



RODRIGO NEVES SILVA

**ESTUDO PARA VALIDAÇÃO DO USO DO TISSUE MICROARRAY
COMO MÉTODO PARA ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE
AMELOBLASTOMAS**

**A VALIDATION STUDY FOR THE USE OF TISSUE
MICROARRAY AS A METHOD FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL
ANALYSIS OF AMELOBLASTOMAS**

Piracicaba

2015



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

RODRIGO NEVES SILVA

**ESTUDO PARA VALIDAÇÃO DO USO DE TISSUE MICROARRAY
COMO MÉTODO PARA ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE
AMELOBLASTOMAS**

**A VALIDATION STUDY FOR THE USE OF TISSUE
MICROARRAY AS A METHOD FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL
ANALYSIS OF AMELOBLASTOMAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Estomatopatologia, na Área de Estomatologia.

Thesis presented to Piracicaba Dental School of the University of Campinas as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Stomatopathology, in Stomatology Area.

**Orientador: Prof. Dr. Alan Roger dos Santos
Silva**

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Rodrigo Neves Silva e orientada pelo Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva.

Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva

Piracicaba

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

N414e Neves-Silva, Rodrigo, 1986-
Estudo para validação do uso do tissue microarray como método para análise imunoistoquímica de ameloblastomas / Rodrigo Neves Silva. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Alan Roger dos Santos Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ameloblastoma. 2. Imunoistoquímica. 3. Validação. 4. Análise serial de tecidos. I. Santos-Silva, Alan Roger, 1981-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: A validation study for the use of tissue microarray as a method for immunohistochemical analysis of ameloblastomas

Palavras-chave em inglês:

Ameloblastoma

Immunohistochemistry

Validation

Tissue array analysis

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Alan Roger dos Santos Silva [Orientador]

Eduardo Rodrigues Fregnani

Lara Maria Alencar Ramos Innocentini

Oslei Paes de Almeida

Marcio Ajudarte Lopes

Data de defesa: 03-07-2015

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 03 de Julho de 2015, considerou o candidato RODRIGO NEVES SILVA aprovado.

Prof. Dr. ALAN ROGÉ DOS SANTOS SILVA

Prof. Dr. EDUARDO RODRIGUES FREGNANI

Profa. Dra. LARA MARIA ALENCAR RAMOS INNOCENTINI

Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

Resumo

Tumores odontogênicos (TOs) são neoplasias originadas do órgão de desenvolvimento dentário ou de seus remanescentes. Neste contexto, o ameloblastoma é um dos TOs mais relevantes devido a sua elevada frequência e alto potencial de agressividade clínica. O presente estudo se propôs a realizar uma análise clinicopatológica retrospectiva de ameloblastomas e, posteriormente, validar o uso da técnica do *tissue microarray* (TMA) para a análise imunoistoquímica de ameloblastomas. **Material e métodos:** O estudo clinicopatológico se baseou numa amostra de 847 TOs, oriundos de dois centros de Patologia Oral brasileiros, sendo 177 (20,89%) casos de ameloblastomas, dos quais foram selecionados 40 (22,59%) casos representativos de ameloblastomas multicísticos que foram distribuídos em dois blocos do TMA montados em triplicata contendo cilindros de 1,0mm e 2,0mm (Sakura Co., Tokyo, Japan). A validação da análise imunoistoquímica foi realizada para proteínas expressas em citoplasma (citoqueratina 14, citoqueratina 19 e Bcl-2) e em núcleo (Ki-67); analisada por meio semiquantitativo e também por microscopia óptica digital (Aperio Scanscope CS® Slide Scanner; Aperio Technologies Inc.; Vista, CA; USA) e quantificada por meio dos algoritmos PixelCount® e NuclearV9® (Aperio Technologies Inc.; Vista, CA; USA). **Resultados:** Os 40 casos de ameloblastoma multicístico afetaram predominantemente pacientes do gênero masculino (62,5%), a média de idade no momento do diagnóstico foi de 39,92 anos (variando de 15 a 71 anos), a maioria (92,5%) dos casos ocorreu na região posterior da mandíbula. A concordância obtida para a expressão imunoistoquímica entre os diferentes diâmetros do TMA e os cortes convencionais mostrou melhores resultados para os cilindros de 2,0mm montados em triplicata nas análises digital e semiquantitativa. Em conclusão, o presente estudo demonstrou originalmente que a técnica do TMA pode ser usada com rigor científico para estudos baseados na análise imunoistoquímica de marcadores de citoplasma e núcleo celular em ameloblastomas multicísticos.

Palavras-chave. Ameloblastoma. Imunoistoquímica. Validação. Análise serial de tecidos.

Abstract

Odontogenic tumors (OTs) are neoplasms originating from the tooth developing apparatus or its remnants. In this context, ameloblastoma is one of the most relevant OTs due to its high frequency and clinical potential of aggressiveness. The present study performed a retrospective, clinicopathological analysis of ameloblastomas and subsequently validated the use of the tissue microarray (TMA) for immunohistochemical analysis of ameloblastomas.

Materials and methods: The clinicopathologic study was based on a sample of 847 OTs from two Brazilian Oral Pathology Centers. Of these, 177 (20.89%) cases were ameloblastomas, of which 40 (22.59%) cases of multicystic ameloblastomas were selected and divided into two TMA blocks mounted in triplicate containing cores of 1.0mm and 2.0mm (Sakura Co., Tokyo, Japan). The validation of the immunohistochemical analysis was performed for proteins expressed in the cytoplasm (cytokeratin 14, cytokeratin 19, and Bcl-2) and nuclei (Ki-67), analyzed in a semiquantitative way as well as by digital optical microscopy (Aperio Scanscope CS[®] Slide Scanner; Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA), and quantified by PixelCount[®] and NuclearV9[®] algorithms (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA). **Results:** Forty cases of ameloblastoma affected predominantly male patients (n=25; 62.5%). The mean age at diagnosis was 39.92 years (ranging from 15 to 71 years), and the majority (92.5%) of the cases occurred in the posterior mandible. The concordance obtained for the immunohistochemical expression in different TMA core diameters and whole sections showed best results for 2.0mm TMA assembled in triplicates both for semiquantitative and digital analyses. In conclusion, this study originally demonstrated that the TMA technique could be used with scientific rigor in studies based on immunohistochemical analysis of cytoplasmic and nuclear markers in multicystic ameloblastomas.

Keywords: Ameloblastoma. Immunohistochemistry. Validation. Tissue array analysis.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: A validation study for the use of tissue microarray as a method for immunohistochemical analysis of ameloblastomas.....	9
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS	34
Anexo 1 - Certificado do Comitê de Ética em pesquisa	40
Anexo 2 – Declaração de não infringência de direitos autorais	41

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **José das Neves Silva** e **Enaura Rodrigues** (*in memoriam*), por sempre terem estado comigo dando apoio e incentivo para que eu alcançasse meus objetivos em toda minha vida, pelo exemplo de fé, perseverança, ética e dedicação à nossa família. Bem como, a todos os meus irmãos pelo apoio dado em todas as etapas da minha jornada acadêmica e pela grande contribuição para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas** na pessoa de seu magnífico reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge** e à **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, na pessoa de seu diretor **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**, pela estrutura física e científica disponibilizada para a realização de trabalhos acadêmicos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia** na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva**, bem como à Presidente da Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva**, pela orientação oferecida visando minha formação como profissional e como pesquisador durante todos esses anos de pós-graduação, bem como pela confiança no meu trabalho nesses anos de curso. Por todo o tempo empenhado para que esta tese fosse concluída com a minha participação em outras atividades relacionadas ao curso, sempre visando o meu enriquecimento profissional. Pelo conhecimento partilhado nesses anos de convívio durante meu mestrado e doutorado. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Marcio Ajudarte Lopes**, da área de Semiologia, pela oportunidade de atuar na Clínica de diagnóstico Oral da FOP (OROCENTRO), bem como pelo conhecimento compartilhado durante minha formação em Estomatologia e Patologia Oral.

Ao **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida**, da área de Patologia, pela oportunidade de atuar na rotina de diagnóstico histopatológico da FOP, sempre agindo com muita seriedade e profissionalismo, bem como por todo o conhecimento compartilhado na rotina de diagnóstico em Patologia Oral.

Aos professores **Pablo Agustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Edgard Graner e Jacks Jorge Júnior** pelo profissionalismo que demonstram e pelas atividades desenvolvidas nas pós-graduação.

Ao pós-doutorando da FOP-UNICAMP, **Felipe Paiva Fonseca**, ao **Prof. Dr. Hélder Antônio Rebelo Pontes** e à **Acadêmica Adriana Souza de Jesus**, ambos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará (UFPA), pelo auxílio durante a realização desta

pesquisa, por terem colaborado na coleta dos dados e por terem cedido gentilmente casos para a realização desta pesquisa.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de Doutorado.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba **Fabiana Facco Cassorotti, Adriano Luís Martins, Geovânia Caldas Almeida, João Carlos Gomes da Silva Júnior**, pelo auxílio para a realização das pesquisas durante meu Mestrado e Doutorado.

Aos profissionais do OROCENTRO **Rogério de Andrade Elias, Jeane Soares, Aparecida Campion, Daniele Castelli Morelli** e a amiga **Érika Graf Pedroso**, pelo saudável convívio que tivemos, a amizade cultivada e o profissionalismo como agem na prática da Estomatologia.

Aos professores da **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas (FOUFAL)**, **José Lécio Machado, Luiz Carlos Oliveira dos Santos, José de Amorim Lisboa Neto, Maria Dânia Holanda Tenório**, que me permitiram participar de atividades de ensino e pesquisa contribuindo valiosamente para a minha formação.

Aos meus amigos **das Alagoas** que durante esses anos vivendo em Piracicaba tive a satisfação de continuar mantendo um convívio próximo, os quais sempre estiveram dispostos a conversar e me ofertar ajuda para o que eu necessitasse. Pessoas a quem sou muito grato pela amizade e companheirismo: **Alexsandro Claudio dos Santos Almeida, Ana Maria Aquino dos Santos, Carla Maria da Silva, Cícero Manoel dos Santos, Daiane Cristina Diniz, Dayse Andrade Romão, Edselma Ferreira de Oliveira, Marcos Alex dos Santos, Maria Tereza Pedrosa Albuquerque, Mercel José dos Santos, José Carlos da Silva Júnior, José Diego Magalhães Soares, José Jacó Pinheiro de Barros, Josias Mendes da Silva, Lais Caroline de Oliveira Omena, Marcos Mausan dos Santos, Pedro Juvêncio de Souza Júnior, Rafaela Alves Azevedo Barros, Raphaela Fernanda Pereira da Silva, Renato Felipe de Farias Costa, Sâmia Kelly Santana Barros, Taciana Santana Guedes, Thaise Rodrigues de Souza e Victor Elson dos Santos Silva.**

Aos amigos **Karina Morais Faria e Wilfredo Alejandro Gonzalez Arriagada**, com quem tanto convivi e tanto contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e profissional durante estes anos de curso.

Aos meus amigos da rotina de histopatologia **Débora Lima Pereira, Marisol Miranda Galvis e José Laurentino Ferreira Filho**, pelo proveitoso e enriquecedor convívio durante as atividades de histopatologia, pessoas que me proporcionaram uma grata experiência de trabalho na pós-graduação.

Aos pós-graduandos em Estomatopatologia, com os quais convivi e dividi atividades pessoais e acadêmicas: **Alicia Rumayor Piña, Ana Lucia Noronha Francisco, Andréia Bufalino, Andréia Aparecida da Silva, Carolina Carneiro Soares Macedo, Celeste Sánchez Romero, Diego Tetzner Fernandes, Fernanda dos Santos Moreira, Florence Juana Maria Cuadra Zelaya, Harim Tavares dos Santos, Isadora Luana Flores, Jorge Esquiche León, Juscelino de Freitas Jardim, Katya Pulido Diaz, Lara Maria Alencar Ramos Innocentini, Luciana Yamamoto de Almeida, Marco Aurelio Carvalho de Andrade, Mariana de Pauli Paglioni, Marisol Martinez Martinez, Renata Lucena Markman, Renato Assis Machado, Rose Mara Ortega, Sabrina Nogueira de Moraes, Vinicius Rabelo Torregrossa e Wagner Gomes da Silva.**

As demais pessoas e profissionais que de alguma maneira contribuíram para a realização desta tese.

INTRODUÇÃO

Ameloblastoma

Os tumores odontogênicos (TOs) representam um grupo heterogêneo de patologias que afetam o complexo buco-maxilo-facial e podem variar desde hamartomas até neoplasias benignas ou malignas com graus variáveis de agressividade. Os TOs são derivados a partir de um ou mais dos elementos epiteliais, ectomesenquimais e mesenquimais que compõem o órgão responsável pela formação dos dentes. Embora sejam considerados, em sua maioria, incomuns, os TOs podem representar um grande desafio diagnóstico e, consequentemente, terapêutico devido à sua grande variabilidade no que tange aos aspectos clínicos, radiográficos, microscópicos e de comportamento biológico (Papagerakis et al., 1999; Barnes et al., 2005; Fernandes et al., 2005; Bologna-Molina et al., 2008; Modolo et al., 2012).

O ameloblastoma é uma das neoplasias odontogênicas benignas mais comuns, apresentando uma frequência que varia de 13,52% a 61,3% de todos os TOs, de acordo com a origem demográfica da população estudada (Daley et al., 1994; Mosqueda-Taylor et al., 1997; Fregnani et al., 2002; Fernandes et al., 2005; Fregnani et al., 2010; Naz et al., 2014). Dois estudos epidemiológicos de TOs realizados na população brasileira demonstraram prevalências que variaram de 23% a 45,2% (Fernandes et al., 2005; Ramos et al., 2014).

Do ponto de vista clinicopatológico, os ameloblastomas são classicamente divididos em quatro tipos, a saber: a. sólido ou multicístico; b. unicístico; c. periférico e d. desmoplásico (Barnes et al., 2005). O tipo multicístico é o mais frequente, sendo caracterizado por um padrão de crescimento relativamente lento, infiltrativo e localmente agressivo, ocorrendo principalmente em região posterior de mandíbula de adultos jovens (25-36 anos). Estes tumores são normalmente diagnosticados devido a aumento de volume assintomático em face, causando ou não reabsorção e deslocamento dos dentes associados. Os ameloblastomas multicísticos podem apresentar uma radiolucência uni ou multilocular, com limites radiográficos pouco definidos e irregulares, com tendência de crescimento por meio da infiltração dos espaços medulares ósseos e expansão e erosão do osso cortical

associado (Mosqueda-Taylor et al., 1997; Jaaskelainen et al., 2002; Fregnani et al., 2010; Gondak et al., 2013).

O ameloblastoma unicístico é uma variante que se apresenta – como o próprio nome sugere – aspecto clínico e radiográfico sugestivo de uma lesão de natureza cística, geralmente associado a um dente incluso mostrando uma média de idade de 16 anos para os pacientes afetados, sem apresentar predileção por gênero. Apenas 5% a 15% de todos os ameloblastomas são do tipo unicístico e a localização de mais de 90% dos casos é a mandíbula, na forma de aumento de volume assintomático. A lesão apresenta-se radiograficamente de modo unilocular e com margens bem definidas ou corticalizadas. A expansão óssea associada ao tipo unicístico dos ameloblastomas pode ser importante e gerar destruição significativa do osso envolvido (Barnes et al., 2005).

O ameloblastoma periférico, ou extra-ósseo, compreende a 1,3% - 10% de todos os tipos de ameloblastomas, localizado em gengiva ou mucosa bucal alveolar, tendo origem de remanescentes epiteliais odontogênicos aprisionados no tecido gengival durante o desenvolvimento embriológico da face. A mandíbula é afetada predominantemente numa relação de 2,4:1 com a maxila. Radiograficamente, a variante periférica dos ameloblastomas não está associada a alterações significantes, podendo raramente gerar erosão apenas superficial do osso adjacente (Barnes et al., 2005).

O ameloblastoma desmoplásico é semelhante ao ameloblastoma multicístico no que diz respeito à idade e distribuição por gênero dos pacientes afetados, contudo, mostra uma relação de acometimento de 1:1 entre a maxila e a mandíbula e é encontrado predominantemente na região anterior como um aumento de volume assintomático. Radiograficamente, aproximadamente 50% dos casos de ameloblastoma desmoplásico mostram aspecto misto (radiolúcido e radiopaco), com margens mal definidas (Barnes et al., 2005).

No contexto microscópico, os ameloblastomas apresentam uma complexa proliferação de epitélio odontogênico benigno, num estroma fibroso, cujos critérios diagnósticos histopatológicos classicamente descritos incluem: 1. hiper cromatismo dos núcleos das células basais do epitélio que reveste as áreas de epitélio ameloblástico; 2. núcleos das células basais do epitélio que reveste as áreas de epitélio ameloblástico em

paliçada e com polarização invertida; e 3. vacuolização citoplasmática das células basais que revestem as áreas de epitélio ameloblástico (Vickers e Gorlin, 1970). As estruturas histopatológicas tumorais de células periféricas do ameloblastoma se assemelham aos ameloblastos ou pré-ameloblastos, enquanto que as células centrais se assemelham às células do retículo estrelado do órgão do esmalte. Também são bem conhecidas uma série de variantes microscópicas dos ameloblastomas incluindo variantes foliculares, plexiformes, acantomatosos, de células basais e de células granulares, entre outras. Acredita-se atualmente que a variante microscópica dos ameloblastomas não está associada ao comportamento clínico das lesões, que seria determinado principalmente por seu tipo clinicopatológico (Gardner e Pecak, 1980; Jaaskelainen et al., 2002).

A etiologia dos ameloblastomas ainda não é totalmente conhecida, pois seu exato mecanismo de formação, de diferenciação celular e da progressão clínica não é completamente compreendido. De modo semelhante, pouco se conhece a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do crescimento e da invasão nos ameloblastomas (Mosqueda-Taylor et al., 1997; Kumamoto e Ooya, 2004; Modolo et al., 2012).

Alterações moleculares e genéticas associadas ao desenvolvimento e progressão de TOs incluem oncogenes e genes supressores de tumores como diversos fatores de crescimento, fatores controladores do ciclo celular, fatores relacionados à apoptose, moléculas de adesão intercelular, proteinases de matriz extracelular, fatores pró-angiogênicos e citocinas osteolíticas, entre outros (Kumamoto et al., 2004; Florescu et al., 2012). A título de exemplo, um estudo genético demonstrou um perfil homogêneo para o ameloblastoma em 8 amostras por meio de matriz de cDNA e identificou que 34 de 588 genes estudados eram exclusivos dos ameloblastomas quando comparados aos germes dentários. Entre estes genes, o fos-oncogene e o fator-receptor-1 de necrose tumoral (TNFRSF-1A) foram os mais expressos. Adicionalmente, dez outros genes, incluindo Sonic hedgehog (SHH), caderinas 12 e 13 (CDH12 e 13) e fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1) mostraram baixa expressão em todos os ameloblastomas estudados (Heikinheimo et al., 2002; Barnes et al., 2005). Recentemente, mutações no gene SMO (encoding Smoothened) se mostraram comuns em ameloblastomas da maxila, enquanto mutações no gene BRAF

V600E (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) foram encontradas em alta frequência (63% dos casos) para casos envolvendo a mandíbula (Kurppa et al., 2014; Sweeney et al., 2014), gerando então novas possibilidades de investigações moleculares e clínicas acerca dos mecanismos de início e progressão dos ameloblastomas, bem como novas estratégias de tratamento baseadas na terapia alvo molecular.

Embora o diagnóstico dos ameloblastomas seja realizado, até o momento, por meio das características morfológicas detectáveis em análise histopatológica simples, a imunoistoquímica tem sido amplamente utilizada para avaliar a expressão de diferentes proteínas, sempre com objetivo de identificar marcadores prognósticos que possam orientar o tratamento dos pacientes afetados (Sandra et al., 2001; Luo et al., 2006; Yoon et al., 2011). Além disto, lança-se mão de estudos imunoistoquímicos para investigações relacionadas à patogênese dos ameloblastomas (Kurppa et al., 2014; Sweeney et al., 2014; Kaye et al., 2015); e, adicionalmente, em alguns casos, a imunoistoquímica pode ser de grande auxílio para a diferenciação diagnóstica entre ameloblastomas e carcinomas ameloblásticos (Yoon et al., 2011; Martinez Martinez et al., 2014). Neste contexto, um estudo realizado com o objetivo de avaliar o potencial de uso de diversos marcadores imunoistoquímicos em TOs identificou que o ameloblastoma apresenta expressão para diferentes citoqueratinas (CKs), sendo que se destacou a expressão, pela alta frequência e intensidade, da CK14; enquanto que a expressão da CK19 – embora também tenha sido muito frequente – exibiu imunorreatividade difusa e fraca (Yoon et al., 2011).

A identificação das atividades proliferativa e invasiva em TOs pode ser útil para prever o seu comportamento biológico (Mosqueda-Taylor et al., 1997). Neste campo, o Ki-67 e o p53 são anticorpos com potencial demonstrado para serem utilizados na avaliação da atividade proliferativa de ameloblastomas por meio de cortes histológicos convencionais (Sandra et al., 2001; Meer et al., 2003; Yoon et al., 2011; Gadbail et al., 2012). Estudos nesta linha demonstram que a proteína Ki-67 marca positivamente os núcleos celulares do epitélio tumoral nos ameloblastomas, principalmente nas células da camada basal periférica dos ameloblastomas multicísticos e nas células basais de ameloblastomas unicísticos.

As células semelhantes ao retículo estrelado nos ameloblastomas, bem como as células do retículo estrelado de dentes em desenvolvimento, tendem a ser negativas para a

expressão da proteína Ki-67 (Jaaskelainen et al., 2002; Bologna-Molina et al., 2008). Contudo, é relevante mencionar que os resultados imunoistoquímicos indicam que a atividade proliferativa celular dos ameloblastomas é variável e, conseqüentemente, a avaliação do índice de proliferação por meio do Ki-67 deve ser utilizada com parcimônia (Sandra et al., 2001; Bologna-Molina et al., 2009). Para os ameloblastomas, o índice de proliferação celular baseado na expressão imunoistoquímica do Ki-67 é de aproximadamente 4% (Sandra et al., 2001; Yoon et al., 2011).

A proteína p53 é um produto do gene supressor tumoral p53 (Gadbail et al., 2012) que também já foi analisada no contexto da proliferação celular e do comportamento clínico de ameloblastomas por meio da imunoistoquímica, com taxas de positividade variando entre 22 e 36% nos ameloblastomas multicísticos e 32% nos ameloblastomas unicísticos (Sharifi-Sistani et al., 2011).

Adicionalmente, estudos que avaliaram apoptose demonstraram que as células da camada basal periférica dos ameloblastomas seriam as responsáveis pela progressão da neoplasia, uma vez que expressam proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2, bem como marcadores de proliferação celular, incluindo o Ki-67 (Luo et al., 2006; Gomes et al., 2010). Um estudo que realizou a análise simultânea de diferentes marcadores imunoistoquímicos em 17 casos de ameloblastomas multicísticos identificou que o p53 e a Bcl-2 apresentaram imunomarcção predominantemente nas células periféricas; também identificaram um número de células imunomarcadas superior a 50%, enquanto a percentagem de células positivas nas áreas centrais semelhantes ao retículo estrelado foi inferior a 10% (Florescu et al., 2012). Outro estudo imunoistoquímico para a proteína Bcl-2 em 110 ameloblastomas demonstrou que a marcação citoplasmática apresentou uma forte imunoexpressão em ameloblastomas multicísticos (46%) e nos ameloblastomas unicísticos (40,2%), concluindo que a alta imunoexpressão citoplasmática de Bcl-2 pode sugerir um comportamento clínico mais agressivo para os ameloblastomas (Gonzalez-Gonzalez et al., 2015).

O tratamento dos ameloblastomas é um tema controverso e representa um grande desafio profissional devido, sobretudo, à elevada taxa de recorrência (que varia de 22 a 70% dos casos, dependendo do tipo clinicopatológico da doença e da modalidade de tratamento utilizada). Além disto, sabe-se que os ameloblastomas apresentam um potencial de

malignização ou de ocorrência de metástase em até 2% dos casos (Jaaskelainen et al., 2002; Fregnani et al., 2010; DeVilliers et al., 2011; Florescu et al., 2012; Gadbail et al., 2012). Diferentes modalidades de tratamento são aplicadas para o ameloblastoma, incluindo a ressecção cirúrgica primária (considerada a modalidade mais adequada para a maioria dos casos multicísticos), curetagem cirúrgica conservadora, descompressão cirúrgica seguida de curetagem e associação de técnicas adjuvantes como criocirurgia e uso de solução de Carnoy, entre outras (Fregnani et al., 2010). A ressecção cirúrgica em bloco parece ser o tratamento mais adequado para os casos avançados de ameloblastomas, o que pode causar morbidade e deformidade significativa ao complexo craniomaxilofacial, com perda da função e da estética (Mendenhall et al., 2007; DeVilliers et al., 2011).

Recentemente, foi descrita uma resposta favorável ao tratamento cirúrgico inicial associado à terapia alvo molecular adjuvante baseada na combinação inibitória de BRAF/MEK (Dabrafenib e Trametinib), sendo observado controle da doença tanto no ameloblastoma primário em mandíbula quanto no ameloblastoma metastático em pulmão do caso em questão. Esta observação sugere a possibilidade da terapia alvo neo-adjuvante ou adjuvante à cirurgia para ameloblastomas com mutação demonstrada no gene BRAF V600E. Caso confirmada por meio de ensaios clínicos o uso da terapia alvo molecular em ameloblastomas tem potencial para minimizar morbidades funcionais e estéticas associadas ao tratamento cirúrgico (Kaye et al., 2015).

Técnica do *Tissue microarray* (TMA)

O diagnóstico anatomopatológico é tradicionalmente baseado em cortes histológicos convencionais e avaliado por meio da microscopia de luz óptica e lâminas de vidro, o que costuma ser trabalhoso do ponto de vista técnico (Radhakrishnan et al., 2008). De modo similar, um dos grandes desafios inerentes à imunoistoquímica é que se trata de uma técnica trabalhosa e de custo relativamente alto. Este cenário faz com que trabalhos de pesquisa sejam geralmente realizados por meio de amostras pequenas, sem o uso de duplicatas ou triplicatas para homogeneização dos resultados, tornando, portanto, os resultados menos sólidos e de difícil reprodutibilidade (Fregnani, 2008). Assim, a técnica do *tissue microarray*

(TMA) foi desenvolvida para facilitar a realização de estudos imunoistoquímicos e de hibridação *in situ* (Kononen et al., 1998; Boone et al., 2008), possibilitando a reunião de diversos cilindros de tecidos obtidos de um grupo de blocos doadores que serão transferidos para um bloco receptor único de parafina com coordenadas definidas de matriz bem definidas. Esta técnica permite a análise rápida de um grande número de casos sob condições de laboratório e de avaliação normalizadas. Além disso, o advento da técnica do TMA gerou redução significativa da quantidade de produtos de consumo utilizados e tempo necessário para a interpretação dos resultados, reduzindo os custos e aumentando a eficácia de análises imunoistoquímicas e por hibridação *in situ* (Hoos e Cordon-Cardo, 2001; Moch et al., 2001; Boone et al., 2008; Radhakrishnan et al., 2008).

Em outras palavras, por meio do TMA, tecidos de centenas de espécimes podem ser representados em um bloco de parafina único, proporcionando um processo de alto rendimento para o estabelecimento do perfil patológico de espécimes de tecidos utilizando diferentes técnicas de pesquisa e permitindo o processamento de um grande grupo de amostras de uma só vez, utilizando condições experimentais mais homogêneas e padronizadas. É oportuno lembrar ainda que esta técnica de análise reduz significativamente a quantidade de tecido de arquivo exigido para um estudo em particular, preservando assim a maior parte do tecido remanescente para outras pesquisas ou necessidades de diagnóstico (Hoos e Cordon-Cardo, 2001; Moch et al., 2001; Pacifico et al., 2004).

Embora a técnica do TMA seja considerada dinâmica e muito versátil, sua principal limitação é o volume reduzido de tecido obtido de cada cilindro de bloco doador (Radhakrishnan et al., 2008). Outra potencial desvantagem em comparação com cortes de tecidos convencionais é que os cilindros doadores podem não ser representativos de todo o tumor, particularmente no caso de tumores heterogêneos microscopicamente e quando se usa marcadores moleculares com expressão tecidual heterogênea. Contudo, a evolução da experiência com os TMAs permitiu o uso de construções de arranjos teciduais muito seletivos e localizados, baseados em duplicatas ou triplicatas (Fregnani, 2008) bem como em cilindros de tamanhos variáveis o que – de certa forma – diminuiu as limitações supramencionadas (Boone et al., 2008).

Assim, alguns estudos de validação diagnóstica, imunoistoquímica e por hibridação *in situ* envolvendo TMA já foram realizados em diferentes tipos de lesões como, por exemplo, para o estudo de tumores de glândulas salivares (Fonseca et al., 2014), carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço e da cavidade oral (Fillies et al., 2006; Kleer et al., 2006; Freier et al., 2007; Laimer et al., 2007), carcinomas espinocelulares de esôfago (Boone et al., 2008), câncer do endométrio (Fons et al., 2007), carcinomas da mama (Camp et al., 2000; Van den Eynden et al., 2004; Alkushi, 2009), adenocarcinoma cervical uterino (Tawfik El-Mansi e Williams, 2006), câncer vulvar (Fons et al., 2009), câncer de pulmão (Karlsson et al., 2009), câncer de bexiga (Nocito et al., 2001), câncer retal e colorretal (Fernebro et al., 2002; Jourdan et al., 2003), carcinoma de células escamosas de laringe (Griffin et al., 2003) e melanoma (Pacífico et al., 2004).

Embora a técnica do TMA tenha sido inicialmente descrita para a caracterização de biomarcadores na pesquisa com câncer (DeRisi et al., 1996), a utilização desta técnica está em expansão por consequência natural do aprimoramento de seu uso em associação com diversos métodos de investigação científica, incluindo – além da imunoistoquímica e da hibridação *in situ* – a análise de ploidia de DNA, a morfometria nuclear e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Todas as técnicas em questão são usadas para validação de marcadores tumorais, identificação de novos marcadores biológicos, análise de progressão tumoral, análise de prognóstico e estudos genômicos e proteômicos (Radhakrishnan et al., 2008).

Um aspecto ainda pouco desenvolvido no que diz respeito ao uso do TMA para pesquisa em Patologia Oral é a falta de validação científica para estudos imunoistoquímicos (Pacífico et al., 2004). Neste contexto, até o presente momento, não foi possível identificar um estudo científico que tenha validado o uso do TMA para análises imunoistoquímicas envolvendo TOs. Tendo em vista o exposto, torna-se imperioso um estudo para validação do uso do TMA como método para análise imunoistoquímica de ameloblastomas.

CAPÍTULO 1

Artigo submetido para publicação no periódico *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology*

A validation study for the use of tissue microarray as a method for immunohistochemical analysis of ameloblastomas

Rodrigo Neves-Silva, DDS, MSc^a

Felipe Paiva Fonseca, DDS, PhD^a

Adriana Souza de Jesus, DDS^b

Hélder Antônio Rebelo Pontes, DDS, PhD^b

André Caroli Rocha, DDS, PhD^c

Pablo Agustin Vargas, DDS, PhD^a, FRCPath

Marcio Ajudarte Lopes, DDS, PhD^a

Oslei Paes de Almeida, DDS, PhD^a

Alan Roger Santos-Silva, DDS, PhD^a

^a Oral Diagnosis Department, Semiology and Pathology Areas, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, São Paulo, Brazil

^b João de Barros Barreto University Hospital, Federal University of Pará (UFPA), Belém, Pará, Brazil

^c Faculty of Medicine, Clinics Hospital, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

Correspondence to:

Alan Roger Santos-Silva

Área de Semiologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

Av. Limeira, 901, Bairro Areão, Piracicaba, São Paulo, Brasil, CEP 13414-903

Phone: + 55 19 2106-5320 Fax: + 55 19 2106-5218

E-mail: alanroger@fop.unicamp.br

Abstract

Objective: To determine the most adequate number and size of tissue microarray (TMA) cores in immunohistochemical studies for ameloblastomas.

Materials and methods: Forty formalin-fixed, paraffin-embedded cases of multicystic ameloblastomas were distributed in two TMA blocks assembled in triplicate containing 1.0mm and 2.0mm cores. Immunohistochemical analyses against cytokeratins 14 and 19, Bcl-2, and Ki-67 were performed, digitally and semiquantitatively quantified, and the results were subsequently compared with those obtained in conventional whole section slides (CWSS). Digital analysis was performed with PixelCount® and NuclearV9® software applications by using AperioScanscopeCS® Slide Scanner.

Results: It was found that 1.0mm TMA presented lower preservation of cores (overall mean lost cores rate of 33.74%), while a better correlation was observed between 2.0mm cores assembled in triplicates and CWSS. In general, concordance (*Kappa* and intraclass correlation test) between immunostaining in 2.0mm TMA and CWSS was good for both digital and semiquantitative analysis in all tested antibodies (CK14 [$k=0.4218$ and $k=0.2093$], CK19 [$k=0.5000$ and $k=0.8571$], Bcl-2 [$k=0.3750$ and $k=0.5224$], and Ki-67 [$k=0.6154$ and 0.88881]).

Conclusions: TMA blocks containing 2.0mm cores arranged in triplicate provide reliable immunohistochemical results for nuclear and cytoplasmic markers in multicystic ameloblastomas.

Keywords: ameloblastoma, immunohistochemistry, validation, tissue microarray.

Statement of clinical relevance

Immunohistochemistry is widely used to evaluate biomarkers in ameloblastomas in order to improve diagnosis and predict clinical behavior. TMA leads to the preservation of the original tissue, laboratory cost reduction, and a reduction of execution time. This is the first study to demonstrate that TMA is a reliable method for immunohistochemical studies of ameloblastomas.

Introduction

Odontogenic tumors (OTs) are lesions derived from the tooth-forming apparatus or its remnants. They develop exclusively on maxillary bones, forming a heterogeneous group of lesions that range from non-neoplastic tissue proliferations (hamartomas) to benign and malignant neoplasms.^{1, 2}

In the context of OTs, ameloblastomas are benign but locally aggressive neoplasms that affect the mandible or, less commonly, the maxilla of patients in their third to fifth decades of life with no gender predilection and a high rate of recurrence following surgical treatment. Ameloblastomas are considered the second most common OTs and account for up to 30% of these lesions.³⁻⁶

Tissue microarray (TMA) was first described by Wan et al. in 1987⁷ and further explored by Kononen et al. in 1998, following an exponential increase in the number of studies using this laboratory approach.⁷⁻⁹ The main advantage of the TMA method is its ability to aggregate tissue samples of hundreds of different cases on a single paraffin block, leading to the preservation of the original tissue, laboratory cost reduction, and a reduction of execution time.⁹⁻¹² On the other hand, limitations have been pointed out, including the variable quality of tissue used in TMA constructions, the technical skills required for arranging and cutting TMA blocks, and, most importantly, the ability of TMA to adequately represent heterogeneous neoplasias. Such limitations have necessitated the development of validation studies.^{9, 12-14}

TMA is a versatile technical approach, as slides can be examined using several assay protocols developed for conventional whole section slides (CWSS), such as diagnostic histopathology, immunohistochemistry, DNA ploidy, and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), among others.¹⁴

In this study, we tested the hypothesis that TMA is a reliable and useful method for immunohistochemical studies based on cytoplasmic and nuclear staining of ameloblastomas by investigating the immunoexpression of cytokeratin (CK) 14, CK19, Bcl-2, and Ki-67 in ameloblastomas arranged in TMA blocks containing 1.0mm and 2.0mm cores assembled in triplicate and comparing these to the findings from CWSS.

Materials and methods

The study was approved by the Ethics Committee for Human Studies, Piracicaba Dental School, Brazil (protocol number: 015/2015).

Tissue samples

A 15-year retrospective review for the period from 2000 to 2014 was performed in the files of the Department of Oral Diagnosis (Pathology Area) of the University of Campinas (Piracicaba Dental School, Piracicaba, Brazil), and a 10-year retrospective review for the period from 2005 to 2014 was performed in the files of the Service of Oral Pathology of the Federal University of Pará (João de Barros Barreto University Hospital, Belém, Brazil). All formalin-fixed, paraffin-embedded cases diagnosed as OTs were retrieved. Afterwards, 40 multicystic ameloblastomas with enough tissue were included in this study and further arranged in TMAs.

Clinicopathological features including age, gender, affected site, radiographic pattern and histopathological pattern were retrieved from patients' pathological reports and dental and medical charts. Original diagnoses were confirmed by two independent oral pathologists by reviewing 5-µm histological sections stained with haematoxylin and eosin (H&E) following the 2005 World Health Organization guidelines.⁵ For a detailed epidemiological

characterization, data of all OTs diagnosed in these two services in the above-mentioned periods were also collected.

Tissue microarray construction

Representative tumor areas were selected and marked on H&E-stained sections using an objective marker (Eclipse E200, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). The slide was then overlaid on the original paraffin block to determine the corresponding area to be used. TMAs were constructed using a manual tissue arrayer (Sakura Co., Tokyo, Japan), and three representative cylindrical cores of 1.0mm and 2.0mm diameter were taken from each original tissue block and then arranged sequentially into a recipient ready-to-use paraffin block (Sakura Co., Tokyo, Japan). The 40 cases of ameloblastoma were distributed as follows: 20 cases in one TMA block containing 1.0mm cores and the other 20 cases in one TMA block containing 2.0mm cores. Three cores of oral fibrous hyperplasia were inserted in each recipient block as a reference for orientation. A map specifying the exact position of each case and the cores of oral fibrous hyperplasia was prepared to facilitate the interpretation of the immunohistochemical results.

TMA blocks were analyzed to determine the percentage of tissue loss in each case caused by technical preparation procedures. Following methods previously applied,¹⁷ cores were considered lost when <10% of their areas were composed of tumor cells ('sampling error') or when <10% of tissue was present ('absent core').

TMA cases where only one (out of three) core was lost during construction were kept in the study and classified as duplicates in order to be compared with triplicates and to determine the most adequate number of cores for ameloblastoma studies. Cases were excluded if two (out of three) TMA cores were lost.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed both in TMA sections and corresponding CWSS of each ameloblastoma case included in the TMAs based on methods previously

applied by Andrade et al. (2012).¹⁵ Briefly, the reactions were conducted in 3- μ m-thick sections of the original formalin-fixed, paraffin-embedded tissues that were de-waxed with xylene and then hydrated in an ethanol series. The antigen retrieval was done using a pressure-cooker for 3 minutes, and the endogenous peroxidase activity was blocked using 10% hydrogen peroxide. After washing in PBS buffer (pH 7.4), slides were incubated overnight with primary antibodies against CK14 (clone LL002, Novocastra, diluted 1:200), CK19 (clone RCK108, DakoCytomation, diluted 1:200), Bcl-2 (clone Bcl-2-100, Zymed, diluted 1:50), and Ki-67 (clone MIB1, DakoCytomation, diluted 1:100). All slides were subsequently exposed to avidin-biotin complex, horseradish peroxidase reagents (LSAB Kit-DakoCytomation, USA), and diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) and subsequently counterstained with Carazzi hematoxylin. Adequate positive control sections were used for each antibody, including skin samples for CKs, a sarcoma sample for Ki-67, and a tonsil fragment for Bcl-2, whereas the negative control was obtained by omitting the primary specific antibody.

Digital analysis

The immunohistochemical stained slides were scanned into high-resolution images using the AperioScanscopeCS[®] Slide Scanner (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA). All digital images obtained in .svs format were visualized with ImageScope software (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA).

The PixelCount V9 Algorithm (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA) was used for analyzing the cytoplasmic expression of CK14, CK19, and Bcl-2 with the following input parameters: overlap size 0, hue value 0.1, hue width 0.5, color saturation threshold 0.04, and an intensity threshold ranging from 0 to 235. Staining was automatically quantified according to cytoplasm reactivity for CK14, CK19, and Bcl-2, whereby weak staining was scored 1, moderate scored 2, and strong scored 3. For cytoplasm staining, the final score of each tumor was calculated as the sum of the percentage of each category multiplied by their intensity scores using the following formula: $([\%weak \times 1] + [\%moderate \times 2] + [\%strong \times 3])$.¹⁶

Ki-67 reactions were analyzed using the Nuclear Staining V9 Algorithm (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA) with the following input parameters: averaging radius 1, curvature threshold 2.5, lower threshold 0, upper threshold 230, minimum nuclear size 10, maximum nuclear size 1000000, minimum roundness 0.35, minimum compactness 0.3, minimum elongation 0.1, clear area intensity 240, and an intensity threshold ranging from 0 to 205. The positive nuclear staining was measured in ten hotspot areas using a 20x magnification, and the positive staining of nuclear cells was expressed in percentage.

For statistical purposes, the median value of the final immunostaining results were used to split cases into two groups, below and above the median, respectively, representing low and high expression levels of the markers analyzed, based on methods previously applied by our group.¹⁶

Semiquantitative analysis

Conventional semiquantitative analysis of the immunohistochemical reactions, adapted from the methods of Boone et al. (2008),¹⁷ was jointly carried out by two independent observers for CK14, CK19, and Bcl-2 reactions. Briefly, CK14 staining was considered focal when <10% of the neoplastic cells were positive, weak when $\geq 10\%$ and $\leq 80\%$ were positive, and strong when $> 80\%$ were positive. CK19 reactivity was considered focal when <10% of the neoplastic cells were positive, weak when $\geq 10\%$ and $\leq 50\%$ were positive, and strong when $> 50\%$ were positive. Bcl-2 staining was considered negative when there was no positivity in the neoplastic cells, weak when <30% of the neoplastic cells were positive, and strong when $\geq 30\%$ of the neoplastic cells were positive.

Ki-67 semiquantitative analysis was performed by one observer counting the percentage of positive nuclei in a total of 500 cells per case using photomicrographs taken in a DFC345 Photomicroscope (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and evaluated with ImageJ software¹⁸ (National Institutes of Health, USA).

Statistical analysis

Kappa and intraclass correlation coefficient tests were used to compare the immunoexpression of CK14, CK19, Bcl-2, and Ki-67 in TMAs containing 1.0mm and 2.0mm cores and their respective CWSSs and to determine the chance-corrected agreement between the immunohistochemical staining scores of TMA and CWSS. Chance-corrected agreement was established based in previous studies^{17,19} and was considered poor if $\kappa < 0.00$, slight if $0 < \kappa < 0.20$, fair if $0.21 < \kappa < 0.40$, moderate if $0.41 < \kappa < 0.60$, substantial if $0.61 < \kappa < 0.80$, and almost perfect if $0.81 < \kappa < 1.00$. The SAS[®] software (version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was employed for data analysis.

Results

This study identified a total of 847 cases diagnosed as OTs in the two Oral Pathology services analyzed, Piracicaba Dental School (n=653, 77.1%) and João de Barros Barreto University Hospital (n=194, 22.9%). In the files of Piracicaba Dental School, 114 (17.46%) cases of ameloblastoma were found, representing the third most frequent OT. In the files of the João de Barros Barreto University Hospital, 63 (32.49%) cases of ameloblastoma were found, representing the most frequent OT (**Table 1**).

Considering the 40 cases of multicystic ameloblastoma selected for this study, a slight male preponderance was observed (n=25, 62.5%), with a mean age of 39.92 years at diagnosis. The mandible was the most commonly affected site (n=37, 92.5%). In terms of histopathological types, 19 (47.5%) cases were classified as follicular type and 21 (52.5%) as plexiform type. Complete epidemiologic data is presented in **Table 2**.

Results obtained using the CK14 marker showed consistently strong intensity, and the immunostaining was observed in the cytoplasm of peripheral and central (stellate reticulum) epithelial cells (**Figure 1a**). Results obtained using the CK19 marker showed weak intensity, and the immunostaining was observed in the cytoplasm of peripheral and central (stellate reticulum) epithelial cells (**Figure 1b**). Results obtained using the Bcl-2 marker showed negativity or weak intensity, and the immunostaining was observed in the

cytoplasm of peripheral and central (stellate reticulum) epithelial cells (**Figures 1c**). Results obtained using the Ki-67 marker showed medium to strong intensity, and the immunostaining was observed in the nuclei of peripheral and central (stellate reticulum) epithelial cells (**Figures 1d**).

The percentage of core losses was analyzed, and 1.0mm TMA presented a higher incidence of loss than 2.0mm. During the CK14 analysis, 1.0mm TMA presented a rate of core loss of 38.33%, while TMA of 2.0mm presented 3.33% of loss. In CK19, 1.0mm TMA presented a loss of 16.66%, while 2.0mm did not show any loss at all. In Bcl-2, 1.0mm TMA presented a rate of core loss of 41.66%, and 8.33% in 2.0mm TMA. In Ki-67, 1.0mm TMA presented a 38.33% loss, while 2.0mm TMA presented an 8.33% loss. Overall, 1.0mm TMA presented 33.74% of lost cores, while only 4.99% of the cores were lost in 2.00mm TMA.

Statistical results concerning the chance-corrected agreement between the immunohistochemical staining scores of TMAs assembled in triplicate and duplicate and corresponding CWSSs are presented in **Table 3**.

In summary, during the immunohistochemical digital quantification, the best chance-corrected agreement between the immunohistochemical staining scores of TMA and CWSS were obtained in 2.0mm duplicate TMA for CK14 ($k=0.5405$), 2.0mm triplicate or duplicate TMA for CK19 ($k=0.5000$), 1.0mm triplicate TMA for Bcl-2 ($k=1.0000$), and 1.0mm triplicate TMA for Ki-67 ($k=1.0000$). Because of the high prevalence of lost cores, it was not possible to obtain a *Kappa* value for CK14 in 1.0mm triplicates.

The semiquantitative analysis showed that the best chance-corrected agreements between the immunohistochemical staining scores of TMA and CWSS were obtained in 1.0mm duplicate TMA for CK14 ($k=0.4000$), 2.0mm triplicate or duplicate TMA for CK19 ($k=0.8571$), 1.0mm triplicate TMA for Bcl-2 ($k=0.7619$), and 1.0mm triplicate TMA for Ki-67 ($k=0.98924$). Because of the high prevalence of lost cores, it was not possible to obtain a *Kappa* value for CK14 in 1.0mm triplicates.

Discussion

OTs constitute a relevant disease group in the context of jawbone pathology and present a variable prevalence in terms of epidemiology according to the population studied. Variations in incidence of OTs may be influenced by geographic and ethnic factors or even by the institution where the data were collected.²⁰ Generally, data obtained from medical centers show a predominance of ameloblastomas, while studies performed in dental centers present a greater prevalence of odontomas.^{1,6,21-26} When taking together all OTs observed in the present retrospective study, which was based on a large cohort of Brazilian patients diagnosed over a 10- to 15-year period, keratocystic odontogenic tumors (KCOTs), odontomas, and ameloblastomas were the most prevalent lesions.

Ameloblastoma is one of the most common OTs, and although benign, it is characterized by local invasiveness and high rates of recurrence. According to the 2005 Histological Classification of Tumors by the World Health Organization,⁵ ameloblastomas are classified as multicystic (or solid), unicystic, extraosseous (or peripheral), and desmoplastic. The multicystic type is the most frequent and aggressive variant among all ameloblastomas; therefore, this study was based only on multicystic cases in order to achieve a more homogeneous and representative sample.

Immunohistochemistry has been widely used to evaluate the expression of different biomarkers in ameloblastomas in order to improve diagnosis and to predict their clinical behavior and response to treatment.²⁹⁻³¹ TMA was developed to preserve original tissue blocks from diagnostic laboratories and to save time and costs in large-scale immunohistochemical essays.⁹⁻¹² Hence, the versatility of TMA would allow the reunion of large samples of ameloblastoma cases on a single paraffin block, leading to the preservation of the original tissue, laboratory cost reduction, and a reduction of execution time. However, before routine use of TMAs for immunohistochemical studies on ameloblastomas there's urgent need for well-controlled validation studies, such as those previously performed for a variety of human tumors and TMAs, including salivary gland tumors,⁹ head and neck and oral cavity cancer,³²⁻³⁵ esophageal squamous cell carcinoma,¹⁷ endometrial cancer,³⁶ breast

carcinoma,^{27,28,37} cervical adenocarcinoma,³⁸ vulvar cancer,³⁹ lung cancer,⁴⁰ bladder cancer,⁴¹ rectal and colorectal cancer,^{42, 43} squamous cell carcinoma of the larynx,⁴⁴ and melanoma.⁴⁵

To the best of our knowledge, this was the first study to validate TMA as a reliable and useful method for immunohistochemical studies of ameloblastomas. The decision to select CK14, CK19, Bcl-2, and Ki-67 was based on previously published CWSS studies demonstrating that such proteins are good markers for cytoplasmic and nuclear immunostaining in ameloblastomas.^{30,31,46-50} Percentages of positive cells, patterns of staining, and proliferation indexes observed in the present study were in accordance with the values of previously published immunohistochemical studies on ameloblastomas.^{30,31,46-50}

In addition, the percentage of lost cores found in this study was similar to previous publications, which reported up to 25% of lost cores.^{17,27,28,36,51} Improper selection of representative tumor areas on the donor block's H&E slide or incorrect punching of these representative areas out of the donor block can cause tissue cores that contain too little tumor. Also, possible causes of absent cores are the size and fragility of the tumor tissue used and the aggressiveness of tissue processing applied.^{17,52}

For this TMA validation study, a combination of digital and conventional (semiquantitative) methods for immunohistochemical quantification as well as different core diameters were used in an attempt to increase the reproducibility of the investigation. Both digital and semiquantitative analyses were impaired for CK14 because of a high quantity of lost cores in 1.0mm TMA. For this marker, *Kappa* values were improved for 2.0mm TMAs when compared to CWSS results. Digital and semiquantitative analyses were also better for CK19 when using 2.0mm TMAs. Additionally, digital and semiquantitative analyses were better for 1.0mm TMAs when evaluating Bcl-2 and Ki-67 expression. In a similar way to other TMA validation studies, good results were obtained with 1.0mm and 2.0mm TMA cores.^{9,27,28} However, because of the high percentage of lost cores found in the 1.0mm TMA (33.74%), it seems more reasonable to recommend 2.0mm TMAs assembled in triplicate for best results in immunohistochemical studies based on multicystic ameloblastomas.

Similarly to previous findings in TMA validation studies, variable *Kappa* values were observed for the different markers used herein, where agreement between TMA cores and CWSS varied from slight to almost perfect.⁵¹ This variation could be due to variables such

as cellular tumor heterogeneity, topographical variations in the expression patterns of the markers used, and the scoring criteria used.¹⁷ Previous validation studies based on immunohistochemistry also demonstrated a good agreement between TMA and CWSS, even with the evidence of variable *Kappa* values.^{17,28,36,51}

Previous studies suggest that the use of a higher number of cores per tumor (duplicates or triplicates) can result in lower numbers of lost cases during TMA construction and processing as well as lower non-concordance rates with CWSS results.⁴⁵ This study demonstrated that the most adequate TMA construction to represent CWSS of ameloblastomas is a 2.0mm core assembled in triplicate for each case. Additionally, both digital and semiquantitative analysis can be reliably used for cytoplasmic and nuclear immunohistochemical markers in ameloblastoma TMAs.

In conclusion, this study accepted the tested hypothesis that TMA is a reliable and useful method for immunohistochemical studies based on cytoplasmic and nuclear staining of ameloblastomas. Most importantly, a well-sampled 2.0mm TMA arranged in triplicate can provide immunohistochemical results for ameloblastomas similar to those of CWSS; however, some minor variability can be found depending on the marker used. Moreover, this study originally demonstrated that the TMA approach is a valid method for immunohistochemical analysis of multicystic ameloblastomas with good agreement levels within different markers.

Acknowledgements

We thank Fabiana Facco Cassarotti and João Carlos da Silva Júnior from the Pathology Area, Piracicaba Dental School, for their contribution during the laboratory immunohistochemical reactions.

References

1. Fernandes AM, Duarte EC, Pimenta FJ, Souza LN, Santos VR, Mesquita RA, et al. Odontogenic tumors: a study of 340 cases in a Brazilian population. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34: 583–587.
2. Ramos GO, Porto JC, Vieira DS, Siqueira FM, Rivero ER. Odontogenic tumors: a 14-year retrospective study in Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Oral Research.* 2014; 28: 33–38.
3. Farias LC, Gomes CC, Brito JA, Galvao CF, Diniz MG, de Castro WH, et al. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. *Hum Pathol.* 2012; 43: 1229–1233.
4. Gondak RO, Rocha AC, Neves Campos JG, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA, et al. Unicystic ameloblastoma mimicking apical periodontitis: a case series. *J Endod.* 2013; 39: 145–148.
5. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors.* Lyon, France: IARC Press; 2005.
6. Fregnani ER, da Cruz Perez DE, de Almeida OP, Kowalski LP, Soares FA, de Abreu Alves F. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 39: 145–149.
7. Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J Immunol Methods.* 1987; 103: 121–129.

8. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998; 4: 844–847.
9. Fonseca FP, de Andrade BA, Rangel AL, Della Coletta R, Lopes MA, de Almeida OP, et al. Tissue microarray is a reliable method for immunohistochemical analysis of pleomorphic adenoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2014; 117: 81–88.
10. van de Rijn M, Gilks CB. Applications of microarrays to histopathology. *Histopathology*. 2004; 44: 97–108.
11. Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 5630–5637.
12. Paiva-Fonseca F, de Almeida OP, Ayroza-Rangel AL, Agustin-Vargas P. Tissue microarray construction for salivary gland tumors study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; 18: e1–6.
13. Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hematol*. 2002; 30: 1365–1372.
14. Radhakrishnan R, Solomon M, Satyamoorthy K, Martin LE, Lingen MW. Tissue microarray: a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37: 166–176.
15. de-Andrade BA, Toral-Rizo VH, Leon JE, Contreras E, Carlos R, Delgado-Azanero W, et al. Primary oral melanoma: a histopathological and immunohistochemical study of 22 cases of Latin America. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012; 17: e383–388.

16. Kelner N, Rodrigues PC, Bufalino A, Fonseca FP, Santos-Silva AR, Miguel MC, et al. Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2015; 37: 479–486.
17. Boone J, van Hillegersberg R, van Diest PJ, Offerhaus GJ, Rinkes IH, Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Virchows Arch*. 2008; 452: 507–514.
18. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012; 9: 671–675.
19. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33: 159–174.
20. Naz I, Mahmood MK, Akhtar F, Nagi AH. Clinicopathological evaluation of odontogenic tumours in Pakistan: a seven years retrospective study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15: 3327–3330.
21. Fregnani ER, Fillipi RZ, Oliveira CR, Vargas PA, Almeida OP. Odontomas and ameloblastomas: variable prevalences around the world? *Oral Oncol*. 2002; 38: 807–808.
22. Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruiz-Godoy Rivera LM, Meneses-Garcia A. Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997; 84: 672–675.
23. Lima GS, Fontes ST, de Araujo LM, Etges A, Tarquinio SB, Gomes AP. A survey of oral and maxillofacial biopsies in children: a single-center retrospective study of 20 years in Pelotas-Brazil. *Journal of Applied Oral Science: revista FOB*. 2008; 16: 397–402.

24. Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64: 1343–1352.
25. da-Costa DO, Mauricio AS, de-Faria PA, da-Silva LE, Mosqueda-Taylor A, Lourenco SD. Odontogenic tumors: a retrospective study of four Brazilian diagnostic pathology centers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012; 17: e389–394.
26. El-Gehani R, Orafi M, Elarbi M, Subhashraj K. Benign tumours of orofacial region at Benghazi, Libya: a study of 405 cases. *J Craniomaxillofac Surg.* 2009; 37: 370–375.
27. Alkushi A. Validation of tissue microarray biomarker expression of breast carcinomas in Saudi women. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2009; 2: 394–398.
28. Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere S, Colpaert CG, van Dam P, Merajver S, et al. Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 85: 13–22.
29. Sandra F, Mitsuyasu T, Nakamura N, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2001; 37: 193–198.
30. Yoon HJ, Jo BC, Shin WJ, Cho YA, Lee JI, Hong SP, et al. Comparative immunohistochemical study of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112: 767–776.
31. Luo HY, Yu SF, Li TJ. Differential expression of apoptosis-related proteins in various cellular components of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35: 750–755.
32. Laimer K, Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Brunhuber T, Fong D, et al. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral

cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol.* 2007; 43: 193–198.

33. Kleer CG, Teknos TN, Islam M, Marcus B, Lee JS, Pan Q, et al. RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 4485–4490.

34. Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, Brandt B, Morin P, Weingart D, et al. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer.* 2006; 6: 10.

35. Freier K, Pungs S, Sticht C, Flechtenmacher C, Lichter P, Joos S, et al. High survivin expression is associated with favorable outcome in advanced primary oral squamous cell carcinoma after radiation therapy. *Int J Cancer.* 2007; 120: 942–946.

36. Fons G, Hasibuan SM, van der Velden J, ten Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in endometrioid cancer of the endometrium. *J Clin Pathol.* 2007; 60: 500–503.

37. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest.* 2000; 80: 1943–1949.

38. Tawfik El-Mansi M, Williams AR. Validation of tissue microarray technology using cervical adenocarcinoma and its precursors as a model system. *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16: 1225–1233.

39. Fons G, van der Velden J, Burger M, ten Kate F. Validation of tissue microarray technology in vulvar cancer. *Int J Gynecol Pathol.* 2009; 28: 76–82.

40. Karlsson C, Bodin L, Piehl-Aulin K, Karlsson MG. Tissue microarray validation: a methodologic study with special reference to lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18: 2014–2021.

41. Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, et al. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol.* 2001; 194: 349–357.
42. Fernebro E, Dictor M, Bendahl PO, Ferno M, Nilbert M. Evaluation of the tissue microarray technique for immunohistochemical analysis in rectal cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126: 702–705.
43. Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E, Mourra N, Flahault A, Olschwang S, et al. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. *Virchows Arch.* 2003; 443: 115–121.
44. Griffin MC, Robinson RA, Trask DK. Validation of tissue microarrays using p53 immunohistochemical studies of squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol.* 2003; 16: 1181–1188.
45. Pacifico MD, Grover R, Richman P, Daley F, Wilson GD. Validation of tissue microarray for the immunohistochemical profiling of melanoma. *Melanoma Res.* 2004; 14: 39–42.
46. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39: 585–591.
47. Jaaskelainen K, Jee KJ, Leivo I, Saloniemi I, Knuutila S, Heikinheimo K. Cell proliferation and chromosomal changes in human ameloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002; 136: 31–37.
48. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Garcia-Vazquez F, et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol.* 2008; 44: 805–811.

49. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, de Almeida OP, Carrasco-Daza D, Farfan-Morales JE, et al. Comparative expression of syndecan-1 and Ki-67 in peripheral and desmoplastic ameloblastomas and ameloblastic carcinoma. *Pathol Int.* 2009; 59: 229–233.
50. Florescu A, Simionescu C, Ciurea R, Pitru A. P53, Bcl-2 and Ki67 immunoexpression in follicular solid ameloblastomas. *Rom J Morphol Embryol.* 2012; 53: 105–109.
51. Chen B, van den Brekel MW, Buschers W, Balm AJ, van Velthuysen ML. Validation of tissue array technology in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2003; 25: 922–930.
52. Tzankov A, Went P, Zimpfer A, Dirnhofer S. Tissue microarray technology: principles, pitfalls and perspectives--lessons learned from hematological malignancies. *Exp Gerontol.* 2005; 40: 737–744.

Table 1. Epidemiologic data of odontogenic tumors.

Piracicaba Dental School		João de Barros Barreto University Hospital	
Odontogenic Tumor	n (%)	Odontogenic Tumor	n (%)
Keratocystic odontogenic tumor	291 (44.57)	Ameloblastoma	63 (32.49)
Odontoma	171 (26.19)	Keratocystic odontogenic tumor	59 (30.42)
Ameloblastoma	114 (17.46)	Odontogenic myxoma	17 (8.79)
Odontogenic myxoma	20 (3.07)	Odontoma	16 (8.24)
Adenomatoid odontogenic tumor	13 (1.99)	Calcifying cystic odontogenic tumor	7 (3.6)
Calcifying cystic odontogenic tumor	12 (1.84)	Adenomatoid odontogenic tumor	7 (3.6)
Calcifying epithelial odontogenic tumor	11 (1.69)	Odontogenic fibroma	6 (3.09)
Cementoblastoma	10 (1.53)	Calcifying epithelial odontogenic tumor	5 (2.57)
Ameloblastic fibro-odontoma	5 (0.76)	Ameloblastic fibro-odontoma	4 (2.06)
Odontogenic fibroma	3 (0.45)	Cementoblastoma	3 (1.54)
Ameloblastic fibrodentinoma	1 (0.15)	Ameloblastic carcinoma	3 (1.54)
Ameloblastic fibroma	1 (0.15)	Ameloblastic fibroma	2 (1.03)
Malignant ameloblastoma	1 (0.15)	Ameloblastic fibrosarcoma	2 (1.03)
Ameloblastic carcinoma	NS	Ameloblastic fibrodentinoma	NS
Ameloblastic fibrosarcoma	NS	Malignant ameloblastoma	NS

NS: Not specified.

Table 2. Epidemiologic data of ameloblastomas included in this study.

TMA 1.0mm and 2.0mm (n=40)	
Parameter	n (%)
Age	n (%)
< 30	9 (22.5)
30-60	13 (32.5)
> 60	5 (12.5)
NS	13 (32.5)
Gender	n (%)
Male	25 (62.5)
Female	14 (35)
NS	1 (2.5)
Tumor Site	n (%)
Mandible	37 (92.5)
Maxilla	2 (5)
NS	1 (2.5)
Radiographic pattern	n (%)
Unilocular	11 (27.5)
Multilocular	10 (25)
NS	19 (47.5)
Histopathological pattern	n (%)
Follicular	19 (47.5)
Plexiform	21 (52.5)

NS: Not specified.

Table 3. Comparative study of digital and semiquantitative immunohistochemical analyses.

Digital immunohistochemical analyses		Semiquantitative immunohistochemical analyses	
CK14	<i>Kappa</i>	CK14	<i>Kappa</i>
1.0mm		1.0mm	
CWSS (W=10; S=10) x T (W=0; S=5)	-	CWSS (W=4; S=16; N=0) x T (W=0; S=4; N=0)	-
CWSS (W=10; S=10) x D (W=2; S=8)	0.0909	CWSS (W=4; S=16; N=0) x D (W=2; S=10; N=0)	0.4000
2.0mm		2.0mm	
CWSS (W=10; S=10) x T (W=11; S=6)	0.4218	CWSS (W=4; S=16; N=0) x T (W=4; S=12; N=0)	0.2093
CWSS (W=10; S=10) x D (W=12; S=5)	0.5405	CWSS (W=4; S=16; N=0) x D (W=3; S=16; N=1)	0.2083
CK19		CK19	
1.0mm		1.0mm	
CWSS (W=10; S=10) x T (W=4; S=5)	0.3415	CWSS (W=15; S=5; N=0) x T (W=6; S=5; N=0)	0.6207
CWSS (W=10; S=10) x D (W=6; S=8)	0.1600	CWSS (W=15; S=5; N=0) x D (W=8; S=7; N=0)	0.5872
2.0mm		2.0mm	
CWSS (W=10; S=10) x T (W=11; S=9)	0.5000	CWSS (W=15; S=5; N=0) x T (W=16; S=4; N=0)	0.8571
CWSS (W=10; S=10) x D (W=11; S=9)	0.5000	CWSS (W=15; S=5; N=0) x D (W=16; S=4; N=0)	0.8571
Bcl-2		Bcl-2	
1.0mm		1.0mm	
CWSS (W=10; S=10) x T (W=2; S=3)	1.0000	CWSS (W=10; S=5; N=5) x T (W=1; S=1; N=3)	0.7619
CWSS (W=10; S=10) x D (W=5; S=5)	0.6000	CWSS (W=10; S=5; N=5) x D (W=2; S=1; N=7)	0.4737
2.0mm		2.0mm	
CWSS (W=10; S=10) x T (W=9; S=7)	0.3750	CWSS (W=12; S=0; N=8) x T (W=5; S=0; N=11)	0.5224
CWSS (W=10; S=10) x D (W=10; S=8)	0.5500	CWSS (W=12; S=0; N=8) x D (W=6; S=0; N=11)	0.5526
Ki-67		Ki-67	
1.0mm		1.0mm	
CWSS (W=10; S=10) x T (W=1; S=4)	1.0000	CWSS (1.66%) x T (3.35%)	0.98924
CWSS (W=10; S=10) x D (W=5; S=5)	0.8000	CWSS (1.66%) x D (1.7%)	0.97318
2.0mm		2.0mm	
CWSS (W=10; S=10) x T (W=9; S=6)	0.6154	CWSS (1.28%) x T (1.21%)	0.88881
CWSS (W=10; S=10) x D (W=9; S=8)	0.6483	CWSS (1.28%) x D (1.16%)	0.87105

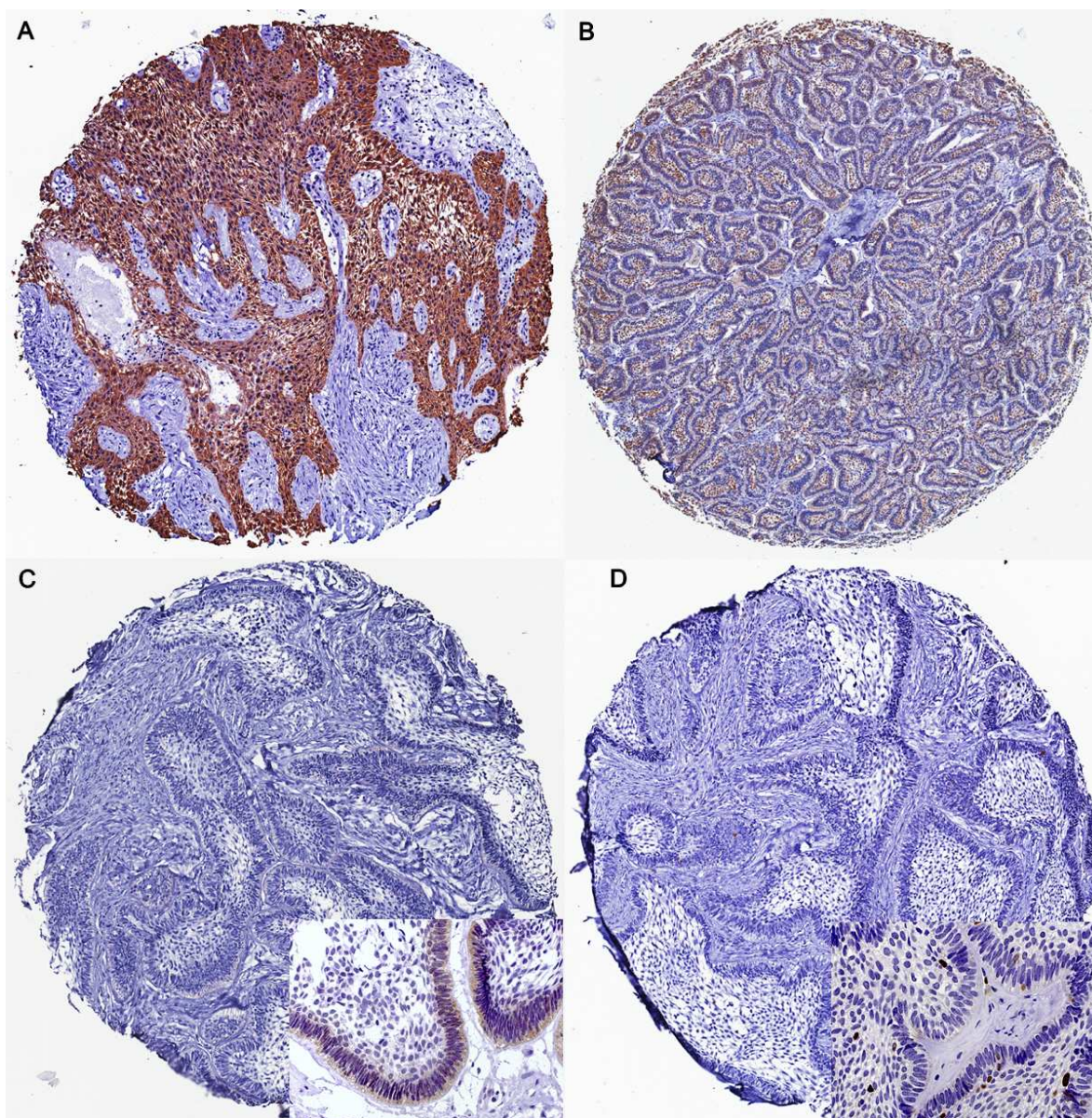
T – Triplicate; CWSS – Conventional whole section slides; D – Duplicate; W – weak; S – strong; N – Negative.

Legends of figure

Fig 1. Representative TMA cores and immunohistochemical markers. **(A).** Immunohistochemical expression of CK14 in ameloblastomas using 2.0mm TMA (streptavidin-biotin, original magnification x10); **(B).** Immunohistochemical expression of CK19 in ameloblastomas using 2.0mm TMA (streptavidin-biotin, original magnification x10); **(C).** Immunohistochemical expression of Bcl-2 in ameloblastomas using 2.0mm TMA (streptavidin-biotin, original magnification x10). Insert showing higher magnification of Bcl-2 expression (x20); **(D).** Immunohistochemical expression of Ki-67 in ameloblastomas using 2.0mm TMA (streptavidin-biotin, original magnification x10). Insert showing higher magnification of Ki-67 expression (x20).

FIGURE

Fig 1.



CONCLUSÃO

- A técnica do TMA é um método válido e confiável para análises imunoistoquímicas (baseadas nos marcadores CK14, CK19, Bcl-2 e Ki-67) em ameloblastomas e apresenta altos níveis de correspondência com análises realizadas em cortes histológicos convencionais;
- As técnicas digital e semi-quantitativa são métodos válidos e confiáveis para a quantificação imunoistoquímica dos marcadores CK14, CK19, Bcl-2 e Ki-67 em TMAs de ameloblastomas; apresentando altos níveis de correspondência com análises realizadas em cortes histológicos completos;
- TMAs construídos com cilindros de 1,0mm e de 2,0mm de diâmetro montados em triplicata apresentam bons níveis de correspondência com análises imunoistoquímicas realizadas em cortes histológicos convencionais. Contudo, dentro dos limites técnicos do presente estudo, recomendam-se cilindros de 2,0mm de diâmetro montados em triplicata.

REFERÊNCIAS*

1. Alkushi A. Validation of tissue microarray biomarker expression of breast carcinomas in Saudi women. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2009; 2(3): 394-8.
2. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. Lyon, France: IARC Press; 2005.
3. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Garcia-Vazquez F, et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol.* 2008; 44(8): 805-11.
4. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, de Almeida OP, Carrasco-Daza D, Farfan-Morales JE, et al. Comparative expression of syndecan-1 and Ki-67 in peripheral and desmoplastic ameloblastomas and ameloblastic carcinoma. *Pathol Int.* 2009; 59(4): 229-33.
5. Boone J, van Hillegersberg R, van Diest PJ, Offerhaus GJ, Rinkes IH, Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Virchows Arch.* 2008; 452(5): 507-14.
6. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest.* 2000; 80(12): 1943-9.
7. Daley TD, Wysocki GP, Pringle GA. Relative incidence of odontogenic tumors and oral and jaw cysts in a Canadian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 77(3): 276-80.
8. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet.* 1996; 14(4): 457-60.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. DeVilliers P, Suggs C, Simmons D, Murrah V, Wright JT. Microgenomics of ameloblastoma. *J Dent Res*. 2011; 90(4): 463-9.
10. Fernandes AM, Duarte EC, Pimenta FJ, Souza LN, Santos VR, Mesquita RA, et al. Odontogenic tumors: a study of 340 cases in a Brazilian population. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34(10): 583-7.
11. Fernebro E, Dictor M, Bendahl PO, Ferno M, Nilbert M. Evaluation of the tissue microarray technique for immunohistochemical analysis in rectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126(6): 702-5.
12. Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, Brandt B, Morin P, Weingart D, et al. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer*. 2006; 6: 10.
13. Florescu A, Simionescu C, Ciurea R, Pitru A. P53, Bcl-2 and Ki67 immunoexpression in follicular solid ameloblastomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2012; 53(1): 105-9.
14. Fons G, Hasibuan SM, van der Velden J, ten Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in endometrioid cancer of the endometrium. *J Clin Pathol*. 2007; 60(5): 500-3.
15. Fons G, van der Velden J, Burger M, ten Kate F. Validation of tissue microarray technology in vulvar cancer. *Int J Gynecol Pathol*. 2009; 28(1): 76-82.
16. Fonseca FP, de Andrade BA, Rangel AL, Della Coletta R, Lopes MA, de Almeida OP, et al. Tissue microarray is a reliable method for immunohistochemical analysis of pleomorphic adenoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2014; 117(1): 81-8.
17. Fregnani ER. Estudo clínico, radiográfico, microscópico e perfil imunoistoquímico dos ameloblastomas: a experiência do Hospital A. C. Camargo [tese]. São Paulo: Hospital A. C. Camargo, Fundação Antônio Prudente; 2008.
18. Fregnani ER, da Cruz Perez DE, de Almeida OP, Kowalski LP, Soares FA, de Abreu Alves F. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 39(2): 145-9.
19. Fregnani ER, Fillipi RZ, Oliveira CR, Vargas PA, Almeida OP. Odontomas and ameloblastomas: variable prevalences around the world? *Oral Oncol*. 2002; 38(8): 807-8.

20. Freier K, Pungs S, Sticht C, Flechtenmacher C, Lichter P, Joos S, et al. High survivin expression is associated with favorable outcome in advanced primary oral squamous cell carcinoma after radiation therapy. *Int J Cancer*. 2007; 120(4): 942-6.
21. Gadbail AR, Patil R, Chaudhary M. Co-expression of Ki-67 and p53 protein in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Acta Odontol Scand*. 2012; 70(6): 529-35.
22. Gardner DG, Pecak AM. The treatment of ameloblastoma based on pathologic and anatomic principles. *Cancer*. 1980; 46(11): 2514-9.
23. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39(8): 585-91.
24. Gondak RO, Rocha AC, Neves Campos JG, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA, et al. Unicystic ameloblastoma mimicking apical periodontitis: a case series. *J Endod*. 2013; 39(1): 145-8.
25. Gonzalez-Gonzalez R, Molina-Frechero N, Damian-Matsumura P, Salazar-Rodriguez S, Bologna-Molina R. Immunohistochemical expression of Survivin and its relationship with cell apoptosis and proliferation in ameloblastomas. *Dis Markers*. 2015; 2015: 301781.
26. Griffin MC, Robinson RA, Trask DK. Validation of tissue microarrays using p53 immunohistochemical studies of squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol*. 2003; 16(12): 1181-8.
27. Heikinheimo K, Jee KJ, Niini T, Aalto Y, Happonen RP, Leivo I, et al. Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. *J Dent Res*. 2002; 81(8): 525-30.
28. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*. 2001; 81(10): 1331-8.
29. Jaaskelainen K, Jee KJ, Leivo I, Saloniemi I, Knuutila S, Heikinheimo K. Cell proliferation and chromosomal changes in human ameloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002; 136(1): 31-7.
30. Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E, Mourra N, Flahault A, Olschwang S, et al. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. *Virchows Arch*. 2003; 443(2): 115-21.

31. Karlsson C, Bodin L, Piehl-Aulin K, Karlsson MG. Tissue microarray validation: a methodologic study with special reference to lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(7): 2014-21.
32. 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.* 2015; 107(1): 378.
33. Kleer CG, Teknos TN, Islam M, Marcus B, Lee JS, Pan Q, et al. RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(15): 4485-90.
34. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998; 4(7): 844-7.
35. Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14 proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(5): 292-9.
36. Kumamoto H, Ooya K. Expression of survivin and X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in ameloblastomas. *Virchows Arch.* 2004; 444(2): 164-70.
37. Kurppa KJ, Caton J, Morgan PR, Ristimäki A, Ruhin B, Kellokoski J, et al. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol.* 2014; 232(5): 492-8.
38. Laimer K, Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Brunhuber T, Fong D, et al. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol.* 2007; 43(2): 193-8.
39. Luo HY, Yu SF, Li TJ. Differential expression of apoptosis-related proteins in various cellular components of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35(8): 750-5.
40. Martinez Martinez M, Mosqueda-Taylor A, Carlos R, Delgado-Azanero W, de Almeida OP. Malignant odontogenic tumors: a multicentric Latin American study of 25 cases. *Oral Dis.* 2014; 20(4): 380-5.

41. Meer S, Galpin JS, Altini M, Coleman H, Ali H. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(2): 213-21.
42. Mendenhall WM, Werning JW, Fernandes R, Malyapa RS, Mendenhall NP. Ameloblastoma. *Am J Clin Oncol.* 2007; 30(6): 645-8.
43. Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol.* 2001; 8(1): 14-20.
44. Modolo F, Biz MT, de Sousa SM, Fachinelli Rde L, Crema VO. Immunohistochemical expression of Rho GTPases in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2012; 41(5): 400-7.
45. Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruiz-Godoy Rivera LM, Meneses-Garcia A. Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84(6): 672-5.
46. Naz I, Mahmood MK, Akhtar F, Nagi AH. Clinicopathological evaluation of odontogenic tumours in Pakistan - a seven years retrospective study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(7): 3327-30.
47. Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, et al. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol.* 2001; 194(3): 349-57.
48. Pacifico MD, Grover R, Richman P, Daley F, Wilson GD. Validation of tissue microarray for the immunohistochemical profiling of melanoma. *Melanoma Res.* 2004; 14(1): 39-42.
49. Papagerakis P, Peuchmaur M, Hotton D, Ferkdadji L, Delmas P, Sasaki S, et al. Aberrant gene expression in epithelial cells of mixed odontogenic tumors. *J Dent Res.* 1999; 78(1): 20-30.
50. Radhakrishnan R, Solomon M, Satyamoorthy K, Martin LE, Lingen MW. Tissue microarray - a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37(3): 166-76.
51. Ramos GO, Porto JC, Vieira DS, Siqueira FM, Rivero ER. Odontogenic tumors: a 14-year retrospective study in Santa Catarina, Brazil. *Brazilian oral research.* 2014; 28(1): 33-8.

52. Sandra F, Mitsuyasu T, Nakamura N, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2001; 37(2): 193-8.
53. Sharifi-Sistani N, Zartab H, Babakoochi S, Saghravanian N, Jamshidi S, Esmaili H, et al. Immunohistochemical comparison of the expression of p53 and MDM2 proteins in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *J Craniofac Surg.* 2011; 22(5): 1652-6.
54. Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho J, Neahring L, Kwei KA, et al. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat Genet.* 2014; 46(7): 722-5.
55. Tawfik El-Mansi M, Williams AR. Validation of tissue microarray technology using cervical adenocarcinoma and its precursors as a model system. *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16(3): 1225-33.
56. Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere S, Colpaert CG, van Dam P, Merajver S, et al. Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 85(1): 13-22.
57. Vickers RA, Gorlin RJ. Ameloblastoma: Delineation of early histopathologic features of neoplasia. *Cancer.* 1970; 26(3): 699-710.
58. Yoon HJ, Jo BC, Shin WJ, Cho YA, Lee JI, Hong SP, et al. Comparative immunohistochemical study of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(6): 767-76.

Anexo 1 - Certificado do Comitê de Ética em pesquisa

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise clinicopatológica e imunohistoquímica de ameloblastoma por meio da técnica de tissue microarray", protocolo nº 015/2015, dos pesquisadores Rodrigo Neves Silva, Alan Roger dos Santos Silva e Pablo Agustin Vargas, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 27/02/2015.		
The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "Clinicopathological and immunohistochemistry analysis of ameloblastoma by tissue microarray technique", register number 015/2015, of Rodrigo Neves Silva, Alan Roger dos Santos Silva and Pablo Agustin Vargas, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Feb 27, 2015.		
		
Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Secretário CEP/FOP/UNICAMP	Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.		

Anexo 2 – Declaração de não infringência de direitos autorais



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



DECLARAÇÃO

A cópia do artigo de minha autoria submetido para publicação em revista científica sujeito a arbitragem, que consta na minha Tese de Doutorado, intitulada "**A validation study for the use of tissue microarray as a method for immunohistochemical analysis of ameloblastomas**", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Piracicaba - SP, 19 de Junho de 20 15.

Rodrigo Neves Silva
RG: 2.077.255
Autor

Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva
RG: 33.306.690X
Orientador