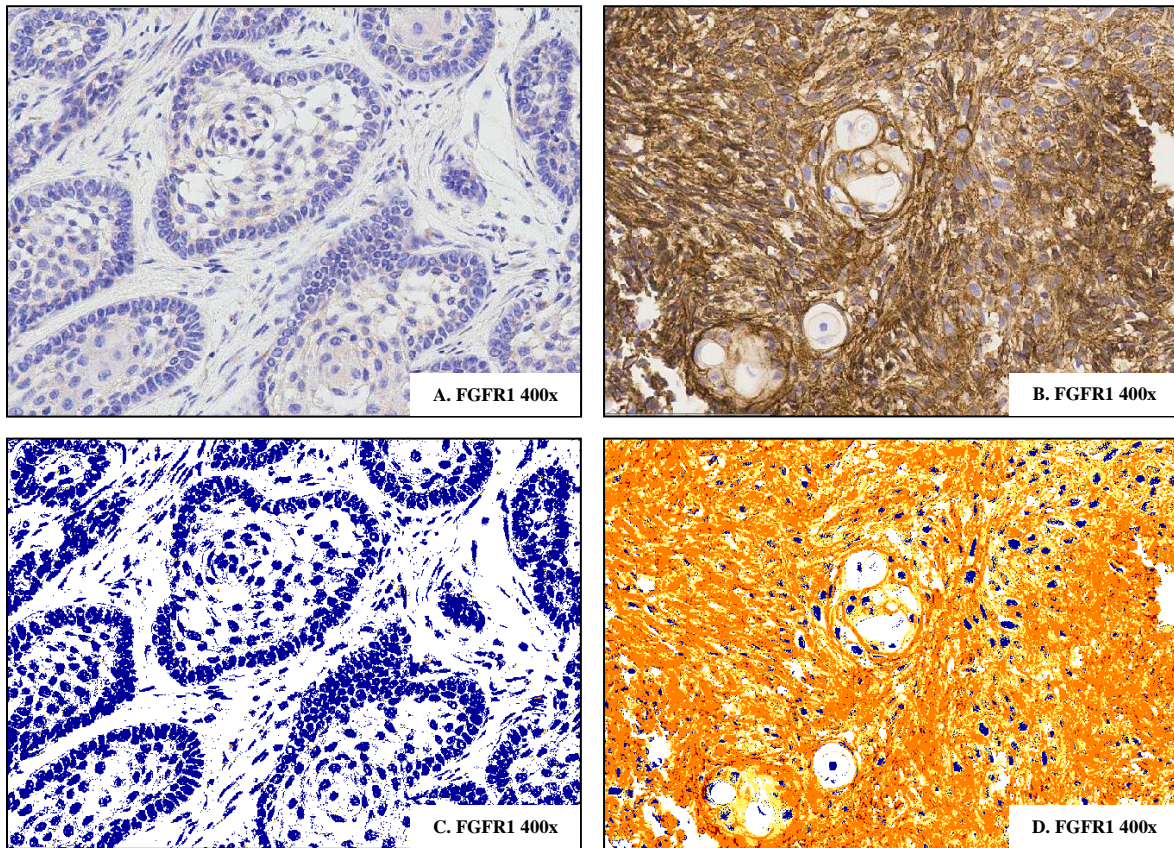


Figura 3. Casos de AC (A) y CA (B) en los cuales se observa la expresión membranal y citoplasmática de FGFR1 en células tumorales. AC (C) presenta un puntaje de expresión de 1 donde la expresión es prácticamente imperceptible, a diferencia de CA (D) que presenta un puntaje de 3 con intensa expresión a lo largo de toda la lesión, mostrando las evidentes diferencias en los puntajes de expresión que permiten diferenciar claramente ambas lesiones ($p=0.0002$)

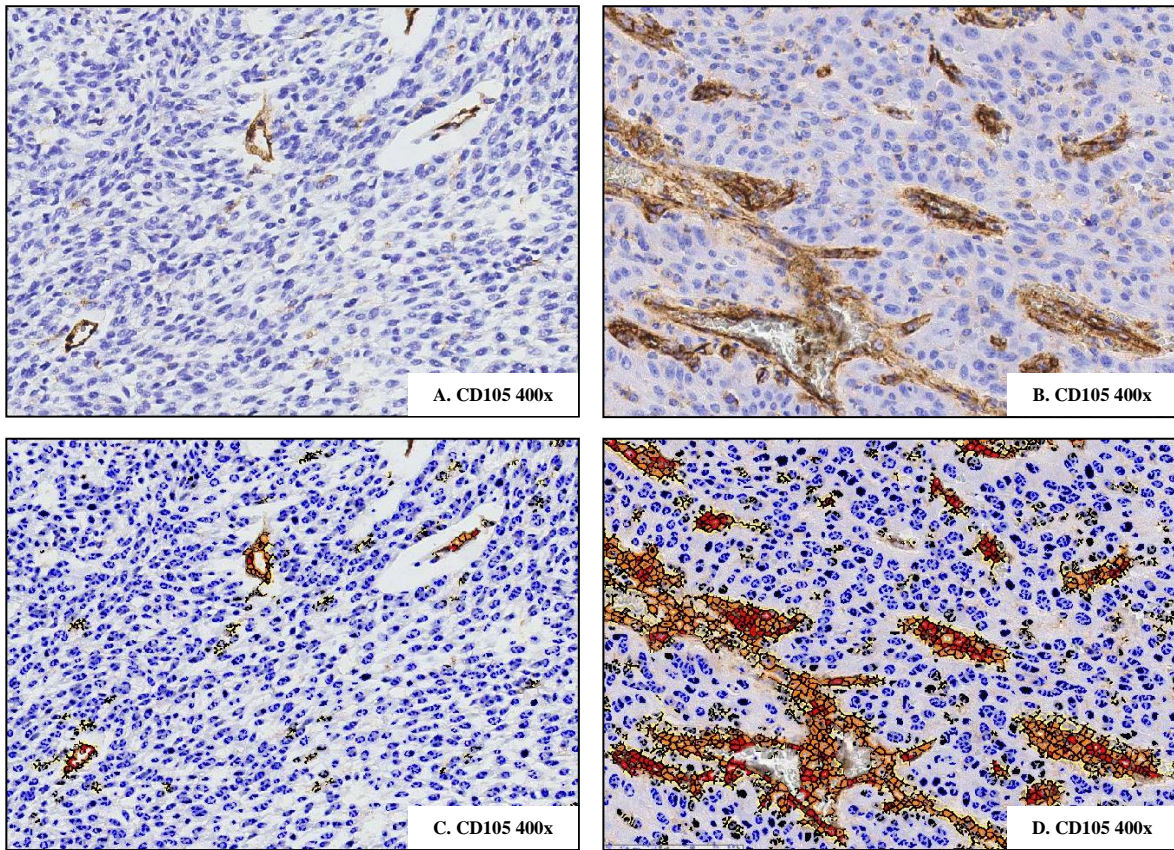


Figura 4. Casos de AC (A) y CA (B) con expresión membranal de CD105 en células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos. Los casos de AC presentan escaso número de vasos sanguíneos, presentando en su mayoría un puntaje de expresión total de 0 (C), a diferencia de los casos de CA que presentan gran cantidad de vasos sanguíneos conformados por células con mayor intensidad de expresión, presentando un puntaje de expresión total de 2 (D), mostrando la evidente diferencia en la microdensidad vascular que pueden presentar estas lesiones ($p=0.007$)

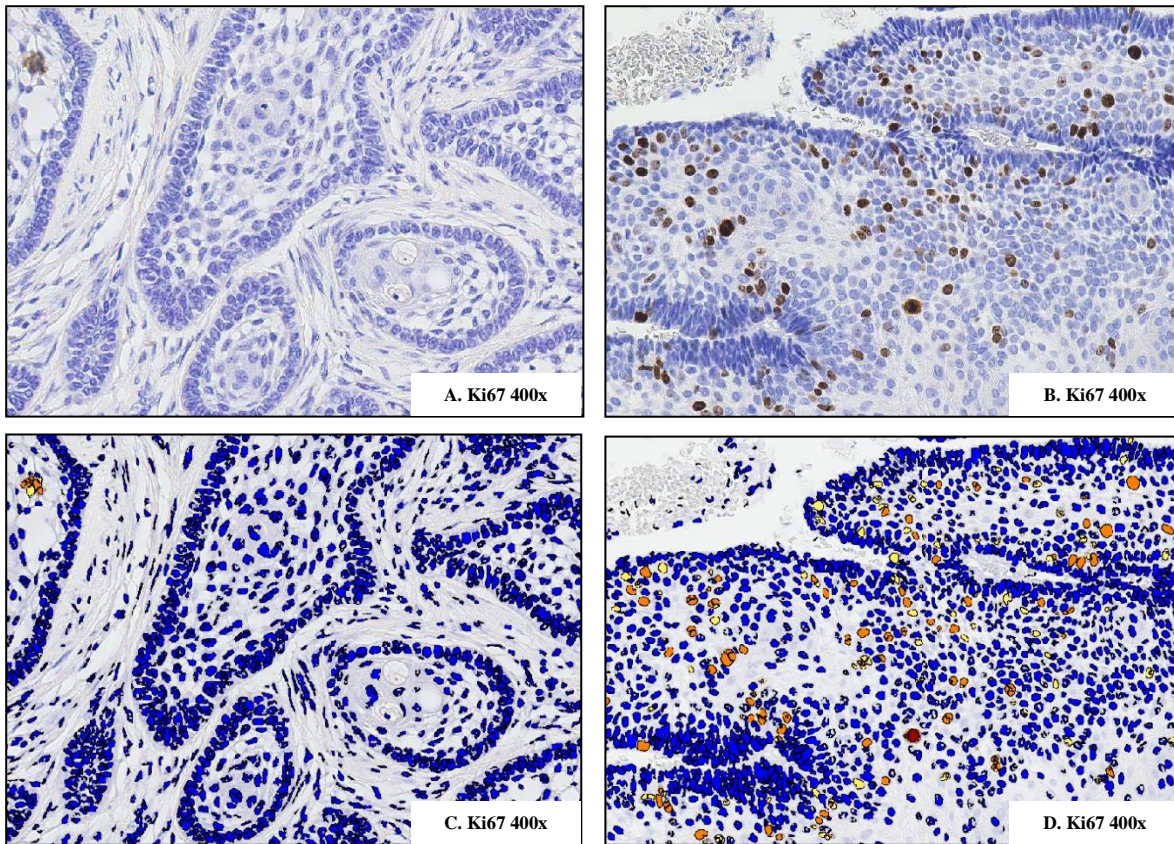


Figura 5. Casos en los que se observa la expresión nuclear de Ki67 en células tumorales de AC (A) y CA (B), la cual nos permite determinar el índice de proliferación celular de cada tumor. Estos casos representan a las medianas de expresión para cada tumor, siendo de 0.7% (Q1-Q3: 0.2 - 1.9) para AC (C) y de 22.1% (Q1-Q3: 8.7 - 52.7) para CA (D), observando diferencias significativas que nos permite diferenciar ambos tumores ($p < 0.0001$)