Mutación en *Smoothened* y su rol en las variantes no malignas del ameloblastoma. Revisión sistemática

Trabajo de Investigación
requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos:
Mauricio Javier Hidalgo Figueroa.
Jimmy Alberto Reyes Becerra.
Nicolás Andrés Richter Contreras

Docente Guía: Prof. Dr. Rodrigo Fuentes Cortés
Cátedra de Patología y Diagnóstico Oral

Valparaíso- Chile
2020

DEDICATORIA.

Quisiera dedicar este trabajo a mi familia, por su amor, por su fuerza y por darme las ganas de seguir cuando más faltaron, a mis amigos, en especial a Gonzalo y Nicole quienes siempre tuvieron palabras para apoyarme y supieron sacarme sonrisas, a mi pareja Mónica quien estuvo ahí para mi siempre que lo necesité, a la cátedra de Patología Oral, quienes abrieron sus puertas a un alumno entusiasta dándole apoyo y conocimientos, al tutor de esta tesis el Dr. Rodrigo Fuentes, quien nunca dudó del grupo de trabajo y siempre tuvo las palabras exactas para guiarnos y culminar finalmente esta linda etapa.

Mauricio Hidalgo Figueroa.

Quisiera agradecer profundamente a mi familia por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por compartir su amor incondicional y un sistema familiar basado en el respeto mutuo y en una sana y horizontal convivencia, que a la larga me enseñó a ver a mis pares como lo que son; una parte de un todo que camina en conjunto en búsqueda del bienestar y de la verdad. Por otra parte quisiera agradecer a mis compañeros de tesis con los cuales se formó un lazo fraterno que inclusive los momentos más estresantes no pudieron romper. Finalmente, no quisiera dejar de lado a mis amigos quienes siempre han estado dispuestos a compartir su vida conmigo, cada uno de ustedes sabe cuánto los quiero.

Jimmy Reyes Becerra.

Este camino me ha costado sangre sudor y lágrimas y creo que si no fuera por mi familia que me ha acompañado incondicionalmente hubiese fracasado rotundamente. Mi madre con su amor sin fronteras me ha impulsado a ser mejor humano y mi padre con su simpleza me ha dado todas las herramientas para ser alguien empático y decente. Mi hermana que me ha enseñado paciencia y comprensión junto a su hermoso hijo Ngaru que logró ganarse mi corazón en el primer instante que llegó a este mundo. A mis amigos que amo con toda mi alma, no tengo palabras suficientes, porque me encargaré de personalmente acercarme a ustedes. Por último agradecer y elogiar a nuestro docente guía, por su vocación y comprensión, me dan más ganas de estudiar y aprender para ser mejor profesional a futuro. Compañeros míos, Jimmy y Mauricio, ustedes saben lo mucho que los amo. Esto es solo el principio de una hermosa amistad y larga vida juntos.

Nicolás Richter Contreras.

AGRADECIMIENTOS.

Quisiéramos al Dr. Rodrigo Fuentes por su acertada y fraterna guía durante este proceso, a la cátedra de Patología Oral, a Maria Pilar por su grata asesoría estadística, al equipo docente de Seminario de Tesis por su disposición y guía.Por otra parte quisiéramos agradecer a los investigadores Kondo, Gurgel, Sweeny y Gültekin junto con su equipo de trabajo, quienes con gran amabilidad nos facilitaron antecedentes para ayudar a mejorar nuestra investigación.

Índice

1. Introducción. 6

Planteamiento del problema. 6

Justificación. 6

2. Marco Teórico. 8

2.1. Ameloblastoma. 8

2.1.1. Ameloblastoma convencional. 9

2.1.1.1. Patrón folicular. 10

2.1.1.2. Patrón plexiforme. 10

2.1.1.3. Patrón acantomatoso. 10

2.1.1.4. Patrón de células granulares. 11

2.1.1.5. Patrón desmoplástico. 11

2.1.1.6. Patrón de células basales. 11

2.1.2. Ameloblastoma uniquistico. 11

2.1.2.1. Ameloblastoma uniquistico luminal. 12

2.1.2.2. Ameloblastoma uniquistico intraluminal. 12

2.1.2.3. Ameloblastoma uniquístico mural. 12

2.1.3. Ameloblastoma periférico. 13

2.1.4. Ameloblastoma metastatizante. 13

2.2. Vía de señalización Sonic Hedgehog (SHH). 14

2.2.1. Estructura de Smoothened (SMO). 15

2.3. Rol de la vía de señalización en la formación de estructuras orales. 16

2.3.1. Formación del tejido dentario. 16

2.4. Rol de la vía SHH en la tumorogénesis. 17

2.4.1. SMO en los tumores odontogénicos. 17

2.4.2. SMO en el ameloblastoma. 18

2.4.3. Inmunoreactividad de SMO y la vía SHH en ameloblastoma. 18

2.5. Técnicas de identificación del gen SMO. 19

2.5.1. Técnicas de secuenciamiento. 19
2.5.1.1. Sanger Sequencing. 19
2.5.1.2. Next generation sequencing (NGS). 19
2.5.1.3. cDNA microarray. 19
2.5.1.4. oligonucleotide microarray. 20
2.5.2. Técnicas de amplificación 20
2.5.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 20
2.5.2.2. Cuantitative real-time PCR (qPCR). 20
2.5.3. Inmunohistoquimica. 21
3. Objetivos 22
3.1. Objetivo general. 22
3.2. Objetivo específico. 22
4. Materiales y métodos. 23
4.1. Búsqueda bibliográfica. 23
4.2. Criterios de inclusión. 24
4.3. Criterios de exclusión. 24
4.4. Formulario de extracción de datos. 25
4.5. Definición de variables de interés. 26
4.5.1. Año de publicación. 26
4.5.2. Tipo de estudio. 27
4.5.3. Número de casos. 27
4.5.4. Presentación clínica del ameloblastoma. 27
4.5.5. Presentación clínica del ameloblastoma con expresión de mutación en SMO. 27
4.5.6. Sexo. 27
4.5.7. Edad. 28
4.5.8. Presentación histológica del ameloblastoma. 28
4.5.9. Ubicación del tumor. 28
4.5.10. Técnica de obtención de la mutación. 28
4.5.11. Sobreexpresión de SMO. 29
5. Resultados 30

5.1. Búsqueda de la literatura. 30
5.2. Evaluación de riesgo de sesgos. 31

5.3. Descripción de los estudios. 37
5.3.1. Año de publicación. 37
5.3.2. Tipos de estudio. 37
5.3.3. Número de casos. 38
5.3.4. Presentación clínica del ameloblastoma. 38
5.3.5. Presentación clínica del ameloblastoma con expresión de mutación en SMO. 38
5.3.6. Sexo. 41
5.3.7. Edad. 41
5.3.8. Presentación histológica del ameloblastoma. 42
5.3.9. Ubicación del tumor. 42
5.3.10. Técnica de obtención de la mutación. 43
5.3.11. Sobreexpresión de SMO. 45

6. Discusión 47
7. Conclusiones 53
8. Sugerencias 54
9. Resumen 55
10. Referencias bibliográfica 56

1. INTRODUCCIÓN

El ameloblastoma es definido por la OMS como una neoplasia benigna [25] localmente agresiva [12], siendo el tumor odontogénico más común formado a partir de epitelio [5, 12]. La clasificación del año 2017 de la OMS incluye los tipos convencional (sólido/multiquístico), periférico (contraparte extraósea), uniquístico y metastatizante [1, 25]. El 80% de los ameloblastomas se presentan en mandíbula sobre todo en la región del tercer molar, el 20% restante se presenta en maxilar superior [1]. Esta lesión es de crecimiento lento y asintomático, sin signos de inflamación [1]. El tratamiento actual para el ameloblastoma incluye una modalidad conservadora (enucleación y curetaje) [1] y una no conservadora, resección en bloque [1, 4]. La primera resulta en una alta tasa de recidiva mientras que la segunda conlleva una alta deformación facial y morbilidad [1, 4]. La comprensión de la etiología molecular repercute en el entendimiento de la fisiopatología de esta lesión y posibles *targets* para tratamientos farmacológicos, los cuales vendrían a ayudar y posiblemente reemplazar los tratamiento actuales [4].

Dentro de las posibles etiologías del ameloblastoma, la evidencia disponible indica una probable relación entre las mutaciones de los genes encargados de la traducción de BRAF [1,4,30], *Smoothened* (SMO) [1,4], *Epithelial growth factor receptor* (EGFR), KRAS y NRAS [1], teniendo cada uno de ellos una relevancia diferente en la formación del ameloblastoma [1] La literatura no expresa un rol claro de una mutación en SMO en la etiología de las variantes no malignas de un ameloblastoma, algunos autores describen una gran expresión de SMO [8,12], mientras que otros expresan lo contrario [10,13]. A raíz de lo anterior es que se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es el rol de una mutación en Smoothened en la expresión de las variantes no malignas del ameloblastoma?. Dicha interrogante buscará ser respondida mediante una revisión sistemática de la literatura, donde la población de estudio serán artículos que estudien

mutaciones de SMO en muestras de variantes no malignas de ameloblastoma extraídas a partir de humanos.

SMO, es una proteína transmembrana que forma parte de la vía de señalización Sonic hedgehog (SHH) [1, 7]. Esta vía de señalización cumple una función importante en la regulación de la organogénesis [2, 7]. En el desarrollo de los gérmenes dentarios, el ligando SHH se expresa en el componente epitelial, desde ahí regula la proliferación y diferenciación de los ameloblastos [3, 7]. Se ha identificado que células expresan componentes de la vía Hedgehog (HH) en el ameloblastoma (línea celular AM-1), por lo que se sugiere una activación constante de esta vía en dicha patología [3].

Algunos autores denotan una marcada diferencia fenotípica en mutaciones BRAF y SMO, en donde ameloblastomas con mutación BRAF se localizan preferentemente en mandíbula y a menores edades [1,10, 25]; por el contrario, los que presentan mutaciones en SMO ocurren preferentemente en maxilar superior [4,10, 25] y en edades más avanzadas [1]. Respecto a la recurrencia, se identifica en los ameloblastomas con mutación en SMO una tendencia a presentar recurrencias más tempranamente comparado con los que poseen mutaciones en BRAF [4].

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Ameloblastoma.

El ameloblastoma a pesar de tener una incidencia de 0,5 casos por millón de habitantes al año [25], resulta ser el tumor odontogénico más frecuente, representando entre un 11 y 13% de todos los tumores odontogénicos [27], excluyendo los odontomas [25]. La población con ameloblastoma se encuentra en su mayoría entre los 30 a 60 años de edad [28,37] sin evidenciar una predilección por el sexo [25.37]. El desvelamiento de los factores etiológicos del ameloblastoma ha ido evolucionando con los años, sin embargo aún no ha sido dilucidado completamente. Se ha propuesto la idea de que determinados factores moleculares y genéticos, que promueven la oncogénesis de epitelio odontogénico a ameloblastoma, están fuertemente relacionados con la desregularización de múltiples genes [29,36] asociados a vías de señalización, tales como MAPK (Proteína quinasa mitógeno activada) [4, 30, 34,35,36], Sonic Hedgehog (SHH) [7,36], y WNT/β-catenin [31]. Estos tumores son tumores de origen epitelial. Teóricamente, podrían surgir de restos de la lámina dental, del órgano del esmalte en desarrollo, del recubrimiento epitelial de un quiste odontogénico o de células basales de la mucosa oral [22,36]. Los ameloblastomas son tumores localmente invasivos de crecimiento lento y de características benignas en la mayoría de los casos [22]. Según la última clasificación del 2017 de la OMS, se reconocen cuatro variantes clínicas y radiográficas diferentes, que merecen consideraciones separadas debido a que poseen manejos terapéuticos y pronósticos distintos [25,37], siendo estas variables: Ameloblastoma convencional, (sólido o multiquístico) que corresponde al 86% de los casos; Uniquístico, 13% de los casos; Periférico (extraóseo), 1% de los casos; y, Metastatizante, con menos del 1% de los casos [22, 25,37].

2.1.1 Ameloblastoma convencional.

También llamado sólido, multiquístico intraóseo, es encontrado en un rango amplio de edad de pacientes, siendo raro en niños menores de 10 años y relativamente poco común entre los 10 y 19 años de edad [22,37]. Muestra mayor prevalencia desde la tercera a la séptima década de edad. No hay predilección por sexo [22,25,37]. Aproximadamente un 80% a 85% de los ameloblastomas convencionales ocurren en mandíbula, más comúnmente en la rama ascendente [25,36,37]. Un 15% a 20% de los ameloblastomas ocurren en maxilar, usualmente en la región posterior [25]. El tumor es mayoritariamente asintomático [22] sin embargo puede presentar lesiones más pequeñas que son detectadas sólo durante el exámen radiográfico [22]. Un aumento de volumen indoloro es la presentación clínica usual [22,25], que después puede presentar crecimiento acelerado [25].De no ser tratado, puede crecer lentamente hasta formar una lesión de gran tamaño [22,36] y generar complicaciones como movilidad dentaria, maloclusión, apertura bucal disminuida, parestesia, dolor, invasión de tejido blando, deformidad facial, dificultad para masticar y obstrucción de la vía aérea [25].

El rasgo radiográfico característico es la radiolucidez multilocular en formas de pompas de jabón o panal de abejas [22,25,37]. La expansión cortical de las tablas vestibulares/linguales y reabsorción de las raíces de los dientes adyacentes al tumor, resultan comunes [22, 25]. Los ameloblastomas sólidos pueden aparecer radiográficamente como defectos radiolúcidos uniloculares lo que puede confundirse con cualquier tipo de lesión quística [22]. Sin embargo, el margen de estas lesiones presenta un festoneado irregular [22].

El ameloblastoma sólido presenta múltiples presentaciones histopatológicas dentro de las cuales encontramos el patrón folicular y plexiforme como las más comunes [22,37].

Se relatan un tipo de ameloblastoma híbrido o mixto, presentando lesiones que contienen áreas con patrón desmoplástico y otras con patrón sólido [32].

2.1.1.1 Patrón folicular.

Es el más común. Islas de epitelio se asemejan al epitelio del órgano del esmalte en un estroma de tejido conectivo fibroso [22, 25, 29]. Los nidos de epitelio consisten en un núcleo de células angulares dispuestas holgadamente asemejándose al retículo estrellado del órgano del esmalte [22, 25]. Una capa de células columnares altas parecidas a ameloblastos rodea el núcleo central, con los núcleos de estas células localizados en el polo opuesto a la membrana basal (polaridad invertida) [22, 25] y pudiendo experimentar cambios quísticos [25]. En otras áreas, las células periféricas pueden ser más cuboidales y asemejarse a células basales [22].

2.1.1.2 Patrón plexiforme.

Consiste en largas cuerdas que se anastomosan o láminas grandes de epitelio odontogénico [22, 25, 29]**.** Las cuerdas o láminas de epitelio están unidas por células columnares o cuboidales parecidas a ameloblastos, rodeando células epiteliales dispuestas holgadamente [22]. La formación de quistes es relativamente poco común en esta variedad. Cuando esto ocurre, está más asociado a degeneración de estroma que a cambios quísticos dentro del epitelio [22].

2.1.1.3 Patrón acantomatoso.

Ocurre metaplasia escamosa extensa, comúnmente asociada a formación de queratina, en las porciones centrales de las islas epiteliales de un ameloblastoma folicular, el término ameloblastoma acantomatoso es aplicado en algunos casos [22]. Este cambio no indica un curso más agresivo de la lesión, sin embargo; histopatológicamente, una lesión así podría ser confundida con carcinoma de células escamosas o un tumor odontogénico escamoso [22].

2.1.1.4 Patrón de células granulares.

Los ameloblastomas pueden a veces mostrar transformaciones de grupos celulares de lesiones epiteliales a células granulares [22]. Estas células tienen abundante citoplasma lleno de gránulos eosinofílicos que se asemejan a lisosomas ultraestructural e histoquimicamente [22]. Esta variante se ha visto en pacientes jóvenes y en tumores clínicamente agresivos. Cuando este cambio a células granulares es extenso en un ameloblastoma, la designación de ameloblastoma de células granulares resulta apropiada [22].

2.1.1.5 Patrón desmoplástico.

Este tipo de ameloblastoma contiene pequeñas islas y cuerdas de epitelio odontogénico en un estroma altamente colagenizado [22].Tiene predilección en zona mandibular anterior, especialmente la maxila [25]. Puede presentar radiolucidez mixta y apariencia radiopaca asemejándose a una lesión fibro-ósea [25].

2.1.1.6 Patrón de células basales.

Este patrón es el menos común. Estas lesiones están compuestas por nidos de células basaloides uniformes y son parecidas histopatológicamente, al carcinoma de células basales de la piel [22]. No hay presente un retículo estrellado en las porciones centrales de los nidos. Las células periféricas de los nidos tienden a ser cuboidales más que columnares [22].

2.1.2 Ameloblastoma uniquístico.

Es más común verlo en pacientes jóvenes, con una edad promedio de 26 años [33]. Son el 5 - 22% de todos los ameloblastomas [25]. Más del 90% de ameloblastomas uniquísticos son encontrados en mandíbula, usualmente en regiones posteriores [22] y los casos maxilares en regiones posteriores [25]. La lesión

presenta una expansión asintomática [25, 33]. En muchos pacientes, esta lesión aparece como una radiolucidez circunscrita que rodea la corona de un tercer molar inferior no erupcionado, pareciéndose clínicamente y radiográficamente a un quiste dentígero [22, 25]. El diagnóstico final sólo es posible después de un estudio microscópico [22]. La reabsorción radicular es común y la perforación de tablas está presente en aproximadamente un ⅓ de los casos [25]. Se describen tres variables histopatológicas del ameloblastoma uniquístico [22, 25].

2.1.2.1 Ameloblastoma uniquístico luminal.

El tumor está confinado a la superficie luminal del quiste [22]. La lesión consiste de una pared quística fibrosa con un revestimiento que consiste total o parcialmente de epitelio ameloblástico [22, 25]. Esto demuestra una capa basal de células columnares o cuboidales con núcleos hipercromáticos que muestran polaridad invertida y vacuolización citoplasmática basilar [22, 29]. Las células epiteliales suprayacentes están libremente cohesivas y parecen retículo estrellado [22].

2.1.2.2 Ameloblastoma uniquístico intraluminal.

Uno o más nódulos de ameloblastoma se proyectan desde el revestimiento quístico hacia el lumen del quiste [22, 25]. Estos nódulos pueden ser relativamente pequeños o llenar el lumen quístico [22]. En algunos casos, el nódulo de tumor que se proyecta hacia el lumen, demuestra un patrón edematoso y plexiforme, el cual se asemeja al patrón plexiforme visto en el ameloblastoma convencional [22, 25].

2.1.2.3 Ameloblastoma uniquístico mural.

La pared fibrosa del quiste está infiltrada por ameloblastoma plexiforme o folicular [22, 29]. La extensión y profundidad de la infiltración ameloblástica puede variar considerablemente [22]. Con cualquier presunto ameloblastoma uniquístico, múltiples secciones a través de varios niveles del espécimen son necesarias para

descartar la posibilidad de invasión mural de células tumorales [22]. Aproximadamente la mitad a ⅔ de los ameloblastomas uniquisticos son murales y presentan un comportamiento más agresivo, similar al ameloblastoma convencional [25].

2.1.3 Ameloblastoma periférico.

Es el menos común y probablemente surge de restos de lámina dental debajo de la mucosa oral o de células epiteliales basales de la superficie epitelial [22]**.** Histopatológicamente, estas lesiones tienen los mismos rasgos que la forma intraósea del tumor [22, 25]. Son lesiones gingivales o de áreas edéntulas alveolares de base sésil o pediculada no dolorosas, sin presencia de úlceras [22, 25]. Los rasgos clínicos no son específicos y la mayoría de las lesiones son consideradas a representar un fibroma o granuloma piógeno [22]. El tumor se expresa en pacientes en un amplio rango etario, pero la mayoría de casos se han visto en personas de mediana edad, con un promedio de reporte de 52 años [22, 29]. El ameloblastoma periférico se encuentra comúnmente en encía a nivel posterior o en mucosa alveolar y en zonas mandibulares más que en maxilar [22, 25]. El ameloblastoma periférico tiene islas de tejido epitelial ameloblástico ocupando la lámina propia debajo de la superficie epitelial [22]. El epitelio proliferativo puede mostrar rasgos descritos en un ameloblastoma convencional; con patrones plexiformes o foliculares siendo los más comunes [22, 25, 29].

2.1.4. Ameloblastoma metastatizante.

Corresponde a un tipo de ameloblastoma que sufrió metástasis a pesar de tener apariencia histológica benigna [25]. Raramente, un ameloblastoma posee un comportamiento maligno con desarrollo de metástasis con una incidencia de 1.79 casos por 10 millones de habitantes [25]. Este tipo de ameloblastomas han sido observados en pacientes con rango de edad entre 4 a 75 años con un promedio de 30 años [22]. Es más común en mandíbula que en maxilar y la lesión primaria es

un ameloblastoma del tipo convencional [25]. La metástasis es más común en pulmones, y menos común en linfonodos cervicales y hueso [22,25, 29].

2.2 Vía de señalización Sonic Hedgehog (SHH).

Smoothened (SMO) es una proteína con 7 dominios transmembrana que forma parte de la vía de señalización Sonic Hedgehog (SHH) [1, 7]. PTCH1 es un receptor con 12 dominios transmembrana y forma un complejo/receptor heterodimérico con SMO, el cual es activado por el ligando SHH [7].

SHH es el homólogo de un gen descubierto en Drosophila, se expresa en mamíferos y corresponde a una proteína altamente hidrofóbica [7]. Existen tres formas identificadas en humanos de este ligando, Sonic, Indian y Desert Hedgehog [7]. Las tres son solubles y modificadas a partir de lípidos [7]. PTCH1 mantiene una inhibición constante sobre SMO cuando no está unido a su ligando (SHH) [2], se cree que el dominio de detección de esteroles (SSD) de PTCH1 es importante para la supresión de la actividad de SMO, esto podria ocurrir mediante la eliminación de oxiesteroles, dada por 7-dehidrocolesterol reductasa [2].

Tras la unión de una proteína SHH o una mutación en el SSD de PTCH, la bomba de esteroles se inactiva permitiendo que los oxiesteroles se acumulen y se active SMO [2]. Cuando se libera de la inhibición SMO, se activan la familia de factores de transcripción asociados a Zinc Fingers, Glioma, denominados GLI (GLI1, GLI2 y GLI3) [2. 7] (Figura 1). Aunque no se ha definido completamente cómo se vincula SMO con GLI, se sabe que la acumulación de estos factores de transcripción activados en el núcleo controlan la expresión de los genes diana [2]. Conceição *et al*. expresan; mientras que GLI1 actúa como activador de genes diana, GLI2 actúa como un represor o como un activador transcripcional [5]. Lo anterior se ve complementado por el trabajo de Mishra *et al.* el cual señala que GLI1 induce, GLI3 reprime y GLI2 puede actuar de manera positiva o negativa según los eventos post transcripcionales [7].

2.2.1 Estructura de Smoothened (SMO).

SMO corresponde a una proteína con estructura de receptor acoplado a proteína G (GPCR), tiene siete hélices transmembrana y una pequeña hélice citosólica que se empaca contra la membrana plasmática [23]. Las hélices transmembrana forman un bolsillo hidrofóbico el cual se abre hacia el lado extracelular [23]. Las porciones extracelulares están unidas por varios puentes disulfuro pareciendo que forman una tapa de los dominios transmembrana [23].

Hoy en día se reconocen distintos sitios de unión a ligando dentro del canal hidrofóbico de SMO, lo anterior gracias a la interacción de la estructura cristalina de SMO con varias moléculas pequeñas como LY-2940680, ciclopamina, SANT-1 y SAG1 [23] (Figura 2).

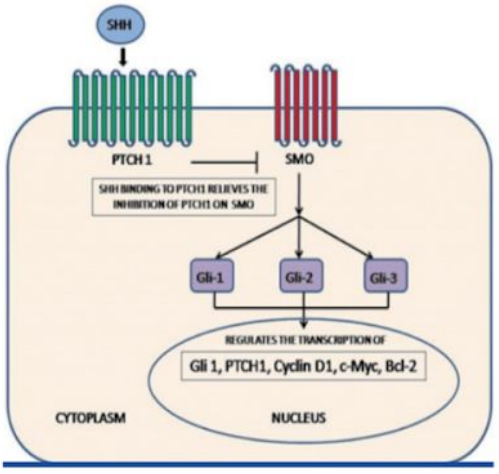

Figura 1. Vía señalización SHH (Fuente:Mishra P, Panda A, et al. Sonic Hedgehog Signalling Pathway and Ameloblastoma - A Review. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(11):ZE10-ZE13).

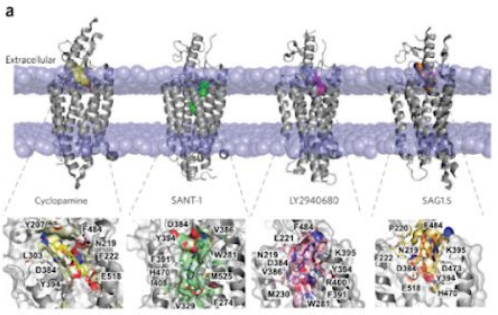

Figura 2. interacciones de moléculas pequeñas con el haz de siete hélices de SMO. Múltiples moléculas pequeñas naturales y sintéticas pueden unirse y modular la actividad de SMO. a) Estructuras cristalinas de SMO unidas a ciclopamina, SANT-1. LY2940680 y SAG1. **Fuente:** Sharpe HJ, Wang W, et al.. Regulation of the oncoprotein Smoothened by small molecules. *Nat Chem Biol.* 2015;11(4):246-255.

2.3 Rol de la vía de señalización en la formación de estructuras orales.

La vía de señalización SHH es fundamental en la regulación del desarrollo embrionario y del crecimiento celular [5], en etapas tempranas de la embriogénesis esta vía tiene un importante rol en el desarrollo de nervios, sistema gastrointestinal, pulmones, glándula pituitaria y dientes [1,6]. Principalmente la vía SHH actúa mediante la activación de la transcripción de genes implicados en los procesos de proliferación, apoptosis y autorregulación celular, los cuales a la vez coordinan el crecimiento de los tejidos embrionarios y mesenquimatosos [6].

2.3.1 Formación del tejido dentario.

Durante el desarrollo embrionario podemos encontrar la interacción de células del ectoderma y mesénquima oral para la producción de una estructura altamente calcificada conocida como diente [7]. En los primeros pasos de este desarrollo podemos encontrar a la lámina dental, estructura que da origen a los brotes o yemas dentales y que expresa la proteína SHH [7, 26]. Hardcastle *et al.* identifican la expresión de PTCH1, SMO y proteínas de la familia GLI como Gli1, Gli2 y Gli3 tanto en el epitelio como en el mesénquima [7, 14, 26], pero SHH solo es detectado en el epitelio [7, 26]. A medida que el diente se desarrolla el epitelio expresa SHH y las células del mesénquima actúan como target de SHH, expresando PTCH1 y Gli1 [7], sumado a lo anterior Gritli-Linde *et al.* sugieren que la vía SHH tiene una actividad de largo rango y está activa durante la comunicación epitelio-mesénquima en la formación dentaria [26]. Esto implica que la actividad de SHH afecta directamente la proliferación celular del epitelio produciendo la aparición de las crestas dentales [7, 26].

El rol regulatorio de la vía SHH en el desarrollo embrionario es confirmado por una parte; por el resultado de las invaginaciones epiteliales ectópicas producidas cuando SHH es localizado en epitelio oral que no corresponde al dental [7] y por otra parte por el menor tamaño resultante en los dientes a los cuales se les fue removida la vía SHH durante el desarrollo temprano. [7].

SHH es expresado a partir de una zona denominada *Enamel Knot* o nudo del esmalte [7, 26]. Lo anterior, en conjunto con la expresión de PTCH y GLI alrededor de las células del germen dental, fortalece la idea del rol de los enamel knot como un centro de señalización y regulación [7]. Por otra parte, ninguno del resto de los genes de la vía SHH son expresados dentro de esta estructura, lo cual fortalece la idea de que la acción final de la vía SHH está en un lugar fuera de los enamel knot [7].

2.4 Rol de la vía SHH en la tumorogénesis.

Diversas vías de señalización participan activamente en la formación de los tejidos embrionarios, pero estas vías se mantienen apagadas en las células adultas [8]. La activación aberrante de los genes que participan en la vía SHH está asociada con la tumorogénesis en humanos y animales [5]. Devilliers *et al.* hace énfasis en que la vía SHH induce carcinogenesis y promueve la supervivencia celular en el cáncer de diferentes órganos [9]. Lo anterior fue sometido a prueba por Kanda *et al.* donde suprimieron la vía con anticuerpo neutralizante de SHH y ciclopamina, el resultado fue una supresión con ambas drogas de la proliferación en células cultivadas a partir de ameloblastomas (AM - 1) [3].

La asociación de esta vía con el desarrollo de neoplasias se observó inicialmente en el síndrome de Gorlin Goltz, principalmente en el carcinoma de células basales [3, 6, 7]. A partir de este hallazgo se ha identificado la activación de la vía SHH en meduloblastomas, rabdomiosarcomas, meningiomas, glioblastoma multiforme, tumores odontogénicos entre otros [7].

2.4.1. SMO en los tumores odontogénicos.

Dentro de los tumores odontogénicos, generalmente la inmunoreactividad para SHH, PTCH, SMO y GLI1 es detectada tanto en el epitelio odontogénico como en la transición epitelio-mesénquima [8]. Los tumores odontogénicos mesenquimales

no muestran expresión positiva, excepto por células epiteliales focalizadas en forma de islas o cordones de la porción central del tumor [8]. El patrón de expresión de SHH, PTCH, SMO y GLI1 muestra diferencias en los subtipos de un mismo tipo de tumor [8].

2.4.2. SMO en el ameloblastoma.

El ameloblastoma es el tumor más común formado a partir de epitelio odontogénico [12]. Gurgel *et al.* comentan que una sobre expresión de los genes SMO, PTCH1, Gli1, CCND1 en el ameloblastoma contribuye al desarrollo y comportamiento biológico de este tumor [6]. Además identifican una activación constitutiva de la vía de señalización SHH, la cual contribuye a la proliferación celular y la sobrevida celular en esta patología [3, 6]. A lo anterior se suma el trabajo Kondo *et al.* y el de Diniz *et al.* que exponen respectivamente que el análisis *advanced next generation sequencing* (NGS) identificó una alta frecuencia de mutaciones BRAF V600E y de SMO L412F en ameloblastoma [11], y que una mutación activa de SMO (principalmente SMOL412F) actúa como un evento tumorigénico influyente en la patogénesis de los ameloblastomas en maxilar superior [10]. El trabajo de Elif Gültekin, *et al.* describe que los ameloblastomas que expresan SMO se presentan a una mayor edad (67 años en promedio) y se localizan principalmente en el maxilar superior [1].

2.4.3. Inmunoreactividad de SMO y la vía SHH en ameloblastoma.

Kumamoto *et al.* y Zhang *et al.* demostraron por inmunohistoquimica que SHH, PTCH, SMO y GLI1 son expresados en todos los casos de ameloblastoma que estudiaron y que la reactividad fue más potente en las células periféricas cuboidales que en las centrales poliédricas [8, 12]. Dichos resultados fueron repetidos en el estudio de Kanda *et al.* [3]. En cuanto a la inmunoreactividad para SMO, la tinción fue poco común en los ameloblastomas de tipo sólido (22%) y fue más frecuente en los de tipo uniquístico (58%). En ambas variantes se detecta principalmente en la capa basal [4,13] y para basal del epitelio [13].

2.5 Técnicas de identificación del gen SMO.

2.5.1 Técnicas de secuenciamiento

2.5.1.1. Sanger Sequencing.

Es la técnica de secuenciamiento más antigua [20]. Sanger expone que este método consiste en que la DNA polimerasa ocupe 2',3' - dideoxitimidina trifosfato (ddTTP) en lugar de ácido timidílico (dT). Debido a que ddT no contiene un grupo 3' - hidroxilo terminal, la cadena no puede seguir extendiéndose a partir de donde se posiciona [19]. Dentro de sus limitaciones encontramos que requiere mucho tiempo, está limitado al uso de largos fragmentos de DNA y es incapaz de detectar fuera de la región contemplada [20].

2.5.1.2. Next generation sequencing (NGS).

Corresponde a un conjunto de técnicas de secuenciamiento que posibilitan hacer una gran cantidad de análisis de forma paralela, con menores costos y mayor rendimiento que su predecesor, sanger sequencing [51, 52]. Realiza una genoteca in vitro donde el ADN genómico se fragmenta en trozos a los que posteriormente se les adicionan adaptadores (secuencias conocidas) que permitirán realizar inmediatamente una amplificación por PCR de los fragmentos, utilizando partidores que son específicos para los adaptadores ligados [51, 52].

2.5.1.3. cDNA Microarray.

Herramienta de análisis genómico diseñada a partir de ácidos nucleicos en forma de cDNA (DNA monocatenario y complementario al RNA mensajero que contiene la secuencia codificante de un gen) que

permite analizar en un solo estudio miles de genes [16]. Cada uno de los puntos del microarray representa un gen y la información que nos genera se refiere al estatus de ese gen en la muestra analizada [16].

2.5.1.4 Oligonucleotide microarray.

Herramienta de análisis genómico diseñada a partir de secuencias cortas de nucleótidos. Permite analizar en un solo estudio miles de genes [16].

2.5.2. Técnicas de amplificación.

2.5.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Técnica que permite obtener, en pocas horas, varios millones de copias de una secuencia blanco de ADN [21]. Requiere de ADN que sirve como molde obtenido a partir de alguna muestra, oligonucleótidos que actúan como cebadores, ADN polimerasa termoestable y desoxirribonucleótidos que se utilizan como sustrato para copiar las cadenas nuevas a partir del molde [21].

2.5.2.1.1. Cuantitative real-time PCR (qPCR).

Derivado a partir del PCR convencional, mide la cantidad de ácidos nucleicos presentes en una muestra de tejido. Permite evaluar la expresión génica en diferentes tipos de tejidos [21].

2.5.3 Inmunohistoquímica

Esta técnica ocupa anticuerpos para detectar proteínas celulares y provee información semicuantitativa sobre la expresión, distribución y localización de una proteína target [24] (Ver figura 3). Los tejidos son seccionados a partir de bloques

embebidos (por ejemplo en parafina o plástico) o congelados [24]. Posteriormente los cortes son evaluados con un anticuerpo primario marcado (detección directa) o más comúnmente con la adición de anticuerpos secundarios marcados (detección indirecta). El marcaje ya sea fluorescente o enzimático es usado para visualizar el complejo antígeno-anticuerpo [24].

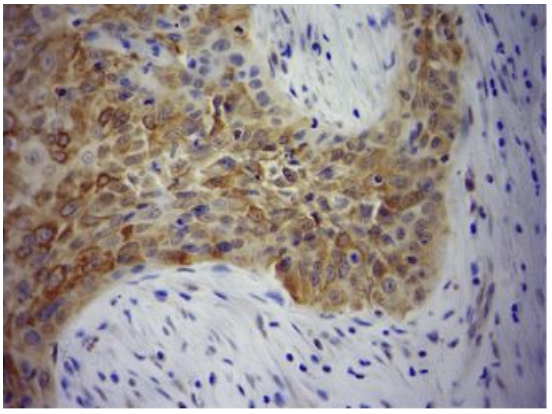

Figura 3. Inmunotinción positiva para PTCH en ameloblastoma. Tinción membranosa y citoplasmática.
Fuente: Farias LC, Gomes CC, Brito JA, *et al.* Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. *Hum Pathol*. 2012;43(8):1229-1233.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.

Reconocer el rol de una mutación en Smoothened (SMO) en la expresión de las variantes no malignas de un ameloblastoma.

3.2 Objetivos Específicos.

- **i.** Identificar la vía por la que SMO influye en la formación de las variantes no malignas de un ameloblastoma.
- **ii.** Asociar características clínicas e histopatológicas de las variantes no malignas de un ameloblastoma que presentan una mutación en SMO.
- **iii.** Reconocer y comparar técnicas empleadas en la determinación de la sobreexpresión de SMO en las variantes no malignas de un ameloblastoma.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Tipo de estudio:** Revisión Sistemática.
- **Universo:** Artículos publicados entre Enero del 2010 y Mayo del 2020 que incluyan muestras de ameloblastomas obtenidos a partir de humanos y que describa una mutación en la vía de señalización Hedgehog.
- **Población objetivo:** Artículos que describen una mutación en SMO en ameloblastomas.

4.1 Búsqueda bibliográfica

La búsqueda de la literatura se realizó en las bases de datos Pubmed, Scopus, Springerlink, Embase y Web of science. Las palabras clave usadas fueron seleccionadas según nuestra pregunta de investigación ceñida al acrónimo PICO (Ver tabla I), estas fueron "SMO", "Hedgehog", "Hedgehog pathway", "Smoothened variants", "Ameloblastoma" y "Epithelial odontogenic tumours". Los términos booleanos implementados fueron and/or para las iteraciones: *"Ameloblastoma"* or *"Epithelial odontogenic tumours"* and *"SMO"* or *"Hedgehog"* or *"Hedgehog pathway"* or *"Smoothened variants"*. Luego del screening de títulos y abstracts los estudios con información útil fueron extraídos para evaluar criterios de inclusión en los full text.

Arquitectura P.I.C.O.	Caracterización	Palabras clave
Población o problema (p)	Pacientes que poseen mutación en Smoothened como factor de riesgo	SMO, Hedgehog, hedgehog pathway, smoothened variants.
Intervención (i)	no aplica.	no aplica.
Comparación (c)	no aplica.	no aplica.
Resultados (o)	Expresión del ameloblastoma	Ameloblastoma, epithelial odontogenic tumours.

Tabla I. Palabras clave seleccionadas según arquitectura P.I.C.O.

Se plantea la siguiente pregunta de investigación; ¿Cuál es el rol de una mutación en Smoothened en la expresión de las variantes no malignas del ameloblastoma?, esta pregunta posee un componente observacional, por lo tanto no aplican la secciones intervención y comparación de la arquitectura P.I.C.O.

Se realizó una búsqueda personalizada adaptando la estrategia de búsqueda para cada base de datos, los detalles de cada llave de búsqueda se encuentran en la tabla II.

Base de Datos	Llave de Búsqueda
Pubmed	(((((SMO[Title/Abstract]) OR Hedgehog[Title/Abstract]) OR "Hedgehog pathway"[Title/Abstract]) OR "Smoothened Variants"[Title/Abstract])) AND ((Ameloblastoma[Title/Abstract]) OR "Epithelial odontogenic Tumours"[Title/Abstract])
Scopus	TITLE-ABS-KEY (*smo*) OR TITLE-ABS-KEY (*hedgehog*) OR TITLE-ABS-KEY (*"Hedgehog Pathway"*) OR TITLE-ABS-KEY (*"Smoothened Variants"*) AND TITLE-ABS-KEY (*ameloblastoma*) OR TITLE-ABS-KEY (*"Epithelial odontogenic tumours"*)
Web of science	TS=(SMO OR HEDGEHOG OR "HEDGEHOG PATHWAY" OR "SMOOTHENED VARIANTS") AND TS=(AMELOBLASTOMA OR "EPITHELIAL ODONTOGENIC TUMOURS")
Embase	(((smo or hedgehog or "hedgehog pathway" or "smoothened variants") and ameloblastoma) or "epithelial odontogenic tumours").ab.
Springerlink	(ameloblastoma OR "Epithelial odontogenic tumours") AND (SMO OR "Smoothened variants" OR Hedgehog OR "Hedgehog pathway")

Tabla II. Bases de datos y llaves de búsqueda.

4.2 Criterios de inclusión

Tres evaluadores independientes revisaron los artículos disponibles, siendo seleccionados una vez cumplieron con estos criterio: 1) Artículos en inglés o español. 2) Artículos con diagnóstico histopatológico confirmado de Ameloblastoma. 3) Estudios con muestras extraídas a partir de humanos. 4) Artículos que precisen la técnica ocupada para determinar la presencia de SMO. 5) Artículos con fecha de publicación desde Enero 2010 hasta Mayo 2020.

4.3 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión fueron: 1) Revisiones sistemáticas y meta análisis, 2) manuscritos de conferencia y resúmenes de otros artículos.

4.4 Formulario de extracción de datos

La recogida de datos fue realizada por tres examinadores independientes identificando y seleccionando aquellos estudios encontrados con las palabras claves escogidas, mediante la lectura del título y resumen. Aquellos estudios en los que no había datos suficientes para tomar una decisión clara, se consideró el informe completo. Discrepancias fueron resueltas mediante discusión entre los examinadores.

Se extrajo la información de cada artículo leyendo los textos completos, para ser revisados y lograr concordancia. Aquellos artículos repetidos entre las bases de datos se dejó solo uno de ellos, descartando las duplicados.

En cada uno de los estudios identificados se extrajeron los siguientes datos: Año de publicación, tipo de estudio, número de casos, presentación clínica del ameloblastoma, presentación clínica del ameloblastoma con expresión de mutación en SMO, sexo, edad, presentación histológica del ameloblastoma, ubicación del tumor, técnica de obtención de la mutación, sobreexpresión de SMO.

Luego de la revisión de cada estudio seleccionado se procedió a contactar vía correo electrónico a los diferentes investigadores con la finalidad de acceder a antecedentes que no estaban disponibles en los documentos publicados. Los datos solicitados fueron aquellos correspondientes a antecedentes generales pertinentes al estudio de ameloblastomas con presentación de SMO, entre estos se cuentan; edad, sexo, localización del tumor, tratamiento, recurrencia y sobre expresión de SMO. Los autores contactados fueron:

1. Gurgel CA, Buim ME, Carvalho KC, et al. Transcriptional profiles of SHH pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(8):619-626.

2. Gültekin SE, Aziz R, Heydt C, et al. The landscape of genetic alterations in ameloblastomas relates to clinical features. *Virchows Arch*. 2018;472(5):807-814.
3. Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, et al. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas [published correction appears in Nat Genet. 2014 Jan;47(1):97]. *Nat Genet*. 2014;46(7):722-725.
4. Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BV, et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol*. 2015;36(7):5649-5653.
5. Kondo S, Ota A, Ono T, et al. Discovery of novel molecular characteristics and cellular biological properties in ameloblastoma. *Cancer Med*. 2020;9(8):2904-2917.
6. Heikinheimo K, Huhtala JM, Thiel A, et al. The Mutational Profile of Unicystic Ameloblastoma. *J Dent Res*. 2018;98(1):54-60.
7. Davanian H, Balasiddaiah A, Heymann R, et al. Ameloblastoma RNA profiling uncovers a distinct non-coding RNA signature. Oncotarget. 2017;8(3):4530-4542.

De los investigadores contactados, Sweeney *et al*., Gültekin *et a*l., Gurgel *et al*. y Kondo *et al.* respondieron a nuestros correos, de estos los 2 primeros adjuntan una tabla de datos, Kondo *et al.* compartió los datos en un correo y Gurgel *et al*. no pudo entregarnos datos debido a que no podía acceder a ellos. No se pudo establecer contacto con DeVilliers P, Suggs C, Simmons D, Murrah V, Wright JT. Microgenomics of ameloblastoma. *J Dent Res*. 2011;90(4):463-469, debido a que el correo de contacto no estaba vigente.

4.5 Definición de variables de interés

4.5.1. Año de publicación:

Variable independiente cuantitativa discreta. Se consignará el año en que fue publicado el artículo.

4.5.2. Tipo de estudio:

Variable independiente cualitativa nominal. Se considera el tipo de estudio que se incluyó en la revisión, siendo este corte transversal y estudio de casos y controles.

4.5.3. Número de casos:

Variable Independiente cuantitativa discreta. Corresponde al número de ameloblastomas incluidos dentro del estudio expresados por cada autor.

4.5.4. Presentación clínica de ameloblastoma:

Variable independiente cualitativa nominal. Corresponde a las variantes clínicas no malignas de un ameloblastoma. Se considerarán los tipos convencional (con), uniquístico (uni), periférico (per).

4.5.5. Presentación clínica del ameloblastoma con expresión de mutación en SMO:

Variable independiente cualitativa nominal. Corresponde a las variantes clínicas no malignas de un ameloblastoma que presenta expresión de alguna mutación en SMO. Se considerarán los tipos convencional (con), uniquístico (uni), periférico (per).

4.5.6. Sexo:

Variable cualitativa nominal. Sexo biológico definido como masculino o femenino del paciente a partir del cual fue extraída la muestra a la cual se logró

identificar alguna mutación en SMO. Se considerarán sexo femenino (F) y masculino (M). Si el artículo no relata sexo del paciente como, No especifica (NE).

4.5.7. Edad:

Variable cuantitativa continua. Edad de los pacientes de los cuales fue extraída la muestra a la cual se logró identificar alguna mutación en SMO.

4.5.8. Presentación histológica del ameloblastoma:

Variable independiente cualitativa nominal. Corresponden a las variantes histológicas no malignas de un ameloblastoma. Se considerarán los subtipos folicular (FOL), plexiforme (PLEX), acantomatoso (ACA), patrón de células granulares (CGR), desmoplástico (DES), patrón de células basales (CBA), luminal (LUM), intraluminal (ILUM), mural (MUR), periférico (PER), mixto (MIX). Si el artículo no relata algún tipo de presentación histológica del ameloblastoma se consignará como, No especifica (NE).

4.5.9. Ubicación del tumor

Variable independiente cualitativa nominal. Se subdividirá en dos, 1) Mandíbula (Man) o maxilar (Max) y, 2) Región anterior (Ant) o región posterior (Post). Si el artículo no relata la ubicación del tumor, se definirá como, No especifica (NE).

4.5.10. Técnica de obtención de la mutación

Variable independiente cualitativa nominal. Corresponde a la técnica con la cual fue reconocida la expresión de SMO en las muestras sometidas a evaluación. Vamos a reconocer Sanger sequencing (sSeq), next generation sequencing (NGS), cDNA microarray (cMic), oligonucleotide microarray (oMic),

reacción en cadena de la polimerasa (PCR), quantitative real time PCR (qPCR), inmunohistoquímica (iHist). Para agrupar estas técnicas se usarán las categorías “secuenciamiento”, “amplificación”, “amplificación + secuenciamiento” y “secuenciamiento + inmunohistoquímica”.

4.5.11. Sobreexpresión de SMO

Variable dependiente cualitativa dicotómica. Corresponde a que tanto se expresa la molécula Smoothened (SMO) respecto a valores de referencia utilizados por cada equipo investigativo. Se considerarán los valores Sí, No y No especifica (NE).

5. RESULTADOS

5.1 Búsqueda de la literatura

La estrategia de búsqueda resultó en 193 artículos, posteriormente. De los 193 artículos resultantes 58 fueron eliminados por ser duplicados (sólo se incluyó una copia de cada artículo), 68 fueron eliminados por no ser atingentes al tema de este artículo. De los 67 artículos restantes se extrajeron de forma manual los artículos que no cumplieran con los criterios de inclusión y que cumplieran con los criterios de exclusión. 5 fueron eliminados debido a que las muestras obtenidas no eran a partir de humanos, 4 eliminados por no incluir a SMO dentro de los genes estudiados a los cuales se aplicaron las pruebas, 5 por no cumplir con ser publicados entre Enero del 2010 y Mayo del 2020. Finalmente 35 fueron eliminados por ser revisiones de la literatura o sistemáticas, 8 fueron eliminados por ser capítulos de libros o resúmenes de conferencias, 2 eliminados por ser corrigendum. Como resultado final 8 artículos fueron seleccionados para realizar este estudio. Este proceso de selección se sintetiza en la figura 4.

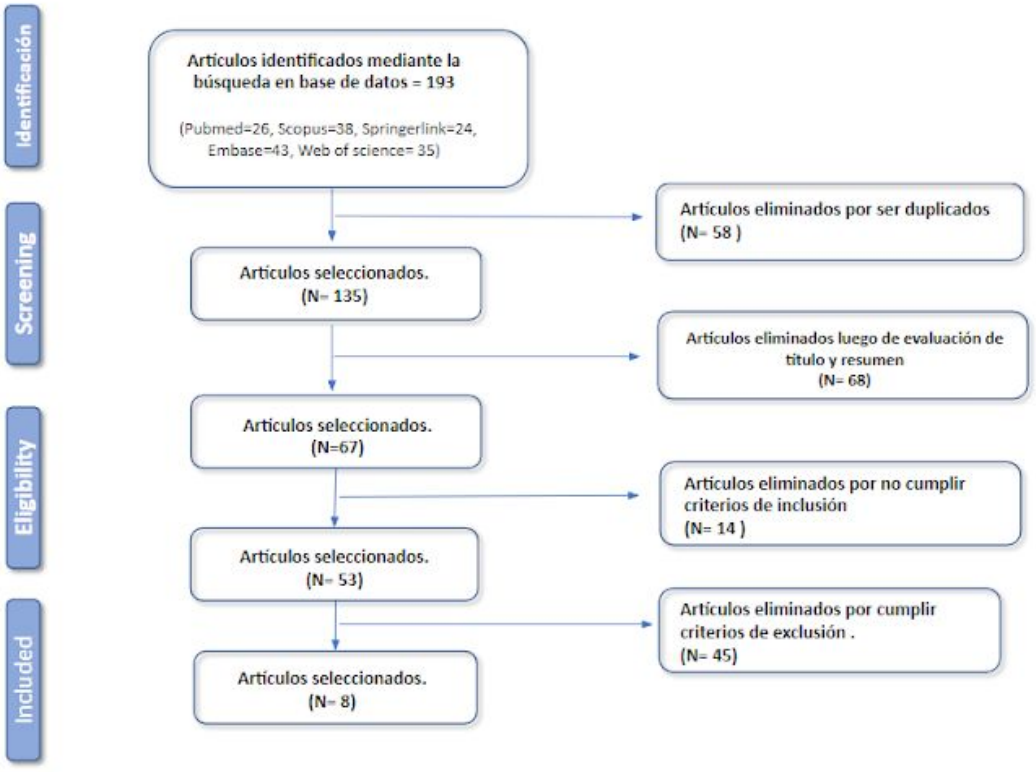

Figura 4. Diagrama de flujo PRISMA.

5.2. Evaluación de riesgo de sesgos.

La evaluación de riesgo de sesgo fue realizada para cada uno de los estudios incluidos. El análisis se realizó mediante la pauta STROBE para estudios de corte transversal (7 artículos) y para estudios de casos y controles (1 artículo). Los criterios de evaluación considerados como intransables son :

- Punto 2: Explica el trasfondo científico y racional para la investigación reportada.
- Punto 3: Establece objetivos específicos, incluyendo cualquier hipótesis preespecificada.
- Punto 5: Describe el ajuste, localización y datos relevantes, incluye periodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recolección de la información

- Punto 8: Para cada variable de interés, describe fuentes de información y detalles del método de medición. Describe métodos de comparación si hay más de un grupo.
- Punto 9: Describe esfuerzos para identificar sesgos**.
- Punto 14: Da características de los participantes del estudio e información de las exposiciones y los confusores.
- Punto 15: Reporta número de resultados y los resume.
- Punto 18: Resume los resultados clave en referencia a sus objetivos.
- Punto 19: Discute limitaciones del estudio, tomando en cuenta potenciales fuentes de sesgo o imprecisión. Discute potencial y magnitud de cualquier potencial sesgo.
- Punto 20: Da una interpretación general cautelosa de los resultados, limitaciones, considerando objetivos, limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otra evidencia relevante.

**Como equipo investigativo se determinaron ciertos tipos de sesgos relevantes a revisar en los artículos seleccionados, tales como, sesgo de selección, sesgo de información y sesgo por falta de sensibilidad de un instrumento. Debido a que el ameloblastoma es una patología con prevalencia baja, en ciertas ocasiones la cantidad de casos no permite realizar un muestreo aleatorio, por lo tanto el sesgo de selección no será considerado. En el caso de la evaluación de riesgo de sesgo por información se consideraron las clasificaciones y consignación de datos en cada estudio para evaluar una precisa categorización de los diferentes ameloblastomas y sus principales características, por otro lado el sesgo por falta de sensibilidad fue evaluado según la técnica de obtención de la muestra y la justificación del uso de cada una. Esto está resumido en la tabla IV.a.

A partir de los puntos considerados de la pauta STROBE se asegura una validez mínima necesaria entre los artículos seleccionados para la presente revisión sistemática. Dichos criterios fueron agrupados en dominios llave según su relación:

1) Antecedentes relevantes e identificación de objetivos: puntos 2 y 3 de STROBE.
2) Información relevante de las muestras: punto 5 de STROBE.
3) Análisis realizados en cada muestra: punto 8 de STROBE.
4) Descripción clínica y análisis de resultados: puntos 14 (a) y 15 de STROBE.
5) Resultados clave y su interpretación: puntos 18 y 20 de STROBE.
6) Sesgos y limitaciones: puntos 9 y 19 de STROBE.

Lo anterior se analiza con mayor profundidad en la tabla III, donde se describen los criterios utilizados para definir como “bajo riesgo de sesgo”, “alto riesgo de sesgo” y “riesgo poco claro de sesgo”.

	Antecedentes relevantes e identificación de objetivos
Evaluación para bajo riesgo de sesgo	- Indica los objetivos específicos, plantea antecedentes relevantes y contextualiza la investigación.
Evaluación para alto riesgo de sesgo	- No indica los objetivos específicos ni antecedentes relevantes ni contextualiza la investigación
Evaluación de riesgo poco claro de sesgo	- No indica objetivos específicos pero si antecedentes relevantes o viceversa.
	Información relevante de las muestras
Evaluación para bajo riesgo de sesgo	- Caracteriza presentaciones clínicas de las muestras, datos relevantes, datos de recolección de datos. - Describe el número de muestras, de donde fueron tomadas, como fueron tratadas y el método de obtención. - Estudios Casos y controles: proporciona los criterios de elegibilidad, así como de donde obtuvieron las muestras y la presentación clínica de los casos. Proporciona las razones para la elección de casos y controles
Evaluación para alto riesgo de sesgo	- No describe los puntos anteriormente mencionados, ni proporciona los criterios de elegibilidad solicitados por los estudios.
Evaluación de riesgo poco claro de sesgo	- No cumple a totalidad los puntos anteriormente mencionados o No indica información suficiente para determinar una evaluación de "bajo riesgo" o de "alto riesgo"
	Análisis realizados en cada muestra
Evaluación para bajo riesgo de sesgo	- Define con claridad a que análisis fue sometida cada muestra para la obtención de SMO.
Evaluación para alto riesgo de sesgo	- No define con claridad a que análisis fue sometida cada muestra para la obtención SMO.
Evaluación de riesgo poco claro de sesgo	-No indica información suficiente para determinar una evaluación de "bajo riesgo" o de "alto riesgo"
	Descripción clínica y análisis de resultados
Evaluación para bajo riesgo de sesgo	- Describe claramente la presentación clínica e histopatológica de las muestras, identificando antecedentes tales como sexo, localización. - Describe claramente la presencia de SMO y su sobreexpresión.
Evaluación para alto riesgo de sesgo	- No describe claramente la presentación clínica e histopatológica de las muestras, identificando antecedentes tales como sexo, localización. - No describe claramente la presencia de SMO y su sobreexpresión.
Evaluación de riesgo poco claro de sesgo	- No indica información suficiente para determinar una evaluación de "bajo riesgo" o de "alto riesgo"
	Resultados claves y su interpretación
Evaluación para bajo riesgo de sesgo	- Precisa claramente resultados a partir de análisis de cada muestra, los interpreta y compara con otros estudios.
Evaluación para alto riesgo de sesgo	- No precisa claramente resultados a partir de análisis de cada muestra ni los interpreta o compara con otros estudios.
Evaluación de riesgo poco claro de sesgo	- Indica resultados pero no los interpreta o compara.
	Sesgo y limitaciones
Evaluación para bajo riesgo de sesgo	- Identifica claramente posibles sesgos, e imprecisiones. Advierte y discute limitaciones del estudio.
Evaluación para alto riesgo de sesgo	- No identifica claramente posibles sesgos ni imprecisiones. No advierte ni discute limitaciones del estudio.
Evaluación de riesgo poco claro de sesgo	- Cumple parcialmente los criterios para ser considerado riesgo alto y riesgo bajo.

Tabla III. Definición de riesgo de sesgo alto, bajo y poco claro.

	Sesgo de información	Sesgo de sensibilidad del instrumento	Riesgo de sesgo
Kondo *et al*. 2020			
Heikinheimo *et al*. 2018			
Gültekin *et al.* 2018			
Davanian *et al*. 2017			
Diniz *et al*. 2015			
Sweeney *et al.* 2014			
Gurgel *et al.* 2014			
DeVilliers *et al*. 2011			

Tabla IV.a. Evaluación de sesgo de información y sesgo de sensibilidad del instrumento según cada estudio.

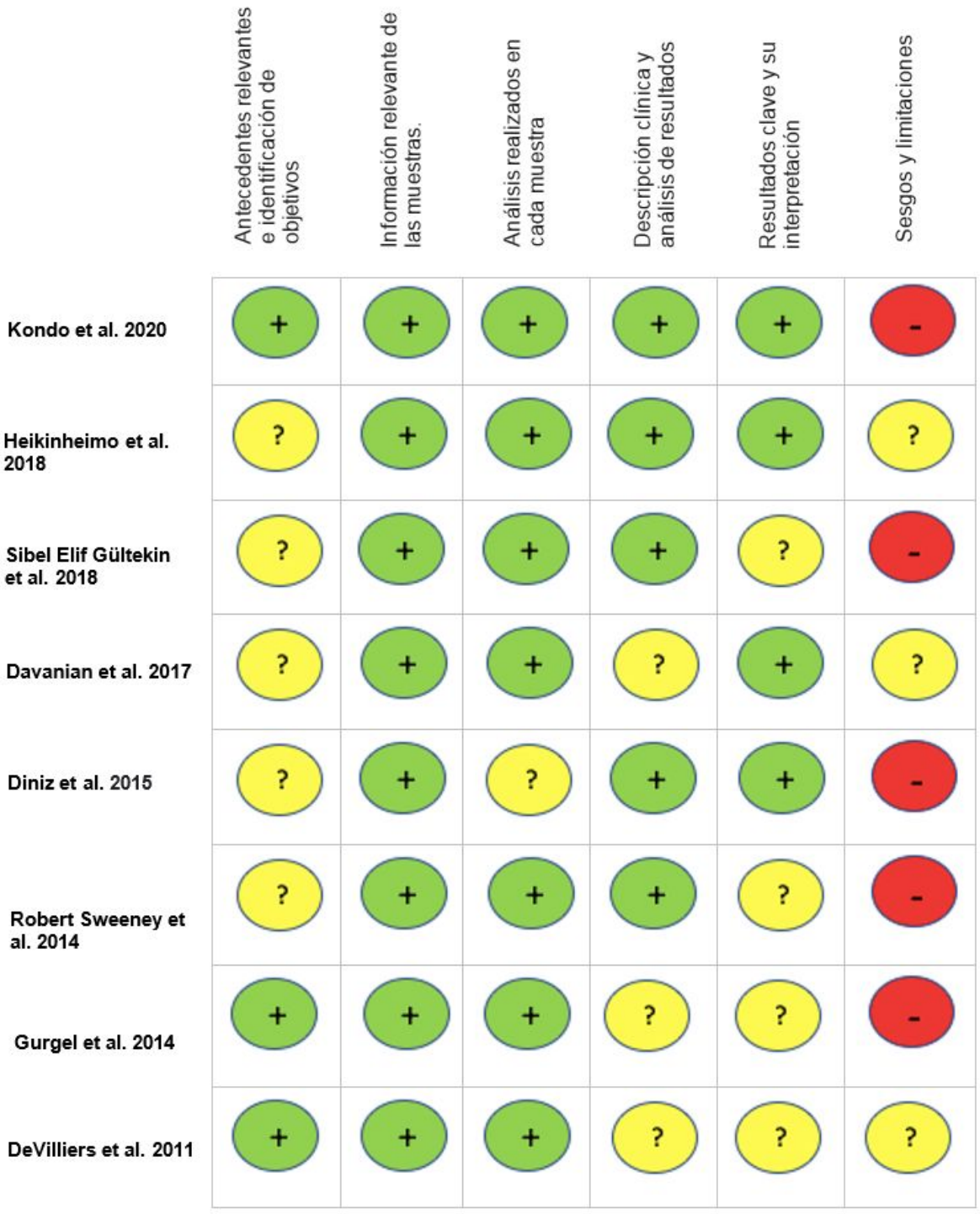

Tabla IV.b. Evaluación de riesgo de sesgo de cada estudio, según cada dominio llave.

5.3. Descripción de los estudios

5.3.1 Año de publicación

A partir de los artículos encontrados, se evaluó la cantidad de ellos según año de publicación y buscador, se obtuvo a partir de las cifras su porcentaje correspondiente. En la Tabla V se resume la distribución por año y buscador de los artículos. Dentro del año de publicación, los artículos seleccionados se encuentran entre el año 2011 y 2020. Entre los años 2014 y 2017 se observa la mayoría de los artículos (62,5%). Se observa que todos los artículos seleccionados fueron encontrados en la base de datos PubMed, algunos de ellos poseían copias en otras bases de datos, pero estas no fueron incluidas (Ver tabla IV).

Año de publicación	Buscador	Total	Porcentaje en años
2011	*Pubmed*	1	12.5%
2014	*Pubmed*	2	25%
2015	*Pubmed*	1	12.5%
2017	*Pubmed*	2	25%
2018	*Pubmed*	1	12.5%
2020	*Pubmed*	1	12.5%
TOTAL	8	8	100%
Porcentaje por buscador	100%	100%	

Tabla V. Distribución de los artículos por año y buscador.

5.3.2. Tipos de estudio

Los artículos incluidos en este estudio se agruparon en dos tipos, corte transversal y casos y controles. Siete de los artículos corresponden a corte transversal (87,5%) y el restante a casos y controles (12,5%).

5.3.3. Número de casos.

Se reportaron un total de 249 muestras de ameloblastomas. Dentro del número de casos incluidos por cada estudio se observa que el 50% de los estudios incorporó entre 5 a 17 muestras y el resto se agrupa en las diferentes categorías. El número mínimo incluido fueron 5 muestras. En el resto de estudios se encontró 7, 11, 17, 28, 41 y 62, llegando a existir como número máximo 78 muestras incluidas en un estudio singular. Lo anterior está resumido en la Tabla VI. La media por artículo es de 31,12 muestras de ameloblastoma, con una desviación estándar de 4,54.

5.3.4. Presentación clínica del ameloblastoma.

La descripción de los tipos de ameloblastoma de cada estudio fue ajustada a la clasificación OMS 2017. Dentro de los artículos incluidos se obtuvo que la mayoría de las muestras corresponden a ameloblastomas de tipo convencional (70,281%), seguido de los uniquisticos (24,9%) y finalmente por los periféricos (2,409%). Existen 6 ameloblastomas los cuales no se definió su presentación clínica dentro de los artículos incluidos (2,409%). Lo anterior está resumido en la Tabla VI.

5.3.5. Presentación clínica del ameloblastoma con expresión de una mutación en SMO.

Dentro de los 249 ameloblastomas, 6 no definen su presentación clínica y por lo tanto no fueron considerados en los siguientes análisis, a partir de esto, de 243 ameloblastomas en los que se define su presentación clínica, 33 (13,58%) expresan una mutación en SMO. A su vez podemos encontrar la mutación en 26 de los 175 ameloblastomas convencionales (14,86%), en 6 de 62 (9,68%) de los ameloblastomas uniquisticos, en 1 de 6 (16,67%) de los ameloblastomas periféricos (Ver figura 4.1).

Al realizar una prueba de proporciones para determinar si existe diferencia significativa entre los porcentajes en los tipos de ameloblastomas con expresión de una mutación en SMO, no se logran apreciar diferencias entre el ameloblastoma convencional y uniquístico (p-valor=0,3121). Por otro lado, entre el ameloblastoma convencional y el periférico tampoco hay diferencias (p-valor=0,8976). Y por último, al comparar los ameloblastomas uniquisticos con los periféricos no hay diferencias (p-valor=0,6824).

Por otro lado, de los 33 ameloblastomas que manifiestan una mutación en SMO, 26 (78,79%) corresponden a la presentación clínica convencional, 6 (18,18%) a uniquisticos, 1 (3,03%) a periférico, esto se ve resumido en la figura 4.2. Por otra parte cabe destacar que 3 estudios no presentan muestras que contengan mutación en SMO (DeVilliers, Diniz y Kondo).

Autor	Convencional	Uniquístico	Periférico	No define	TOTAL
Kondo et al. (2020)	7	0	0	0	7
Heikinheimo *et al*. (2018)	39	39	0	0	78
Gültekin *et al* (2018)	45	11	6	0	62
Davanian *et al*.(2017)	41	0	0	0	41
Diniz *et al* (2015)	11	6	0	0	17
Sweeney *et al* (2014)	23	0	0	5	28
Gurgel et al. (2014)	6	5	0	0	11
DeVilliers *et al*. (2011)	3	1	0	1	5
TOTAL	175	62	6	6	249
Porcentaje	70,28%	24,90%	2,41%	2,41%	100%

Tabla VI. Presentación clínica del ameloblastoma y sus porcentajes.

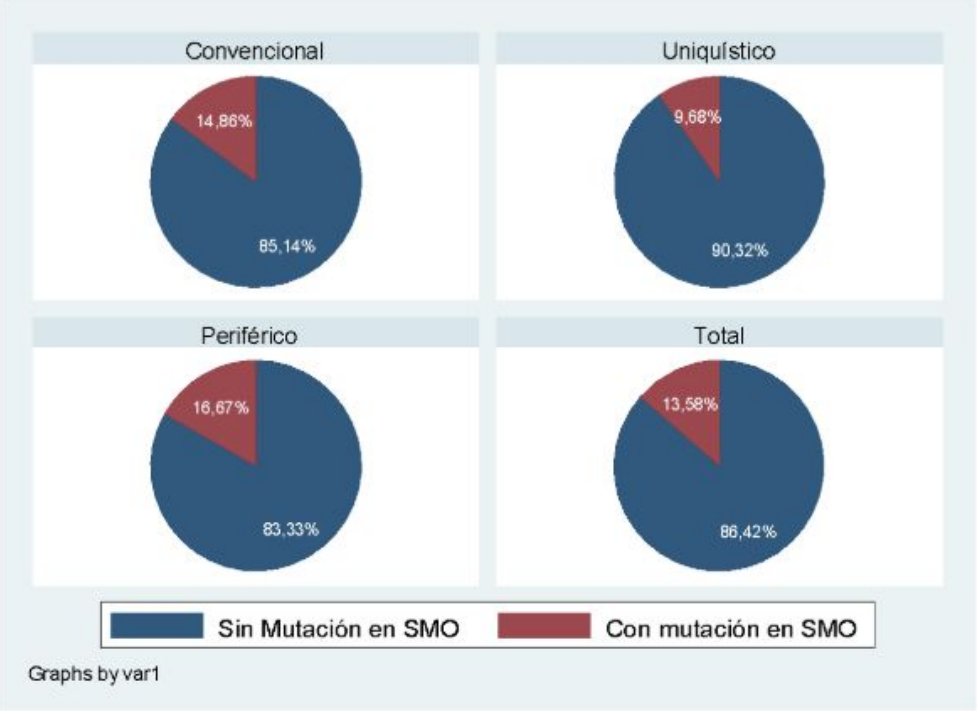

Figura 4.1. Presentación clínica con presencia de SMO a partir del total de ameloblastomas.

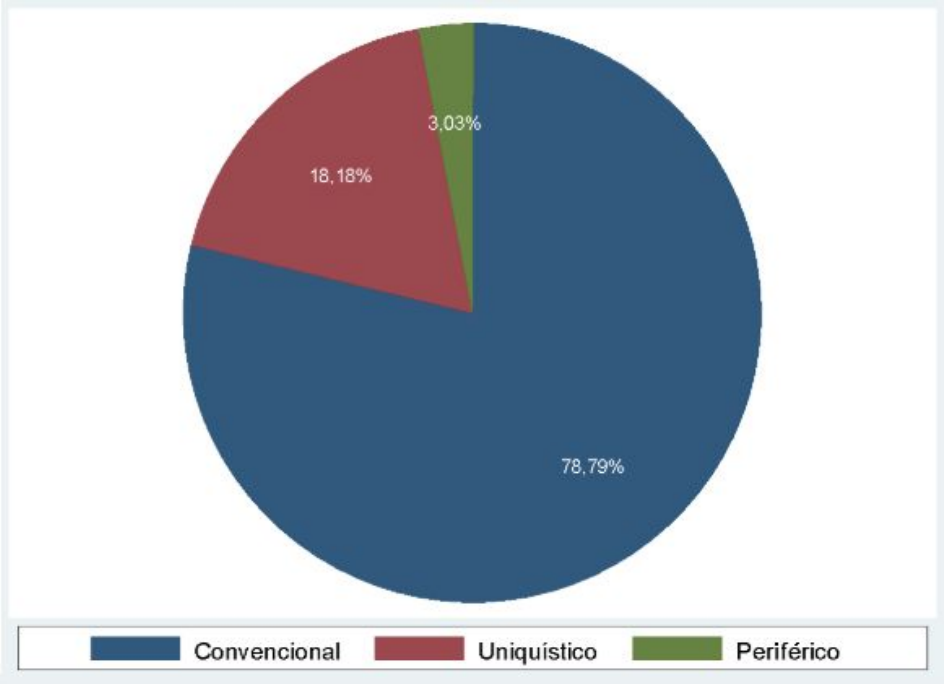

Figura 4.2. Distribución en porcentajes, según presentación clínica con presencia de la mutación SMO. Los valores dentro del gráfico son una representación de los porcentajes de cada presentación clínica de ameloblastomas con presencia de la mutación en SMO.

5.3.6. Sexo.

Dentro de las muestras que presentaban SMO, encontramos 20 pertenecientes a sexo Masculino (60,61%), 11 a sexo femenino (33,33%) y 2 que no especifica (6,06%) (Ver figura 5). Al realizar una prueba de proporciones, se logran apreciar diferencias entre masculino y femenino (p-valor=0,0264).

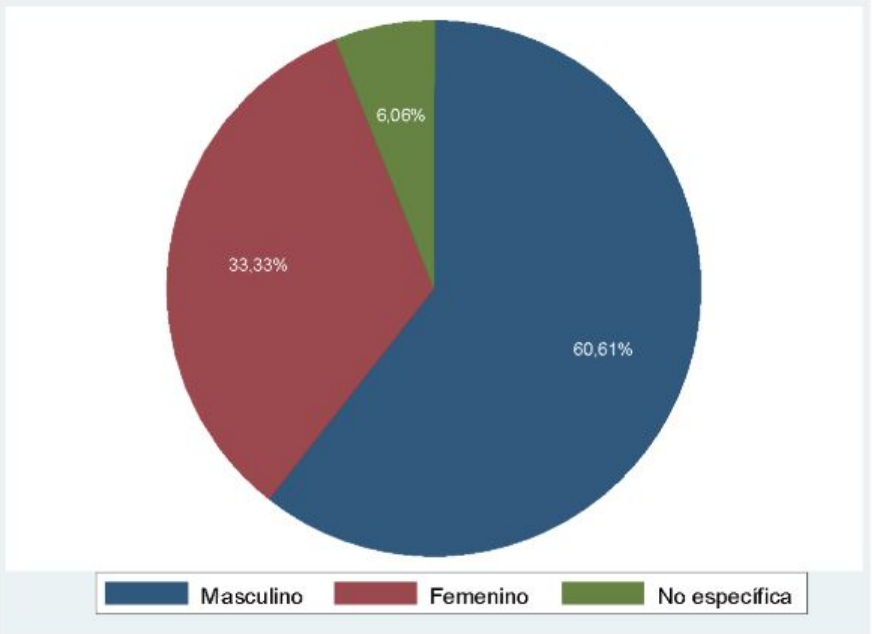

Figura 5. Distribución en porcentajes, según sexo.

5.3.7. Edad.

La edad de los pacientes a los cuales fue extraída la muestra que presentaba una mutación de SMO, fue encontrada tanto de forma específica como en forma de intervalos. A partir de lo anterior 18 de 33 muestras corresponden a personas mayores de 50 años (54,55%), 7 de 33 corresponden a muestras de personas entre 19 y 35 años (21,21%) y 6 de 33 corresponde a personas entre 36 y 50 años (18,18%), por otro lado, sólo 2 no definen la edad (6,06%) (Ver figura 6).

De los estudios de Gültekin *et al*., Sweeney *et al*., Heikinheimo *et al*., se lograron obtener 18 pacientes que presentaban SMO de los que se conoce la edad exacta, el rango de ellos va desde los 29 a 92 años, obteniendo una media de 63,38 años y una desviación estándar de 15,32.

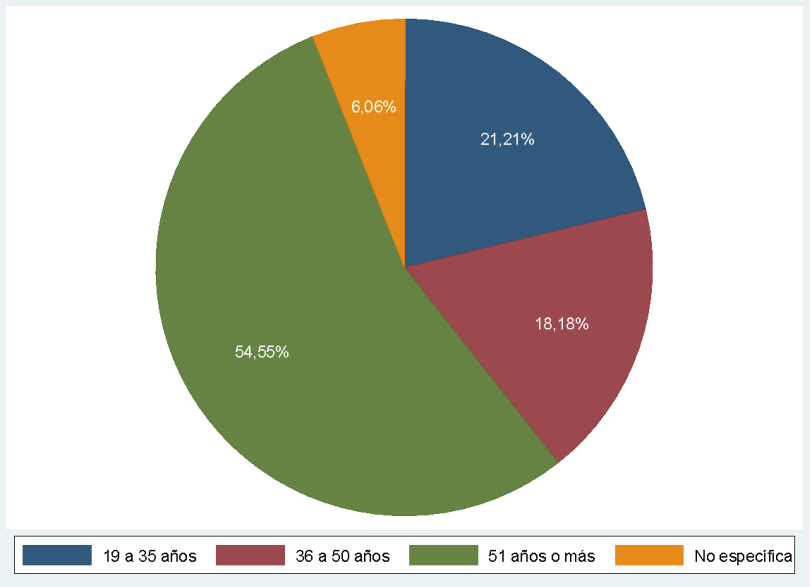

Figura 6. Distribución en porcentajes, según rango etario.

5.3.8. Presentación Histológica.

De los 5 artículos que muestran una presentación clínica con presencia de una mutación en SMO, solo 3 especifican una presentación histológica. Dentro de los 3 estudios se establece que existen 10 muestras con una histología de patrón plexiforme (30,30%), 9 con patrón mixto (27,27%) (este patrón se encontró solo en un estudio), 1 con patrón intraluminal (3,03%), 1 patrón Folicular (3,03%) y 12 no definen el patrón histológico (36,36%) (Ver figura 7).

5.3.9. Ubicación del tumor.

La ubicación de los ameloblastomas que presentaban una mutación de SMO fue variada entre estudios. De los 33 ameloblastomas que se analizaron dentro de esta variable, 17 (51,52%) se ubicaban en maxilar superior y 16 (48,48%) en mandíbula, no existiendo diferencia entre ellos (p-valor=0,8012). En

cuanto a región anterior y posterior, del total de 33, sólo en 19 de ellos (57,6%), está especificado y de estos, 17 (89,5%) se presentan en la región posterior y 2 (10,5%) en la región anterior, sin aclarar el maxilar a cual pertenecen, existiendo diferencia entre ambas regiones (p-valor=0,000) (Figura 8).

5.3.10. Técnica de obtención de la mutación

La obtención de la mutación en SMO se obtuvo de diferentes formas en los diferentes artículos revisados. Se clasificó en las siguientes categorías: “secuenciamiento”, ”amplificación”, “amplificación + secuenciamiento”, “secuenciamiento + inmunohistoquímica”. Dentro de la categoría secuenciamiento se encuentran 3 artículos los cuales a su vez incluyen las técnicas “Sanger sequencing” (2 estudios) y “Sanger sequencing + next generation sequencing” (1 estudio). En la categoría amplificación se encuentran 2 artículos que utilizan la técnica “PCR”. En la categoría amplificación + secuenciamiento se encontraron 2 artículos que incluyen las técnicas “PCR + Sanger Sequencing”. En la categoría “secuenciamiento + inmunohistoquímica” se encontró 1 artículo que ocupa la técnica “oligonucleotide microArray + inmunohistoquímica”. La tabla VII resume la técnica usada para obtener la mutación SMO realizada en cada artículo y la categoría a la cual pertenece.

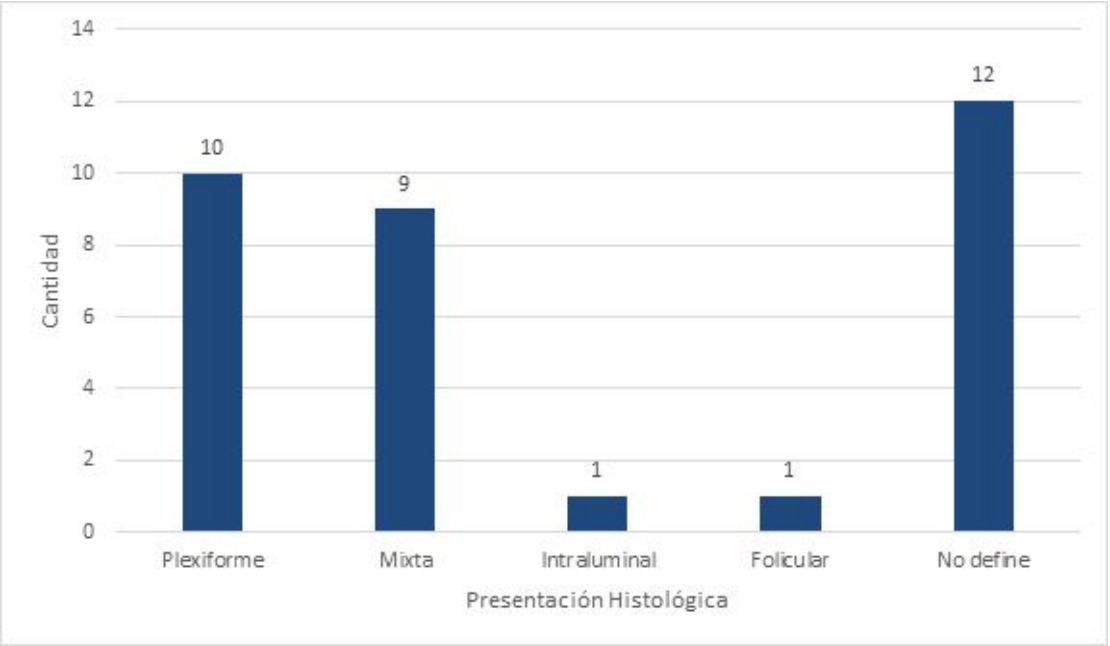

Figura 7. Presentación histológica. Los valores sobre las barras expresan la cantidad respectiva a cada categoría.

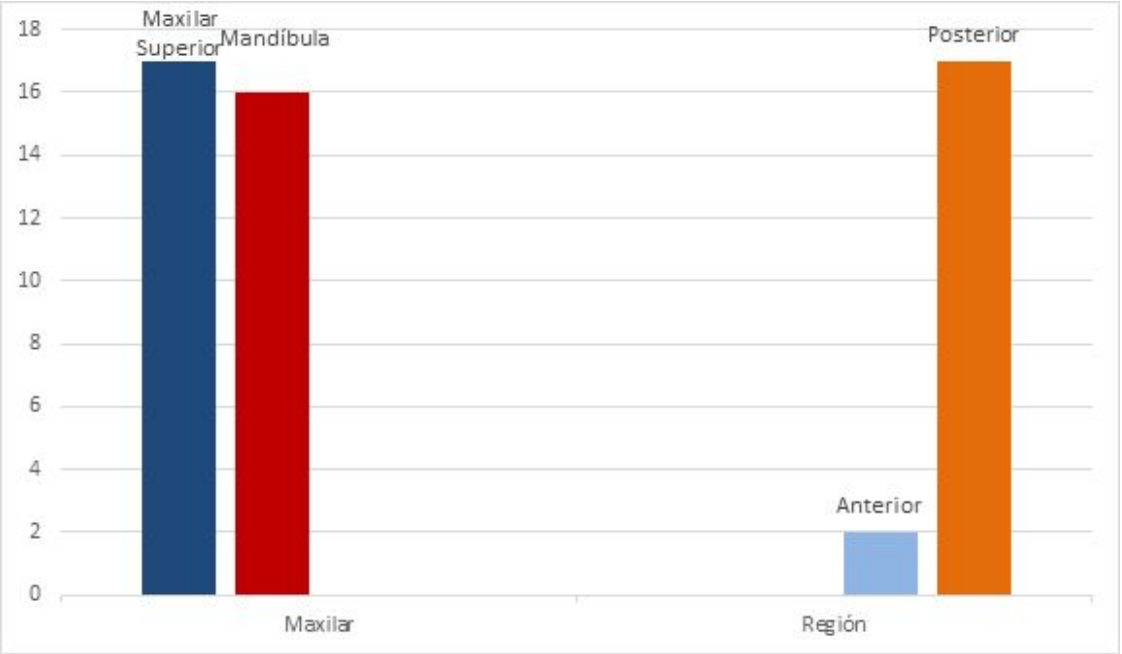

Figura 8. Ubicación del tumor. Representación de la ubicación de los diferentes ameloblastomas. Se expresa por una parte el maxilar en el cual se presentan y por otra si pertenecen a la región anterior o posterior.

Autor	Categoría	Técnica usada
Kondo et al. (2020).	Amplificación	qPCR
Heikinheimo *et al*. (2018).	Secuenciamiento	SSeq + NGS
Gültekin, *et al*. (2018).	Secuenciamiento	sSeq
Davanian *et al*. (2016).	Amplificación + secuenciamiento	PCR + sSeq
Diniz *et al*. (2015).	Secuenciamiento	sSeq
Sweeney *et a*l. (2014).	Amplificación + secuenciamiento	PCR + sSeq
Gurgel *et al*. (2014).	Amplificación	qPCR
DeVilliers *et al*. (2011)	Secuenciamiento + inmunohistoquimica	oMic + iHist

Tabla VII. Técnica usada para la obtención de la mutación según cada estudio. Se subdivide cada estudio en la categoría "secuenciamiento", "amplificación" y "amplificación + secuenciamiento", "secuenciamiento +inmunohistoquímica".

5.3.11. Sobreexpresión de SMO.

Para el análisis de esta variable se agruparon los artículos según la técnica de secuenciamiento utilizada para obtener la mutación de SMO, y la asociación de esta técnica utilizada, con los hallazgos sobre la sobreexpresión de SMO. En 2 artículos cuya única técnica de secuenciamiento de la mutación SMO fue el sSeq se observó la sobreexpresión de la mutación SMO en un artículo, mientras que en el otro se observó que no existía sobreexpresión. Por su lado, 2 artículos que utilizaron solamente qPCR obtuvieron como resultado la sobreexpresión de SMO. En otros dos artículos cuya estrategia fue el uso en conjunto de sSeq y qPCR, uno consigna la sobreexpresión de SMO mientras que el otro no lo consigna. Por otra parte un artículo cuya estrategia fue el uso conjunto de sSeq y NGS no consigna la expresión de SMO. Finalmente un artículo cuya estrategia

fue el uso conjunto de oMic e iHist consignó que no existía sobreexpresión de SMO.

Técnica usada	Sobreexpresión de Smo (+)	Sobreexpresión de Smo (-)	No consigna	Total
sSeq	**1**	**1**	**0**	**2**
qPCR	**2**	**0**	**0**	**2**
qPCR + sSeq	**1**	**0**	**1**	**2**
sSeq + NGS	**0**	**0**	**1**	**1**
oMic + iHist	**0**	**1**	**0**	**1**
Total	**4**	**2**	**2**	**8**

Tabla VIII. Sobreexpresión de SMO según técnica usada para la obtención de la mutación. Los valores dentro de la tabla representan a los artículos que ocupan cada técnica.

6. DISCUSIÓN.

La imposibilidad de contar con antecedentes como sexo, edad o antecedentes sistémicos en los casos publicados fue una relevante limitación al momento de reunir la información y desarrollar el análisis. En cuanto a SMO como un evento único, no logramos determinarlo por falta de precisión en este tópico. Además, la variedad de herramientas de medición para detectar la mutación, así como la falta de estudios que comparen las diferentes técnicas de obtención de una sobreexpresión, se presentó como una dificultad al tratar de discriminar entre los resultados obtenidos por cada estudio.

El ameloblastoma es una neoplasia benigna [25] localmente agresiva [12], corresponde a un tumor odontogénico formado a partir de epitelio [5,12]. Dentro de su etiopatogenia se identifican funciones aberrantes en las moléculas de las vías de señalización MAPK y SHH [3, 4]. La mutación más comúnmente relacionada al ameloblastoma es BRAF V600E [4, 30, 34, 35] seguida por las mutaciones en SMO W535L y L412F. Estas últimas han sido descritas anteriormente en carcinoma de células basales [46, 47] y meningiomas [48, 49].

La proteína serina/treonina quinasa B-raf (BRAF) pertenece a la vía de señalización MAPK [38, 39,40], la cual participa en la diferenciación celular, proliferación y apoptosis [38, 39].

La proteína Smoothened (SMO) es parte de la vía de señalización Hedgehog y tiene un rol fundamental en el desarrollo embrionario [1, 7, 12]. La activación no controlada de los genes de la vía SHH está asociada en humanos con la tumorogénesis [5, 9] y la supervivencia celular en el cáncer de diferentes órganos [9].

Para precisar el rol de SMO dentro del ameloblastoma es importante esclarecer si es que su sobreexpresión ocurre en paralelo con la de otros genes o mutaciones, o es la única existente dentro cierto tipo de ameloblastoma. En cuanto a lo anterior Diniz *et al.* sugiere que SMO, más que una mutación conductora es un evento secundario a otras mutaciones en la etiopatogenia del ameloblastoma [10]. También descartan la premisa de Sweeney et al. que habla sobre la localización del ameloblastoma según su mutación conductora (SMO o BRAF) [4, 10], expresando por el contrario que BRAF es una mutación conductora tanto para los ameloblastomas maxilares como mandibulares [10]. Este debate sobre el rol de la mutación en SMO tiene como fin dilucidar la etiopatogenia de lesiones tumorales como es el caso del Ameloblastoma.

Dentro de los 246 ameloblastomas que definían su presentación clínica incluidos en este estudio, el 13,58% presentó una mutación en SMO, lo cual se asemeja a lo descrito por Brown *et al*. quienes expresan que SMO se presenta en el 16% de los casos [35], quedando por debajo de lo expresado por Sweeney *et al.* que hablan de una expresión en el 39% de los casos [4].

Brown *et al.* identifica a SMO como el gen mutado más común después de BRAF [35], y asevera que tanto BRAF como SMO pueden ocurrir de manera aislada y no ser acompañadas por otra mutación [35]. Dentro del presente estudio no se pudo determinar si la mutación de SMO ocurría de forma aislada o en conjunto con otras mutaciones, respecto a este tema Brown et al. expresa que SMO frecuentemente coexiste con mutaciones en RAS (37% de los casos con SMO mutado) y con mutaciones en FGFR2 (32% de los casos con SMO mutado), mientras que Sweeney identifica que SMO puede ocurrir de manera conjunta con BRAF, KRAS y FGFR2 [4,35, 45].

En cuanto a la edad la literatura define que el rango más común de aparición de esta patología es entre los 30 y los 60 años [28, 37], sin embargo nuestros resultados fueron diversos, encontrando autores como Gultekin que manifiestan que factores tales como localización y edad de los ameloblastomas con mutación en SMO no están dilucidados. Heikinheimo, Kurppa y Brown por su

parte identifican la edad en la que se expresan como avanzada. En el presente estudio los ameloblastomas con mutación en SMO se distribuyen entre los 19 y los 92 años, aunque los resultados muestran que un 54,54% de las muestras corresponden a pacientes mayores de 50 años.

Respecto al sexo la literatura no describe una predilección [25, 37]. Identificamos que los ameloblastomas con mutación en SMO se presentan mayoritariamente en pacientes de sexo masculino (60,61%) con un (p-valor=0.0264) . A la luz de lo anterior es que nuestros resultados sirven para abrir el debate sobre si los ameloblastomas con mutación en SMO se presentan mayoritariamente en pacientes de sexo masculino.

En cuanto a la localización de los ameloblastomas con mutación en SMO Sweeney *et al*. expresan una tendencia hacia el maxilar superior [4, 15]. Nuestros resultados sugieren que no existen diferencias en cuanto a este punto (p-valor=0,8012) y por lo tanto se suman a las conclusiones de Diniz *et al*. que reconocen como improbable esta asociación al maxilar superior [10]. Nuestros resultados arrojan que existe una clara predilección (p-valor=0,000) por el sector posterior de los maxilares en los ameloblastomas con mutación en SMO lo cual no difiere de la caracterización común de un ameloblastoma convencional [25,36,37].

Gultekin *et al.* , Sweeney *et al*. , Gurgel *et al*. y Davanian *et al.* en sus artículos evidencian un total de 26 ameloblastomas convencionales que presentan una mutación en SMO, Gurgel y Heikinheimo presentan en sus artículos 6 ameloblastomas uniquisticos con una mutación en SMO y Gultekin evidencia 1 ameloblastoma periférico con mutación en SMO (78,79%, 18,18% y 3,03% respectivamente de los ameloblastomas con mutación en SMO). Al analizar los resultados obtenidos, no se observa una predilección de mutación en SMO en un ameloblastoma por un tipo de presentación clínica en concreto (convencional/uniquístico (p-valor=0,3121), convencional/periférico (p-valor=0,8976), uniquisticos/ periféricos (p-valor=0,6824)).

En este estudio, la presentación histológica de los ameloblastomas con SMO se concentra principalmente en los patrones plexiforme y mixto (10 y 9 muestras respectivamente), agrupando entre ambos grupos el 57,58% de las muestras que presentan SMO. Debido a que no todos los artículos consignan la histología de los ameloblastomas, no se pudo realizar análisis estadísticos para determinar alguna predilección de una mutación en SMO por alguna de las presentaciones histológicas de ameloblastoma. En este tópico Brown *et al.* indican que SMO no demuestra una asociación significativa por algún tipo histológico [45].

En cuanto al secuenciamiento y sobreexpresión de SMO, nuestros resultados indican que existe una mayor tendencia a utilizar sanger sequencing y puede ser complementado con qPCR en la pesquisa de una mutación de SMO. Los datos obtenidos de la sobreexpresión de SMO según técnica de obtención de la mutación demuestran valores variables, Kondo *et al.* sugieren que para mejorar la precisión en los resultados los estudios venideros deberían realizarse con NGS (*next generation sequencing)* [11]. Además afirman que los microarrays pueden descubrir datos globales del transcriptoma en tumores como el ameloblastoma, pero estos datos no aclaran alteraciones genómicas, pérdida genética, alteraciones somáticas o alteración en la amplificación [11]. Opinión disidente a la de DeVilliers *et al*. quienes comentan que los microarray dan una alta eficiencia para el establecimiento de perfiles de expresión en las células tumorales [9].

Es posible cuestionarse la necesidad de un análisis más específico sobre la técnica de secuenciamiento utilizada cuando se busca la sobreexpresión de SMO mutado o *Wild type;* Sweeney *et al*. y Gurgel *et al*. expresan que los diferentes análisis utilizados para la expresión de genes de la vía SHH como sanger sequencing, microarrays, inmunohistoquímica y qPCR han demostrado diferentes niveles de expresión en los ameloblastomas [4].

En cuanto a los niveles de expresión de SMO, este estudio presenta un resultado heterogéneo, en donde 4 artículos reflejan una sobre expresión de SMO, 2 expresan que no existe una expresión mayor en comparación con una muestra de tejido normal y 2 no definen la expresión de SMO. Nuestros resultados apoyan los resultados de Sweeney, Gurgel, Kondo y Gültekin, en donde en los ameloblastomas se observa una expresión elevada de la molécula SMO [1, 4, 11,] . Importante es destacar que esta sobreexpresión no necesariamente implica que SMO esté mutado [11]. Kondo *et al.* plantean en su artículo una expresión alta 4 de 7 muestras en donde todas expresaban *Wild Type* SMO [11].

Actualmente en el tratamiento para el ameloblastoma se puede optar por dos modalidades, una conservadora en donde se realiza enucleación y curetaje y una no conservadora que incluye una resección en bloque con márgenes de seguridad [1, 4]. Particularmente Gültekin *et al.* , describen una mayor necesidad de resección en bloque con márgenes amplios de seguridad en tumores con mutación SMO debido a un mayor riesgo de recidiva.

Hoy en día autores como Sweeney, Gonzalez y Sauk identifican diversas moléculas como blancos terapéuticos en el ameloblastoma [4, 7, 41]. Los inhibidores de BRAF son una alternativa de tratamiento en el ameloblastoma y son considerados como objetivo de futuras investigaciones [4]. Por otro lado, los inhibidores de la vía SHH son propuestos como tratamiento para el ameloblastoma, en esta categoría encontramos la ciclopamina, KAAD-ciclopamina, robotnikinin, trioxido arsénico (ATO), entre otros [7, 30]. La ciclopamina bloquea la activación de la respuesta de esta vía celular y por lo tanto el crecimiento de las células anormales [9]. DeVilliers en su artículo nombra estudios que muestran una respuesta favorable al tratamiento con ciclopamina en cáncer gástrico, meduloblastoma y carcinoma de células escamosas [7, 9]. Al identificarse mutaciones aisladas de SMO en los ameloblastomas, específicamente maxilares, se reconoce otro posible tratamiento enfocado en este caso a SMO, una molécula en particular de la vía SHH [41]. Los fármacos más comúnmente utilizados como inhibidores de SMO son Vismodegib y Sonidegib

siendo estos ocupados como tratamiento coadyuvante de patologías en las que la vía de señalización SHH está involucrada, tales como carcinoma de células basales, meduloblastomas y otros tipos de neoplasias [42, 43, 44] . Sin embargo, vismodegib ha mostrado no ser efectivo inhibiendo la actividad de SMO mutante (L412F y W535L) en los ameloblastomas [4, 30]. En esta labor, KAAD-ciclopamina y ATO han tenido buenos resultados y son candidatos para futuras experimentaciones [4, 30].

Paralelamente se han identificado mutaciones de SMO que dan resistencia a sus inhibidores target actualmente conocidos [23]. El único mecanismo identificado para esto es una mutación de Asp473, la cual resulta en una activación constitutiva de SMO y reduce su sensibilidad tanto a vismodegib como a PTCH1 [23]. Lo anterior fue identificado en una biopsia de meduloblastoma después de ser tratado con vismodegib [23].

Según Mishra et al., se necesita más investigación para observar el efecto de los agentes inhibidores de SMO en el tratamiento no quirúrgico del ameloblastoma [7]. El fin de probar terapias target sobre moléculas como SMO es en un futuro reducir la morbilidad quirúrgica resultante y así mejorar el pronóstico de esta patología [7].

7. CONCLUSIÓN

1) SMO corresponde a una de las diversas moléculas involucradas en la etiopatogenia del ameloblastoma, pudiendo manifestarse tanto como una mutación (W535L, L412F, entre otras) o como forma Wild-type (no mutado).

2) Existe diferencia en el sexo y localización de un ameloblastoma con mutación en SMO, presentandose mayoritariamente en el sexo masculino y el sector posterior indistintamente del maxilar que esté afectado.

3) No existe una estandarización en cuanto a técnicas que pesquisen mutaciones y sobreexpresión de SMO en ameloblastoma. Las más empleadas son las que incluyen Sanger Sequencing y qPCR.

8. SUGERENCIAS

- Mejorar recogida de antecedentes de los pacientes a los cuales pertenecen las muestras.
- Estandarización en técnica usada para identificar sobreexpresión de SMO mutado o *Wild type.*
- Mayor cantidad de estudios futuros para dilucidar características clínicas de la mutación SMO en el ameloblastoma.
- Estudios que evalúen tratamiento de terapias target para SMO presentes en un ameloblastoma.
- Seguimiento de pacientes a los cuales se haya hecho algún tratamiento.

9. RESUMEN

Introducción: Como posibles etiologías del ameloblastoma encontramos mutaciones en *Smoothened* (SMO). El rol de una mutación en SMO es controversial, se plantea reconocer el rol de una mutación en SMO en la expresión de las variantes no malignas de un ameloblastoma.

Metodología: Se realizó una búsqueda en PubMed, Scopus. Springerlink, Embase y WOS, con las palabras “SMO”, “Hedgehog”, “Hedgehog pathway”, “Smoothened variants”, “Ameloblastoma” y “Epithelial odontogenic tumours”. Se consideraron los artículos publicados en los últimos 10 años. Se incluyeron los estudios que cumplieran los criterios establecidos y se evaluaron 11 variables en cada artículo.

Resultados: De 249 ameloblastomas descritos en 8 artículos, 33 (13,58%) presentaban mutación en SMO con diferencias en el sexo masculino (60,61%) y región posterior (89,5%), sin diferencias por maxilar y presentación clínica. En cuanto a la técnica de obtención de la mutación de SMO se distribuyeron de forma heterogénea al igual que la sobreexpresión.

Discusión: No fue posible estandarizar resultados ya que los artículos analizados no presentan una cantidad de datos homogénea, En el ameloblastoma no se describe una predilección por sexo, nuestros resultados exponen lo contrario y abren el debate sobre la precisión de este antecedente. Los resultados variables en la sobreexpresión de SMO puede deberse a la no estandarización de la técnica de obtención de esta.

Conclusión: Mutaciones en SMO tienen en la actualidad un rol controversial en la etiología del ameloblastoma. La etiopatogenia de esta lesión debe entenderse como un proceso multifactorial donde diversas vías actúan conjuntamente dando lugar a esta patología.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Gültekin SE, Aziz R, Heydt C, et al. The landscape of genetic alterations in ameloblastomas relates to clinical features. Virchows Arch. 2018;472(5):807-814.
2. Sauk JJ, Nikitakis NG, Scheper MA. Are we on the brink of nonsurgical treatment for ameloblastoma?. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;110(1):68-78.
3. Kanda S, Mitsuyasu T, Nakao Y, et al. Anti-apoptotic role of the sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma. Int J Oncol. 2013;43(3):695-702.
4. Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, et al. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas [published correction appears in Nat Genet. 2014 Jan;47(1):97]. Nat Genet. 2014;46(7):722-725.
5. Farias LC, Gomes CC, Brito JA, et al. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. Hum Pathol. 2012;43(8):1229-1233.
6. Gurgel CA, Buim ME, Carvalho KC, et al. Transcriptional profiles of SHH pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. J Oral Pathol Med. 2014;43(8):619-626.
7. Mishra P, Panda A, Bandyopadhyay A, Kumar H, Mohiddin G. Sonic Hedgehog Signalling Pathway and Ameloblastoma - A Review. J Clin Diagn Res. 2015;9(11):ZE10-ZE13.
8. Zhang L, Chen XM, Sun ZJ, Bian Z, Fan MW, Chen Z. Epithelial expression of SHH signaling pathway in odontogenic tumors. Oral Oncol. 2006;42(4):398-408.
9. DeVilliers P, Suggs C, Simmons D, Murrah V, Wright JT. Microgenomics of ameloblastoma. J Dent Res. 2011;90(4):463-469.
10. Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BV, et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. Tumour Biol. 2015;36(7):5649-5653.
11. Kondo S, Ota A, Ono T, et al. Discovery of novel molecular characteristics and cellular biological properties in ameloblastoma. Cancer Med. 2020;9(8):2904-2917.
12. Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Expression of Sonic hedgehog (SHH) signaling molecules in ameloblastomas. J Oral Pathol Med. 2004;33(3):185-190.
13. Vered M, Peleg O, Taicher S, Buchner A. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. J Oral Pathol Med. 2009;38(7):597-604.

14. Kim YS, Lee SK. Different Protein Expressions between Peripheral Ameloblastoma and Oral Basal Cell Carcinoma Occurred at the Same Mandibular Molar Area. Korean J Pathol. 2014;48(2):151-158.
15. Heikinheimo K, Huhtala JM, Thiel A, et al. The Mutational Profile of Unicystic Ameloblastoma. J Dent Res. 2018;98(1):54-60.
16. Cigudosa JC. La revolución de los microarrays en la investigación biosanitaria: tipos de plataformas, usos y perspectivas en oncología [The microarray revolution in biomedical research: types of platforms, uses and perspectives in oncology]. An Sist Sanit Navar. 2004;27(1):11-20.
17. Lay-Son RG, León PL. Perspectivas actuales sobre el diagnóstico genómico en pediatría [Current perspectives on genome-based diagnostic tests in Pediatrics]. Rev Chil Pediatr. 2015;86(1):3-11.
18. Moreno Switt AI, Toledo V. Infectología en la era de la genómica [Infectious diseases in the genomic era]. Rev Chilena Infectol. 2015;32(5):571-576.
19. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(12):5463-5467.
20. Totomoch-Serra A, Marquez MF, Cervantes-Barragán DE. Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. F1000Res. 2017;6:1016.
21. Villegas V, Sánchez M, Chuaire L, reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. Colombia Médica, vol. 40, núm. 3, julio-septiembre, 2009, pp. 347-352.
22. Neville B, Douglas D, Carl M, Jerry E. Odontogenic Cysts and Tumours.En: Neville B.Edited by John D. Oral and Maxillofacial Pathology. 3rd Edition. USA: Elsevier; 2008. p. 702- 711.
23. Sharpe HJ, Wang W, Hannoush RN, de Sauvage FJ. Regulation of the oncoprotein Smoothened by small molecules. Nat Chem Biol. 2015;11(4):246-255.
24. Novus Biologicals. Immunohistochemistry (IHC) Handbook.
25. Vered M. Muller S. Heikinheimo K. Benign epithelial odontogenic tumours. En: IARC, El-Naggar AK., Chan J.K.C., G randis J.R., Takata T., Slootweg P. J. WHO 2017: New Classification of Head and Neck Tumours. 4th edition. Cedex, France: International Agency for Research on Cancer; 2017. p. 215-222.
26. Gritli-Linde, A. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. Development. 2002; 129(23), 5323–5337.
27. Morales Navarro Denia. Ameloblastoma: Revisión de la literatura. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2009 Septiembre; 46(3): 48-61.

28. Oomens MA, Van der Waal I. Epidemiology of ameloblastomas of the jaws; a report from the Netherlands. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 19: e581-3. 2014
29. Effiom OA, Ogundana OM, Akinshipo AO, Akintoye SO. Ameloblastoma: current etiopathological concepts and management. Oral Dis. 2018;24(3):307-316
30. Heikinheimo K, Kurppa KJ, Elenius K. Novel targets for the treatment of ameloblastoma. J Dent Res. 2015;94(2):237-240.
31. Sukarawan W. et al. WNT5A Expression in Ameloblastoma and Its Roles in Regulating Enamel Epithelium Tumorigenic Behaviors. The American Journal of Pathology. Volume 176, Issue 1, January 2010, Pages 461-471
32. Reichart PA, Philipsen HP, Sciubba JJ. The new classification of Head and Neck Tumours (WHO)--any changes?. Oral Oncol. 2006;42(8):757-758.
33. Bansal S, Desai RS, Shirsat P, Prasad P, Karjodkar F, Andrade N. The occurrence and pattern of ameloblastoma in children and adolescents: an Indian institutional study of 41 years and review of the literature. Int J Oral Maxillofac Surg. 2015;44(6):725-731.
34. Kurppa KJ, Caton J, Morgan PR, Ristimaki A, Ruhin B, Kellokoski J, Elenius K, Heikinheimo K High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma.(2014) J Pathol 232(5):492–498
35. Brown NA, Rolland DC, McHugh JB, Weigelin HC, Zhao LL, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS, Betz BL Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma.(2014) Clin Cancer
36. Bilodeau EA, Seethala RR. Update on Odontogenic Tumors: Proceedings of the North American Head and Neck Pathology Society. Head Neck Pathol. 2019;13(3):457-465.
37. Cadavid AM, Araujo JP, et al. Ameloblastomas: current aspects of the new WHO classification in an analysis of 136 cases. Surgical and Experimental Pathology. 2019; 2(7).
38. Govender D, Chetty R. Gene of the month: BRAF. J Clin Pathol. 2012;65(11):986-988.
39. Dienstmann R, Tabernero J. BRAF as a target for cancer therapy. Anticancer Agents Med Chem. 2011;11(3):285-295.
40. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. Mol Cancer Ther. 2011;10(3):385-394.
41. González-González R, López-Verdín S, Lavalle-Carrasco J, et al. Current concepts in ameloblastoma-targeted therapies in B-raf proto-oncogene serine/threonine kinase V600E mutation: Systematic review. World J Clin Oncol. 2020;11(1):31-42.
42. Li Y, Song Q, Day BW. Phase I and phase II sonidegib and vismodegib clinical trials for the treatment of paediatric and adult MB patients: a

systemic review and meta-analysis. Acta Neuropathol Commun. 2019;7(1):123.
43. Spallone G, Sollena P, Ventura A, et al. Efficacy and safety of Vismodegib treatment in patients with advanced basal cell carcinoma and multiple comorbidities. Dermatol Ther. 2019;32(6):e13108.
44. Meiss F, Andrlová H, Zeiser R. Vismodegib. Recent Results Cancer Res. 2018;211:125-139.
45. Brown NA, Betz BL. Ameloblastoma: A Review of Recent Molecular Pathogenetic Discoveries. Biomark Cancer. 2015;7(Suppl 2):19-24.
46. Xie J, Murone M, Luoh SM, et al. Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. Nature. 1998;391(6662):90-92.
47. Sirunya Silapunt, Leon Chen, and Michael R. Migden. Hedgehog pathway inhibition in advanced basal cell carcinoma: latest evidence and clinical usefulness. Ther Adv Med Oncol. 2016 Sep; 8(5): 375–382.
48. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, et al. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. Science. 2013;339(6123):1077-1080.
49. Brastianos PK, Horowitz PM, Santagata S, et al. Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. Nat Genet. 2013;45(3):285-289.
50. Davanian H, Balasiddaiah A, Heymann R, et al. Ameloblastoma RNA profiling uncovers a distinct non-coding RNA signature. Oncotarget. 2017;8(3):4530-4542.
51. Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition, 98(6), 236–238.
52. Demlow U, Ploski R. Clinical Application for Next-Generation Sequencing. 1th ed. London; Elsevier press; 2016. Krystyna Szymańska, Krzysztof Szczałuba, Tomasz Wolańczyk p. 97-136