

**ESTUDO CLÍNICO, RADIOGRÁFICO,
MICROSCÓPICO E PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO
DOS AMELOBLASTOMAS: A EXPERIÊNCIA DO
HOSPITAL A.C. CAMARGO**

EDUARDO RODRIGUES FREGNANI

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Fregnani, Eduardo Rodrigues

**Estudo clínico, radiográfico, microscópico e perfil
imunoistoquímico dos ameloblastomas: a experiência do Hospital
A.C. Camargo** / Eduardo Rodrigues Fregnani -- São Paulo, 2008.
98p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:
Oncologia.

Orientador: Fábio de Abreu Alves

Descritores: 1. TUMORES ODONTOGÊNICOS. 2. AMELOBLASTOMA.
3. IMUNOHISTOQUÍMICA. 4. MICROSCOPIA. 5. CIRURGIA. 6.
TRATAMENTO. 7. MANDÍBULA. 8. MAXILA.

**“Life is no straight
and every corridor along which
we travel isn’t free and unhampered,
but is a maze of passages,
through which we must seek our way,
lost and confused, now and again
checked in a blind alley.**

**But always, if we have faith,
a door will open for us,
Not perhaps one that we ourselves
would ever have thought of,
But one that will ultimately prove good for us.”**

A. J. Cronin

DEDICATÓRIA

À minha esposa **Ana Cecília**, minha alma gêmea e meu espelho de perfeição, meu braço direito e esquerdo, parceira para o que der e vier. Sem você esta tese ainda seria um simples projeto.

Aos meus pais **Carlos Roberto e Maria do Carmo** que com todo o amor do mundo estão sempre ao meu lado incentivando, ouvindo e apoiando meus sonhos e angústias e me fazendo uma pessoa mais feliz.

Ao **Renato**, companheiro indispensável e presente em todas as etapas desta caminhada chamada Vida.

Ao meu sogro **Márcio** e minha sogra **Lúcia** pelo carinho, apoio e eterna disponibilidade em ajudar.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves**, Diretor do Departamento de Estomatologia e meu orientador pela confiança depositada, incentivo e amizade que tornaram possível a realização desta tese.

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, meu co-orientador, pela grande eficiência, conhecimento e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida**, exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino. Meu exemplo a ser seguido, obrigado pelo apoio, confiança, oportunidades e constante incentivo na minha formação profissional e engrandecimento pessoal.

Ao amigo e colega **Danyel Elias da Cruz Perez** pelos momentos na pós-graduação e toda ajuda e incentivo para a realização desta tese. Obrigado pela valiosa amizade.

AGRADECIMENTOS

À **Fundação Antônio Prudente**, Hospital A.C. Camargo nas pessoas do seu Diretor Presidente **Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani**.

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pela concessão da Bolsa de Estudos (04/15360-3) e Auxílio à Pesquisa (05/59755-4).

Ao **Prof. Luiz Fernando Lima Reis** coordenador geral do programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Aos **Profs. Drs. Luiz Paulo Kowalski e Fábio Ramôa Pires** pela valiosa avaliação do meu trabalho durante o curso.

Aos amigos e colegas de pós-graduação **Jorge Esquiche e Ademar Takahama Jr.** pela amizade e apoio na realização desta tese.

Aos amigos de faculdade e companheiros de toda a vida, **Marcelo Oliveira, Fabio Mitsui, Carla Sano, Patrícia Freitas, Patrícia Damasceno, Leonardo Cunha, Vanessa Berber, Rogério de Oliveira**.

Aos colegas do Departamento de Estomatologia pela amizade e incentivo.

A **Sra. Hirde Contesini** e ao **Sr. Luis Otílio de Lima** pela colaboração, dedicação e ajuda no levantamento dos prontuários por meio do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME).

À Sueli Nonogaki e ao Carlos Ferreira Nascimento pela contribuição no laboratório para a realização das reações imunohistoquímicas e montagem do TMA.

A **Sra. Suely Francisco**, bibliotecária do Hospital A.C. Camargo, pelas sugestões, orientações e revisão desta tese.

Ciente de que seria impossível lembrar de todos que, direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, deixo aqui meus sinceros agradecimentos aqueles que fizeram parte de minha conquista.

RESUMO

Fregnani ER. **Estudo clínico, radiográfico, microscópico e perfil imunoistoquímico dos ameloblastomas: a experiência do Hospital A.C. Camargo.** São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Os Ameloblastomas são tumores odontogênicos que exibem crescimento lento, porém mostram-se localmente agressivos. Este estudo teve como objetivo avaliar e correlacionar os achados clínico-radiográficos, histopatológicos e a expressão imunoistoquímica de diversos marcadores em Ameloblastomas e estabelecer informações relevantes quanto biologia, tratamento e prognóstico deste tumor. Trata-se de um estudo retrospectivo de 121 casos de Ameloblastomas diagnosticados e tratados no Hospital A.C.Camargo entre os anos de 1953 a 2003. A partir do material existente nos blocos de parafina, realizaram-se novos cortes para confirmação do tipo histológico e seleção das áreas para o Tissue Microarray. Foram analisados anticorpos para investigação de fatores prognósticos e de proliferação celular (anti Ki-67; p53, EGFR, Syndecan-1 (CD 138), PTHrP) e para investigação da histogênese tumoral (vimentina e citoqueratinas Ck 1, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 16,18,19 e 34 β e AE1/AE3). Os dados foram analisados estatisticamente usando os testes estatísticos apropriados, dentre eles o método de Kaplan-Meyer e a regressão logística de Cox. A idade dos pacientes variou de 02 a 82 anos (media= 33,2 anos) com ligeira predileção pelo gênero feminino. A maioria dos casos acometeu a região posterior de mandíbula (80%). Radiograficamente, 60% mostraram o padrão multilocular. Os Ameloblastomas sólidos corresponderam a 113 casos, e o tipo histológico plexiforme foi o mais comum. Os tumores sólidos foram tratados por ressecção em bloco, curetagem associada à crioterapia ou somente curetagem, tumores unicísticos apenas por procedimentos conservadores. A taxa global de recidiva foi de 22,1%, com um tempo de acompanhamento

médio de 9,7 anos. A análise estatística univariada mostrou que o aspecto radiográfico multilocular, a presença de corticais ósseas rompidas e o aspecto histológico folicular indicaram maior chance de recorrência. Positividade para as citoqueratinas AE1/AE3, 34 β 12, 14 e 19 e negatividade para as citoqueratinas 1 e 10 fortalecem seu perfil odontogênico. Os inúmeros subtipos histológicos e grande variabilidade de diferenciação celular em cada tumor fizeram com que algumas citoqueratinas, tais como as CKs 6,7, 8, 16 e 18 e vimentina mostrassem expressões focais e específicas. Syndecan-1 mostrou negatividade para 18,2% e fraca positividade para 42,1% dos casos. Mostrou associação estatisticamente significativa com o tempo de queixa, ou seja, os casos positivos para este marcador mostraram tempo de queixa menor que os casos onde Syndecan-1 era negativo. EGFR foi expresso na maioria dos casos, independente do subtipo histológico, mas não mostrou associação com qualquer parâmetro clínico e radiográfico. PTHrP mostrou 100% de positividade em nossa casuística e a análise estatística mostrou que a idade dos pacientes com forte positividade para este marcador foi maior do que os pacientes com fraca positividade do mesmo. Na avaliação para Ki67, a maioria das amostras apresenta marcação entre 0-25% das células tumorais. O marcador p53 mostrou positividade em 82,5% dos casos e destes, 40,7% com imunoreatividade entre 51-100% das células tumorais. Podemos concluir que o ameloblastoma mostrou distribuição semelhante entre os gêneros, predominância na quarta e quinta décadas de vida na região posterior de mandíbula. O padrão sólido foi o mais comum e radiograficamente estes casos exibiram predominantemente o padrão multilocular com aumento estatisticamente significativo na incidência de recidivas quando comparado aos casos sólidos uniloculares. A presença de cortical mandibular perfurada também indicou um maior risco para a recorrência (6,5 vezes). O epitélio dos ameloblastomas foi intensamente positivo para as citoqueratinas AE1/AE3, 34 β 12, 14 e 19. O tempo de queixa com positividade para Syndecan-1 foi estatisticamente menor do que os casos negativos. Além disso, os ameloblastomas mostram imunopositividade para EGFR e PTHrP.

SUMMARY

Fregnani ER. **[Clinico radiographic, histologic and immunohistochemical study of ameloblastomas: the A.C Camargo Hospital experience]**. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Ameloblastomas are benign odontogenic tumors that exhibit slow growth, but have shown to be locally aggressive. The aim of this study was to evaluate and correlate the clinical-radiographic, histopathologic findings and immunohistochemical expression of various markers in Ameloblastomas and establish relevant information regarding biology, treatment and prognosis of this tumor. This was a retrospective study of 121 cases of Ameloblastomas diagnosed and treated at the “Hospital A.C.Camargo” between 1953 and 2003. All cases were confirmed histologically, classified and a selection of areas for the Tissue Microarray were done. Antibodies were analyzed to investigate prognostic and cell proliferation factors, (anti Ki-67; p53, EGFR, Syndecan-1 (CD 138), PTHrP) and to investigate the tumoral histogenesis (vimentin and cytokeratins Ck 1, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 18, 19 and 34 β and AE1/AE3). The data were statistically analyzed using the appropriate statistical tests, among them the Kaplan-Meyer method and Cox logistic regression. Patients’ ages ranged from 02 to 82 years (mean = 33.2 years) with slight predilection for females. The majority of cases affected the posterior region of the mandible (80%). Radiographically, 60% showed multilocular pattern. Solid Ameloblastomas accounted for 113 cases, and the plexiform histologic type was the commonest. Solid tumors were treated by resection in block, curettage associated with cryotherapy, or only curettage, and unicystic tumors only by conservative procedures. The global recurrence rate was 22.1% with a mean follow-up time of 9.7 years. Univariate statistical analysis showed that the radiographic multilocular aspect, presence of ruptured bone corticals and the follicular histologic aspect indicated greater

chance of recurrence. Positivity for cytokeratins AE1/AE3, 34 β 12, 14 and 19 and negativity for cytokeratins 1 and 10 strengthened their odontogenic profile. The innumerable histologic subtypes and great variability of cellular differentiation in each tumor makes some cytokeratins, such as CKs 6,7, 8, 16 and 18 and vimentin show focal and specific expressions. Syndecan-1 showed negativity for 18.2% and weak positivity for 42.1% of the cases. It showed statistically significant association with the time of complaint, in other words, cases positive for this marker showed a shorter time of complaint than the cases in which Syndecan-1 was negative. EGFR was expressed in the majority of cases, irrespective of the histologic subtype, but showed no association with any clinical and radiographic parameter. PTHrP showed 100% positivity in our casuistic and statistical analysis showed that patients with strong positivity for this marker were at an older age than patients with weak positivity for it. In the evaluation for Ki67, the majority of the samples presented marking between 0-25% of tumoral cells. The marker p53 showed positivity in 82.5% of the cases and of these, 40.7% with immunoreactivity between 51-100% of the tumoral cells. In conclusion, ameloblastoma showed similar gender distribution, most of the cases occurred in the fourth and fifth decades and the majority affected the posterior region of the mandible. The solid pattern was the most common and, radiographically those cases were predominantly multilocular. The multilocular pattern showed a statistically higher tendency to recurrence when compared to the solid unilocular type. Moreover, a perforated osseous cortical increased 6.5X the chance for recurrence. Typically, the Ameloblastoma epithelium was positive for cytokeratins AE1/AE3, 34 β 12, 14 and 19. The time of complaint for the positive cases of Syndecan-1 were statistically lower when compared to the negative cases and solid ameloblastomas were positive for EGFR and PTHrP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gráfico da distribuição conjunta de sexo por classes de idade	26
Figura 2	Gráfico da curva de Sobrevida Livre de Recidiva para os Ameloblastomas Sólidos	34
Figura 3	Gráfico da curva de Sobrevida Livre de Recidiva por tipo de tratamento	35
Figura 4	Gráfico da curva de Sobrevida Livre de Doença por faixa etária	36
Figura 5	Gráfico da curva de Sobrevida Livre de Doença por padrão radiográfico	37
Figura 6	Ameloblastoma plexiforme (A) e Ameloblastoma de células granulares (B) apresentando intensa uniforme positividade para Ck AE1/AE3 em todo o epitélio odontogênico. (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x)	44
Figura 7	Ameloblastoma de células granulares (A) e Ameloblastoma acantomatoso (B) apresentando forte e homogênea positividade para Ck 34B12 (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x)	45
Figura 8	Ameloblastoma plexiforme apresentando positividade uniforme para Ck14 (IQ, 10x)	46
Figura 9	Cordões de células tumorais num caso de Ameloblastoma plexiforme (A) e ninhos tumorais com degeneração cística num caso de Ameloblastoma folicular (B) mostrando forte positividade para a Ck19 (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x)	47
Figura 10	Lençóis de células de Ameloblastoma plexiforme (A) e células escamosas com degeneração cística de Ameloblastoma acantomatoso (B) (IQ, MO x20) mostrando negatividade para o marcador CK1. (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x)	48
Figura 11	Ck10 foi uniformemente negativo para Ameloblastoma plexiforme (A) e folicular (B). (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x)	49

Figura 12	Ilhas tumorais sólidas de epitélio odontogênico de Ameloblastoma plexiforme (A) e Ameloblastoma plexiforme com áreas de degeneração estromal (B) exibindo negatividade para a CK7. (IQ, 20x).	50
Figura 13	Células tumorais com diferenciação escamosa e com perda de coesividade em Ameloblastoma folicular (A), assim como as células suprabasais de ninhos tumorais em Ameloblastoma folicular (B) exibiram fraca positividade para a CK18. (B), IQ, 20x	51-2
Figura 14	Seletiva marcação para a CK4 nas áreas de diferenciação escamosa no Ameloblastoma acantomatoso (IQ, 20x). B. Células suprabasais em área semelhante ao retículo estrelado do germe dentário em Ameloblastoma plexiforme apresentando fraca imunomarcação para a CK4 (IQ, 20x)	53
Figura 15	A: Ameloblastoma apresentando intensa positividade para Ck6 em células epiteliais com diferenciação escamosa (IQ, 20x). B: Ameloblastoma folicular apresentando positividade para Ck6 em áreas de degeneração cística (IQ, 20x)	54
Figura 16	Células basais adjacentes a cavidades císticas (A) e supra-basais (B) com imunoreatividade para a CK8 em Ameloblastoma plexiforme (IQ, 20x)	55
Figura 17	Ninho tumoral de Ameloblastoma folicular mostrando microcisto revestido por células escamosas (A) e lençóis de células escamosas acantolíticas de Ameloblastoma acantomatoso com imunopositividade para a CK16. (IQ, 20x)	56
Figura 18	Cordões tumorais de epitélio odontogênico num caso de Ameloblastoma plexiforme mostrando expressão de CK16 (IQ, MO x10), IQ, 20x	57
Figura 19	Forte imunoreatividade para vimentina no estroma tumoral em Ameloblastoma folicular. Note que o epitélio odontogênico é negativo IQ, 20x	59

Figura 20	Neste caso de Ameloblastoma plexiforme, tanto o componente tumoral epitelial quanto estromal foram positivos para vimentina (IQ, 20x)	59
Figura 21	Expressão com intensidade variável para vimentina no epitélio odontogênico em Ameloblastoma folicular (IQ, 20x)	60
Figura 22	Expressão com intensidade variável para vimentina no epitélio odontogênico em Ameloblastoma folicular (IQ, 20x)	62
Figura 23	Syndecan-1 exibindo forte marcação citoplasmática no epitélio odontogênico de Ameloblastoma plexiforme. (A: IQ, 20x; IQ, 40x)	63
Figura 24	Ninhos tumorais de Ameloblastoma folicular mostrando fraca reatividade para EGFR (A: IQ, 20x; B: IQ, 40x)	64
Figura 25	Intensa imunomarcação para EGFR em Ameloblastoma plexiforme (A); assim como outro caso de ameloblastoma folicular (B) Neste último, note o padrão de marcação em membrana nas áreas acantomatosas (A: IQ, 20x; B: IQ, 40x)	65
Figura 26	Padrão plexiforme de Ameloblastoma mostrando forte marcação citoplasmática para PTHrP (A). Em maior aumento (B), detalhe da imunomarcação no epitélio tumoral para PTHrP (A: IQ, 20x; B: IQ, 40x)	66
Figura 27	Ninhos neoplásicos de Ameloblastoma folicular exibindo marcação fraca para Ki67(IQ, 20x)	67
Figura 28	Lençóis de epitélio odontogênico em Ameloblastomaplexiforme com expressão intermediária para Ki-67 referencialmente nas células na camada basal (IQ, 20x)	68
Figura 29	Marcação nuclear homogênea e intensa para p53 nas camadas basal e suprabasal em Ameloblastoma plexiforme (IQ, 40x)	69
Figura 30	Cordões tumorais de Ameloblastoma plexiforme expressando positividade intermediária para p53 (IQ, 40x)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos casos por faixa etária	25
Tabela 2	Distribuição dos casos quanto ao tipo de queixa no momento do diagnóstico	27
Tabela 3	Medidas resumo para o tempo de queixa e tamanho do tumor	27
Tabela 4	Distribuição dos 121 casos quanto à localização do tumor	28
Tabela 5	Distribuição dos casos quanto ao tipo de Ameloblastoma	28
Tabela 6	Distribuição dos casos quanto a tratamento prévio	29
Tabela 7	Tratamento realizado nos 121 casos de Ameloblastomas	29
Tabela 8	Distribuição das recidivas de acordo com o tipo de Ameloblastoma	30
Tabela 9	Distribuição dos 121 Ameloblastomas, de acordo com o tempo de acompanhamento.	30
Tabela 10	Distribuição dos casos de Ameloblastomas Unicísticos	32
Tabela 11	Recidiva, por tipo de tratamento nos casos de Ameloblastomas sólidos	33
Tabela 12	Sobrevida livre de recidiva, por faixa etária	35
Tabela 13	Distribuição dos Ameloblastomas sólidos por padrão radiográfico e ocorrência de recidiva	37
Tabela 14	Resultado da regressão de Cox (univariada) para a análise das variáveis clínicas que podem estar correlacionadas com a ocorrência de recidiva	39
Tabela 15	Resultado da regressão logística univariada para a análise das variáveis histológicas que podem estar correlacionadas com a ocorrência de recidiva	40
Tabela 16	Distribuição de frequências para as citoqueratinas	43
Tabela 17	Distribuição de Ck de acordo com o padrão histológico	58

Tabela 18	Distribuição de frequências para Syndecan-1-1, EGFr e PTHrP	61
Tabela 19	Distribuição de frequências para Ki67 e p53.	70
Tabela 20	Estatísticas resumo do tempo de queixa (em meses), para casos com Syndecan + e Syndecan -	71
Tabela 21	Estatísticas resumo da idade dos pacientes (em anos), para casos com presença fraca e forte do marcador PTHRP	71

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µm	Micrómetro
Ck	Citoqueratina
DAB	Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dp	Desvio padrão
EGF	Fator de crescimento epitelial
EGFR	Receptor de fator de crescimento epitelial
HeE	Hematoxilina-Eosina
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
KDa	Quilodalton
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
n	Número de amostras
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
pH	potencial hidrogeniônico
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
RNA	Ácido ribonucleico
Rx	Radiografia
TMA	Tissue microarray

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Conceito, etiologia e epidemiologia	1
1.2	Aspectos clínico-radiográficos	3
1.2.1	Ameloblastomas sólidos ou multicísticos	3
1.2.2	Ameloblastomas unicísticos	4
1.2.3	Ameloblastomas periféricos	4
1.3	Aspectos anátomo-patológicos	5
1.4	Tratamento	7
1.5	Aspectos imunoistoquímicos	9
2	OBJETIVOS	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Amostra do estudo	16
3.2	Metodologia	16
3.3	Construção do <i>array</i> de tecido	17
3.4	Forma de análise das reações imunoistoquímicas	21
3.5	Análise estatística	22
3.5.1	Análise dos dados clínicos, radiográficos e histológicos	22
3.5.2	Análise dos dados imunoistoquímicos	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Dados Gerais dos 121 casos	25
4.1.1	Dados Demográficos	25
4.1.2	Parâmetros Clínicos	26
4.1.3	Tempo de Acompanhamento nos 121 casos	30
4.2	Dados específicos para cada tipo de Ameloblastoma	31
4.2.1	Ameloblastoma periférico	31
4.2.2	Ameloblastomas unicísticos	31
4.2.3	Ameloblastomas sólidos	32

4.3	Curvas de sobrevida para os Ameloblastomas sólidos	33
4.3.1	Análise da sobrevida livre de recidiva, por tipo de tratamento	34
4.3.2	Análise da sobrevida livre de recidiva, por faixa etária	35
4.3.3	Análise da sobrevida livre de recidiva, por padrão radiográfico	36
4.4	Análise de Regressão (modelo de riscos proporcionais de Cox) para os casos de Ameloblastomas Sólidos	38
4.4.1	Parâmetros Clínicos	38
4.4.2	Parâmetros Histopatológicos	40
4.5	Casos incomuns	41
4.6	Análise imunoistoquímica	42
4.6.1	Citoqueratinas e Vimentina	43
4.6.2	Syndecan-1 (CD138), EGFR, PTHrP, Ki67 e p53	61
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ANEXOS

Anexo 1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 Ficha padronizada para coleta dos dados

Anexo 3 Fregnani ER, Perez DEC, Almeida OP, Kowalski LP, Soares FA, Alves FA. Clinicopathological study and treatment evaluation of 121 cases of Ameloblastomas. Artigo científico submetido para publicação à revista International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery

Anexo 4 Fregnani ER, Sobral LM, Alves FA, Soares FA, Kowalski LP, Coletta RD. Myofibroblasts in the stroma of ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. Artigo científico submetido para publicação à revista Journal of Oral Pathology e Medicine

Anexo 5 Fregnani ER, da Cruz Perez DE, Soares FA, Alves FA. Synchronous ameloblastoma and orthokeratinized odontogenic cyst of the mandible. J Oral Pathol Med. 2006 Oct; 35(9):573-5.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONCEITO, ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

Tumores Odontogênicos (TO) têm sua origem associada ao órgão dental ou aos seus remanescentes, podendo se desenvolver a partir do epitélio odontogênico, do ectomesênquima ou de ambos. O comportamento clínico dessas lesões varia consideravelmente, algumas apresentam potencial de crescimento limitado, provavelmente representando hamartomas, enquanto outras possuem características de verdadeira neoplasia, como os Ameloblastomas. Estes tumores são pouco freqüentes e, na América Latina, os autores SANTOS et al. (2001), OCHSENIUS et al. (2002), FREGNANI et al. (2003a), FERNANDES et al. (2005) e GUERRISI et al. (2007) relataram experiências em TO em centros localizados no Chile, Brasil e Argentina.

Os trabalhos epidemiológicos mundiais mostram consideráveis diferenças na prevalência dos TO, principalmente quando são comparados estudos Africanos e Asiáticos com os da América do Norte (REGEZI et al. 1978; WU e CHAN 1985; DALEY et al. 1994; ODUKOYA et al. 1995; AROTIBA et al. 1997; MOSQUEDA-TAYLOR et al. 1997; LU et al. 1998). Essas variações são justificadas por fatores geográficos, étnicos e sócio-econômicos (FREGNANI et al. 2002).

Apesar de raros, os Ameloblastomas representam 13 a 58% dos TO (DALEY et al. 1994; LU et al. 1998). Foram descritos no século XIX por Cusack (1827) e mais detalhadamente por Broca em 1868, citados por REICHART e PHILIPSEN 2004, p.43). Ao longo do tempo, surgiram inúmeras descrições e classificações até que em 1971, a Organização Mundial de Saúde (OMS) através de KRAMER et al. (1992) classificou TO de acordo com o comportamento biológico e os Ameloblastomas foram enquadrados como neoplasias benignas. Contudo em 1992, a Organização Mundial de Saúde subdividiu os tumores benignos em três grupos: lesões nas quais existe epitélio odontogênico sem ectomesênquima odontogênico, lesões na qual o epitélio e ectomesênquima odontogênico estão presentes e lesões onde o ectomesênquima é predominante, sendo o Ameloblastoma inserido no primeiro grupo (KRAMER et al. 1992).

A atual classificação da OMS (BARNES et al. 2005) inclui os Ameloblastomas no grupo de tumores benignos com presença de epitélio odontogênico com estroma fibroso e maduro, não havendo presença de ectomesênquima odontogênico. Esta classificação também ressalta que não é suficiente diagnosticar um tumor meramente como Ameloblastoma. As suas variantes mostram distinção nos seus aspectos clínicos e demográficos bem como no comportamento biológico.

Sendo assim, atualmente, informações clínicas, radiográficas, padrões de comportamento biológico permitem-nos subdividi-los em sólido ou multicístico, unicístico, extra-ósseo ou periférico e desmoplásico (REICHART e PHILIPSEN 2004).

1.2 ASPECTOS CLÍNICO-RADIOGRÁFICOS

1.2.1 Ameloblastomas Sólidos ou Multicísticos

Os Ameloblastomas sólidos ou multicísticos ocorrem quase exclusivamente de maneira intra-óssea na mandíbula e maxila, usualmente têm crescimento lento, porém mostram-se localmente agressivos. As células tumorais infiltram os espaços medulares podendo erodir corticais ósseas e invadir estruturas adjacentes e, assim, levar a alta taxa de recorrência se não tratados adequadamente. A mandíbula é afetada em 80% dos casos, sendo o ramo ascendente da mandíbula e a região dos molares os locais mais acometidos (REICHART et al. 1995). O estudo africano conduzido por CHIDZONGA et al. (1996) mostra, entretanto, uma maior predileção para a região anterior de mandíbula na população do Zimbábue.

A maior parte dos casos sólidos é diagnosticada com média etária de 35 anos, todavia considerando somente casos relatados em países desenvolvidos a idade média cai para 27,7 anos (REICHART et al. 1995). Estes tumores são normalmente descobertos devido a aumento de volume assintomático nos maxilares, causando ou não deslocamento dos dentes.

Radiograficamente apresentam-se como lesões osteolíticas destrutivas, que podem ser uni ou multiloculares. Em lesões multiloculares apresentam o aspecto radiográfico característico de “bolhas de sabão”. Frequentemente também é observada expansão das corticais ósseas, deslocamento de dentes e reabsorção radicular (MULLER e SLOOTWEG 1985). Um diagnóstico definitivo não pode ser feito baseado nas

características radiográficas, visto que os queratocistos, mixomas e outros tumores odontogênicos podem apresentar características similares (REICHART e PHILIPSEN 2004).

1.2.2 Ameloblastomas unicísticos

Os Ameloblastomas unicísticos representam entre 5 e 15% dos casos e apresentam-se radiograficamente como cistos. Quando estão associados a dentes não erupcionados mostram média de 16 anos de idade no diagnóstico, enquanto que na ausência de dentes a média etária sobe para 35 anos de idade (ACKERMANN et al. 1988). De maneira geral, a média de idade é inferior aos dos casos de Ameloblastomas sólidos.

Aproximadamente 90% dos casos acometem a região posterior da mandíbula e estando associados a um terceiro molar não erupcionado e radiograficamente mostram-se como uma lesão unilocular bem delimitada (REICHART e PHILIPSEN 2004). O diagnóstico diferencial mais importante é o cisto dentígero (LEIDER et al. 1985; REICHART et al. 1995).

1.2.3 Ameloblastomas Periféricos

Poucos casos foram descritos como Ameloblastomas periféricos, também conhecidos por extra-ósseos, localizados na gengiva e mucosa jugal. Apresentam aspecto microscópico semelhante ao padrão sólido. As lesões periféricas não invadem o osso e não apresentam comportamento biológico agressivo. Assim, raramente recidivam após o tratamento cirúrgico (GARDNER 1977; SCIUBBA et al. 1991; PHILLIPSEN et al. 2001a).

1.3 ASPECTOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS

Os Ameloblastomas sólidos podem exibir vários padrões microscópicos, e uma mesma lesão pode apresentar múltiplos padrões. Porém, em quase todos os tipos apresenta característica marcante de células com núcleos polarizados semelhantes à ameloblastos e localizadas na periferia dos ninhos tumorais (KRAMER et al. 1992).

Os padrões mais freqüentemente encontrados são folicular e plexiforme. O tipo folicular apresenta ilhas de células tumorais imersas em estroma de tecido conjuntivo fibroso, as quais por serem semelhantes ao folículo dental normal, dão origem do nome. Quando observada em maior aumento a região periférica das ilhas, as células são colunares com polarização reversa (núcleo polarizado voltado para o interior da ilha e o citoplasma para o estroma). As células da porção central da ilha são semelhantes ao retículo estrelado. É comum a formação de cistos ou microcistos neste tipo de Ameloblastoma. No tipo plexiforme, o epitélio odontogênico é arranjado em longos cordões que parecem envolver o estroma. Estes cordões também apresentam células com polarização reversa envolvendo células semelhantes ao retículo estrelado (PINHEIRO 2002).

Algumas lesões apresentam áreas com ilhas tumorais com diferenciação escamosa, sendo usado o termo Ameloblastoma Acanomatoso. Quando pérolas de queratina são observadas, pode ser conferido o nome de Querato Ameloblastoma, ou se as células

apresentarem grânulos no citoplasma, o nome de Ameloblastoma de Células Granulares. É possível ainda encontrar outras variantes com diferenciações de células mucosas (WILSON et al. 2001) e hemangiomatosa (VAN RENSBURG et al. 2001).

No Ameloblastoma Desmoplásico verifica-se um estroma colagenizado extremamente denso que suporta o tumor (EVERSOLE et al. 1984; PHILLIPSEN et al. 2001b) e devido suas diferenças histológicas, radiográficas e de localização, as classificações mais atuais preferem analisá-lo separadamente. A análise de 100 casos de PHILLIPSEN et al. (2001b) mostrou que os Ameloblastomas desmoplásicos radiograficamente têm bordas bem definidas em apenas 7% dos casos e 53% mostravam radiopacidade. Ainda de acordo com este estudo, a mandíbula e maxilas mostram-se igualmente afetadas.

O termo Ameloblastoma Unicístico deriva dos achados macro e microscópicos, sendo a lesão essencialmente bem definida com uma grande cavidade monocística revestida por epitélio odontogênico ameloblastomatoso. Estes tumores possuem os seguintes subtipos microscópicos: luminal, intraluminal e mural (ROBINSON e MARTINEZ 1977). No padrão luminal, nota-se uma parede fibrosa revestida por epitélio ameloblástico. No padrão intraluminal, existem projeções do epitélio em direção ao lúmen cístico e no padrão mural, notam-se ninhos de células epiteliais originários do parênquima tumoral na parede fibrosa que pode infiltrar o osso adjacente como as outras formas de Ameloblastomas (KRAMER et al. 1992; PINHEIRO 2002).

1.4 TRATAMENTO

O tratamento dos Ameloblastomas varia consideravelmente dependendo da sua subclassificação. Atualmente o tema continua bastante controvertido com trabalhos descrevendo diferentes abordagens e técnicas e, conseqüentemente, diferentes resultados. Os avanços na compreensão do comportamento biológico desta neoplasia vêm proporcionando protocolos de tratamentos de maneira mais racional (GARDNER 1984; MULLER e SLOOTWEG 1985; NAKAMURA et al. 1995, 2001, 2002; CHAPELLE et al. 2004; VAYVADA et al. 2006; SACHS 2006; SAMMARTINO et al. 2007).

Além disso, os Ameloblastomas exibem características de comportamento únicas tais como crescimento lento, invasão local com altos índices de recidiva e características radiográficas variadas que permitem diferentes estratégias e protocolos de tratamento (SHATKIN e HOFFMEISTER 1965; MEHLISCH et al. 1972; SEHDEV et al. 1974; TSAKNIS e NELSON 1980; PINSOLLE et al. 1995; RAPIDIS et al. 2004; SACHS 2006).

A cirurgia é o tratamento de escolha, porém pode ser procedimento conservador ou radical. Os procedimentos cirúrgicos conservadores incluem as enucleações com curetagem óssea ou ostectomia periférica (SAMPSON e POGREL 1999), marsupialização seguida por enucleação (NAKAMURA et al. 1995, 2002, SACHS 2006), assim como a associação de Solução de Carnoy ou crioterapia à enucleação com curetagem óssea (CURI et al. 1997; LEE et al. 2004; CHAPELLE et al. 2004).

Fatores importantes que determinam o tipo de cirurgia a ser realizada são: o tipo do tumor (sólido x unicístico), localização, tamanho, aspectos histológicos e radiográficos e idade do pacientes (SACHS 2006).

A cirurgia radical consiste na remoção do Ameloblastoma com margem óssea normal, utilizando-se de ressecção segmentar ou marginal (MULLER e SLOOTWEG 1985). Ainda não existe um consenso na literatura da quantidade de tecido ósseo normal a ser removido (GARDNER e PEAK 1980; MULLER e SLOOTWEG 1985; NAKAMURA et al. 2002), mas há trabalhos que variam de 0,5cm (D'AGOSTINO et al. 2001) a 3 cm (CHAPELLE et al. 2004).

Os Ameloblastomas unicísticos com padrões luminais e intra-luminais requerem apenas enucleação cirúrgica conservadora, porém a presença do padrão mural implica em tratamento similar aos Ameloblastomas sólidos. Em 2006, uma revisão sistemática sobre tratamento de Ameloblastomas unicísticos foi realizada por LAU e SAMMAN (2006), na qual o tratamento por ressecção mostrou o menor índice de recidiva (3,6%), seguido por enucleação com aplicação de solução de Carnoy (16%) e somente enucleação mostrou uma taxa de 30,5%.

Existem outros fatores que devem ser avaliados quando estudando as estratégias de tratamento para os Ameloblastomas, tais como características clínicas, achados radiográficos e histológicos. NAKAMURA em 1995 afirma que as lesões císticas tendem a uma maior expansão de corticais que lesões sólidas. Radiograficamente, as lesões multiloculares apresentam características de agressividade (MULLER e SLOOTWEG 1985). Muitos

autores afirmam que um fator clínico-radiográfico importante a ser analisado é presença de expansão das corticais ósseas (D'AGOSTINO et al. 2001; CHAPELLE et al. 2004).

Os índices de recidiva são relatados entre 15 e 25% após tratamentos radicais (SHATKIN e HOFFMEISTER 1965; SEHDEV et al. 1974; GARDNER e PECAK 1980; OLASOJI e ENWERE 2003) e de 35%-80% nos casos de cirurgias conservadoras (SEHDEV et al. 1974; JACKSON et al. 1996; CURI et al. 1997; NAKAMURA et al. 2002; GHANDHI et al. 2006; SAMMARTINO et al. 2007).

Os Ameloblastomas localizados na maxila mostram comportamento mais agressivo (TSAKNIS e NELSON 1980; JACKSON et al. 1996; ZWAHLEN e GRÄTZ 2002). Há relatos de tratamentos mais extensos devido à proximidade com estruturas vitais e assim, dificuldade para o tratamento de qualquer recidiva (GARDNER e PEAK 1980; UEDA e KANEDA 1991; IORDANIDIS et al. 1999).

1.5 ASPECTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

A taxa de proliferação das células tumorais pode representar importante papel na agressividade e no potencial de recidivas. Inúmeros trabalhos mostram a atividade proliferativa dos Ameloblastomas utilizando o marcador PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) que é um marcador de replicação celular como mostra o estudo de PIATTELLI et al. (1998). Outro marcador, Ki67, é uma proteína nuclear de 395 kDa expressa

nas fases S e G2 do ciclo celular (SITTEL et al. 1999) sendo que células quiescentes não expressam esta proteína (GERDES et al. 1984). A expressão aumentada de Ki67 tem mostrado grande valor para entender a biologia tumoral, sendo usada como marcador importante para determinar os índices de proliferação celular. Alguns autores propõem que Ki67 participe na organização do DNA e processamento de RNA ribossômico (BROWN e GATTER 2002). Os estudos utilizam-se principalmente destes dois marcadores para comparar suas expressões entre os diversos tipos histológicos, bem como outras lesões como os cistos odontogênicos e as variantes malignas.

Outra proteína bastante estudada é a p53, codificada pelo gene supressor de tumor TP53. Este gene está localizado no cromossomo 17p13. TP53 pertence à família de genes altamente conservados como TP63 e TP73 que codificam as proteínas p63 e p73, respectivamente. P53 participa ativamente na regulação do ciclo celular diante de uma agressão, atuando como fator de transcrição e na forma de uma proteína de ação anti-proliferativa, provocando a saída da célula do ciclo celular que pode ser reversível ou irreversível, podendo levar à apoptose.

O aumento da expressão do gene supressor de tumor TP53 está associado a inúmeras neoplasias humanas (SHINTANI et al. 1995; TAKAHAMA JUNIOR et al. 2003; ALVES et al. 2004). Em Ameloblastomas, APPEL et al. (2004) demonstraram que 60% dos tumores analisados mostraram expressão do p53 e a correlacionaram com maior tendência a recidivas.

Citoqueratinas (Cks) são filamentos intermediários das células epiteliais e compreendem uma família complexa de pelo menos vinte diferentes polipeptídeos cujos pesos moleculares variam de 40 a 70 KDa. É importante mencionar que ainda em condições neoplásicas, os epitélios modificados continuam expressando seu perfil de Ck nativo (CHU e WEISS 2002).

A distribuição de Ck na cavidade oral é heterogênea, nas fases embrionárias existe predomínio da expressão de Ck 8, 18 e 19 (MORGAN et al. 1987). As Ck 5 e 14 são expressas na porção basal de todos epitélios bucais, queratinizados e não queratinizados. Outras localizações anatômicas, como dorso da língua, podem expressar diversos tipos de Ck, os pares 1 e 10 e 4 e 13 (região papilar e interpapilas) expressos nas regiões suprabasais (HANSSON et al. 2001). As lesões odontogênicas císticas e tumorais possuem um perfil de expressão de Ck variável, de acordo com o tipo de lesão. A detecção imunoistoquímica de diferentes polipeptídeos das Cks no epitélio e tumores odontogênicos mostram que todas as células do germe dental são positivas para Ck14, exceto pré-ameloblastos e ameloblastos secretores, nos quais a Ck14 é gradualmente substituída pela Ck19. A CK 7 são especialmente expressadas nas células do retículo estrelado. A lâmina dental é a única estrutura que expressa Ck 13. O epitélio reduzido do órgão do esmalte contém Ck 14 e ocasionalmente Ck 13. O típico epitélio odontogênico é Ck 14 positivo (CRIVELINI et al. 2003). Alguns estudos descreveram expressão de Cks e vimentina nos componentes epiteliais dos tumores odontogênicos (HEIKINHEIMO et al. 1989, VIGNESWARAN et al.

1993; CRIVELINI et al. 2003). O Tumor Odontogênico Adenomatóide expressa grande parte das citoqueratinas expressas no Ameloblastoma, tais como AE1/AE3, 34 β 12, 14 e 19 (TATEMOTO et al. 1988; CRIVELINI et al. 2003; LEON et al. 2005). O Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante mostra em populações celulares heterogênea positividade para CKs 8, 18 e 19 (MORI et al. 1988), enquanto que os Cistos Odontogênicos Calcificantes (COCs) mostram positividade para Cks 8, 14, 19, AE1/AE3 e 34 β E12 (FREGNANI et al. 2003b).

A produção de Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) tem sido demonstrada nos germes dentais como também em vários tumores (KUMAMOTO e OOYA 2004). Este peptídeo mostra homologia estrutural e funcional com o paratohormônio (PTH) e aumenta a atividade osteolítica nos ossos (KUMAMOTO 2006). A sua expressão em metástases ósseas vem sendo correlacionada com destruição óssea e crescimento tumoral, característica também mostrada nos Ameloblastomas (DUNNE et al. 1995, SHEN et al. 2004, AMIZUKA et al. 2004). São escassos os trabalhos na literatura demonstrando a expressão de PTHrP em grandes séries de Ameloblastomas e relacionando sua presença com o tipo microscópico ou comportamento clínico (ABDELSAYED et al. 2004).

O fator de crescimento epitelial (EGF) e seu receptor (EGFR) desempenham papel importante no desenvolvimento e progressão das neoplasias humanas (SHRESTHA et al. 1992). A expressão do EGFR já foi observada em epitélios orais normais, bem como nos tecidos dentais embrionários e, foi sugerida sua participação na diferenciação dos

ameloblastos. Em 1994, UENO et al. correlacionaram a positividade para EGFR dos Ameloblastomas com sua diferenciação tumoral. A investigação da presença de EGFR nos Ameloblastomas foi revisada por VERED et al. (2003) em grande série de Ameloblastomas, tendo em vista novos agentes terapêuticos anti-EGFR em casos de tumores irresssecáveis, próximos de estruturas vitais ou recidivas, onde exista expressão destes receptores. Revendo a literatura, KUMAMOTO em 2006 reforça a participação do EGFR na tumorigênese do Ameloblastoma.

Syndecan-1 (CD 138) é um proteoglicano transmembrânico expresso por células epiteliais e que interage com fatores de crescimento, componentes da matriz e outras proteínas extracelulares. Assim, relaciona-se sua expressão em processos de crescimento, diferenciação e adesão celular. A expressão de Syndecan-1 aparece geralmente desregulada em carcinomas humanos e muitos estudos têm sugerido valor prognóstico em diversos tipos de câncer, também correlacionando com gradação histológica e tamanho do tumor (WIKSTEN et al. 2000; LEIVONEN et al. 2004; KIVINIEMI et al. 2004). LEOCATA et al. (2007) lançaram a hipótese do Syndecan-1 ser fator crítico para tumorigênese e invasão local dos Ameloblastomas. Recentemente, BOLOGNA-MOLINA et al. (2008) sugeriram que expressão diminuída de Syndecan-1 suporta a idéia de que os Ameloblastomas sólidos exibem características de agressividade superiores aos Ameloblastomas unicísticos.

Um dos grandes problemas dos testes de imunoistoquímica é que se trata de uma técnica trabalhosa e relativamente com alto custo. Isto faz com

que os trabalhos sejam realizados com poucos casos e não sejam testados em duplicada ou triplicata, fazendo com que os trabalhos sejam poucos reprodutíveis. Com o advento da técnica de “array” em tecido (TMA, do inglês tissue microarray) é possível que estes problemas sejam minimizados. Através desse método, centenas de amostras de tecidos podem ser dispostas em uma única lâmina, em cilindros de 0,6-1,0 mm, o que permite análise simultânea de vários tecidos por métodos de imunohistoquímica e hibridizações in situ, para estudos de DNA, RNA ou proteínas, minimizando possíveis variações da técnica entre as amostras, com racionalização dos custos e tempo despendido. Além disso, é possível que as reações sejam realizadas de forma repetida, a similaridade de outras técnicas experimentais; e que o resultado seja expresso pela resultante dos experimentos (RIMM et al. 2001; MOCH et al. 2001; HOOS e CORDON-CARDO 2001; SIMON e SAUTER 2002; HSU et al. 2002).

Uma das principais críticas a essa metodologia diz respeito ao pequeno tamanho das amostras em array, ou seja, se a amostra de alguns milímetros pode ser representativa de todo tumor, levando em consideração à existência de heterogeneidade tecidual. No entanto, tal problema pode ser controlado se mais de um cilindro de cada amostra tecidual for utilizado, com a finalidade de aumentar a representatividade da amostra (HOOS e CORDON-CARDO 2001; RIMM et al. 2001; MOCH et al. 2001; SIMON e SAUTER 2002).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram avaliar e correlacionar os achados clínicos-radiográficos, histopatológicos e expressão imunoistoquímica de marcadores de proliferação celular (Ki67), de fatores prognósticos (p53, EGFR, Syndecan-1, PTHrP) e perfil biológico tumoral (vimentina, Ck 1, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 18, 19, 34 β 12 e AE1/AE3) em Ameloblastomas diagnosticados no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A.C.Camargo, buscando estabelecer informações relevantes quanto ao perfil, ao prognóstico e ao tratamento deste tumor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA

Foram incluídos no estudo pacientes admitidos no Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C.Camargo, no período de 1953 a 2003, com diagnóstico de Ameloblastoma. Além disso, consideraram-se como critérios de inclusão os pacientes efetivamente tratados nesta Instituição, com disponibilidade de material arquivado em parafina suficiente para confirmação histopatológica e para novos cortes. Os casos cujos prontuários não continham informações mínimas para análise foram excluídos da amostra.

Inicialmente, foram selecionados os registros de 143 pacientes para o estudo. Após a avaliação dos prontuários e seleção de blocos de parafina para a realização de novos cortes histológicos, 121 pacientes constituíram a amostra.

3.2 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo de coorte retrospectiva cujos dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos prontuários médicos após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (Anexo 1).

Os dados coletados dos 121 pacientes portadores de Ameloblastomas foram registrados em ficha de levantamento de dados previamente definida (Anexo 2) e os dados lançados em planilha Excel®. Os exames radiográficos e tomográficos disponíveis foram digitalizados e armazenados para análises futuras e uso didático.

A partir do material existente nos blocos de parafina, realizaram-se novos cortes com 5µm para a realização de coloração de Hematoxilina-Eosina (HeE) para confirmação do tipo histológico e seleção das áreas para confecção do Tissue Microarray (TMA).

Todas as lâminas referentes aos casos selecionados foram revistas por dois patologistas orais e os tipos histopatológicos foram revistos e classificados segundo os critérios da OMS (BARNES et al. 2005). Sabendo-se que os Ameloblastomas usualmente podem apresentar mais de um padrão histológico em um mesmo caso, a classificação final foi baseada no aspecto histopatológico predominante, a qual também representava a área de escolha para o TMA. Além disso, a presença de áreas de degenerações císticas em Ameloblastomas sólidos foi avaliada e classificada em áreas macro e microcísticas.

3.3 CONSTRUÇÃO DO ARRAY DE TECIDO

Após a revisão anatomopatológica, com confirmação diagnóstica e presença dos blocos de parafina contendo fragmentos tumorais suficientes, áreas de interesse de cada caso foram selecionadas. A partir desta seleção

foi construído um bloco pela técnica TMA (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA). A área identificada no bloco de parafina doador foi puncionada duas vezes com agulha de 1 mm e os dois cilindros obtidos foram transferidos para o bloco de parafina receptor. Um mapa para identificação detalhada de cada cilindro foi construído em planilha Excel®, permitindo a localização precisa de cada caso. Um caso foi definido como adequado quando o corte resultante ocupou pelo menos 25% da área total do cilindro. Foram realizados cortes seqüenciais de 4 µm de espessura, que foram colhidos em lâminas adesivas oriundas da Instrumedics Inc. (Hackensack NJ, EUA). Para maximizar o uso do TMA, todos os cortes foram colhidos em única sessão e armazenados para uso posterior. O controle do número de casos avaliáveis foi realizado pela coloração de 01 lâmina a cada 25 cortes e pela contagem de quantos cilindros estiveram presentes. Para cada marcador imunoistoquímico foram preparadas duas lâminas obtendo um total de 4 cilindros para cada caso. O TMA foi considerado esgotado quando mais de 25% das amostras não estavam presentes nos cortes.

Os cortes obtidos do bloco de TMA foram submetidos à técnica imunoistoquímica descrita a seguir. Os cortes foram desparafinados deixando-os por 24 horas em estufa 60°C, xilol a 60°C por 20 minutos, xilol à temperatura ambiente por 20 minutos e, em seguida, hidratados em Etanol 100%, 95%, 70% e água corrente e destilada. A recuperação antigênica foi realizada fervendo-se a solução tampão de citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada. Após isso, mergulharam-se as

lâminas e lacrou-se a panela com a válvula de segurança aberta. Ocorrendo a saída do vapor saturado, abaixou-se a válvula de segurança e aguardou-se a pressurização total. Transcorrido 04 minutos, a panela ainda fechada ficou sob água corrente até a despressurização total, seguido por sua abertura e lavagens das lâminas em água corrente e destilada.

Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada e por lavagens em água corrente e destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos. Posteriormente, realizou-se incubação com anticorpos primários diluídos em títulos previamente estabelecidos em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, cat # A9647, USA) e azida sódica 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Foram realizadas três lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada (Quadro 1).

Quadro 1 - Lista de anticorpos primários utilizados no estudo.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes / Códigos
Cytokeratin 1	34βB4	1:400	Novocastra, Newcastle, UK, cat # NCL-CK1
Cytokeratin 4	6B10	1:200	Novocastra, Newcastle, UK, cat #NCL-CK4
Cytokeratin 6	LHK6B	1:100	Novocastra, Newcastle, UK, cat #NCL-CK6
Cytokeratin 7	OV-TL 12/30	1:800	DakoCytomation, Glostrup, Denmark, cat # M7018
Cytokeratin 8, LMW	35βH11	1:200	DakoCytomation, Carpinteria, USA, cat # M0631
Cytokeratin 10	DE-K10	1:400	DakoCytomation, Glostrup, Denmark, cat # M7002
Cytokeratin 14	LL002	1:400	Biogenex, San Ramon, EUA, cat # MU146-UC
Cytokeratin 16	LL025	1:50	Chemicon International, Temecula, USA, cat # CBL273
Cytokeratin 18	DC10	1:800	DakoCytomation, Glostrup, Denmark, cat # M7010
Cytokeratin 19	RCK108	1:800	DakoCytomation, Glostrup, Denmark, cat # M0888
Cytokeratin	AE1/AE3	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, USA, cat # M3515
Cytokeratin HMW	34βE12	1:400	DakoCytomation, Carpinteria, USA, cat # M0630
Vimentin	V9	1:1000	DakoCytomation, Glostrup, Denmark, cat # M0725
p53 protein	DO-7	1:100	DakoCytomation, Glostrup, Denmark, cat # M7001
Ki67 antigen	MIB-1	1:100	DakoCytomation, Glostrup, Denmark, cat # M7240
CD138 (Syndecan-1)	MI15	1:200	DakoCytomation, Glostrup, Denmark, cat # M7228
EGFR	EGFR.113	1:40	Novocastra, Newcastle, UK, cat # NCL-EGFR
PTHrP	3D1.1	1:400	NeoMarkers, Fremont, USA, cat # MS1270

Seguiu-se a técnica com o sistema de amplificação, onde as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cat # RE7260-k, Newcastle Upon Tyne, UK), seguido por três lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Posteriormente, foram incubadas com o NovoLink Polymer por 30 minutos a 37°C e, novamente levados a lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

As lâminas foram então reveladas em solução substrato de 60 mg 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, cat # D-5637, USA), 1

mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol) em 100 mL de PBS incubadas por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, sendo contra-coradas com Hematoxilina de Harris por um minuto. Posteriormente, foram lavadas em água corrente e destilada e imersas duas vezes em água amoniacal (hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada. Os cortes foram então desidratados em banhos de etanol 80%, 95% e 100% por duas vezes de 30 segundos cada e procedeu-se a montagem das lâminas com Entellan neu (Merck, cat #1.07961, Germany) e lamínulas.

3.4 ANÁLISE DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

Para a avaliação da reação imunoistoquímica foi empregado microscópio óptico Zeiss com ocular CFW 10x e objetivas de 20 e 40x. A leitura das reações foi realizada por dois observadores que fizeram avaliações em separado da positividade ou negatividade da reação e a intensidade não foi considerada. Nos casos em que a marcação imunoistoquímica falhou ou não foi possível avaliar fragmento representativo do tumor, o caso foi considerado não avaliável.

As reações imunoistoquímicas para citoqueratinas e vimentina foram avaliadas como positivas e negativas. Os marcadores EGFR, PTHrP e Syndecan foram avaliados como negativos, positividade fraca e positividade

forte, sendo que para EGFR e CD138 considerou-se marcação citoplasmática e de membrana e PTHrP, marcação citoplasmática.

A quantificação das células com positividade nuclear para Ki67 e p53 foi feita através da leitura de quatro campos microscópicos (aumentos de 40x) consecutivos nos quatro cilindros do TMA referentes a cada caso. As células positivas e negativas receberam percentuais e os resultados foram expressos em médias para cada caso. A divisão percentual recebeu divisão em quatro grupos: 0-10% (considerado como marcação negativa); 11-25%; 26-50% e 51-100%.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição das variáveis clínicas, anátomo-patológicas e referentes ao tratamento foram apresentadas na forma de tabelas de contingência. Todos os cálculos foram obtidos com a utilização do software estatístico Minitab e a significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.5.1 Análise dos Dados Clínicos, Radiográficos e Histológicos

A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelos intervalos, medianas, médias e respectivos desvios padrões. As associações das variáveis quantitativas foram efetuadas com o teste do qui-quadrado.

Pacientes que não compareceram as consultas ou sem informações por um período superior a duas vezes o estipulado para o retorno foram considerados perdidos de seguimento na data da última informação. Esses

pacientes contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura.

A técnica de Kaplan-Meier foi aplicada para obtenção da probabilidade de recorrência. As curvas de sobrevida livre de recorrência foram comparadas através do teste de logrank. Os fatores prognósticos independentes para o risco de recorrência foram estimados através do modelo de regressão de Cox, com intervalo de confiança de 95% (COX 1972).

A avaliação estatística das variáveis clínicas, radiográficas e histopatológicas foi feita através de uma análise de regressão utilizando o modelo de riscos proporcionais de Cox. Essa técnica foi escolhida por ser a mais indicada no caso de análise de variáveis cuja ocorrência do evento de interesse (no caso, a recidiva da doença) depende do tempo, e com possibilidade de censura. O teste verifica a hipótese de que hazard ratio = 1. Se essa hipótese for rejeitada ($p < 0,05$) e o valor do hazard ratio for maior que 1, então dizemos que a variável estudada pode ser considerada fator de risco para ocorrência de recidiva. Se a hipótese for rejeitada ($p < 0,05$) e o valor do hazard ratio for menor que 1, costuma-se dizer que essa variável funcionou como fator protetor, ou seja, ajudou evitar recidiva. Por último, se a hipótese não for rejeitada ($p > 0,05$) dizemos que a variável não interfere na ocorrência de recidiva.

Hazard ratio é uma estatística calculada sempre em relação a determinada categoria de referência. Por exemplo, chance de ocorrência de recidiva em pacientes com presença de determinada característica é “X”

vezes a chance de ocorrência de recidiva nos pacientes com ausência dessa característica (neste caso a tabela indicaria *hazard ratio* = 1,00 para os pacientes com a ausência da característica, e *hazard ratio* = “X” para os pacientes com a presença dessa característica).

3.5.2 Análise dos Dados Imunoistoquímicos

Inicialmente foi feita análise descritiva dos marcadores, identificando a frequência absoluta e relativa das respostas obtidas. Depois foi avaliada a associação entre os marcadores, pelo teste exato de Fisher. A associação entre marcadores e parâmetros clínicos e radiológicos também foi medido pelo teste exato de Fisher e, no caso de parâmetros com dados quantitativos (p.ex. tempo de queixa, idade do paciente e tamanho clínico do tumor), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, que verifica se a mediana da resposta desses parâmetros foi diferente entre os casos com e sem presença dos marcadores.

No caso da aplicação do teste exato de Fisher, as variáveis envolvidas devem apresentar respostas dicotômicas. Portanto, em alguns casos, as respostas foram agrupadas até que pudessem ser reduzidas a apenas duas categorias.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS GERAIS DOS 121 AMELOBLASTOMAS

4.1.1 Dados Demográficos

Os Ameloblastomas apresentaram-se numa ampla faixa etária variando de 2 a 82 anos, com $média \pm dp = 33,2 \pm 16,9$. A idade dos pacientes foi agrupada em classes de 10 anos para facilitar a visualização dos dados. Dessa forma, nota-se que a maior frequência está nas classes de 20 a 39 anos de idade (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos casos por faixa etária.

Idade (anos)	n	%
0 – 9	3	2,5
10 – 19	18	14,9
20 – 29	40	33,1
30 – 39	26	21,5
40 – 49	15	12,4
50 – 59	6	5,0
60 – 69	7	5,8
70 – 79	5	4,1
80 – 89	1	0,8
Total	121	100

A distribuição dos pacientes, quanto à etnia, mostrou que a maioria dos casos refere-se a pacientes leucodermas (71,9%). A distribuição quanto ao gênero dos pacientes mostra um equilíbrio já que 47,1% pertenciam ao gênero masculino e 52,9% ao gênero feminino (Figura 1).

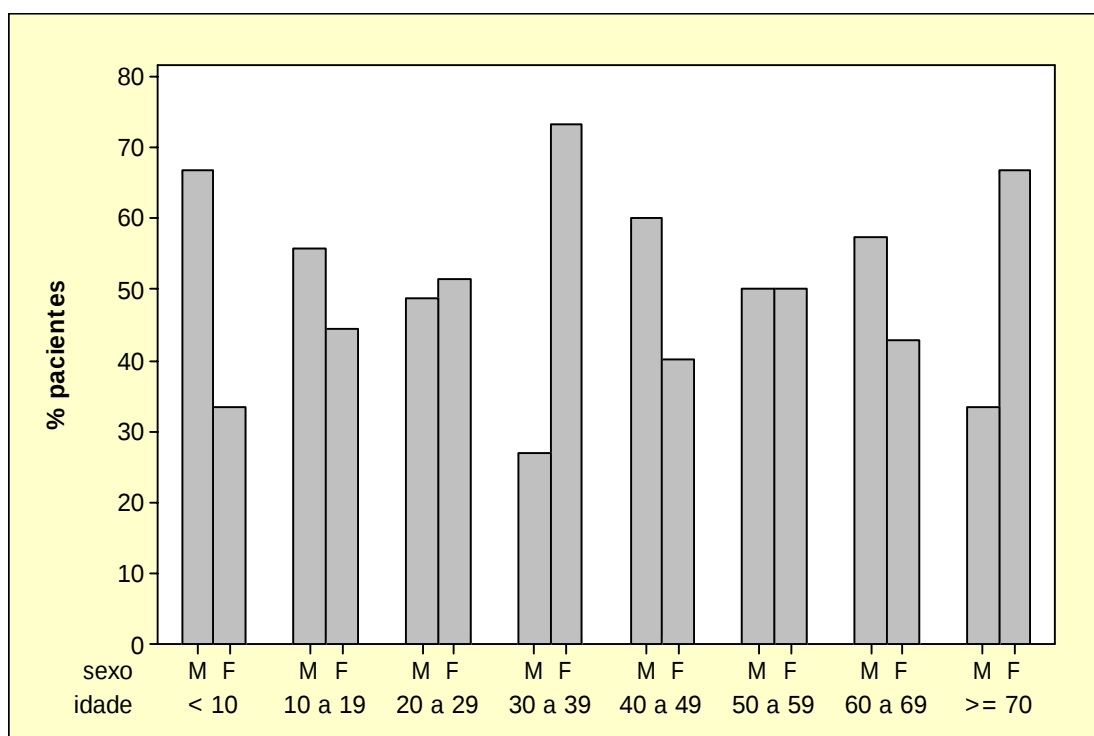


Figura 1 - Gráfico da distribuição conjunta de gênero por classes de idade, em percentuais.

4.1.2 Parâmetros Clínicos

A distribuição dos pacientes quanto ao tipo de queixa no momento do diagnóstico mostrou que a maior procura para diagnóstico foi devido ao aumento de volume (82,6%). Uma grande parte também estava relacionada a dor (33,1%). Na Tabela 2, as porcentagens somam mais que 100% pois as queixas apresentavam-se em combinação de 2 ou mais fatores.

Tabela 2 - Distribuição dos casos quanto ao tipo de queixa no momento do diagnóstico.

Queixa	n	%
dor	40	33,1
aumento de volume	100	82,6
parestesia	4	3,3
trismo	1	0,8
outros	5	4,1

A Tabela 3 indica as medidas resumo para o tempo de queixa, tamanho clínico do tumor e tamanho anátomo-patológico do tumor. O tempo médio de queixa foi de 38,5 meses, sendo o tamanho clínico e anátomo-patológico de 5,5 e 6,7 cm, respectivamente.

Tabela 3 - Medidas resumo para o tempo de queixa e tamanho do tumor.

Variáveis	n	Média±dp	Min	mediana	max
Tempo de queixa (meses)	111	38,5±57,3	1	12	240
Tamanho clínico-radiográfico (cm)	86	5,5±3,5	2	5	25

Min= Mínimo Max= Máximo

A maioria dos tumores (80,2%) estava localizada na região posterior da mandíbula, 11 pacientes (9,1%) apresentavam o tumor na região anterior da mandíbula, 11 (9,1%) na maxila posterior, 1 caso (0,8%) na maxila anterior e 1 caso (0,8%) encontrava-se em localização periférica (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos 121 casos quanto à localização do tumor.

Localização	N	%
Região posterior da maxila (D + E)	11	9,1
Região posterior D	2	
Região posterior E	9	
Região anterior da maxila	1	0,8
Região posterior de mandíbula (D + E)	97	80,2
Região posterior D	50	
Região posterior E	47	
Região anterior de mandíbula	11	9,1
Periférico / extra-ósseo	1	0,8
Total	121	100

D= direito ; E= esquerdo

Dos 121 casos estudados, a grande maioria tratava-se de Ameloblastomas sólidos (93,4%). Sete casos eram Ameloblastomas unicísticos (5,8%) e apenas 1 (0,8%) periférico. Dois casos de Ameloblastoma desmoplásico também foram diagnosticados e agrupados em conjunto com os Ameloblastomas sólidos. A Tabela 5 mostra a distribuição dos casos quanto ao tipo de Ameloblastoma.

Tabela 5 - Distribuição dos casos quanto ao tipo de Ameloblastoma.

Tipo	n	%
Sólido	113	93,4
Unicístico	7	5,8
Periférico	1	0,8
Total	121	100

A maioria dos pacientes deste estudo (74,4%) não havia feito tratamento anterior. Dos 31 casos que fizeram algum tratamento prévio, 22 fizeram curetagem, 6 fizeram tratamento radical e 3 marsupialização (Tabela 9).

Tabela 6 - Distribuição dos casos quanto o tratamento prévio.

Tratamento	n	%
Nenhum	90	74,4
Tratamento radical	6	5,0
Marsupialização	3	2,5
Curetagem	22	18,2
Total	121	100

Em relação ao tratamento realizado nos 121 casos, a curetagem associada à crioterapia (41,3% dos casos) foi mais utilizada, seguida por ressecção segmentar (38,8%) e curetagem (19,0%) (Tabela 7). A cirurgia por enucleação (0,8%) foi realizada no único caso de tumor periférico.

Tabela 7 - Tratamento realizado nos 121 casos de Ameloblastomas.

Tratamento	n	%
curetagem+crioterapia	50	41,3
ressecção segmentar	47	38,8
curetagem	23	19,0
enucleação	1	0,8
Total	121	100

No total, 27 pacientes (22,3%) apresentaram recidiva, sendo 25 (22,1%) com Ameloblastoma Sólido e 2 (28,6%) Unicístico. Recidiva extra-óssea ocorreu em 4 casos (todos em pacientes com tumor sólido). O teste

exato de Fisher indica que não houve diferença estatística significativa do número de pacientes com recidiva, por tipo de Ameloblastoma (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição das recidivas de acordo com o tipo de Ameloblastoma.

Recidiva	Padrão sólido		Padrão unicístico	
	n	%	N	%
Não	88	77,9	5	71,4
Sim	25	22,1	2	28,6
intra-óssea	21		2	
extra-óssea	4		-	
Total	113	100	7	100

Teste exato de Fisher: p=0,654

4.1.3 Tempo de Acompanhamento dos 121 casos

O tempo de acompanhamento foi calculado desde a data da cirurgia até a data da última avaliação disponível, independente da recidiva. A média de tempo de acompanhamento foi de $9,4 \pm 8,3$ e mediana de 7,3 anos (Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição dos 121 Ameloblastomas, de acordo com o tempo de acompanhamento.

tempo	n	%
< 5 anos	49	40,5
de 5 a 10 anos	27	22,3
de 10 a 20 anos	29	24,0
de 20 a 30 anos	14	11,6
de 30 a 40 anos	1	0,8
≥ 40 anos	1	0,8
Total	121	100

4.2 DADOS ESPECÍFICOS PARA CADA TIPO DE AMELOBLASTOMA

Devido à grande diferença de comportamento clínico e agressividade entre o Ameloblastoma padrão sólido e Ameloblastoma padrão unicístico, realizamos algumas análises separadas, de acordo com cada tipo.

4.2.1 Ameloblastoma Periférico

O único caso de Ameloblastoma periférico acometeu um paciente do gênero masculino, leucoderma, com 29 anos. O tumor localizava-se em rebordo alveolar posterior inferior direito, media cerca de 3cm. O aspecto histológico mostrava-se predominantemente folicular. Foi realizado tratamento conservador por enucleação da lesão. O caso obteve 01 ano de seguimento, livre de recidiva.

4.2.2 Ameloblastomas Unicísticos

O padrão unicístico foi confirmado através da análise em conjunto dos achados de imagem, macroscopia e histopatologia. Um total 07 casos foram revisados onde a média de idade foi de 35 anos, sendo mais predominante no gênero feminino. Todos os casos mostravam imagem unilocular nas radiografias panorâmicas. Em todos os casos realizaram-se abordagens cirúrgicas conservadoras. A tabela a seguir mostra a distribuição dos casos com detalhes.

Tabela 10 - Distribuição dos casos de Ameloblastomas Unicísticos.

Caso	G	Idade (Anos)	Local	Tam (cm)	Tratamento	Rec	Fol (meses)	HP
01	F	25	MDP	05	Cur	S	118	M
02	F	38	MDA	05	Cur+Crio	S	56	M
03	F	23	MDP	04	Cur+Crio	N	07	M
04	M	14	MDP	10	Cur	N	38	L
05	F	78	MPX	02	Cur	N	48	IL
06	M	21	MDP	ND	Cur	N	54	M
07	F	50	MDP	ND	Cur+Crio	N	90	IL

G= Gênero Tam= Tamanho Rec= Recidiva Fol= follow-up

HP= Histopatologia F= feminino M= Masculino MDP= Mandíbula posterior

MDA= Mandíbula anterior

MPX= Maxila posterior

Cur=Curetagem

Cur+Crio=

Curetagem e Crioterapia

HP= Histopatologia

M= Mural

L= Luminal

IL= Intra-luminal

4.2.3 Ameloblastomas Sólidos

Em 100 casos de tumores sólidos (88,5%) havia radiografias disponíveis para a análise. Em relação aos tumores sólidos, a maioria era radiograficamente multilocular (62%). Expansão das corticais ósseas vestibular e/ou lingual foi encontrada em 65% e ruptura em 25% dos casos. A cortical basilar mostrou expansão em 40% e ruptura em 13% dos casos.

Histopatologicamente, a maioria dos casos exibia padrão plexiforme (53,1%) ou padrão folicular (33,6%). Outros padrões encontrados foram acantomatoso (7 casos), células granulares (5 casos), 2 casos desmoplásico e 1 caso de hemangiomaso.

A Tabela 11 indica o percentual de recidivas por tipo de tratamento realizado, entre este grupo de pacientes. O teste de Qui-Quadrado indicou que não houve diferença estatística significativa do número de recidivas por tipo de tratamento realizado.

Tabela 11 - Recidiva, por tipo de tratamento nos casos de Ameloblastomas sólidos.

Tipo de tratamento	Casos	Recidiva (%)
Ressecção segmentar	47	8 (17,0)
Curetagem+crioterapia	47	14 (29,8)
Curetagem	19	3 (15,8)

Teste de Qui-Quadrado: $p=0,252$

4.3 CURVAS DE SOBREVIDA PARA OS AMELOBLASTOMAS SÓLIDOS

As diversas curvas a seguir indicam a sobrevida livre de recidiva, ou seja, o tempo decorrido desde a cirurgia até a ocorrência de recidiva, para os pacientes com Ameloblastoma sólido. As estimativas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier, e foi considerado “censura” todo o paciente que não obteve recidiva. Neste caso, a sobrevida livre de recidiva, foi medida desde a data da cirurgia, até a data da última avaliação disponível.

A figura abaixo mostra a curva de sobrevida livre de rescidiva para os ameloblastomas sólidos (Figura 2).

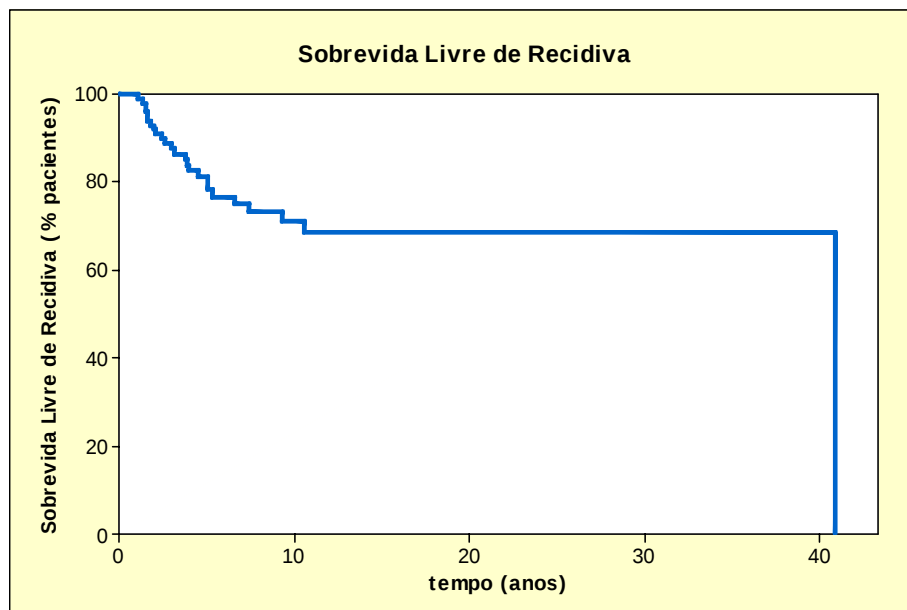


Figura 2 - Gráfico da curva de Sobrevida Livre de Recidiva para os Ameloblastomas Sólidos.

4.3.1 Análise da Sobrevida Livre de Recidiva, por tipo de Tratamento

De acordo com o teste Log-rank ($p=0,259$), não houve diferença estatística significativa entre as curvas, quando analisado o tipo de tratamento.

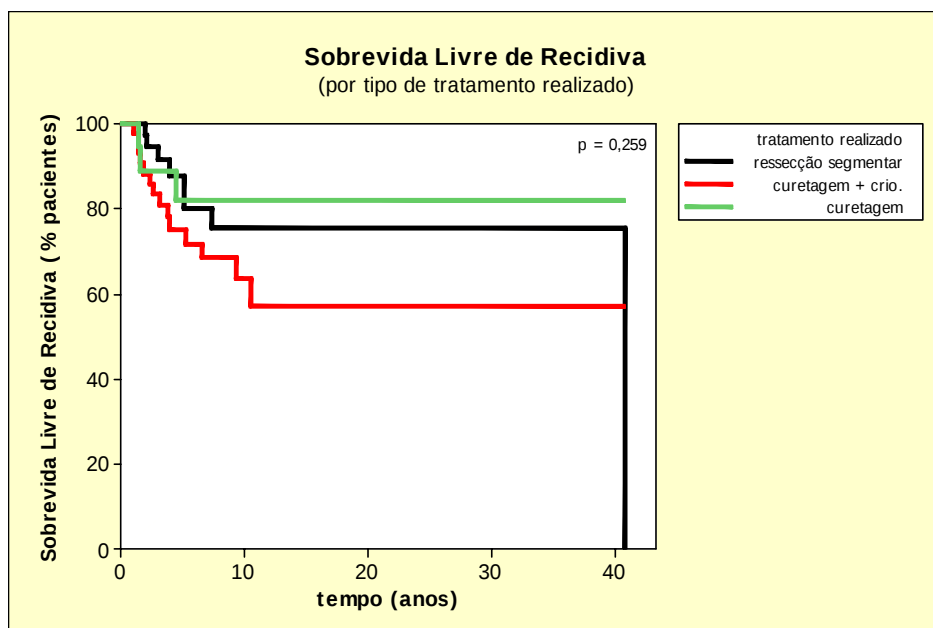


Figura 3 - Gráfico da curva de Sobrevida Livre de Recidiva por tipo de tratamento.

4.3.2 Análise da sobrevida livre de recidiva, por faixa etária

Avaliando a sobrevida livre de recidiva por faixa etária, observamos que a proporção de pacientes com recidiva foi mais elevada no grupo de pacientes entre 18 e 32 anos, e menor no grupo com mais de 32 anos. A comparação da sobrevida livre de recidiva, por faixa etária, mostrou-se próxima da significância ($p=0,059$)(Tabela 12).

Tabela 12 - Sobrevida livre de recidiva, por faixa etária.

Idade	Casos	Recidiva (%)
< 18 anos	16	4 (25,0)
18 a 32 anos	50	15 (30,0)
> 32 anos	47	6 (12,8)

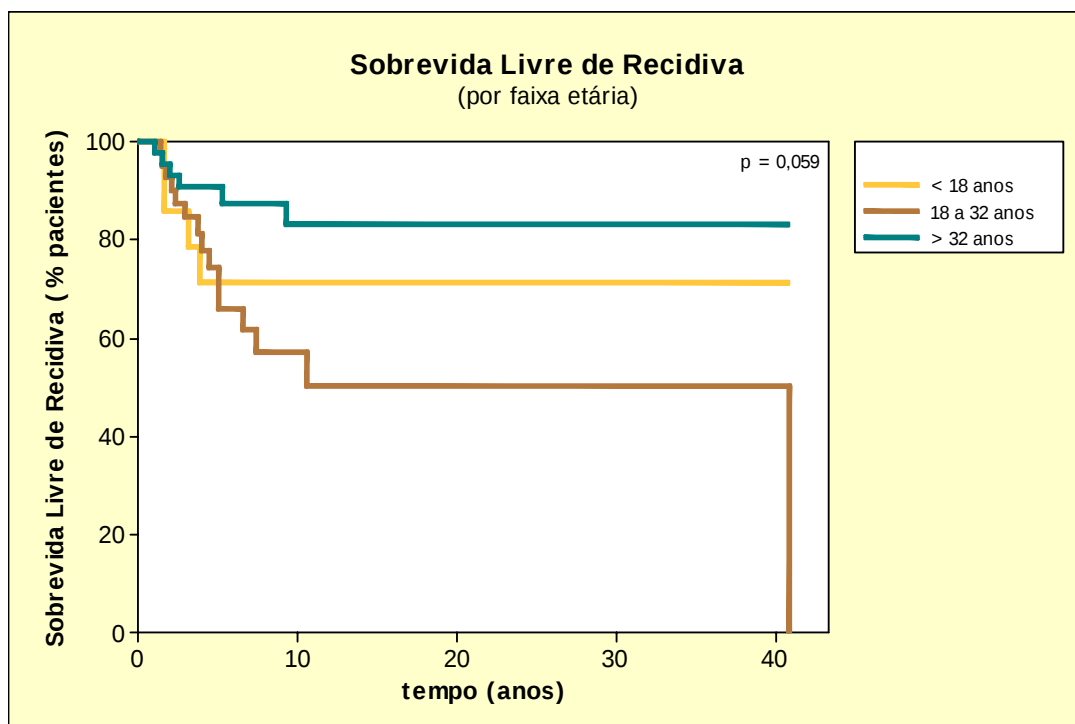


Figura 4 - Gráfico da curva de Sobrevida Livre de Doença por faixa etária.

4.3.3 Análise da Sobrevida Livre de Recidiva por Padrão Radiográfico

O teste de Log-rank, para a comparação das curvas de sobrevida livre de recidiva por padrão radiográfico, mostrou que houve diferença significativa entre os pacientes que apresentavam padrão unilocular e pacientes que apresentavam padrão multilocular, ($p=0,038$). A tabela 13 mostra a distribuição dos casos por padrão radiográfico e ocorrência de recidiva e o Figura 5 mostra a curva de Sobrevida Livre de Doença por padrão radiográfico.

Tabela 13 - Distribuição dos Ameloblastomas sólidos por padrão radiográfico e ocorrência de recidiva.

Padrão radiográfico	total	Recidiva (%)
Unilocular	38	4 (10,5)
Multilocular	62	18 (29,0)

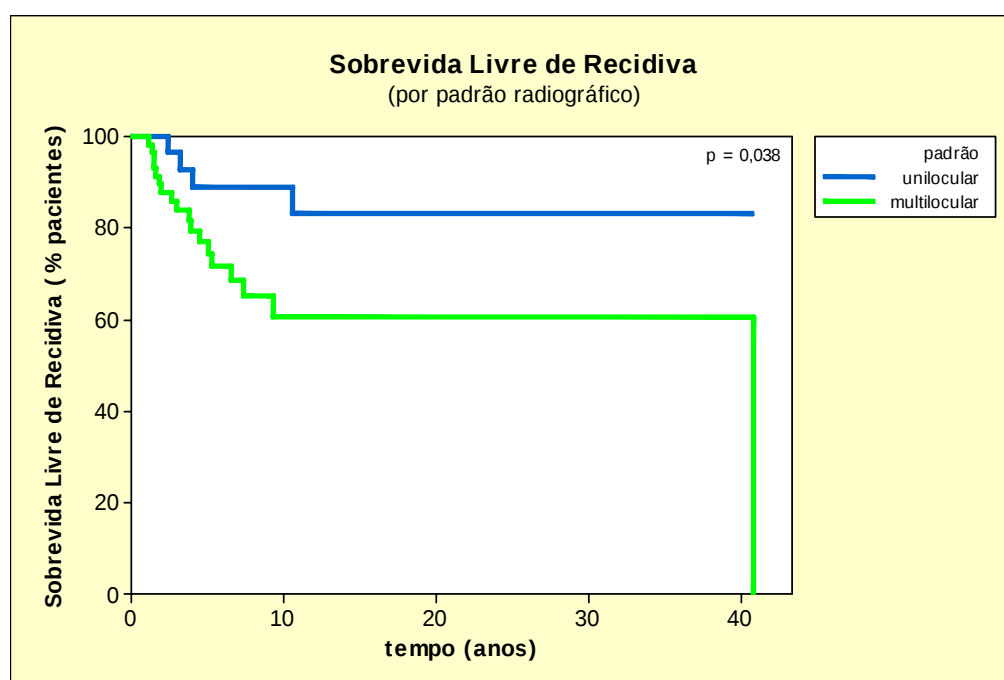


Figura 5 - Gráfico da curva de Sobrevida Livre de Doença por padrão radiográfico.

4.4 ANÁLISE DE REGRESSÃO (MODELO DE RISCOS PROPORCIONAIS DE COX) PARA OS CASOS DE AMELOBLASTOMAS SÓLIDOS

As Tabelas 14 e 15 mostram o valor do *hazard ratio* (HR), o intervalo de confiança de 95% para o *hazard ratio* (IC 95%) e o nível descritivo do teste estatístico (valor do “p”) para cada uma das variáveis.

4.4.1 Parâmetros Clínicos

Podemos notar que das variáveis clínicas analisadas isoladamente, somente padrão radiográfico e cortical óssea basilar foram estatisticamente significantes. O valor do *hazard ratio* de cada uma dessas variáveis citadas foi interpretado da seguinte forma:

- ✓ **Padrão radiográfico** (*hazard ratio* = 3,02): pacientes cujo padrão radiográfico mostrava aspecto multilocular, tiveram 3,02 vezes mais chance de ocorrência de recidiva do que pacientes cujo padrão radiográfico mostrava aspecto unilocular.

- ✓ **Cortical óssea basilar** (*hazard ratio* = 1,55 e 6,51 respectivamente para corticais expandidas e rompidas, em relação à preservada): pacientes que apresentaram cortical óssea basilar expandida tiveram 1,55 vezes a chance de ocorrência de recidiva do que pacientes com cortical óssea basilar preservada. Analogamente, pacientes com cortical óssea basilar rompida tiveram 6,51 vezes a chance de

ocorrência de recidiva do que pacientes com cortical óssea basilar preservada.

Tabela 14 - Resultado da regressão de Cox (univariada) para a análise das variáveis clínicas que podem estar correlacionadas com a ocorrência de recidiva.

Variáveis	n	Recidiva (%)	HR	IC 95%	p
Idade < 18	16	04 (25,0)	1,00		
18 a 32	50	15 (30,0)	1,37	0,45 – 4,16	0,581
> 32	47	06 (12,8)	0,45	0,13 – 1,60	0,216
Etnia Melanoderma	27	06 (22,2)	1,00		
Leucoderma	82	19 (23,2)	0,90	0,36 – 2,28	0,830
Federma	4	00 (0,0)	-	-	-
Gênero Masculino	54	10 (18,5)	1,00		
Feminino	59	15 (25,4)	1,94	0,85 – 4,46	0,117
Queixa (meses) ≤ 12	58	13 (22,4)	1,00		
> 12	47	10 (21,3)	1,04	0,45 – 2,45	0,923
Tamanho (cm)	35	06 (17,1)	1,00		
5 a 10	39	12 (30,8)	1,97	0,73 – 5,34	0,183
> 10	06	00 (0,0)	-	-	-
Tamanho AP (cm) < 5	32	11 (34,4)	1,00		
5 a 10	48	11 (22,9)	0,64	0,28 – 1,48	0,294
> 10	13	01 (7,7)	0,00	-	0,958
Localização Mandíbula	102	24 (23,5)	1,00		
Maxila	11	01 (9,1)	0,35	0,05 – 2,56	0,299
Trat. Prévio Não	84	14 (16,7)	1,00		
Sim	29	11 (37,9)	2,04	0,90 – 4,59	0,086
Tratamento Ressecção	47	08 (17,0)	1,00		
Cur + Crio	47	14 (29,8)	1,91	0,77 – 4,75	0,161
Cur	19	03 (15,8)	0,94	0,24 – 3,65	0,932
P. Radio Unilocular	38	04 (10,5)	1,00		
Multilocular	62	18 (29,0)	3,02	1,01 – 9,04	0,048
Cort (V, L e P) Rompida	28	08 (28,6)	1,00		
Expandida	65	13 (20,0)	0,57	0,23 – 1,40	0,224
Preservada	07	00 (0,0)	-	-	-
Cort basal Preservada	40	07 (17,5)	1,00		
Expandida	34	07 (20,6)	1,55	0,52 – 4,63	0,433
Rompida	11	06 (54,5)	6,51	2,04 – 20,8	0,002
Fratura Não	101	23 (22,8)	1,00		
Sim	4	00 (0,0)	-	-	-

Obs: No modelo de regressão múltipla, tentou-se um ajuste com as variáveis padrão radiográfico e cortical óssea basilar, mas neste caso somente a variável cortical óssea basilar permaneceu significativa, sendo este o parâmetro que melhor explica os casos de recidiva entre as variáveis clínicas.

A.P= anatomo-patológico

V = face vestibular; L=face lingual; P=face palatal

4.4.2 Parâmetros Histopatológicos

Podemos notar que das variáveis histopatológicas analisadas isoladamente, somente o *aspecto histopatológico predominante (plexiforme)* foi estatisticamente significativo. O valor do *hazard ratio* neste caso foi interpretado da seguinte forma:

- ✓ **Aspecto histopatológico predominante** (*hazard ratio* = 3,17):
Pacientes com aspecto histopatológico predominante folicular tem 3,17 vezes a chance de ocorrência de recidiva quando comparados a pacientes com padrão plexiforme. Os demais padrões histológicos já não mostraram diferença significativa em relação ao aspecto folicular, quanto à chance de ocorrência de recidiva.

Tabela 15 - Resultado da regressão logística univariada para a análise das variáveis histológicas que podem estar correlacionadas com a ocorrência de recidiva.

Variável		n	Recidiva (%)	HR	IC 95%	p
Padrão	Plexiforme	60	8 (13,3)	1,00		
	Folicular	38	12 (31,6)	3,17	1,25 – 8,07	0,015
	Outros ¹	15	5 (33,3)	2,86	0,91 – 9,02	0,073
A. Cist.	Ausente	26	6 (23,1)	1,00		
	Micro	36	6 (16,7)	0,65	0,20 – 2,13	0,477
	Macro	38	9 (23,7)	1,15	0,41 – 3,23	0,792
	Ambas	13	4 (30,8)	1,07	0,30 – 3,80	0,918

¹ outros aspectos predominantes: acantomatoso (7 casos, sendo 3 recidivas), desmoplásico (2 casos, sendo 1 recidiva), de células granulares (5 casos, nenhuma recidiva) e hemangiomatoso (1 caso, 1 recidiva)

A. Cist= áreas de degeneração císticas

No caso de um ajuste de regressão múltipla, com as 3 variáveis mais significantes (padrão radiográfico, cortical óssea basilar e aspecto predominante), restou no modelo somente a variável cortical óssea basilar, sendo que esta variável pode ser considerada a mais explicativa para a recidiva da doença.

4.5 CASOS INCOMUNS

Alguns casos isolados, porém raros surgiram nesta investigação. Anteriormente foi mencionado um caso de Ameloblastoma extra-ósseo (periférico). Outro caso digno de nota trata-se de um Ameloblastoma sólido (padrão folicular) que acometeu uma criança do gênero feminino com dois anos de idade em região posterior de maxila. Os dados do prontuário revelam que o tumor apresentava 4 cm de tamanho e o tratamento realizado foi ressecção radical do tumor. Porém, não temos informações quanto ao pós-operatório e não há seguimento clínico deste caso.

É interessante mencionar a ocorrência da recidiva de um tumor após 40 anos de tratamento, com seguimento clínico e radiográfico, em paciente do gênero masculino, inicialmente com 31 anos de idade. Em 1960, realizou-se tratamento radical em um tumor localizado em região posterior de mandíbula, medindo 8 cm de diâmetro e, em 2000, foi detectada a recidiva intra-óssea. O exame anátomo-patológico mostrava que esse tumor era do subtipo plexiforme.

Um raro caso de Ameloblastoma com padrão histológico hemangiomaso também deve ser mencionado. Acometeu a região posterior da maxila em um paciente do gênero masculino, com 15 anos de idade. O caso mostrou recorrência após 2 anos da cirurgia conservadora (curetagem).

Outro caso mostrou-nos a ocorrência de tumores odontogênicos sincrônicos em mandíbula (Ameloblastoma folicular e cisto odontogênico ortoqueratinizado) em homem com 21 anos de idade. Este caso foi relatado em 2006 (FREGNANI et al. 2006 – Anexo 5).

4.6 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Após a realização das reações de imunoistoquímica utilizando-se a técnica de TMA e início da leitura das lâminas, observamos que a análise não pôde ser realizada em alguns casos devido a material insuficiente. Apesar da técnica de TMA ter inúmeras vantagens já descritas inicialmente, a atual experiência com Ameloblastomas mostrou que, pelos motivos a serem mencionados a seguir, a análise pode ficar prejudicada e/ou inviabilizada. Apesar da criteriosa seleção da área no bloco doador, muitos casos ou não mostravam áreas tumorais suficientes ou não mostravam o padrão histológico previamente classificado. Assim, os casos unicísticos, por exemplo, tiveram análise prejudicada. Dessa maneira e pelos motivos supracitados, optamos por realizar a análise imunoistoquímica apenas nos casos sólidos. A média de casos analisados por marcador foi de 87.

4.6.1 Citoqueratinas e Vimentina

A tabela abaixo mostra o número (frequência absoluta) e a porcentagem (frequência relativa) de casos nos quais os marcadores foram positivos e negativos nas amostras analisadas.

Tabela 16 - Distribuição de frequências para as citoqueratinas.

Ck	Negativo	Positivo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
AE1/AE3	-	89 (100)	89 (100)
34 β E12	-	88 (100)	88 (100)
Ck1	86 (100)	-	86 (100)
Ck4	10 (11,5)	77 (88,5)	87 (100)
Ck6	11 (12,8)	75 (87,2)	86 (100)
Ck7	87 (98,9)	1 (1,1)	88 (100)
Ck8	39 (44,3)	49 (66,7)	88 (100)
Ck10	86 (100)	-	86 (100)
Ck14	-	90 (100)	90 (100)
Ck16	36 (41,4)	51 (58,6)	87(100)
Ck18	75 (86,2)	12 (13,8)	87 (100)
Ck19	3 (3,4)	85 (96,6)	88 (100)

Notamos que os marcadores AE1/AE3 (Figura 6), 34 β E12 (Figura 7) e Ck14 (Figura 8) mostraram intensa e homogênea positividade em todas as amostras.

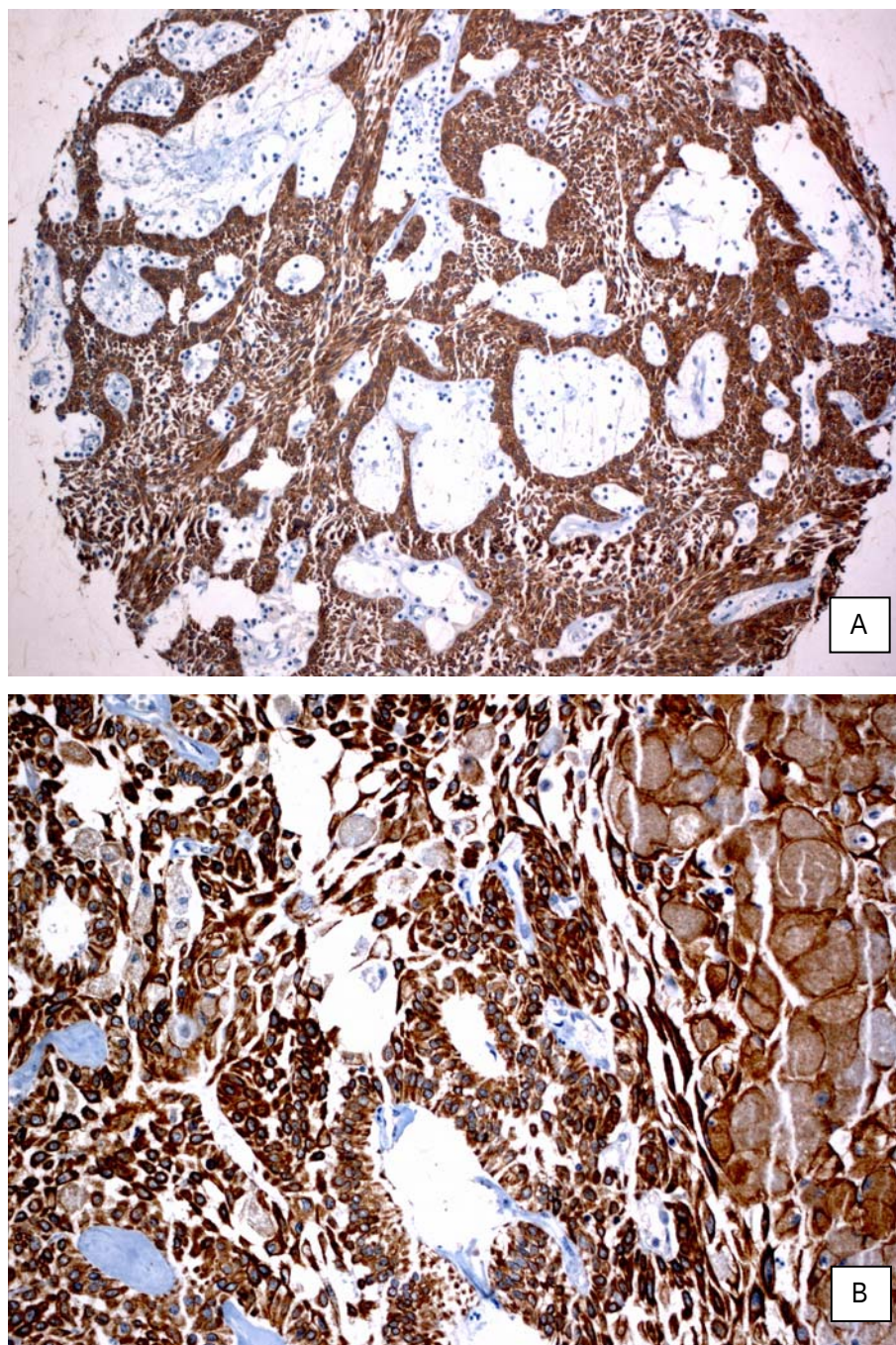


Figura 6 - Ameloblastoma plexiforme (A) e de células granulares (B) apresentando intensa e uniforme positividade para CK AE1/AE3 em todo o epitélio odontogênico. (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x).

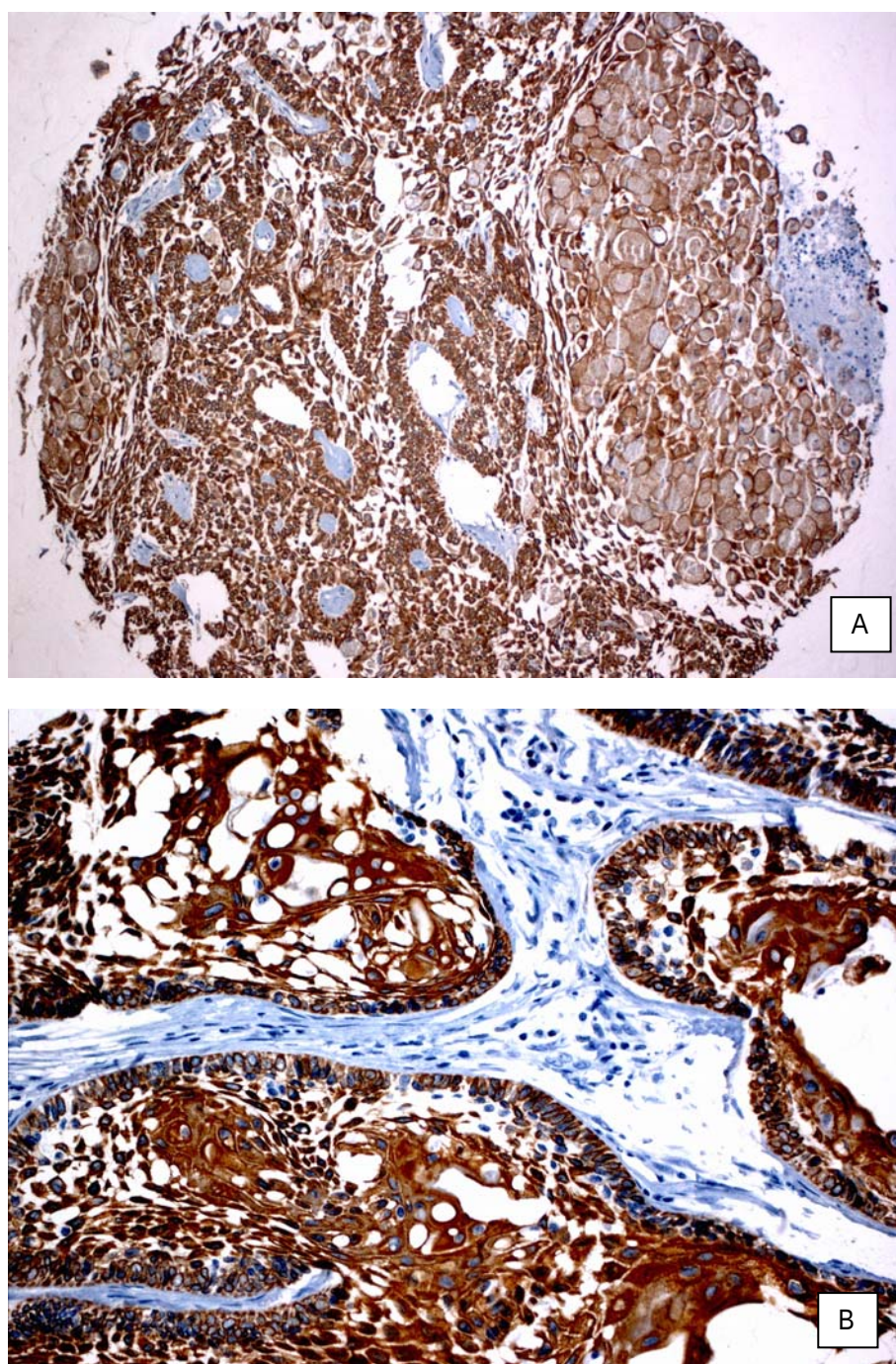


Figura 7 - Ameloblastoma de células granulares (A) e Ameloblastoma acantomatoso (B) apresentando forte e homogênea positividade para Ck 34B12 (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x).

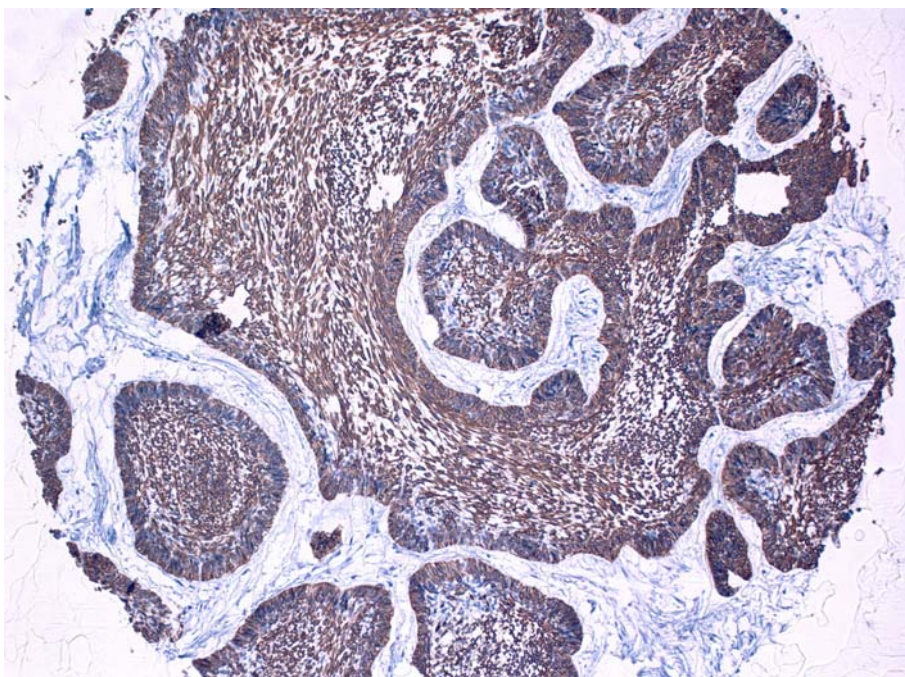


Figura 8 - Ameloblastoma plexiforme apresentando positividade uniforme para Ck14 (IQ, 10x).

A grande maioria dos casos (96,6%) também foi positiva para Ck19, mostrando forte expressão em todo o epitélio odontogênico como podemos observar na Figura 9.

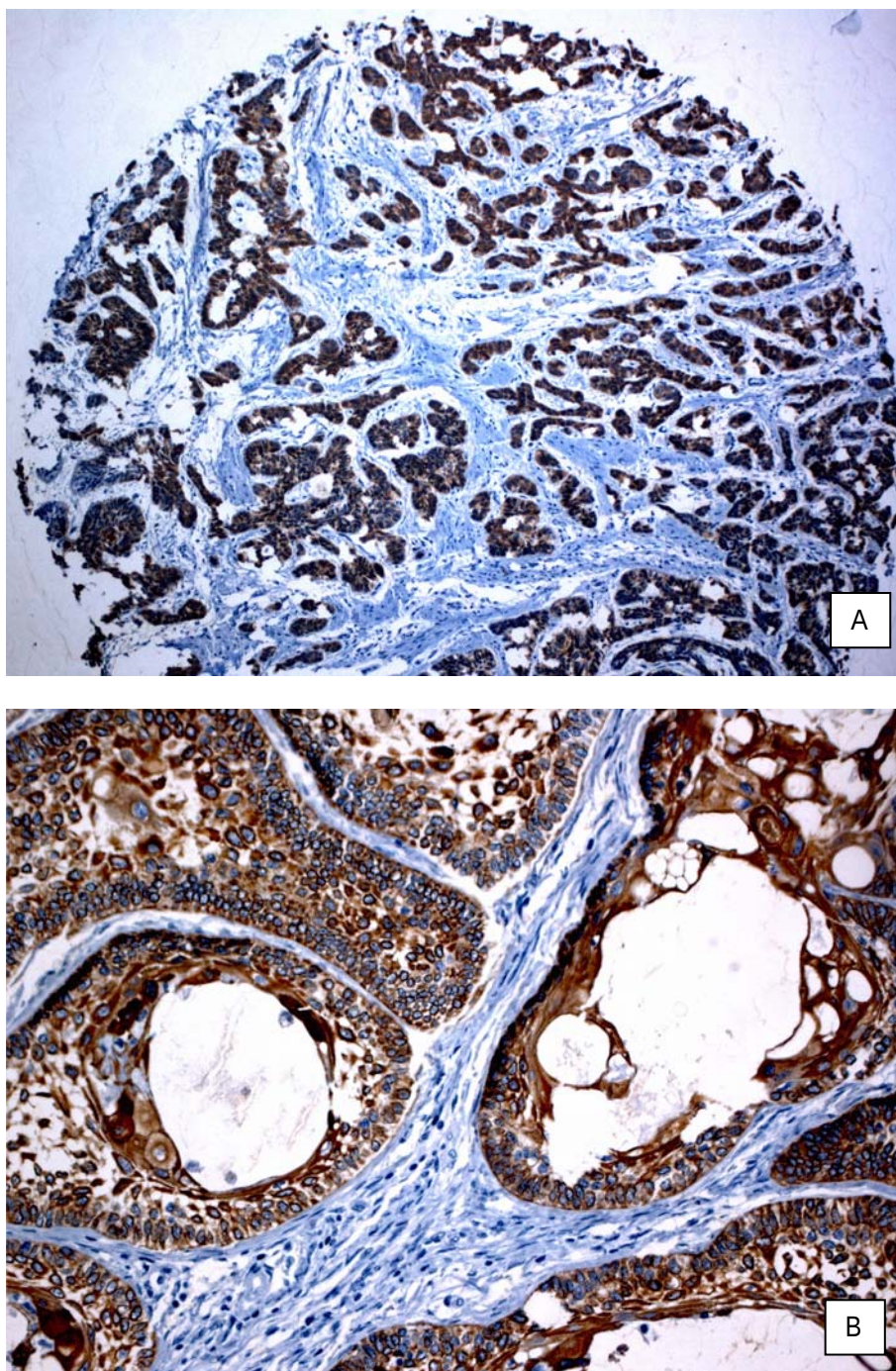


Figura 9 - Cordões de células tumorais em ameloblastoma plexiforme (A) e ninhos tumorais com degeneração cística em Ameloblastoma folicular (B) mostrando forte positividade para a Ck19 (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x).

Os marcadores Ck1 e Ck10 não exibiram reatividade em nenhuma das amostras testadas (Figuras 10 e 11, respectivamente) e a Ck7 foi negativa em 98,9% dos casos, sendo ilustrada pela Figura 12.

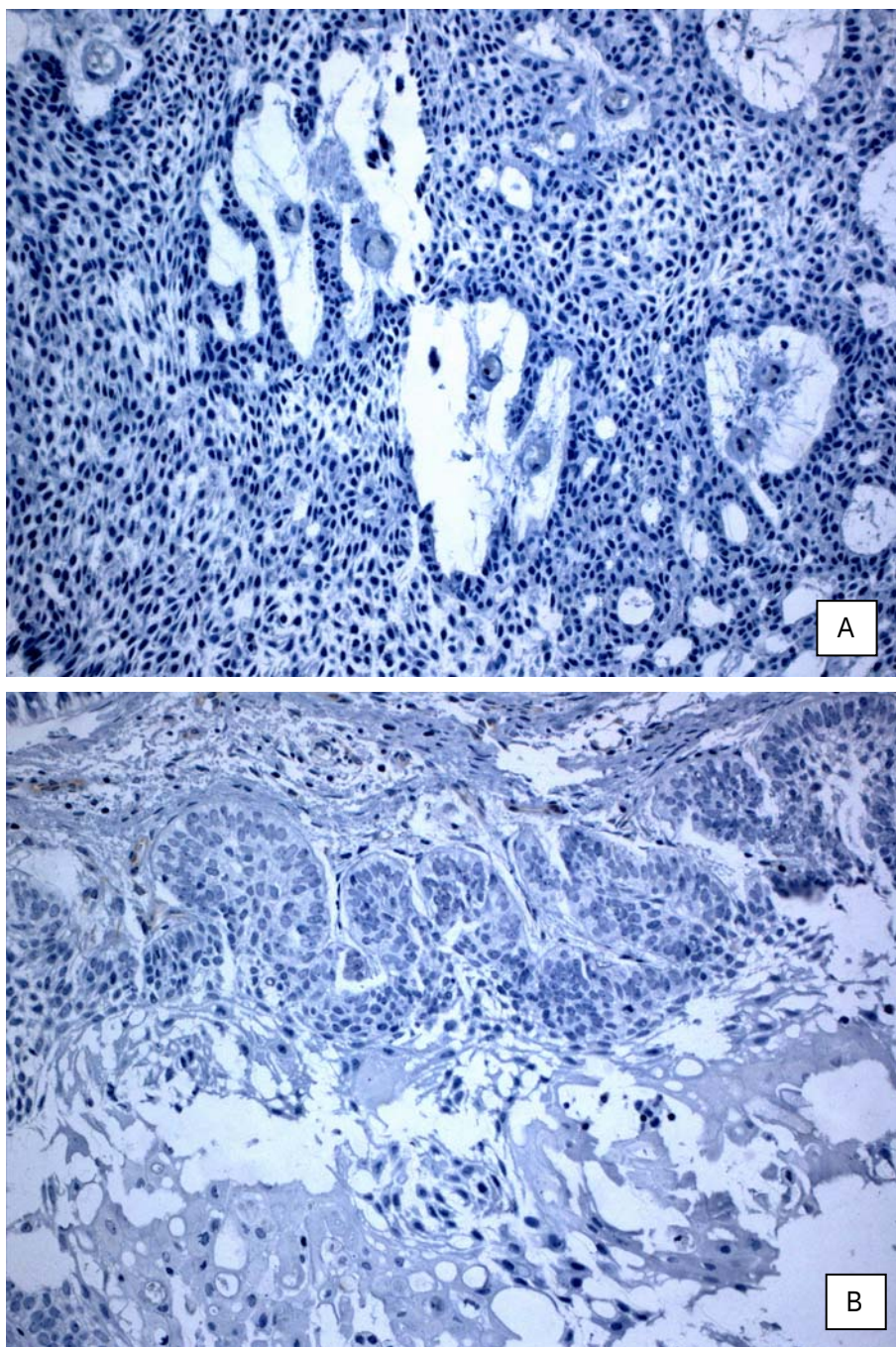


Figura 10 - Lençóis de células de Ameloblastoma plexiforme (A) e células escamosas com degeneração cística de Ameloblastoma acantomatoso (B) (IQ, MO x20) mostrando negatividade para o marcador CK1. (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x).

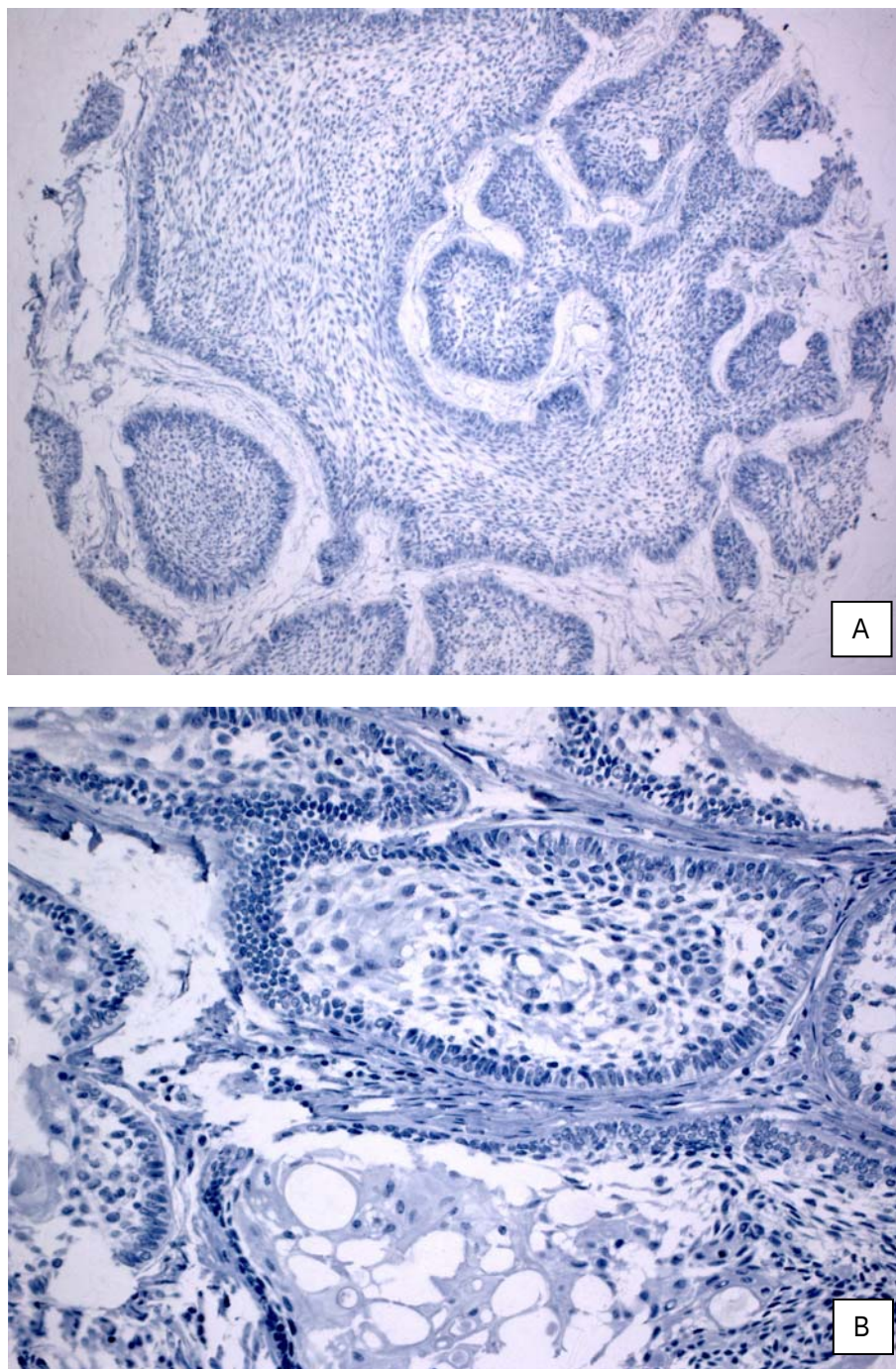


Figura 11 - Ck10 foi uniformemente negativo para Ameloblastoma plexiforme (A) e folicular (B). (A: IQ, 10x; B: IQ, 20x).

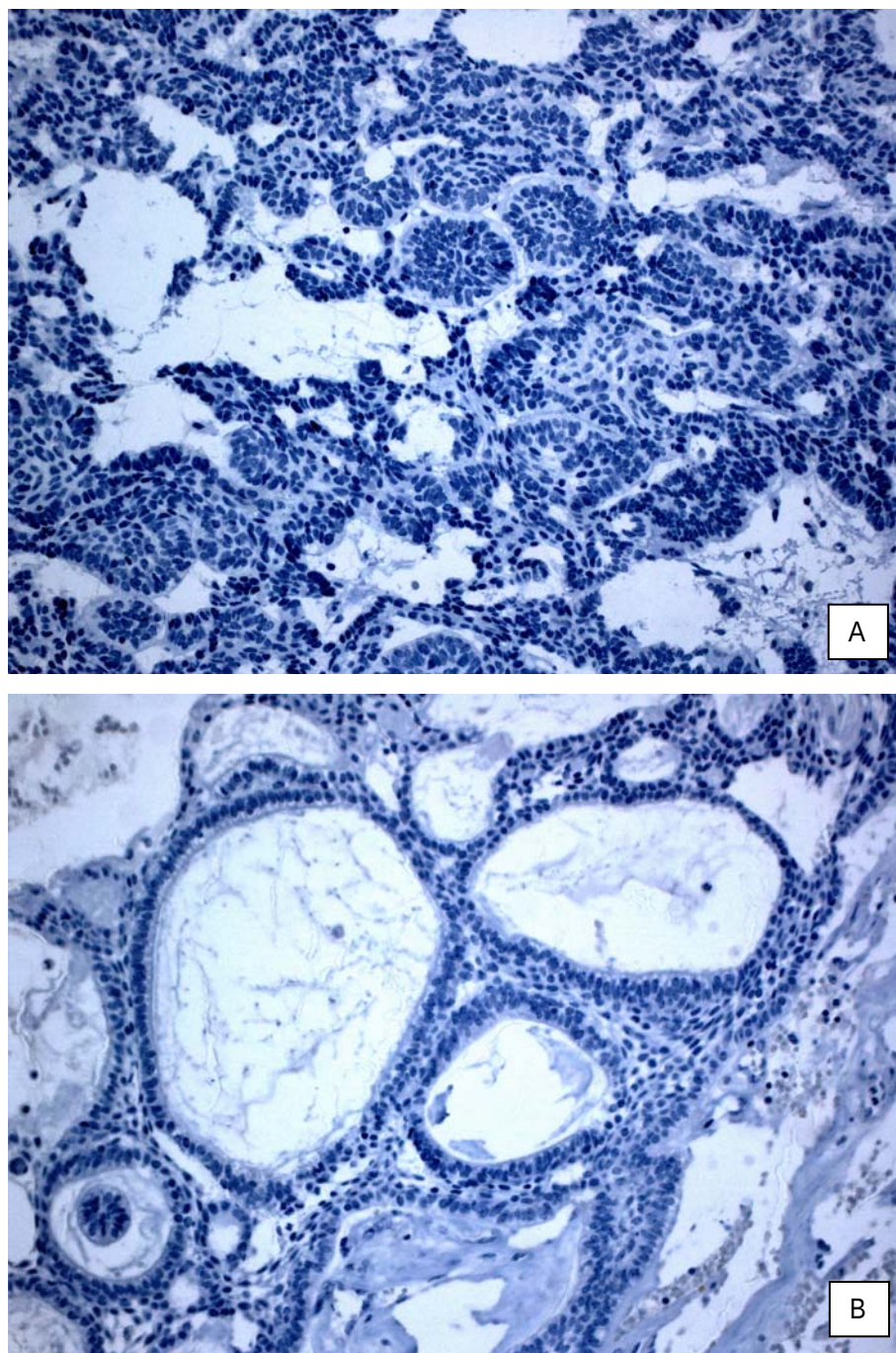
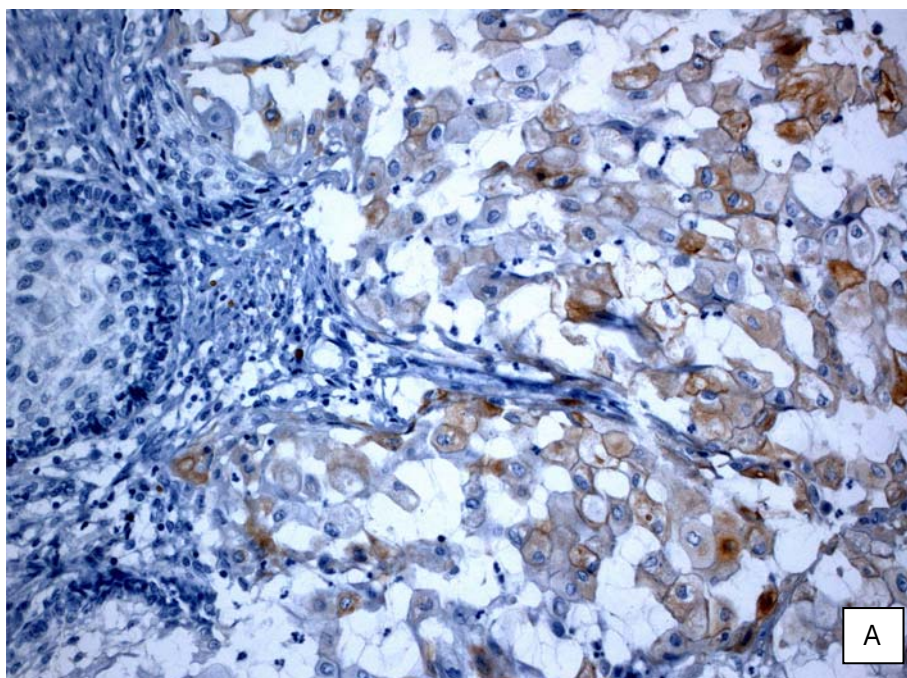


Figura 12 - Ilhas tumorais sólidas de epitélio odontogênico de Ameloblastoma plexiforme (A) e Ameloblastoma plexiforme com áreas de degeneração estromal (B) exibindo negatividade para a CK7. (IQ, 20x).

A grande maioria dos casos (86,2%) foi negativo para CK18, e os poucos casos positivos mostravam expressão bastante focal e em áreas onde havia diferenciação escamosa (Figura 13).



(legenda na página 52)

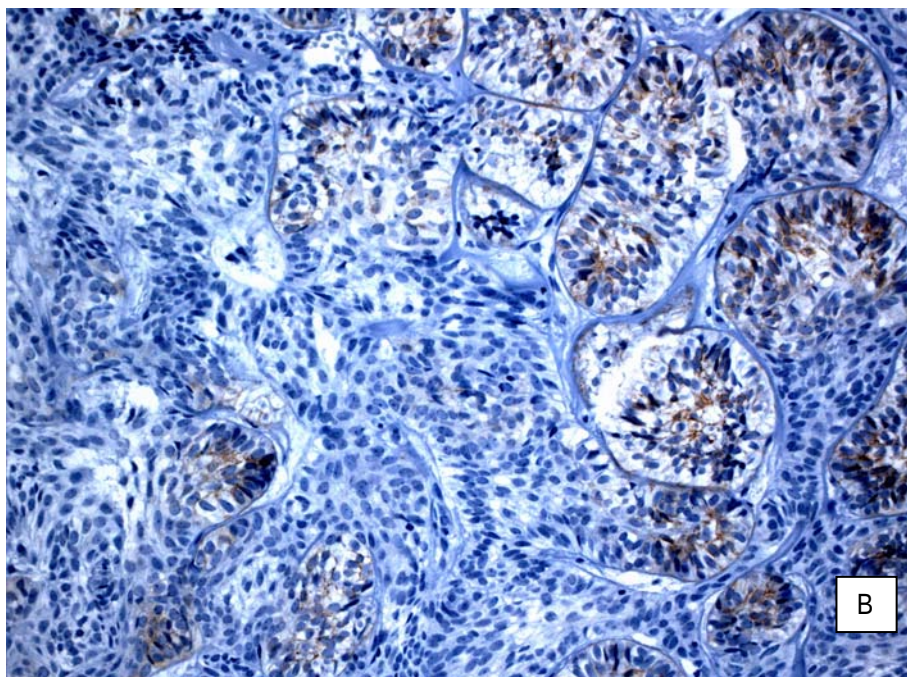


Figura 13 - Células tumorais com diferenciação escamosa e com perda de coesividade em Ameloblastoma folicular (A), assim como as células suprabasais de ninhos tumorais em Ameloblastoma folicular (B) exibiram fraca positividade para a CK18. (B), IQ, 20x.

Ck4 foi expressa em 88,5% dos casos. Destes, 30% apresentavam positividade focal; 15% mostravam marcação em células com diferenciação escamosa ou em áreas onde havia degenerações císticas e outros 15% mostravam expressão mais fraca e restrita às células do retículo estrelado. Os demais 58,5% mostraram expressão de Ck4 mais homogênea e fraca pelo tecido neoplásico (Figura 14).

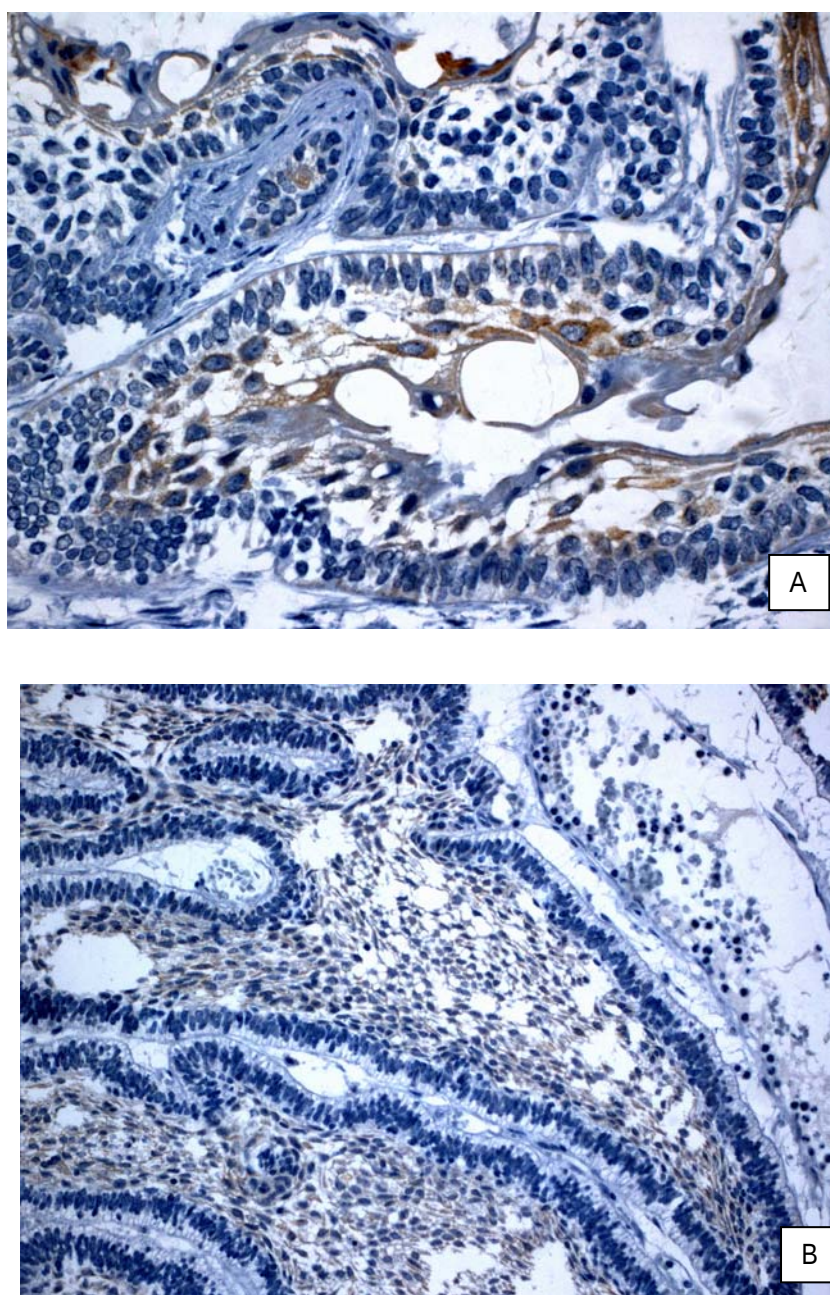


Figura 14 - A. Seletiva marcação para a CK4 nas áreas de diferenciação escamosa no Ameloblastoma acantomatoso (IQ, 20x). B. Células suprabasais em área semelhante ao retículo estrelado do germe dentário em Ameloblastoma plexiforme apresentando fraca imunomarcação para a CK4 (IQ, 20x).

A CK6 foi expressa em 87,2% dos casos, grande parte destes (68%) mostrava a marcação em áreas com diferenciação escamosa ou em áreas onde havia degenerações císticas (Figura 15).

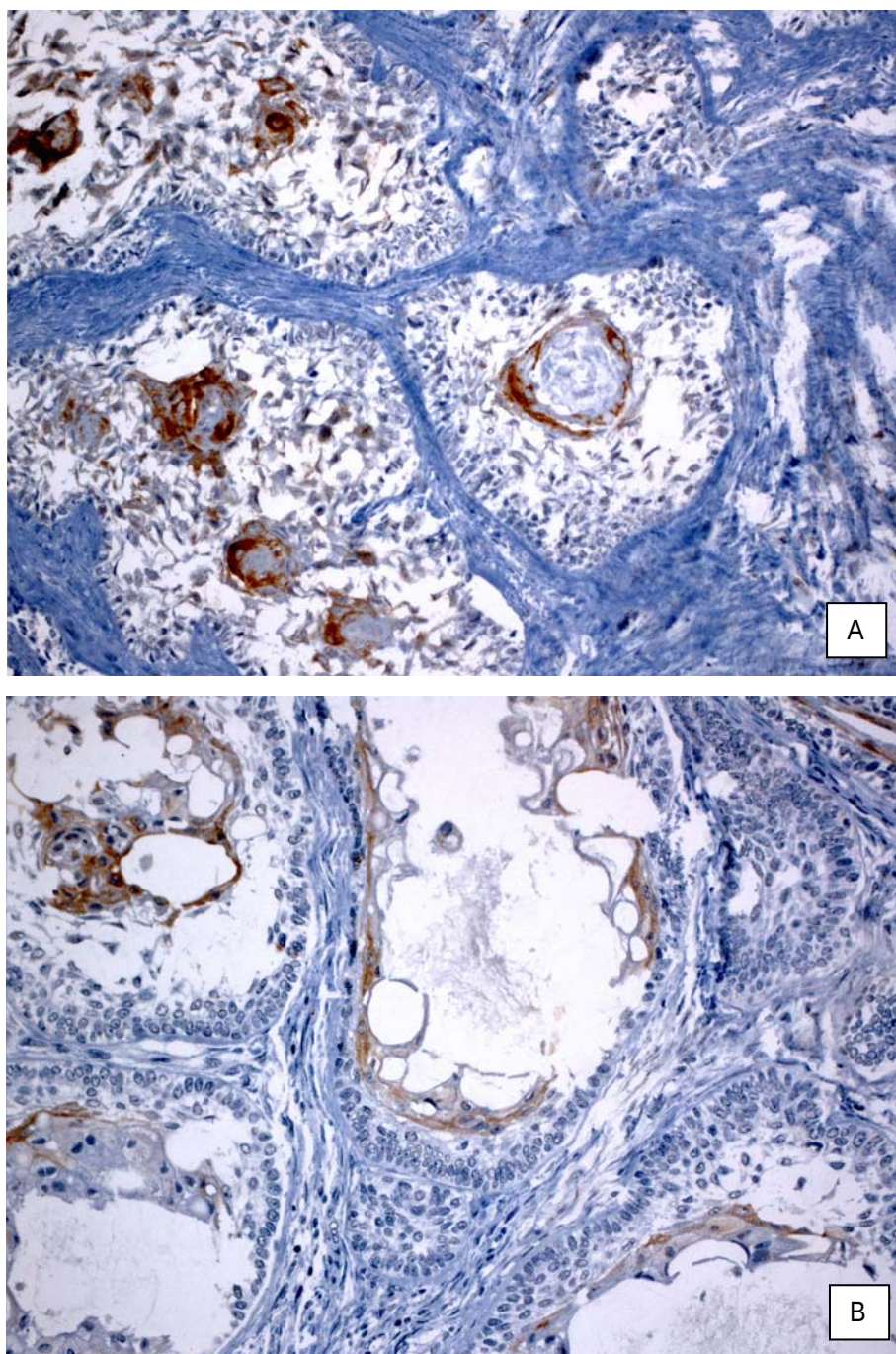


Figura 15 - A: Ameloblastoma apresentando intensa positividade para Ck6 em células epiteliais com diferenciação escamosa (IQ, 20x). B: Ameloblastoma folicular apresentando positividade para Ck6 em áreas de degeneração cística (IQ, 20x).

Ck8 exibiu positividade em 66,7% dos casos com distribuição não homogênea e focal. A Figura 16 mostra células tumorais com imunomarcacão fraca para Ck8. No entanto, as células com diferenciação escamosa ou células epiteliais de revestimento cístico eram notadamente positivas.

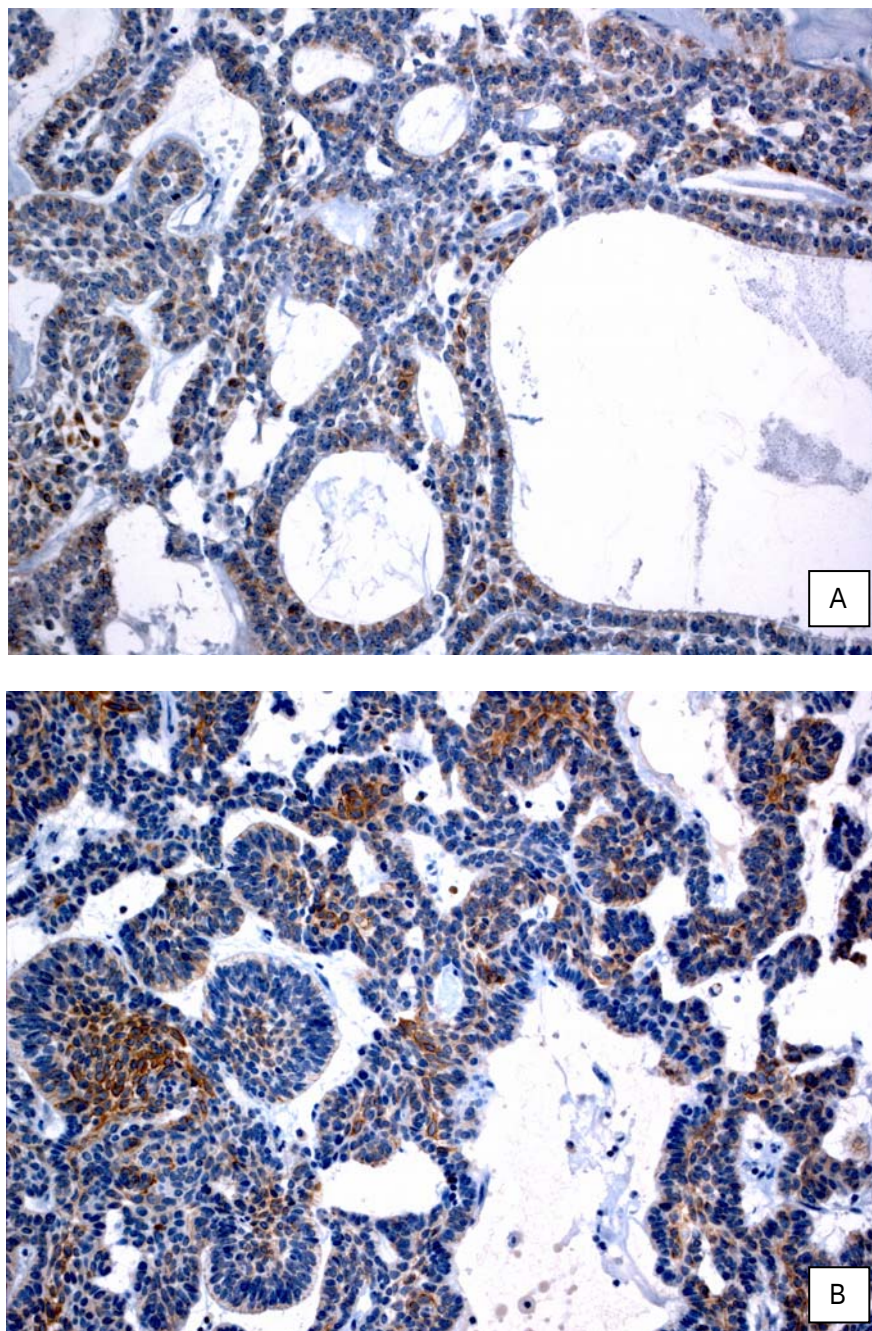


Figura 16 - Células basais adjacentes a cavidades císticas (A) e supra-basais (B) com imunoreatividade para a CK8 em Ameloblastoma plexiforme (IQ, 20x).

A Ck16 foi expressa em 58,6% dos casos. Assim como em outras citoqueratinas descritas acima, em 58% dos casos positivos, esta marcação ocorria apenas em áreas onde o epitélio mostrava diferenciação escamosa ou degenerações císticas (Figura 17). Nos demais casos, a expressão foi mais homogênea (Figura 18).

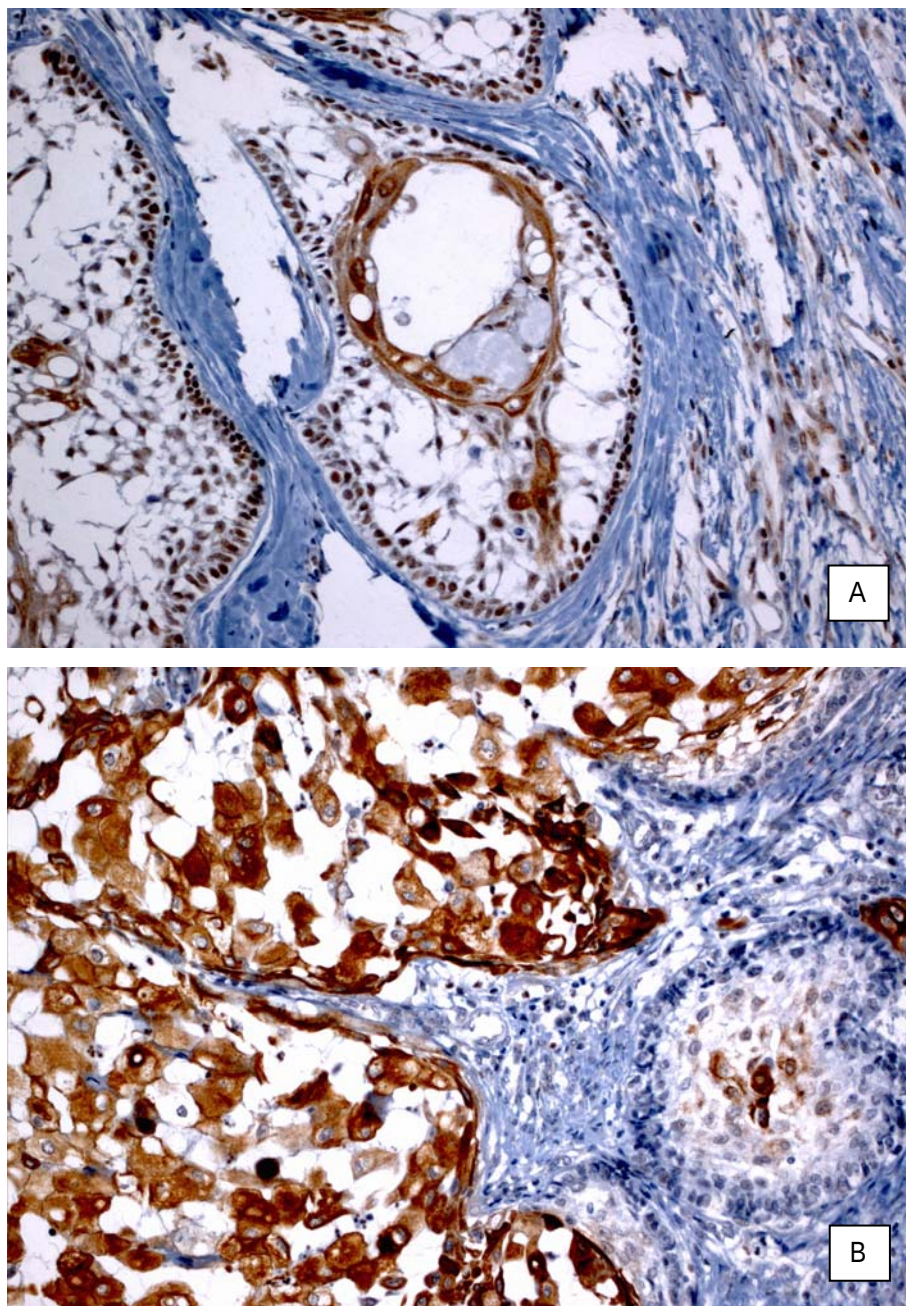


Figura 17 - Ninho tumoral de Ameloblastoma folicular mostrando microcisto revestido por células escamosas (A) e lençóis de células escamosas acantolíticas de Ameloblastoma acantomatoso com imunopositividade para a CK16. (IQ, 20x).

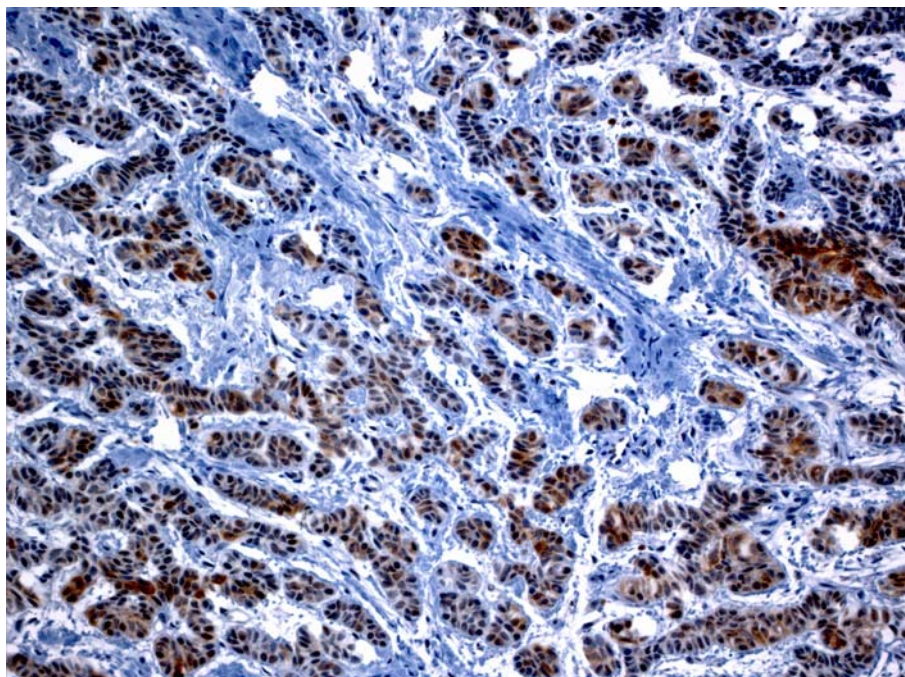


Figura 18 - Cordões tumorais de epitélio odontogênico num caso de Ameloblastoma plexiforme mostrando expressão de CK16 (IQ, x10).

A Tabela abaixo mostra a distribuição das citoqueratinas de acordo com os subtipos histológicos encontrados em nossa casuística.

Tabela 17 - Distribuição de Ck de acordo com o padrão histológico.

Cks		Folicular	Plexiforme	Acantomatoso	Desmoplásico	Células granulares	Hemangiomaso
Ck1	-	25	50	04	01	05	01
	+	00	00	00	00	00	00
Ck4	-	02	07	00	00	01	00
	+	24	43	04	01	04	01
Ck6	-	05	03	01	00	02	00
	+	21	46	03	01	03	01
Ck7	-	26	50	04	01	05	01
	+	01	00	00	00	00	00
Ck8	-	12	17	05	01	03	01
	+	14	33	00	00	02	00
Ck10	-	25	50	04	01	05	01
	+	00	00	00	00	00	00
Ck14	-	00	00	00	00	00	00
	+	28	50	05	01	05	01
Ck16	-	07	23	02	00	03	01
	+	19	27	02	01	02	00
Ck18	-	24	42	03	00	05	01
	+	03	07	01	01	00	00
Ck19	-	00	03	00	00	00	00
	+	26	47	05	01	05	01

A expressão de vimentina foi analisada em 88 casos, dos quais 61 (69,3%) mostraram-se positivos apenas na porção estromal do tumor (Figura 19) e, 27 casos (30,6%) positivos para as células epiteliais neoplásicas, como ilustrado nas Figuras 20 e 21.

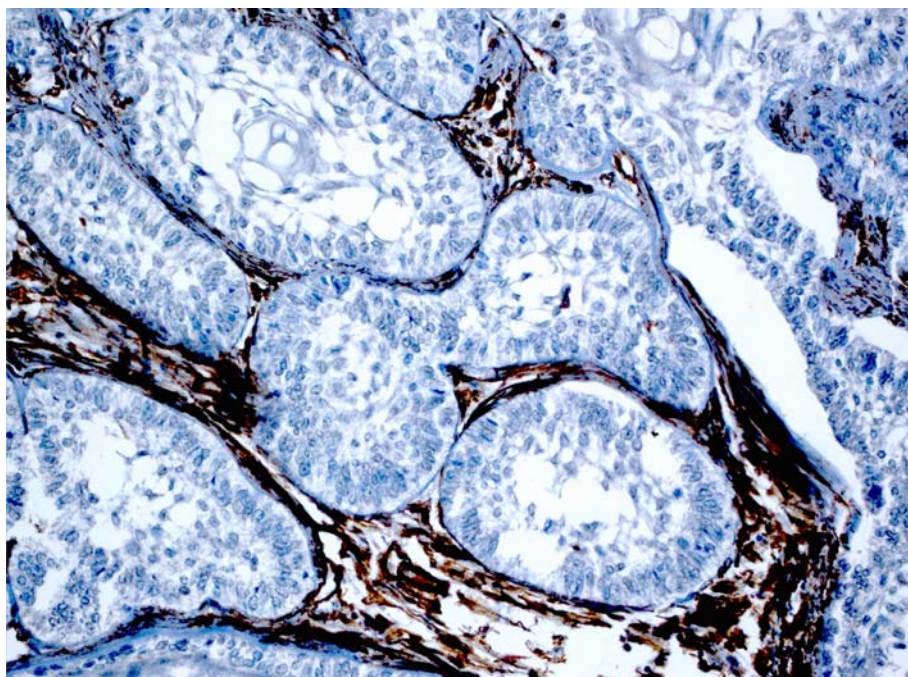


Figura 19 - Forte imunoreatividade para vimentina no estroma tumoral em Ameloblastoma folicular. Note que o epitélio odontogênico é negativo IQ, 20x.

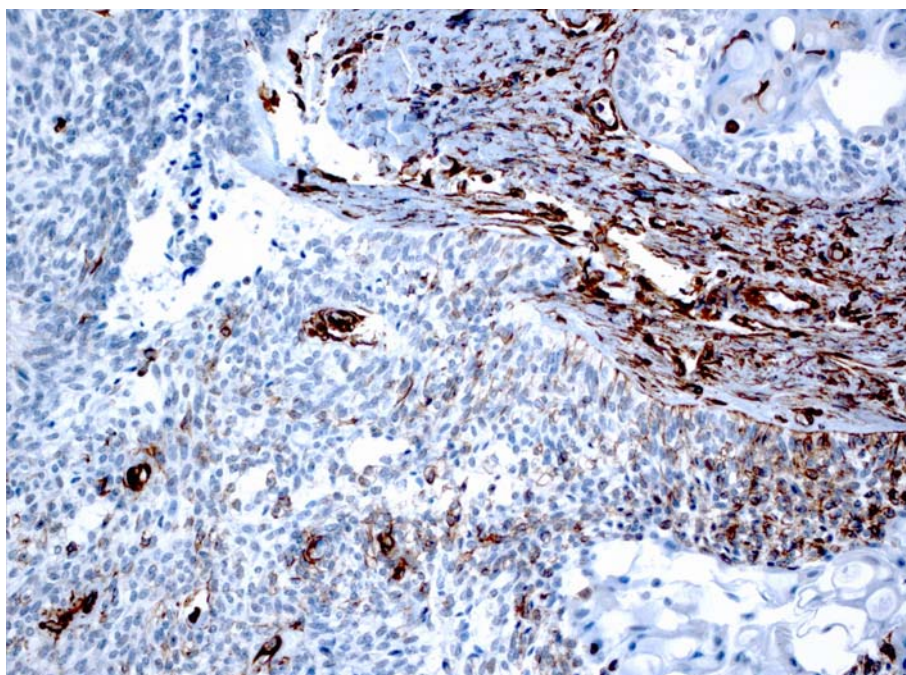


Figura 20 - Neste caso de Ameloblastoma plexiforme, tanto o componente tumoral epitelial quanto estromal foram positivos para vimentina (IQ, 20x).

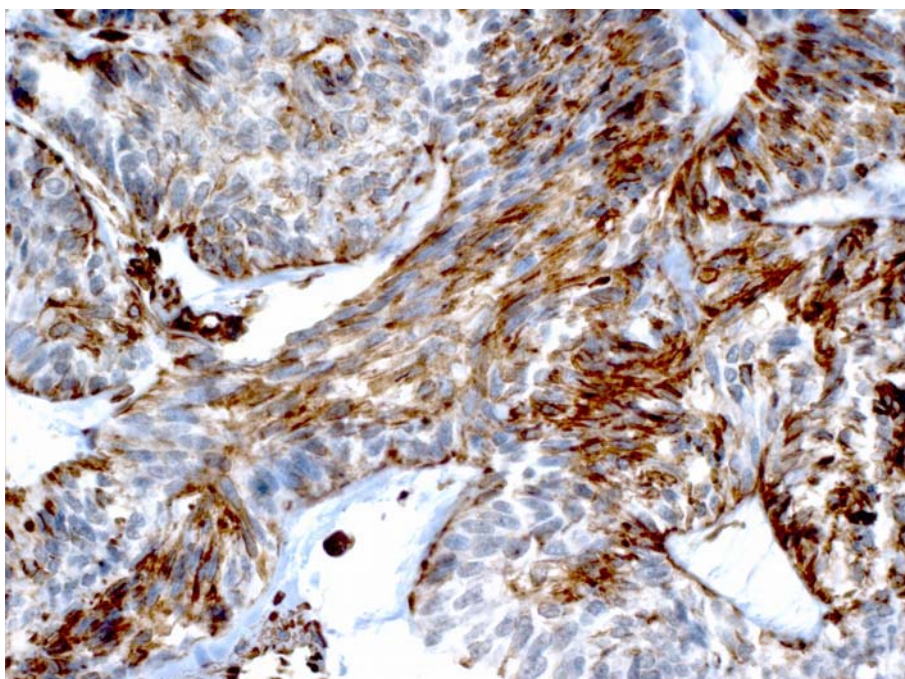


Figura 21 - Expressão com intensidade variável para vimentina no epitélio odontogênico em Ameloblastoma folicular (IQ, 20x).

Os testes exato de Fisher e quando aplicável o teste de Kruskal-Wallis, foram realizados para avaliar a associação entre as respostas das citoqueratinas com os parâmetros (padrão histológico, degenerações císticas, tempo de queixa, recidiva, idade, etnia, gênero, tipo de queixa, tamanho do tumor, tratamento prévio, tratamento realizado, padrão radiográfico e envolvimento de corticais). Destas, foi encontrado nível de significância (p valor) entre Ck6 e padrão radiográfico ($p=0,049$) e entre Ck8 e padrão histológico ($p=0,031$). Ou seja, a presença de citoqueratina 6 e 8 foi maior nos casos de padrão plexiforme em relação aos demais padrões já que a resposta ao padrão histopatológico foi dicotomizada nas categorias: “padrão plexiforme” e “outros”, na análise estatística.

4.6.2 Syndecan-1 (CD138), EGFR, PTHrP, Ki67 e p53

Para a avaliação dos marcadores Syndecan-1, EGFR e PTHrP os casos foram classificados como negativos, fraca positividade ou forte positividade. A tabela abaixo mostra a distribuição de frequências encontradas para estes marcadores.

Tabela 18 - Distribuição de frequências para Syndecan-1-1, EGFr e PTHrP.

Marcadores	Negativo n (%)	Fraca positividade n (%)	Forte positividade n (%)	Total casos n (%)
Syndecan-1	16 (18,2)	37 (42,1)	35 (39,8)	88 (100)
EGFR	19 (22,9)	39 (47,0)	25 (30,1)	83 (100)
PTHrP	-	28 (32,2)	59 (67,8)	87 (100)

Syndecan-1 mostrou padrão de marcação em membrana e/ou citoplasmática nas células epiteliais basais e nas células supra-basais semelhantes às do retículo estrelado. Dos 88 casos analisados, observamos que a grande maioria mostrou-se reativa (81,9%) sendo, 37 casos (42,1%) marcação pouco intensa e, principalmente nas células do supra-basais (Figura 22) e 39,8% mostraram intensa e homogênea positividade (Figura 23).

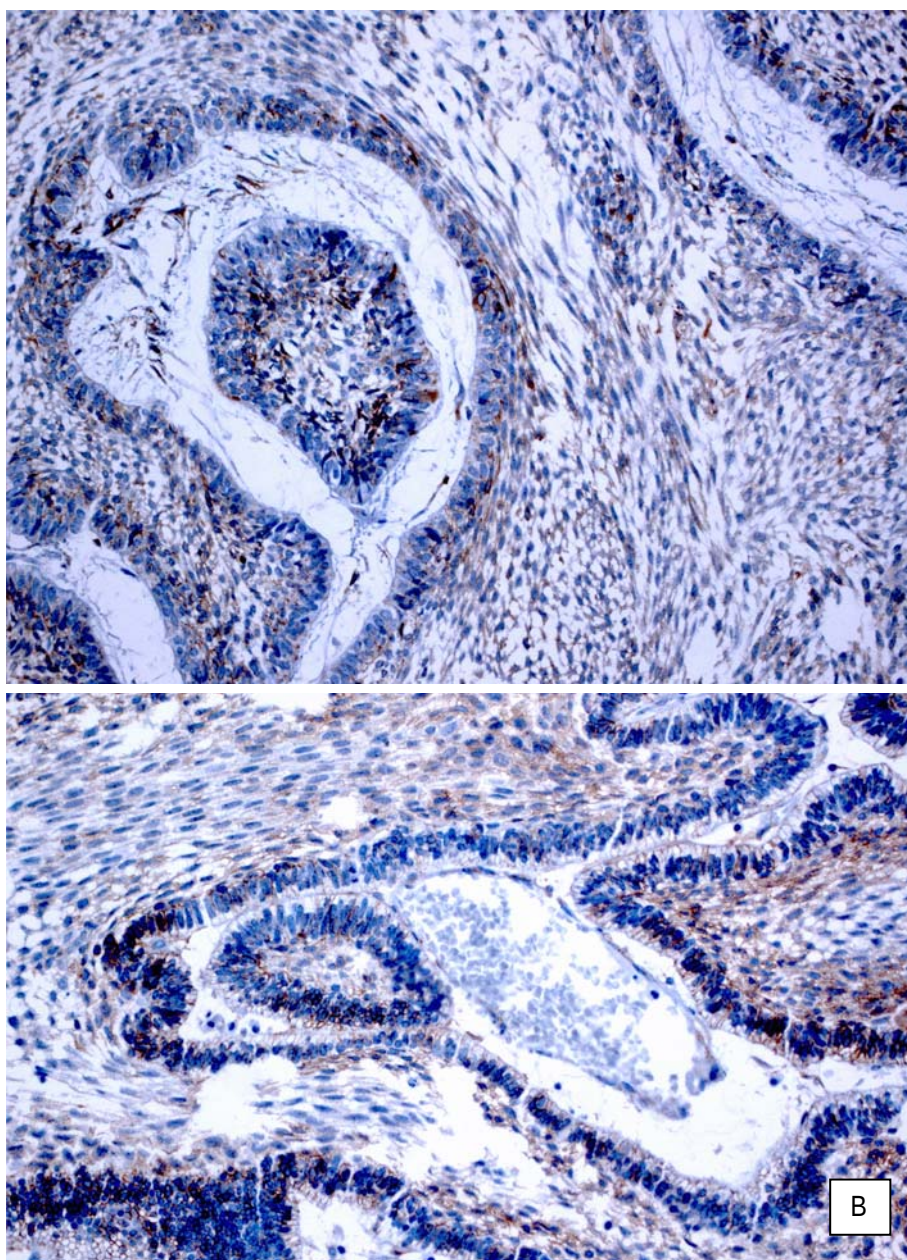


Figura 22 - Fraca reatividade para Syndecan-1 nas células que lembram o retículo estrelado do germe dentário em Ameloblastomas folicularesIQ, 20x).

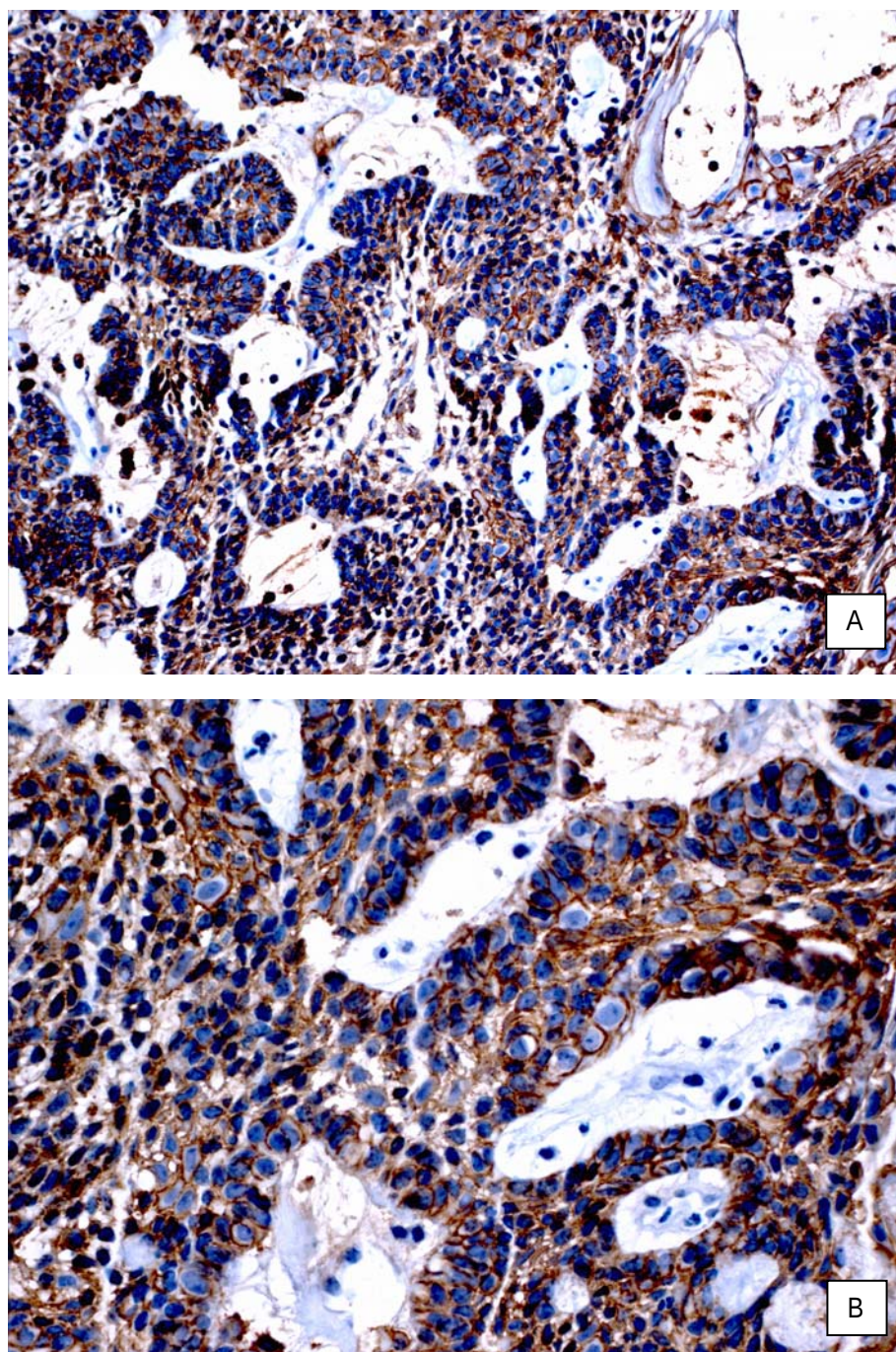


Figura 23 - Syndecan-1 exibindo forte marcação citoplasmática no epitélio odontogênico de Ameloblastoma plexiforme. (A: IQ, 20x; B: IQ, 40x).

Para o EGFR, notamos também que a maioria das amostras estudadas (77,1%) mostrou reatividade. Consideramos que 47% exibiram positividade citoplasmática fraca principalmente nas células supra-basais semelhantes às do retículo estrelado (Figura 24) e 25 casos (30,1%) intensa marcação citoplasmática e de membrana (Figura 25).

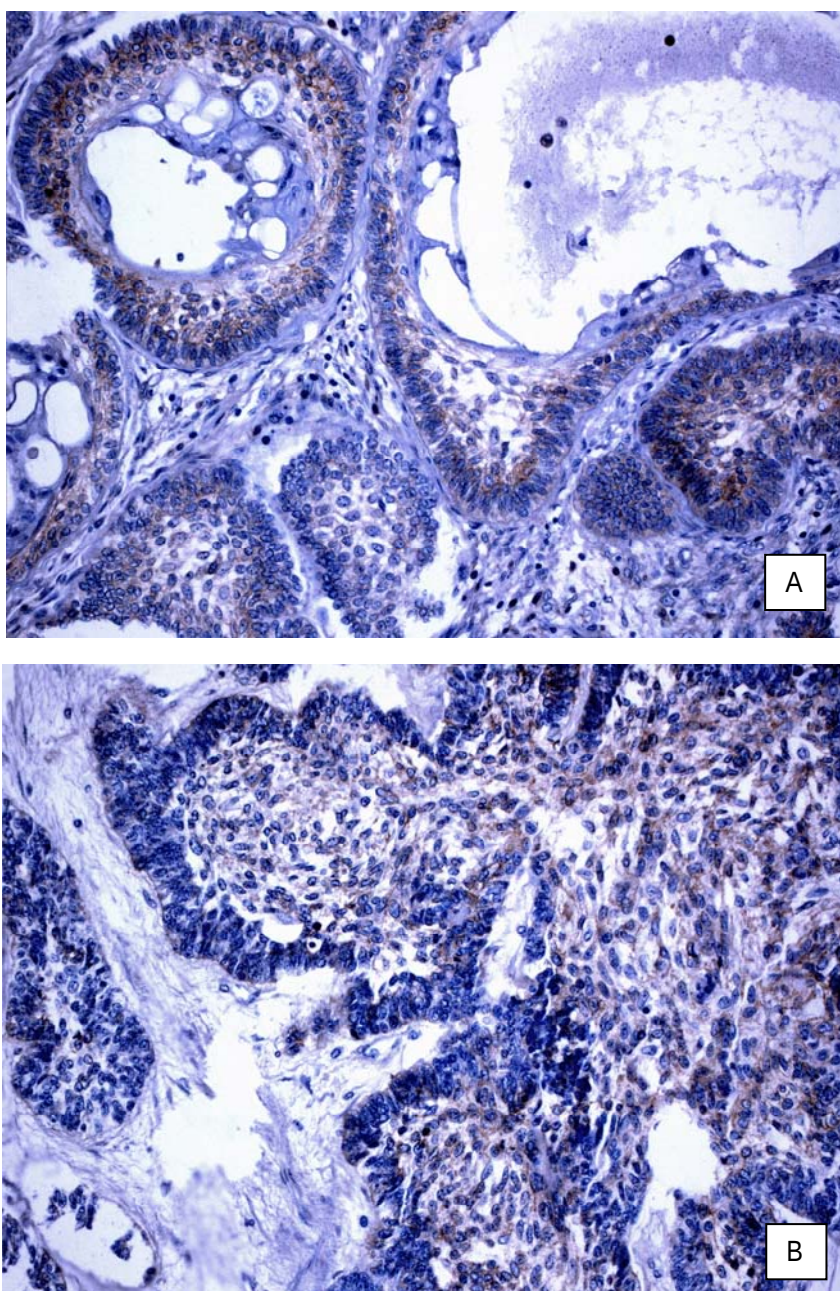


Figura 24 - Ninhos tumorais de Ameloblastoma folicular mostrando fraca reatividade para EGFR. (A: IQ, 20x; B: IQ, 40x).

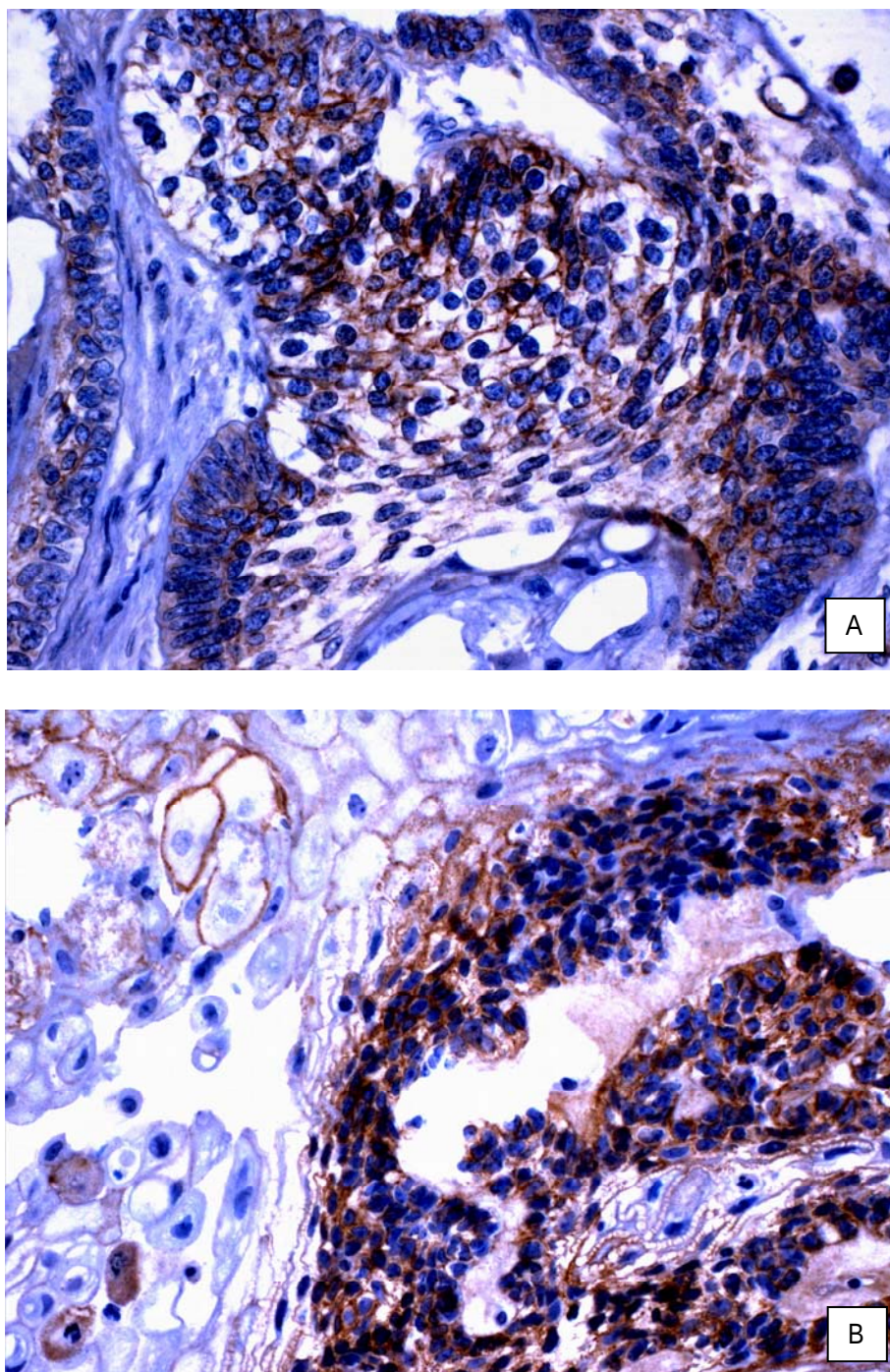


Figura 25 - Intensa imunomarcção para EGFR em Ameloblastoma plexiforme (A); assim como outro caso de ameloblastoma folicular (B) Neste último, note o padrão de marcação em membrana nas áreas acantomatosas. (A: IQ, 20x; B: IQ, 40x).

Todos os casos mostraram positividade para PTHrP. Em 28 casos (32,2%) consideramos a marcação fraca e em 59 casos (67,8%) a marcação foi intensa (Figura 26).

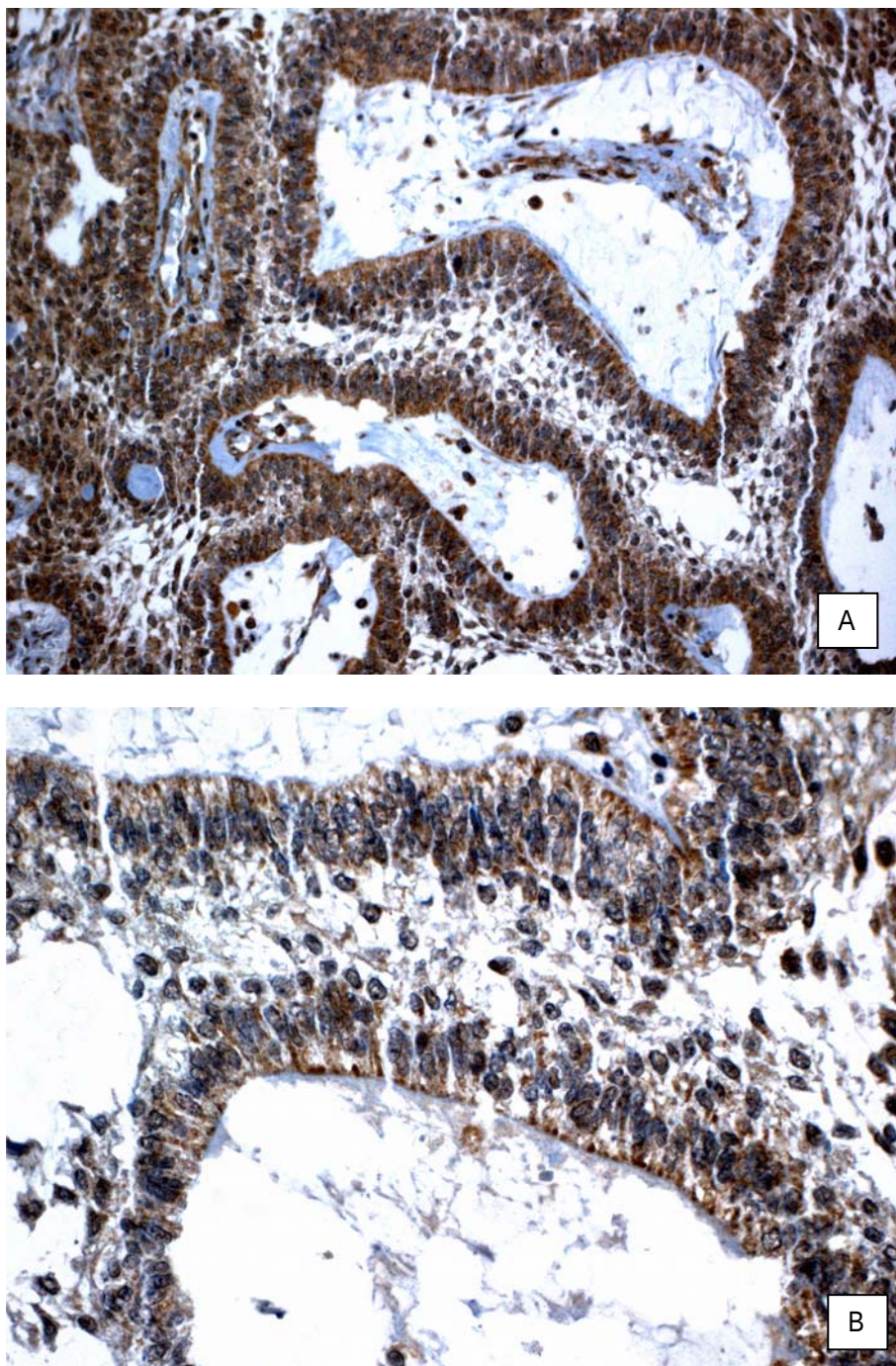


Figura 26 - Padrão plexiforme de Ameloblastoma mostrando forte marcação citoplasmática para PTHrP (A). Em maior aumento (B), detalhe da imunomarcação no epitélio tumoral para PTHrP (A: IQ, 20x; B: IQ, 40x).

A resposta dos marcadores Ki67 e p53 foi categorizada em “0-10%”, “11-25%”, “26-50%” e “51-100%”. Conforme descrito na seção Material e Métodos, consideramos a categoria “0-10%” como negativa.

Na avaliação para Ki67, houve pouca expressão já que a grande maioria das amostras apresentavam este marcador entre 0 e 25%. Somente 03 casos tinham entre 26 e 50% e nenhum com mais de 50%. As Figuras 27 e 28 ilustram as diferentes marcações para o Ki67.

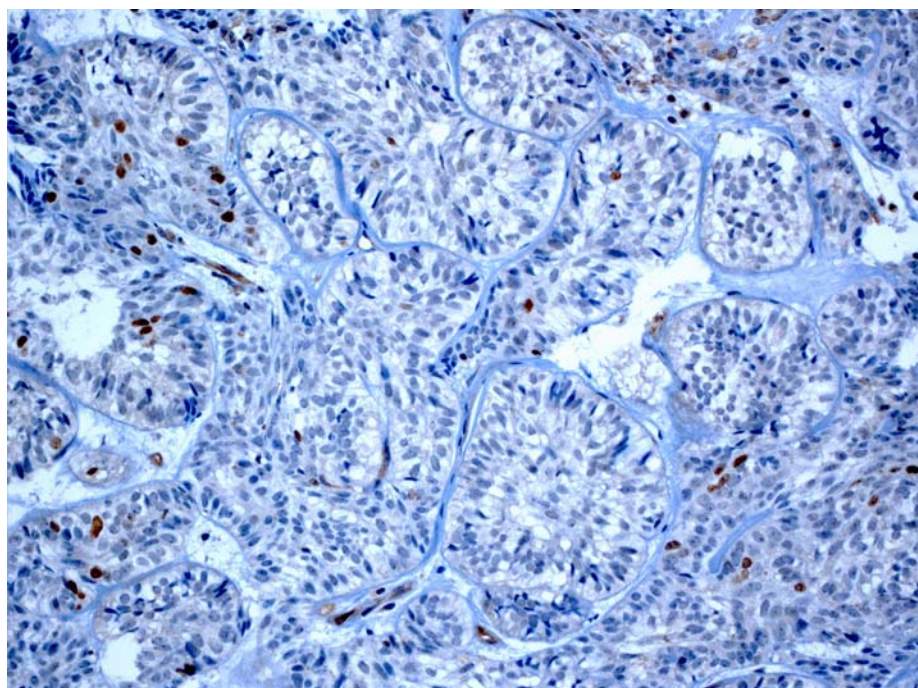


Figura 27 - Ninhos neoplásicos de Ameloblastoma folicular exibindo marcação fraca para Ki67(IQ, 20x).

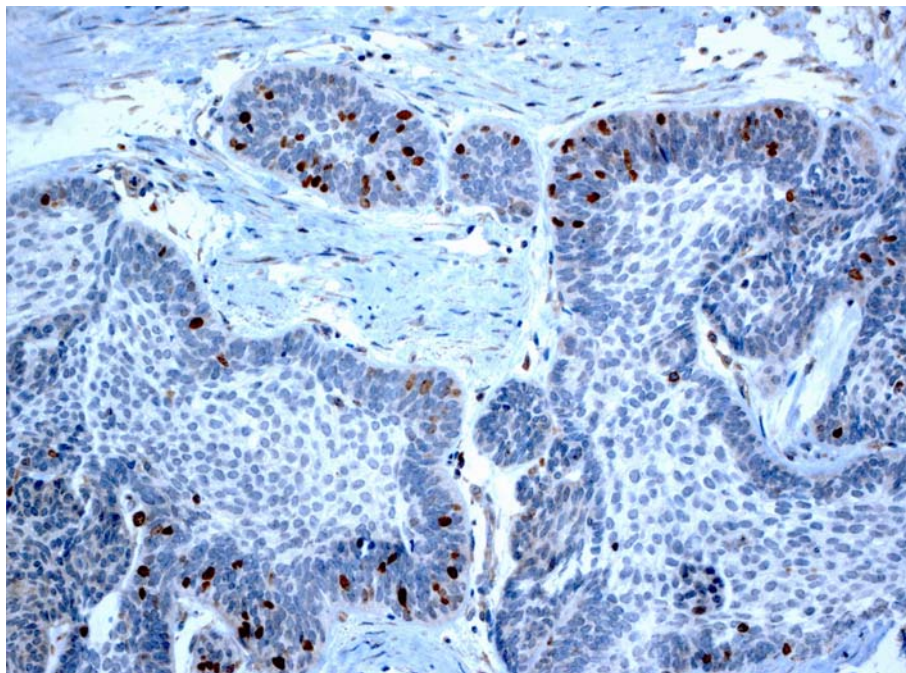


Figura 28 - Lençóis de epitélio odontogênico em Ameloblastoma plexiforme com expressão intermediária para Ki-67 referencialmente nas células na camada basal (IQ, 20x).

O marcador p53 apresentou positividade em 82,5% dos casos. Destes, 40,7% dos casos mostravam imunoreatividade entre 51-100% das células. As Figuras 29 e 30 ilustram as diferentes marcações para o p53.

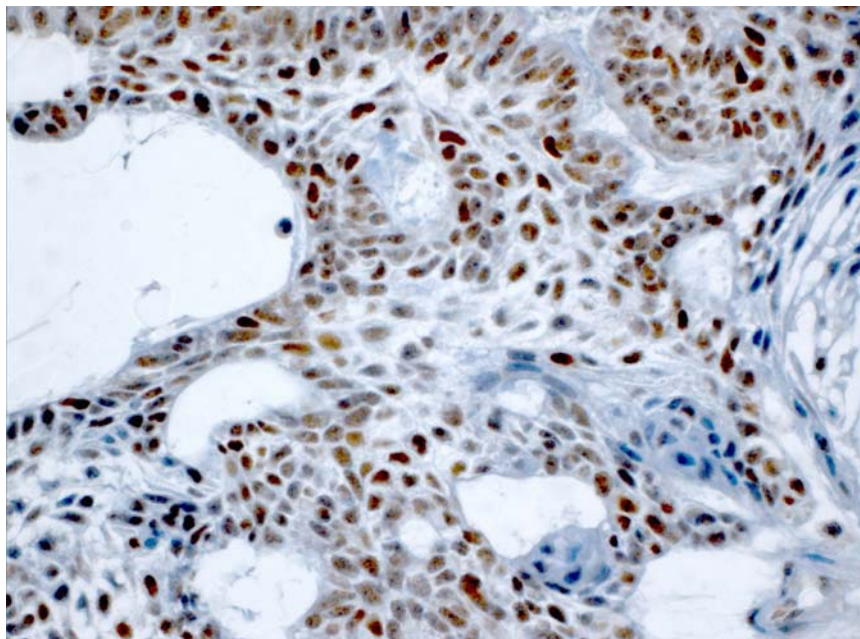


Figura 29 - Marcação nuclear homogênea e intensa para p53 nas camadas basal e suprabasal em Ameloblastoma plexiforme (IQ, 40x).

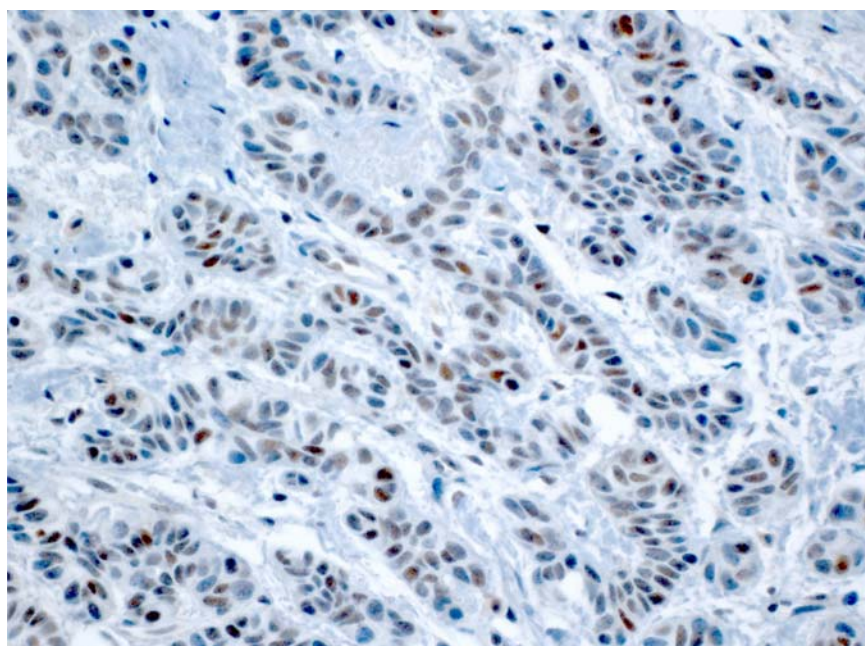


Figura 30 - Cordões tumorais de Ameloblastoma plexiforme expressando positividade intermédiaria para p53 (IQ, 40x).

A Tabela 19 mostra a distribuição de freqüências para Ki67 e p53.

Tabela 19 - Distribuição de freqüências para Ki67 e p53.

	0-10%	11-25%	26-50%	51-100%	Total casos
Marcador	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Ki67	44 (51,8)	38 (44,7)	3 (3,5)	-	85 (100)
p53	15 (17,4)	15 (17,4)	21 (24,4)	35 (40,7)	86 (100)

A resposta dos marcadores Ki67 e p53 havia sido categorizada em “0-10%”, “11-25%”, “26-50%” e “51-100%”. Para avaliar a associação entre esses dois marcadores, as 3 últimas categorias foram agrupadas para que o teste exato de Fisher pudesse ser aplicado. Dessa forma, as respostas aos marcadores ficaram dicotomizadas: “até 10%” e “mais de 10%”.

Os testes exato de Fisher e quando aplicável o teste de Kruskal-Wallis, foram realizados para avaliar a associação entre as respostas dos marcadores Syndecan-1, EGFR e PTHrP, Ki67 e p53 com os parâmetros (padrão histológico, degenerações císticas, tempo de queixa, recidiva, idade, etnia, gênero, tipo de queixa, tamanho do tumor, tratamento prévio, tratamento realizado, padrão radiográfico e envolvimento de corticais). Destas foi encontrado nível de significância (p =valor) entre Syndecan-1 e tempo de queixa ($p=0,041$) e entre PTHrP e idade ($p=0,043$).

O tempo de queixa para os casos positivos para Syndecan-1 foi menor que nos casos onde o marcador era negativo (Tabela 20) e a idade

dos pacientes que apresentaram positividade forte do marcador PTHrP foi maior do que entre os pacientes com positividade fraca (Tabela 21).

Tabela 20 - Estatísticas resumo do tempo de queixa (em meses), para casos com Syndecan + e Syndecan -.

Marcador	N	média	d.p.	mínimo	mediana	máximo
Syndecan +	67	42,0	64,6	1	12	240
Syndecan -	16	54,4	55,8	5	30	192

Tabela 21 - Estatísticas resumo da idade dos pacientes (em anos), para casos com presença fraca e forte do marcador PTHRP.

Marcador	N	média	d.p.	mínimo	mediana	máximo
PTHRP fraco	28	27,7	12,8	6	26	67
PTHRP forte	59	36,2	17,8	9	32	82

5 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos têm mostrado consideráveis diferenças na incidência dos tumores odontogênicos, particularmente quando estudos africanos e asiáticos são comparados com estudos norte-americanos (WU e CHAN 1985; REGEZI et al. 1978; DALEY et al. 1994; ODUKOYA et al. 1995; AROTIBA et al. 1997; MOSQUEDA-TAYLOR et al. 1997; LU et al. 1998). Estas variações na incidência são justificadas por fatores geográficos, étnicos e sócio-econômicos ou pelo local onde os dados foram coletados. É fato que estudos realizados em Hospitais ou Centros Médicos exibem uma predominância de Ameloblastomas, enquanto que estudos realizados em Faculdades de Odontologia ou Centros Odontológicos apresentam uma prevalência pelos Odontomas (FREGNANI et al. 2002). No presente estudo, os Ameloblastomas corresponderam a 67% de todos os tumores odontogênicos, o que confirma o anteriormente mencionado. De forma geral, excluindo-se os Odontomas, os Ameloblastomas são considerados os tumores odontogênicos mais comuns e importantes controvérsias clínicas e biológicas ainda persistem em relação a estes tumores. Na literatura, nota-se atualmente um número crescente de trabalhos considerando os aspectos clinico-patológicos dos Ameloblastomas, inclusive na América Latina (OCHSENIUS et al. 2002; FREGNANI et al. 2003a; LEDESMA-MONTES et al. 2007).

Nossa série de 121 casos mostrou média de idade de 33,2 anos, o que está de acordo com a meta-análise realizada por REICHART et al. em 1995 e também com o recente estudo multicêntrico realizado na América Latina por LEDESMA-MONTES et al. (2007). A maioria dos estudos mostra incidência similar entre os gêneros, com pequenas variações entre os estudos (REICHART et al. 1995; LU et al. 1998; LEDESMA-MONTES et al. 2007). Nossos resultados mostram um discreto número maior de casos acometendo mulheres (52,9%).

Na literatura está bem estabelecido também que a região posterior de mandíbula é o local de maior incidência tanto para os Ameloblastomas sólidos quanto unicísticos, assim como observado no presente estudo (REICHART e PHILIPSEN 2004; BARNES et al. 2005).

Nossa casuística mostra que os Ameloblastomas sólidos foram os mais comuns (93,4%) e apenas sete casos (5,8%) foram considerados unicísticos. Este resultado está de acordo com a maioria dos estudos (REICHART et al. 1995). Entretanto, LEDESMA-MONTES et al. em 2007 mostrou que 63,2% dos casos da sua casuística eram Ameloblastomas unicísticos. Esta é uma observação interessante e nós acreditamos que critérios mais uniformes para o diagnóstico do Ameloblastoma unicístico sejam necessários. Apesar de a nossa série apresentar apenas 07 casos considerados unicísticos, a idade media destes tumores foi superior a encontrada em outros estudos (PHILIPSEN e REICHART 1998).

As características radiográficas parecem ter um papel importante para o prognóstico dos Ameloblastomas (MULER e SLOOTWEG 1985;

D'AGOSTINO et al. 2001; CHAPELLE et al. 2004; SACHS 2006). Os nossos casos de Ameloblastomas sólidos com imagem radiográfica multilocular apresentaram aumento estatisticamente significativo na incidência de recidivas. Além disso, a presença de cortical basilar mandibular perfurada ou rompida indica um risco maior para recorrência quando comparados aos casos que exibem corticais preservadas ou expandidas.

A maioria dos estudos para Ameloblastomas sólidos mostra que subtipo histológico não tem relevância para a ocorrência de recidivas. Entretanto de acordo com os nossos resultados e com os de HONG et al. (2007), considerando-se os dois subtipos histológicos mais freqüentes, ou seja, plexiforme e folicular, o último apresentou um número estatisticamente significativo maior de recidivas.

Recentemente, inúmeros estudos considerando critérios e protocolos para o tratamento de Ameloblastomas sólidos foram publicados, mas o assunto ainda é controverso. Recentes avanços na compreensão do comportamento biológico deste tumor forneceram novos protocolos de tratamento (CHAPELLE et al. 2004; VAYVADA et al. 2006; SACHS 2006; SAMMARTINO et al. 2007).

A crioterapia é uma forma de tratamento adjuvante que pode ser utilizada em lesões benignas intra-ósseas, incluindo os Ameloblastomas objetivando eliminar células tumorais residuais dentro do trabeculado ósseo, por congelamento. Apesar da crioterapia não ser muito utilizada nos Ameloblastomas, ela pode ser útil quando um tratamento conservador é realizado. Já foi avaliado que utilizando-se da crioterapia como forma

adjuvante, os casos recidivantes tendem a ser pequenos e limitados, facilitando posteriormente a remoção completa da lesão (CURI et al. 1997). O trabalho de CURI et al. (1997) também realizado no Hospital A.C. Camargo mostra índice de 30,6% de recidiva após tratamento com curetagem seguido por crioterapia. O presente estudo reflete os dados atualizados até 2003 e mostrou índice de 29,8%.

CARLSON e MARX em 2006 realizaram uma extensa revisão da literatura e concluíram que o tratamento radical continua sendo a única forma de tratamento com resultados previsíveis. As taxas de recorrência para os Ameloblastomas sólidos variam entre 15% e 25% após tratamentos radicais, como foi encontrado no presente estudo.

Entretanto, os nossos casos tratados por curetagem apresentaram uma taxa de recidiva similar (15,8%), mas muito diferente dos achados da maioria dos estudos, onde elas ficam entre 35-80% (SEHDEV et al. 1974; GARDNER e PECAK 1980; JACKSON et al. 1996; CURI et al. 1997; NAKAMURA et al. 2002; GHANDHI et al. 2006; SAMMARTINO et al. 2007). Isto pode ser explicado pelo fato de que os casos tratados somente por curetagem eram relativamente pequenos (média de 4cm), o que é um indicador de bom prognóstico como mostrado anteriormente.

Apesar de controverso, os Ameloblastomas unicísticos que exibem infiltração mural merecem tratamento similar ao dos Ameloblastomas sólidos. LAU e SAMMAN (2006) realizaram uma revisão sistemática sobre tratamento de Ameloblastomas unicísticos e mostraram que os menores índices de recidivas (3,6%) ocorreram naqueles casos tratados por

resseccção segmentar, seguido por enucleação com aplicação da solução de Carnoy (16%) e somente curetagem (30,5%). No nosso estudo, 02 dos sete casos de Ameloblastomas unicísticos apresentaram recidivas (28,6%), ambos apresentavam infiltração mural e 01 caso havia sido tratado por curetagem seguido por crioterapia e o outro apenas por curetagem.

Alguns estudos descreveram a expressão das citoqueratinas no componente epitelial de tumores odontogênicos. Os estudos indicaram que o epitélio odontogênico do Ameloblastoma reagem com a Ck5, 8 (HEIKINHEIMO et al. 1989, VIGNESWARAN et al. 1993) 13, 14 e 19 (HEIKINHEIMO et al. 1989; VIGNESWARAN et al. 1993; ONG'UTI et al. 1999, CRIVELINI et al. 2003).

Em nosso trabalho, analisamos um amplo painel de citoqueratinas no intuito de determinar o perfil e histogênese dos Ameloblastomas. O componente epitelial foi intensamente positivo para as citoqueratinas AE1/AE3, 34 β 12, 14 e 19. A intensa expressão de Cks 14 e 19 sugere que o componente epitelial dos ameloblastomas neoplásicos resguardem características de células basais com potencial proliferativo (ONG'UTI et al. 1999).

Alem disso, 100% dos casos de Ck 1 e Ck 10 e 98,9% dos casos de Ck7 não apresentaram reatividade, o que está de acordo com o resultado de ONG'UTI et al. (1999). Sabe-se que Ck1 e Ck10 mostram expressão preferencial por epitélio estratificado e nestes, em zonas supra-basais (MOLL et al. 1982). Segundo alguns estudos, as Cks 10 podem estar expressas em Ameloblastomas em áreas de células metaplásicas

queratinizantes e células escamosas, respectivamente (HEIKINHEIMO et al. 1989; VIGNESWARAN et al. 1993).

Não foram encontrados estudos avaliando a expressão de Ck4 em Ameloblastomas, porém podemos comparar nossos achados com a expressão de Ck13, tendo em vista que estas geralmente são expressas de maneira conjunta (MOLL et al. 1982). Os trabalhos já publicados analisando Ck13 em Ameloblastomas mostram expressão nas células semelhantes ao retículo estrelado (HEIKINHEIMO et al. 1989; CRIVELINI et al. 2003), como encontrado em 58,5% dos nossos casos positivos para Ck4. Além disso, as Cks 4 e 13 estão normalmente expressas nas porções supra-basais dos epitélios estratificados (MOLL et al. 1981) e não é raro sua expressão em Ameloblastomas em áreas de diferenciação escamosa, conforme encontramos em 30% das nossas amostras.

Grande parte dos nossos casos mostraram positividade para as Cks 6 e 16 (87,2% e 58,6%, respectivamente) e esta positividade ocorria especialmente em áreas escamosas. Os mesmos resultados foram encontrados por ONG'UTI et al. (1999). Nosso estudo demonstra alta expressão das CK6 e CK16, quando comparados a expressão esporádica nos 39 casos de Tumor Odontogênico Adenomatóide avaliados por LEON et al. (2005). A expressão da CK6 e CK16, normalmente expressas em epitélios proliferativos, poderia se correlacionar com a natureza biológica ativa destes tumores, os quais clinicamente são localmente agressivos. Porém, futuros estudos a esse respeito tornam-se necessários.

Nossos resultados também mostraram positividade para as Ck 8 (66,7%) e numa minoria dos casos (13,8%) para Ck 18. Para ambas as citoqueratinas, a marcação foi fraca e principalmente em áreas com diferenciação escamosa, como descrito por ONG'UTI et al. (1999). FUKUMASHI et al. (2002) estudando as citoqueratinas em Ameloblastomas também mostraram positividade da Ck 8.

FUKUMASHI et al. (2002) concluíram a partir de seu estudo que o padrão plexiforme seria provavelmente o tipo original de Ameloblastoma e os demais, tais como folicular, acantomatoso e de células granulares se desenvolveriam a partir da diferenciação das células dos padrões plexiformes em epitélio escamoso (FUKUMASHI et al. 2002).

A positividade para vimentina no componente epitelial não é um achado incomum nos tumores odontogênicos (TATEMOTO et al. 1988, LEON et al. 2005). Estes autores indicam positividade em elementos epiteliais específicos. Em nossa casuística, 30,6% dos casos mostravam áreas epiteliais exibindo marcação heterogênea e com expressão variável para esta proteína, indicando a provável existência de uma variabilidade fenotípica em certas áreas deste tumor.

Alguns estudos mostraram que a perda de expressão de Syndecan-1 em neoplasias epiteliais está associado a invasão local, metástase e pior prognóstico (KUMAMOTO e OOYA 2004; NISHIHARA et al. 2007). LEOCATA et al. (2007) mostraram que Syndecan-1 está presente nos Ameloblastomas, e também é sabido que está expresso em células epiteliais e durante a odontogênese (WEINSTEIN et al. 1976; LIOTTA et al. 1986). A

invasão celular exige alterações na membrana basal e na matriz extracelular, seguida por crescimento e proliferação celular. Assim, a diminuição da adesão intercelular e alterações na membrana basal influenciam o crescimento de tumores malignos (WEINSTEIN et al. 1976; LIOTTA et al. 1986). De acordo com LEOCATA et al. (2007), a expressão de Syndecan-1 nos Ameloblastomas está diminuída em relação às células normais de germens dentários. BOLOGNA-MOLINA et al. (2008) mostraram expressão de Syndecan-1 em 50% dos seus casos de Ameloblastomas sólidos, porém não obteve diferença significativa entre casos recidivantes e não-recidivantes. Nossa casuística mostrou que 18,2% dos casos não mostravam marcação de Syndecan-1 e, 42,1% tinham positividade diminuída ou fraca. Quando correlacionamos esse resultado com os parâmetros clínicos, radiográficos e histológicos, vemos que houve apenas associação estatística com o tempo de queixa da doença. O tempo de queixa para os casos com positividade para Syndecan-1 foi menor do que os casos negativos. Assim, podemos inferir que a perda desta proteína é gradativa e tempo-dependente.

Alguns pesquisadores já investigaram a presença de EGFR nos Ameloblastomas (LI et al. 1993; UENO et al. 1994; VERED et al. 2003; PAYERAS et al. 2007) e, assim como o presente trabalho, concluíram que EGFR é expresso na maioria dos casos. VERED et al. (2003) demonstrou não haver diferenças na marcação entre os tipos histológicos, resultado também obtido em nosso estudo. VERED et al. (2003) ainda ressalta que a expressão de EGFR foi estatisticamente maior nas células semelhantes às do retículo estrelado quando comparadas às células periféricas colunares.

Já PAYERAS et al. (2007) mostraram que a marcação de membrana ocorria em áreas onde os ninhos de células tumorais são menores e supostamente mais proliferativos. LI et al. (1993) compararam a expressão de EGFR entre Ameloblastomas e Cistos odontogênicos e não encontraram diferenças de marcação. VERED et al. (2003) ainda concluem que já que os Ameloblastomas são positivos para EGFR, agentes anti-EGFR deveriam ser considerados para reduzir o tamanho de tumores extensos e tratar tumores próximos de estruturas vitais. Apesar de não termos obtidos nenhum valor estatisticamente significativo, o presente estudo parece-nos ser o primeiro a buscar correlações da expressão de EGFR com parâmetros clínicos e radiográficos.

Hipercalcemia é uma das maiores complicações metabólicas que tumores malignos causam e o PTHrP parece ter íntima associação, aumentando a atividade osteoclástica dos ossos (KUMAMOTO e OOYA 2004; KUMAMOTO 2006). Assim como nos estudos de OHTSURO et al. (2005), ABDELSAYED et al. (2004), KUMAMOTO E OOYA (2004) e KUMAMOTO (2006), nossos resultados mostraram que 100% dos casos foram positivos para PTHrP. Sabemos que a marcação de PTHrP ocorre exclusivamente no citoplasma, porém em alguns de nossos casos notamos uma simulação de marcação de membrana, provavelmente devido à distribuição e localização citoplasmática da proteína. KUMAMOTO (2006) mostrou que sua expressão é mais forte nas células periféricas colunares que nas células poliédricas centrais. Como a expressão de PTHrP vem sendo associada à regulação do metabolismo ósseo local (KUMAMOTO e

OOYA 2004; KUMAMOTO 2006) e ao caráter infiltrativo dos Ameloblastomas (OHTSURO et al. 2005). ABDELSAYED et al. (2004) sugerem o desenvolvimento de alvos terapêuticos que bloqueiem a expressão da PTHrP.

Nossa casuística mostrou que mais de 50% dos casos foram negativos para o marcador de proliferação celular ki67. A correlação com os parâmetros clínicos, radiográficos e histológicos mostrou que a positividade para ki67 associou-se com tumores com aspecto radiográfico multilocular. Tendo em vista nossos resultados já anteriormente mencionados, os quais mostraram a correlação entre Ameloblastomas multiloculares e recidivas, podemos inferir que expressão positiva de ki67 indiretamente relacionou-se com os casos de pior prognóstico. ONG'UTI et al. (1999) mostrou na sua casuística de 54 casos que os Ameloblastomas foliculares exibiram um índice de proliferação celular superior aos casos de Ameloblastomas plexiformes. BOLOGNA-MOLINA et al. (2008) também encontraram um baixo índice de ki67 em seu estudo e não demonstraram diferença entre os casos recidivantes e não-recidivantes. MIGALDI et al. (2008) recentemente relacionaram altos índices de ki67 com menos tempo de sobrevida livre de doença.

Expressão imunoistoquímica aumentada para p53 já foi detectada em Ameloblastomas (SLOOTWEG 1995; BARBOZA et al. 2005; KUMAMOTO 2004), porém vários estudos também mostraram que mutações do p53 são incomuns nestes tumores (CARVALHAIS et al. 1999; SHIBATA et al. 2002; APPEL et al. 2004). O estudo de SLOOTWEG (1995) mostrou não haver

associação entre p53 e ki67. Assim como o nosso estudo, BARBOZA et al. (2005) não encontraram associação entre a expressão de p53 com os tipos histológicos e comportamento clínico dos Ameloblastomas. KUMAMOTO (2004) mostrou que 45% dos seus casos de Ameloblastoma foram positivos para p53 e que os casos plexiformes mostraram expressão significativamente aumentada em relação aos casos foliculares. A nossa casuística mostrou que 40% dos casos continham intensa marcação e 41,8% apresentavam marcação fraca ou intermediária para p53, e o que está bastante acima dos outros estudos. Porém, não conseguimos associar a expressão de p53 com parâmetros clínicos, radiográficos ou histológicos. Como vimos, a expressão de p53 ainda é controversa, porém os nossos resultados sugerem que esta proteína esteja associada à fatores de diferenciação celular nos Ameloblastomas.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

1. O ameloblastoma é uma neoplasia odontogênica benigna que mostra distribuição semelhante entre homens e mulheres, predominantemente na 4ª e 5ª décadas de vida e na região posterior de mandíbula. O ameloblastoma na grande maioria dos casos é do tipo sólido e, usualmente, provoca aumento de volume.
2. Radiograficamente, os ameloblastomas sólidos em sua maioria exibem o padrão multilocular e estes apresentaram aumento estatisticamente significativo na incidência de recidivas em relação aos ameloblastomas uniloculares. Além disso, a presença de cortical basilar mandibular perfurada ou rompida indica um risco 6,5 vezes maior para recorrência quando comparados aos casos que exibem corticais preservadas ou expandidas.
3. Os subtipos histológicos plexiforme e folicular são os mais freqüentes, sendo o último relacionado com maior possibilidade de recidivas.
4. O componente epitelial dos ameloblastomas foi intensamente positivo para as citoqueratinas AE1/AE3, 34 β 12, 14 e 19 e negativos para citoqueratinas 1, 10 e 7; perfil que confirma sua origem odontogênica.
5. O tempo de queixa para os casos com positividade para Syndecan-1 foi estatisticamente menor do que os casos negativos. Assim, a perda desta proteína é gradativa e tempo-dependente.

6. Os ameloblastomas mostram imunopositividade para EGFR e PTHrP, marcadores que desempenham papel importante no desenvolvimento e progressão dos ameloblastomas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelsayed RA, Vartanian RK, Smith KK, Ibrahim NA. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) expression in ameloblastoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2004; 97:208-19.

Ackermann GL, Altini M, Shear M. The unicystic ameloblastoma: a clinicopathological study of 57 cases. **J Oral Pathol** 1988; 17:541-6.

Alves FA, Pires FR, Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumors. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2004; 33:593-7.

Amizuka N, Davidson D, Liu H, et al. Signaling by fibroblast growing factor receptor 3 and parathyroid hormone-related peptide coordinate cartilage and bone development. **Bone** 2004; 34:13-25.

Appel T, Gath R, Wernert N, Martini M, Berge S. Molecular biological and immunohistochemical anlysis of tp53 in human ameloblastomas. **Mund Kiefer Gesichtschir** 2004; 8:167-72.

Arotiba JT, Ogunbiyi JO, Obiechina AE. Odontogenic tumours: a 15-year review from Ibadan, Nigeria. **Br J Oral Maxillofac Surg** 1997; 35:363-7.

Barboza CA, Pereira Pinto L, Freitas Rde A, Costa Ade L, Souza LB. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 protein expression in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. **Braz Dent J** 2005; 16:56-61.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. **Pathology e genetics of the head and neck tumors**. Lyon: International Agency for Research on Cancer IARC Press; 2005. Odontogenic tumors; p.283-327.

Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. **Oral Oncol** 2008 Jan 18; [Epub ahead of print].

Brown Dc, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology** 2002; 40:2-11.

Carlson ER, Marx RE. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. **J Oral Maxillofac Surg** 2006; 64:484-94.

Carvalhais J, Aguiar M, Araujo V, Araujo N, Gomez R. P53 and MDM2 expression in odontogenic cysts and tumors. **Oral Dis** 1999; 5:218-22.

Chapelle KA, Stoelinga PJ, de Wilde PC, Brouns JJ, Voorsmit RA. Rational approach to diagnosis and treatment of ameloblastomas and odontogenic keratocysts. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2004; 42:381-90.

Chidzonga MM, Lopez-Perez VM, Portilla- Alvarez AL. Ameloblastoma: The Zimbabwean experience over 10 years. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1996; 82:38-41.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. **Histopathology** 2002; 40:403-39.

Cox DR. Regression models and life-tables. **J R Stat Soc** 1972; 34:187-220.

Crivelini MM, de Araujo VC, de Sousa SO, de Araujo NS. Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms. **Oral Dis** 2003; 9:1-6.

Curi MM, Dib LL, Pinto DS. Management of solid ameloblastoma of the jaws with liquid nitrogen spray cryosurgery. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod** 1997; 84:339-44.

D'Agostino A, Fior A, Pacino GA, Bedogni A, De Santis D, Nocini PF. Retrospective evaluation on the surgical treatment of jaw bones ameloblastic lesions. **Minerva Stomatol** 2001; 50:1-7.

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; 77:276-80.

Dunne FP, Bowden SJ, Brown JS, Ratcliffe WA, Browne RM. Parathyroid hormone related protein in oral squamous cell carcinomas invading the mandible. **J Clin Pathol** 1995; 48:300-3.

Eversole LR, Leider AS, Hansen LS. Ameloblastomas with pronounced desmoplasia. **J Oral Maxillofac Surg** 1984; 42:735-40.

Fernandes AM, Duarte ECB, Pimenta FJGS, et al. Odontogenic tumors: a study of 340 cases in a Brazilian population. **J Oral Pathol Med** 2005; 34:583-7.

Fregnani ER, Fillipi RZ, Oliveira CR de, Vargas PA, Almeida OP. Odontomas and ameloblastomas: variable prevalences around the world? **Oral Oncol** 2002; 38:807-8.

Fregnani ER, Faria PR, Rangel ALCA, Almeida OP, Vargas PA. Tumores odontogênicos: análise de 113 casos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP. **RPG** 2003a; 10:355-9.

Fregnani ER, Pires FR, Quezada RD, Shih leM, Vargas PA, de Almeida OP. Calcifying odontogenic cyst: clinicopathological features and immunohistochemical profile of 10 cases. **J Oral Pathol Med** 2003b; 32:163-70.

Fregnani ER, da Cruz Perez DE, Soares FA, Alves FA. Synchronous ameloblastoma and orthokeratinized odontogenic cyst of the mandible. **J Oral Pathol Med** 2006; 35:573-5.

Fukumashi K, Enokiya Y, Inoue T. Cytokeratins expression of constituting cells in ameloblastoma. **Bull Tokyo Dent Coll** 2002; 43:13-21.

Gardner DG. Peripheral ameloblastoma: a study of 21 cases, including 5 reported as basal cell carcinoma of the gingiva. **Cancer** 1977; 39:1625-33.

Gardner DG, Pecak AMJ. The treatment of ameloblastoma based on pathologic and anatomic principles. **Cancer** 1980; 46:2514-9.

Gardner DG. A pathologist's approach to the treatment of ameloblastoma. **J Oral Maxillofac Surg** 1984; 42:161-6.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol** 1984; 133:1710-5.

Ghandhi D, Ayoub AF, Pogrel MA, MacDonald G, Brocklebank LM, Moos KF. ameloblastoma: a surgeon's dilemma. **J Oral Maxillofac Surg** 2006; 64:1010-4.

Guerrisi M, Piloni MJ, Keszler A. Odontogenic tumors in children and adolescents: a 15-year retrospective study in Argentina. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2007; 12:180-5.

Hansson A, Bloor BK, Haig Y, Morgan PR, Ekstrand J, Graftsom RC. Expression of keratins in normal, immortalized and malignant oral epithelia in organotypic culture. **Oral Oncol** 2001; 37:419-30.

Heikinheimo K, Hormia M, Stenman G, Virtanen I, Happonen RP. Patterns of expression of intermediate filaments in ameloblastoma and human fetal tooth germ. **J Oral Pathol Med** 1989; 18:264-73.

Hong J, Yun PY, Chung IH, et al. Long-term follow up on recurrence of 305 ameloblastoma cases. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2007; 36:283-8.

Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. **Lab Invest** 2001; 81:1331-8.

Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, et al. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. **Mod Pathol** 2002; 15:1374-80.

Iordanidis S, Makos C, Dimitrakopoulos J, Kariki H. Ameloblastoma of the maxilla: case report. **Aust Dent J** 1999; 44:51-5.

Jackson IT, Callan PP, Forte RA. An anatomical classification of maxillary ameloblastoma as an aid to surgical treatment. **J Craniomaxillofac Surg** 1996; 24:230-6.

Kiviniemi J, Kallajoki M, Kujala I, et al. Altered expression of syndecan-1 in prostate cancer. **APMIS** 2004; 112:89-97.

Kramer IRH, Pindborg JI, Shear M. **World Health Organization: Histological Typing of Odontogenic Tumors**. 2nd ed. Berlin: Springer Verlag; 1992.

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; 33:292-9.

Kumamoto H, Ooya K. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med** 2004; 33:46-52.

Kumamoto H. Molecular pathology of odontogenic tumors. **J Oral Pathol Med** 2006; 35:65-74.

Oral Radiol Endod 2005; 99:191-5.

Lau SL, Samman N. Recurrence related to treatment modalities of unicystic ameloblastoma: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2006; 35:681-90.

Ledesma-Montes C, Mosqueda-Taylor A, Carlos-Bregni R, et al. Ameloblastomas: a regional Latin-American multicentric study. **Oral Dis** 2007; 13:303-7.

Lee PK, Samman N, Ng IO. Unicystic ameloblastoma-use of Carnoy's solution after enucleation. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2004; 33:263-7.

Leider AS, Eversole LR, Barkin ME. Cystic ameloblastoma: a clinicopathologic analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1985; 60: 624-30.

Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C. Prognostic value of syndecan expression in breast cancer. **Oncology** 2004; 67:11-8.

Leocata P, Villari D, Fazzari C, Lentini M, Fortunato C, Nicòtina PA. Syndecan-1 and Wingless-type protein-1 in human ameloblastomas. **J Oral Pathol Med** 2007; 36:394-9.

Leon JE, Mata GM, Fregnani ER, et al. Clinicopathological and immunohistochemical study of 39 cases of adenomatoid odontogenic tumour: a multicentric study. **Oral Oncol** 2005; 41:835-42.

Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Expression of epidermal growth factor receptors by odontogenic jaw cysts. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** 1993; 423:137-44.

Liotta LA, Rao CN, Wewer UM. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. **Annu Rev Biochem** 1986; 55:1037-51.

Lu Y, Xuan M, Takata T, et al. Odontogenic tumors. A demographic study of 759 cases in a Chinese population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1998; 86:707-14.

Mehlich DR, Dahlin DC, Masson JK. Ameloblastoma: a clinicopathologic report. **J Oral Surg** 1972; 30:9-22.

Migaldi M, Sartori G, Rossi G, Cittadini A, Sgambato A. Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma. **Oral Oncol** 2008; 44:50-60.

Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? **Adv Anat Pathol** 2001; 8:14-20.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. **Cell** 1982; 31:11-24.

Morgan PR, Shirlaw PJ, Jonhson NW, Leigh IM, Lane EB. Potential applications of anti-keratin antibodies in oral diagnosis. **J Oral Pathol** 1987; 16:212-22.

Mori M, Tatemoto Y, Yamamoto N, Okada Y. Immunohistochemical localization of intermediate filament proteins in calcifying epithelial odontogenic tumor. **J Oral Pathol** 1988; 17:236-40.

Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, et al. Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1997; 84:672-5.

Muller H, Slootweg PJ. The growth characteristics of multilocular ameloblastoma: a histological investigation with some interferen with regard to operative procedures. **J Maxillofac Surg** 1985; 13:224-30.

Nakamura N, Higuchi Y, Tashiro H, Ohishi M. Marsupialization of cystic ameloblastoma: a clinical and histopathologic study of the growth characteristics before and after marsupialization. **J Oral Maxillofac Surg** 1995; 53:748-6.

Nakamura N, Mitsuyasu T, Higuchi Y, Sandra F, Ohishi M. Growth characteristics of ameloblastoma involving the inferior alveolar nerve: a clinical and histopathologic study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001; 91:557-62.

Nakamura N, Hoggish Y, Mitsuyasu T, Sandra F, Ohishi M. Comparison of long-term results between different approaches to ameloblastoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2002; 93:13-20.

Nishihara M, Kanematsu T, Taguchi T, Razzaque MS. PTHrP and tumorigenesis: is there a role in prognosis? **Ann N Y Acad Sci** 2007; 1117:385-92.

Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Penafiel C, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. **J Oral Pathol Med** 2002; 31:415-20.

Odukoya O. Odontogenic tumors: analysis of 289 Nigerian cases. **J Oral Pathol Med** 1995; 24:454-7.

Ohtsuro M. Expression of parathyroid hormone-related protein in ameloblastomas. **Tokai J Exp Clin Med** 2005; 30:233-9.

Olasoji HO, Enwere ON. Treatment of ameloblastoma: a review. **Niger J Med** 2003; 12:7-11.

Ong'uti MN, Howells GL, Williams DM. An immunohistochemical study of keratin expression in ameloblastoma from a Kenyan population. **Oral Dis** 1999; 5:111-6.

Payeras MR, Sant'Ana Filho M, Lauxen IS, Barbachan JJ. Quantitative analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions and epidermal growth factor receptor in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med** 2007; 36:99-104.

Philipsen HP, Reichart PA. Unicystic ameloblastoma: a review of 193 cases from the literature. **Oral Oncol** 1998; 34:317-25.

Phillipsen HP, Reichart PA, Nikai H, Takata T, Kudo Y. Peripheral ameloblastoma: biological profile based on 160 cases from the literature. **Oral Oncol** 2001a; 37:17-27.

Phillipsen HP, Reichart PA, Takata T. Desmoplastic ameloblastoma (including “hybrid” lesion of ameloblastoma): biological profile based on 100 cases from the literature and own cases. **Oral Oncol** 2001b; 37:455-60.

Piattelli A, Fiorini M, Santinelli A, Rubini C. Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts. **Oral Oncol** 1998; 34; 408-12.

Pinheiro JJV. **Estudo imuno-histoquímico e zimográfico das metaloproteinases da matriz 1, 2 e 9 no ameloblastoma.** São Paulo; 2002. [Dissertação de Mestrado-Universidade de São Paulo].

Pinsolle J, Michelet V, Coustal B, Siberchicot F, Michelet FX. Treatment of ameloblastoma of the jaws. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1995; 121:994-6.

Rapidis AD, Andressakis, DD, Stavrianos SD, et al. Ameloblastomas of the jaw: clinico-pathological review of 11 patients. **Eur J Surg Oncol** 2004; 30:998-1002.

Regezi JA, Kerr DA, Courtney RM. Odontogenic tumors: analysis of 706 cases. **J Oral Surg** 1978; 36: 771-8.

Reichart PA, Phillipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. **Eur J Cancer B Oral Oncol** 1995; 31:86-89.

Reichart PA, Phillipsen HP. **Odontogenic tumors and allied lesions.** Londres: Quintessence Publishing; 2004.

Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. **Cancer J** 2001; 7:24-31.

Robinson L, Martinez MG. Unicystic ameloblastoma: a prognostically distinct entity. **Cancer** 1977; 40:2278-85.

Sachs SA. Surgical excision with peripheral ostectomy: a definitive, yet conservative, approach to the surgical management of ameloblastoma. **J Oral Maxillofac Surg** 2006; 64:476-83.

Sammartino G, Zarrelli C, Urciuolo V, et al. Effectiveness of a new decisional algorithm in managing mandibular ameloblastomas: a 10-years experience. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2007; 45:306-10.

Sampson DE, Pogrel MA. Management of mandibular ameloblastoma: the clinical basis for a treatment algorithm. **J Oral Maxillofac Surg** 1999; 57:1074-7.

Santos JN, Pinto LP, de Figueredo CR, de Souza LB. Odontogenic tumors: analysis of 127 cases. **Pesq Odontol Bras** 2001; 15:308-13.

Sehdev MK, Huvos AG, Strong EW, Gerold FP, Willis GW. Proceedings: ameloblastoma of maxilla and mandible. **Cancer** 1974; 33:324-33.

Shatkin S, Hoffmeister FS. Ameloblastoma: a rational approach to therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1965; 20:421-35.

Shen X, Qian L, Falzon M. PTH-related protein enhances MCF-7 breast cancer cell adhesion, migration, and invasion via intracrine pathway. **Exp Cell Res** 2004; 294:420-33.

Shibata T, Nakata D, Chiba I, et al. Detection of TP53 mutation in ameloblastoma by the use of a yeast functional assay. **J Oral Pathol Med** 2002; 31:534-8.

Shintani S, Yoshihama Y, Emilio AR, Matsumura T. Overexpression of p53 is an early event in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. **Anticancer Res** 1995; 15:305-8.

Shrestha P, Yamada K, Higashiyama H, Takagi H, Mori M. Epidermal growth factor receptor in odontogenic cysts and tumors. **J Oral Pathol Med** 1992; 21:314-7.

Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. **Exp Hematol** 2002; 30:1365-72.

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki67 (MIB-1) PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncol** 1999; 35:583-9.

Slootweg PJ. p53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions: an immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med** 1995; 24:393-7.

Takahama Junior A, Alves FA, Pinto CA, Carvalho AL, Kowalski LP, Lopes MA. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of twenty-five head and neck osteosarcomas. **Oral Oncol** 2003; 39:521-30.

Tatemoto Y, Tanaka T, Okada Y, Mori M. Adenomatoid odontogenic tumour: co-expression of keratin and vimentin. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** 1988; 413:341-7.

Tsaknis PJ, Nelson JF. The maxillary ameloblastoma: an analysis of 24 cases. **J Oral Surg** 1980; 38:336-42.

Ueda M, Kaneda T. Combined chemotherapy and radiotherapy for advanced maxillary ameloblastoma: a case report. **J Craniomaxillofac Surg** 1991; 19:272-4.

Ueno S, Miyagawa T, Kaji R, Mushimoto K, Shirasu R. Immunohistochemical investigation of epidermal growth factor receptor expression in ameloblastomas. **J Pathol** 1994; 173:33-8.

van Rensburg LJ, Thompson IO, Kruger HE, Norval EJ. Hemangiomatous ameloblastoma: Clinical, radiologic, and pathologic features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001; 91:374-80.

Vayvada H, Mola F, Menderes A, Yilmaz M. Surgical management of ameloblastoma in the mandible: Segmental mandibulectomy and immediate reconstruction with free fibula or deep circumflex iliac artery flap (evaluation of the long-term esthetic and functional results). **J Oral Maxillofac Surg** 2006; 64:1532-9.

Vered M, Shohat I, Buchner A. Epidermal growth factor receptor expression in ameloblastoma. **Oral Oncol** 2003; 39:138-43.

Vigneswaran N, Whitaker SB, Budnick SD, Waldron CA. Expression patterns of epithelial differentiation antigens and lectin-binding sites in ameloblastomas: a comparison with basal cell carcinomas. **Hum Pathol** 1993; 24:49-57.

Weinstein RS, Merk FB, Alroy J. The structure and function of intercellular junctions in cancer. **Adv Cancer Res** 1976; 23:25-3.

Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Kokkola A, Haglund C. A prognostic value of syndecan-1 in gastric cancer. **Anticancer Res** 2000; 20:4905-7.

Wilson D, Walker M, Aurora N, Moore S. Ameloblastoma with mucous cell differentiation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001; 91:576-8.

Wu PC, Chan KW. A survey of tumors of the jaw bones in Hong-Kong Chinese: 1963-1982. **Br J Oral Maxillofac Surg** 1985; 23:92-102.

Zwahlen RA, Grätz KW. Maxillary ameloblastomas: a review of the literature and of a 15-year database. **J Craniomaxillofac Surg** 2002; 30:273-9.

ANEXOS

Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

CENTRO DE TRATAMENTO E PESQUISA

**HOSPITAL
DO CANCER**

A. C. CAMARGO

São Paulo, 02 de fevereiro de 2005.

Ao

Dr. Eduardo Rodrigues Fregnani

Ref.: Projeto de Pesquisa n.º 669/05

"Estudo clínico, radiográfico, microscópico e perfil imunohistoquímico dos ameloblastomas. Experiência do Hospital A.C. Camargo".

Seu projeto de pesquisa, acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em sua última reunião de 01/02/2005. Os membros desta comissão aprovaram a realização deste estudo.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhados à secretaria do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,



Dr. Daniel Deheinzelin

Vice Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa

C.C.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP
Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP CEP 01509-900
PABX(0XX11)3272-5000 ramal 1117

Anexo 2 - Ficha de Levantamento de Dados

- 1.ID..... | | | |
- 2.RGH..... | | | | | | | |
3. Idade (anos)..... | | | |
4. Etnia (1) Melanoderma (2) Leucoderma (3) Feoderma (99) ND..... | |
- 5.Sexo (1) masculino 2 (feminino) | |
- 6.Tempo de queixa (meses).....(99) ND..... | | | |
7. Tipo de queixa (1) Dor (2) Tumor (3) Parestesia (4) Trismo (5) Outros.
| | | |
- 8.Tamanho clínico do tumor (cm)(99) ND..... | | | |
9. Tamanho anátomo- patológico do tumor (cm).....(99) ND..... | | | |
10. Localização do tumor..... | |
(1) Maxila Posterior D (4) Mandibula Posterior D (6) Mandibula Posterior E
(2) Maxila Anterior (5) Mandíbula Anterior (7) Extra-ósseo
(3) Maxila Posterior E
11. Infiltra tecidos moles : (1) Sim (2) Não | |
12. Tratamento prévio..... | | | |
(1) Nenhum (2) Ressecção (3) Marsupialização (4) Curetagem (5) Outros_____
13. Tipo de tratamento realizado..... | | | | | |
(1) Ressecção marginal (2) Ressecção segmentar (3) Curetagem + crioterapia
(4) Curetagem (5)Nenhum (6) Outros:_____
14. Data da cirurgia..... | | / | | / | |
15. Recidiva (1) Sim (2) Não | |
16. Recidiva (1) Intra-óssea (2)Extra-óssea | |
17. Data da recidiva..... | | / | | / | |
18. Data da última informação..... | | / | | / | |
19. Situação da ultima informação..... | |
(1) Vivo sem doença (2) Vivo com doença (3) Morto pela doença (4) Morto por outras causas (5) Perdido de vista
20. Padrão radiográfico (1) Unilocular (2) Multilocular (3) Extra-ósseo (99) ND .nvolvimento da cortical V e L(P) (1) Preserva (2) Expande (3) Rompe (99) ND.. | | | |
21. Envolvimento da cortical basilar (1) Preserva (2) Expande (3) Rompe (99) ND. | | | |
22. Associação com elementos dentais..... | | | | | |
(1)Deslocamento dental (2) Envolvimento tumoral (3) Reabsorção radicular (4) Nenhum (99) ND.
- 23 Fratura patológica (1) Sim (2) Não (99) ND..... | |

Anexo 3 - Artigo científico submetido para publicação à revista Internacional Journal of Oral Maxilofacial Surgery

Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of Ameloblastomas

Eduardo Rodrigues Fregnani^{1*} Danyel Elias da Cruz Perez¹ Oslei Paes de Almeida² Luiz Paulo Kowalski³ Fernando Augusto Soares⁴ Fábio de Abreu Alves¹

¹Department of Stomatology, A. C. Camargo Cancer Hospital, Rua Professor Rua Prof. Antônio Prudente, 211 –São Paulo/SP – Brazil.

² Department of Oral Pathology, University of Campinas Dental School, Avenida Limeira, 901 – 13414-903 - Piracicaba, Brazil,

³ Department of Head and Neck Surgery and Otorinolaryngology, A. C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil,

*** Corresponding author:**

Dr Eduardo Rodrigues Fregnani
Department of Stomatology, A. C. Camargo Cancer Hospital, Rua Professor

Antônio Prudente, 211 – Liberdade –

CEP: 01509-010. São Paulo/SP – Brazil.

Telephone number: 55 11 2189-5129 FAX number: 55 11 2189-5100

e-mail: erfreg@terra.com.br

SUPPORT: This work was supported by The State of São Paulo Research Foundation (**FAPESP**).

ABSTRACT

The aim of this paper is to evaluate clinical, radiographic, histopathological findings and treatment modalities in all cases of ameloblastomas treated at the Sao Paulo Cancer Hospital, between 1953 and 2003. 121 cases were retrieved from medical files. Data were reviewed and statistical analysis was performed using Kaplan-Meyer method and Cox's proportional risk model. Patient's age ranged from 2 to 82 years (mean = 33.2 years), with a slight female prevalence. Most cases were located in posterior mandible (80%). Radiographically, 60% showed a multilocular pattern. Solid ameloblastomas corresponded to 113 cases, and plexiform subtype was the most common. Solid tumors were treated by wide resection, curettage and cryosurgery, and curettage, and unicystic by curettage and/or cryotherapy. The global mean recurrence rate was 22.1%, with a mean follow-up of 9.7 years. Ameloblastomas were predominantly solid, affecting the posterior mandible. Important factors for the patient outcome were radiographically multilocular lesions, the presence of ruptured basal cortical bone and histologically follicular tumors.

KEY-WORDS: Ameloblastomas; Mandible; Odontogenic tumors

INTRODUCTION

Ameloblastomas correspond to 13 – 58% of all odontogenic tumors, and were firstly described by Cusack in 1827 and detailed by Broca in 1868¹. The WHO classifies ameloblastomas as benign odontogenic tumors formed by odontogenic epithelium with fibrous mature stroma, but without odontogenic ectomesenchyme².

Solid/multicystic; unicystic and peripheral variants, with distinctive clinical, demographic and biological features are well established¹. Solid ameloblastomas are the most frequent, characterized by slowly but infiltrative growth pattern and locally aggressive, occurring mainly on the posterior mandible of young adults (25-36 years-old). Radiographically ameloblastomas are uni or multilocular osteolytic lesions, frequently showing cortical expansion. Microscopically, the follicular and plexiform patterns are the most common, and other subtypes include acantomatous, desmoplastic, granular and basal. It is common to find more than one histological variant in the same tumor^{2,3}. Characteristically, polarized cells that resemble ameloblasts surround tumor cells nests and cystic cavities.

The term unicystic ameloblastoma derives from both macro and microscopical appearances. The lesion is essentially a well-defined single cavity lined by ameloblastomatous epithelium, and three variants are accepted: luminal, intraluminal and mural^{4,5,6}.

Treatment of ameloblastoma is controversial. Unicystic ameloblastomas are usually treated conservatively by curettage and cryosurgery. On the other hand, there is a wide discussion in the literature on different treatment approaches for solid ameloblastomas^{7,8,9,10}.

The aim of this study was to evaluate clinical, radiographic, histopathological findings and treatment modalities of 121 cases of ameloblastomas during a period time of fifty years at a single institution.

MATERIAL AND METHODS

All cases diagnosed as ameloblastomas between 1953 and 2003 were retrieved from the files of the A. C. Camargo Hospital, Sao Paulo, Brazil. Clinical, radiographical, treatment and follow-up information were obtained from the patients' records. All hematoxylin-eosin stained slides were reviewed and the tumors classified according to 2005 WHO criteria ². Cases without enough data or pathological specimen (slides or parafin block) were excluded from this study and so, were included 121 cases.

Follow-up was calculated from the date of the first treatment up to the date of the last assessment available. The Kaplan-Meyer method was used to assess the probability of recurrence, and for comparison of the recurrence-free survival curves the log-rank test was used. Statistical assessment of the clinical and histopathologic variables was done by a multivariate regression analysis Cox's proportional risk model.

RESULTS

Most patients were Caucasians (71.9%), with a slight female predominance (52.9%), and ages ranged from 2 to 82 years old (mean = 33.2 years). The clinical size of the lesions ranged from 1.5 to 25 cm, with a mean of 5.5 cm. The main complaints were swelling on the involved area, (82.6%) and/or pain (33.1%). The large majority of cases were located in the posterior region of the mandible (80%). Table 1 shows further details of the distribution of all cases studied. Most of the patients were firstly treated at the AC Camargo Hospital, but 31 cases (25.6%) were previously treated elsewhere by bone curettage (22 cases), radical resection (6 cases) and marsupialization (3 cases).

There were 113 cases classified as solid (93.4%), 7 (5.5%) as unicystic and only one as peripheral. Regarding the solid tumors, most of them (62%) were radiographically multilocular; 65% showed expansion and 25% discontinuity of the vestibular and/or lingual bone plate. The basal plate bone presented expansion in 40% of the cases and discontinuity in 13%.

Histologically, most cases were classified as plexiform (53.1%) or follicular (33.6%). Other histological subtypes (13.3%) identified were acantomatous (7 cases), granular (5 cases), desmoplastic (2 cases) and haemangiomatous (1 case). In relation to treatment of 113 solid ameloblastomas, 47 cases were treated with radical surgery, 47 with bone curettage followed by cryotherapy, and 19 cases with bone curettage only.

Diagnosis of unicystic ameloblastoma was confirmed in 7 cases, considering the image exams, macroscopic and histologic findings. The mean age was 35 years, 5 cases affecting women. All cases showed unilocular images and four cases were of the mural histological variant. All cases were treated conservatively by curettage or curettage and cryotherapy. The only patient affected by an extra-osseous lesion was a 29 year-old Caucasian man. The lesion of 3 cm in size was located on the left mandibular alveolar edge and it was treated by enucleation. The histological aspect of this case was predominantly follicular.

The mean follow-up time was 9.7 years and in total, 27 patients presented recurrences, 25 of the 113 (22.1%) with solid ameloblastomas and 2 of 7 (28.6%) with unicystic lesions. Extra-osseous recurrences occurred in four solid ameloblastomas. The two unicystic cases that recurred were of the mural subtype; one had been treated with curettage associated with cryotherapy, and the other with curettage only. Table 2 shows the data of recurrences of solid ameloblastomas. In short, the Chi-square test indicated that there were no significant statistical differences between recurrences and type of treatment performed.

Table 3 shows the main data of solid ameloblastomas cases, as well as the results of Cox's univariate regression for analysis of the clinical variables correlated with recurrences. It may be noted that of the clinical variables, only the radiographic pattern and the basal cortical bone status were statistically significant. Patients with radiographically multilocular lesions had 3.02 times more chance of recurrences than patients with unilocular lesions. (Figure 1). Moreover, patients that presented only expanded basal cortical bone had 0.24 chance of recurrence than those with ruptured basal

cortical bone. Analogously, patients with preserved basal cortical bone had 0.15 chance of recurrence than patients with ruptured basal cortical bone. It is relevant to point out that this parameter was analyzed only in mandibular cases.

Considering the microscopic aspects, cases predominantly plexiform had 0.31 times chance of recurrence than those with a follicular pattern. During the histopathological review, it was also observed that 87 cases (77%) of the solid tumors exhibited cystic areas (predominantly microcystic in 36 cases; macrocystic in 38 and both in 13 cases). In addition, areas with intense mesenchymal fibrosis were observed in 28 cases. However, these variables were not statistically significant for recurrences.

When the multiple regression analysis was performed, taking in consideration the three most significant variables (radiographic pattern, basal cortical bone status and main histological aspect), only the variable status of the basal cortical bone remained. Therefore, this variable was considered the most explicative for recurrence of the disease.

DISCUSSION

Epidemiologic studies have shown considerable differences in the incidence of odontogenic tumors, particularly when African and Asiatic studies are compared with those of North America¹¹⁻¹⁶. These variations in incidence are justified by geographic, ethnic and socio-economic factors or by the institution where the data were collected. In fact, data obtained from medical centers usually shows predominance of ameloblastomas, while studies from Dental Centers present a greater prevalence of odontomas¹⁷. In the present study, ameloblastomas corresponded to 67% of all odontogenic tumors, which confirms the bias found in studies from medical centers. Therefore, except odontomas, ameloblastomas are the most common odontogenic tumors, and important clinical and biological controversies persist in relation to them. In the literature, there are few studies considering the clinical-pathologic characteristics of ameloblastomas in Latin America¹⁸⁻

Our series of 121 cases showed a mean age of 33.2 years, which is in agreement with the meta-analysis done by Reichart et al.³ in 1995, and also with a recent multicentric study in the Latin American population conducted by Ledesma-Montes et al.¹⁸ (2007). Most of the studies show a similar incidence between men and women, with slight variations from one study to another^{3,13,18}. Our data showed a modest higher number of women (52.9%). It is also well established that the posterior region of the mandible is the location of greatest incidence of both solid and unicystic ameloblastomas, as it was observed in the present study^{1,2}.

Solid ameloblastomas were the most common (93.4%) and only seven cases (5.8%) were considered unicystic. This is according to the majority of other studies³. However, a recent Latin American multicentric study showed that 63.2% of the cases were unicystic ameloblastomas¹⁸. This is an interesting observation, and we believe that a more uniform criteria to diagnosis ameloblastomas as unicystic or solid is necessary. Although our series had only 7 cases considered unicystic, the mean age for these cases was higher when compared with other studies⁴. The radiographic characteristics seem to be relevant for the prognosis of ameloblastomas²¹⁻²⁴. Our solid cases with a multilocular radiographic image, presented significantly higher incidence of recurrences. Also, a ruptured mandibular basal cortical bone indicated a 3 times higher risk of recurrence, when compared with cases of preserved or expanded cortical.

Most of the studies show that for solid ameloblastomas the predominant histological pattern has no relevance for recurrences. Nevertheless, according to our data and those of Hong et al.²⁵ 2007, considering the two most frequent subtypes, plexiform and follicular, the latter presented a significantly higher number of recurrences. As this is very controversial issue, more studies are necessary to confirm or not this observation.

Recently, various studies considering treatment criteria and protocols for solid ameloblastomas were published, but the subject remains very controversial. Recent advances in the understanding of the biologic behavior

of this tumor have provided new treatment protocols in a more rational manner^{9,21,24,26}.

Cryotherapy is a form of adjuvant treatment that can be used in benign intraosseous lesions, including ameloblastoma, aiming to eliminate residual tumor cells inside the bone trabeculae by freezing. Although this form of treatment has not been widely used in ameloblastomas, it can be useful when more conservative treatment is performed. It was shown that after cryotherapy, when recurrences occur they are small and well limited, facilitating complete removal of the lesion¹⁰. In fact, the 30.6% of recurrences reported after curettage and cryotherapy of ameloblastomas is considered high, and therefore this form of treatment should be selected to small or unicystic lesions.

Carlson and Marx⁷ in 2006 made an extensive literature review, and concluded that radical resection continues to be the only form of treatment for ameloblastomas with predictable results. The rates of recurrence for solid ameloblastomas range between 15% and 25% after radical treatments, as it was found in the present study. However, those cases treated with curettage presented a similar value of recurrence (15.8%), differing from the rates of 35-80% described in the majority of studies^{9,27-31}. This can be explained because our cases treated only with curettage were relatively small (mean of 4cm), which is an indicator of good prognosis, as previously shown. In fact, the 3 recurrences were associated with ruptured basal cortical bone. On the other hand, those cases that presented large dimensions with cortical thinning and/or rupture received more radical treatments.

Although controversial, it is considered that unicystic ameloblastomas with mural infiltration require treatment similar to that of solid ameloblastomas. Lau and Samman⁸ (2006) made a systematic review about the treatment of unicystic ameloblastomas, and treatment by resection showed the lowest incidence of recurrence (3.6%), followed by enucleation with the application of Carnoy solution (16%) and simply enucleation (30.5%). In our study, two out of seven cases of unicystic ameloblastomas presented recurrences

(28.6%), both had mural infiltration; one was treated with curettage followed by cryotherapy and the other with simple curettage.

To sum up, we evaluated clinical, radiographic and histopathological findings of 121 cases of ameloblastomas from a single institution, and found that the tumors were predominantly solid, affecting the posterior mandible. Our data showed that cases treated by wide resection presented less recurrence, and that radiographically multilocular lesions, the presence of ruptured basal cortical bone and histologically follicular ameloblastoma seems to be important factors for prognosis of the patient.

REFERENCES

1. Reichart PA, Phillipsen HP, editors. Odontogenic Tumors and allied lesions. London: Quintessence Publishing Co Ltd: 2004.
2. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology e Genetics of the Head and Neck tumors. Lyon: IARC Press; 2005: 283-327.
3. Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. Eur J Cancer B Oral Oncol 1995; **31**:86-9.
4. Philipsen HP, Reichart PA. Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. Oral Oncol 1998; **34**: 317-25.
5. Gardner DG. Some current concepts on the pathology of ameloblastomas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996 ; **82**: 660-9.
6. Robinson L, Martinez MG. Unicystic ameloblastoma: a prognostically distinct entity. Cancer 1977; **40**: 2278-85.
7. Carlson ER, Marx RE. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. J Oral Maxillofac Surg 2006; **64**: 484-94
8. Lau SL, Samman N. Recurrence related to treatment modalities of unicystic ameloblastoma: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg 2006; **35**: 681-90

9. Sammartino G, Zarrelli C, Urciuolo V, di Lauro AE, di Lauro F, Giannone N, Lo Muzio L. Effectiveness of a new decisional algorithm in managing mandibular ameloblastomas: a 10-years experience. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007; **45**: 306-310.
10. Curi MM, Dib LL, Pinto DS. Management of solid ameloblastoma of the jaws with liquid nitrogen spray cryosurgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 1997; **84**:339-44.
11. Arotiba GT, Ladeinde LA, Arotiba JT, Ajike SO, Ugboko VI, Ajayi OF. Ameloblastoma in Nigerian children and adolescents: A review of 79 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; **63**:747-751.
12. 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**:276-280.
13. Lu Y, Xuan M, Takata T, Wang C, He Z, Zhou Z et al. Odontogenic tumors. A demographic study of 759 cases in a Chinese population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; **86**:707-714.
14. 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.
15. Regezi JA, Kerr DA, Courtney RM. Odontogenic tumors: analysis of 706 cases. *J Oral Surg* 1978; **36**: 771-778.
16. Wu P, Chan KW. A survey of tumours of the jaw bones in Hong-Kong Chinese: 1963-1982. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1985; **23**:92-102.
17. Fregnani ER, Fillipi RZ, Oliveira CR de, Vargas PA, Almeida OP. Odontomas and Ameloblastomas: variable prevalences around the world? *Oral Oncol* 2002; **38**:807-808.
18. Ledesma-Montes C, Mosqueda-Taylor A, Carlos-Bregni R, de Leon ER, Palma-Guzman JM, Paez-Valencia C, Meneses-Garcia A. Ameloblastomas: a regional Latin-American multicentric study. *Oral Dis* 2007; **13**: 303-7.

19. Fregnani ER, Faria PR, Rangel ALCA, Almeida OP, Vargas PA. Tumores Odontogênicos: Análise de 113 casos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP. RPG 2003; **10**: 355-359.
20. Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Penafiel C, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. J Oral Pathol Med 2002; **31**:415-20.
21. Sachs SA. Surgical excision with peripheral ostectomy: A definitive, yet conservative, approach to the surgical management of ameloblastoma J Oral Maxillofac Surg 2006; **64**: 476-83.
22. Muller H, Slootweg PJ. The ameloblastoma, the controversial approach to therapy. J Maxillofac Surg 1985 ;**13**:79-84.
23. D'Agostino A, Fior A, Pacino GA, Bedogni A, De Santis D, Nocini PF. Retrospective evaluation on the surgical treatment of jawbones ameloblastic lesions. Minerva Stomatol 2001; **50**:1-7.
24. Chapelle KA, Stoelinga PJ, de Wilde PC, Brouns JJ, Voorsmit RA. Rational approach to diagnosis and treatment of ameloblastomas and odontogenic keratocysts. Br J Oral Maxillofac Surg 2004; **42**:381-90.
25. Hong J, Yun PY, Chung IH, Myoung H, Suh JD, Seo BM, Lee JH, Choung PH. Long-term follow up on recurrence of 305 ameloblastoma cases. Int J Oral Maxillofac Surg 2007; **36**:283-8.
26. Vayvada H, Mola F, Menderes A, Yilmaz M. Surgical management of ameloblastoma in the mandible: Segmental mandibulectomy and immediate reconstruction with free fibula or deep circumflex iliac artery flap (evaluation of the long-term esthetic and functional results) J Oral Maxillofac Surg 2006; **64**:1532-9.
27. Gardner DG, Pecak AMJ. The treatment of ameloblastoma based on pathologic and anatomic principles. Cancer 1980; **46**:2514-2519.
28. Sehdev MK, Huvos AG, Strong EW, Gerold FP, Willis GW. Proceedings: Ameloblastoma of maxilla and mandible. Cancer 1974; **33**: 324-33.

29. Jackson IT, Callan PP, Forte RA. An anatomical classification of maxillary ameloblastoma as an aid to surgical treatment. J Craniomaxillofac Surg 1996; **24**: 230-6.
30. Nakamura N, Higuchi Y, Mitsuyasu T, Sandra F, Ohishi M. Comparison of long-term results between different approaches to ameloblastoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; **93**:13-20.
31. Ghandhi D, Ayoub AF, Pogrel MA, MacDonald G, Brocklebank LM, Moos KF Ameloblastoma: a surgeon's dilemma. J Oral Maxillofac Surg 2006; **64**:1010-4.

LEGENDS

Figure 1. Disease-free survival function curves according to the radiographic pattern.

Table 1: Site distribution of 121 cases of Ameloblastomas.

Table 2: Recurrences of 113 cases of solid ameloblastomas according to the treatment modality.

There were no statistical differences between treatment modalities and recurrences*

Table 3: Main findings of 113 cases of Solid Ameloblastomas and Univariate analysis.

TABLES:

Table 1: Site distribution of 121 cases of Ameloblastomas.

	N	%
Maxilla	12	9.9
Right - posterior region	2	1.6
Left - posterior region	9	7.4
Anterior maxilla	1	0.8
Mandible	108	89.2
Right – posterior region	50	41.3
Left – posterior region	47	38.9
Anterior mandible	11	9.1
Peripheral	1	0.8
Total	121	100.0

Table 2: Follow-up period of 113 cases of Solid Ameloblastomas.

Treatment	N total	N with recurrence	% of recurrence
Wide resection	47	8	17.0
Bone curettage + cryotherapy	47	14	29.8
Bone curettage	19	3	15.8
Total	113	25	22.1

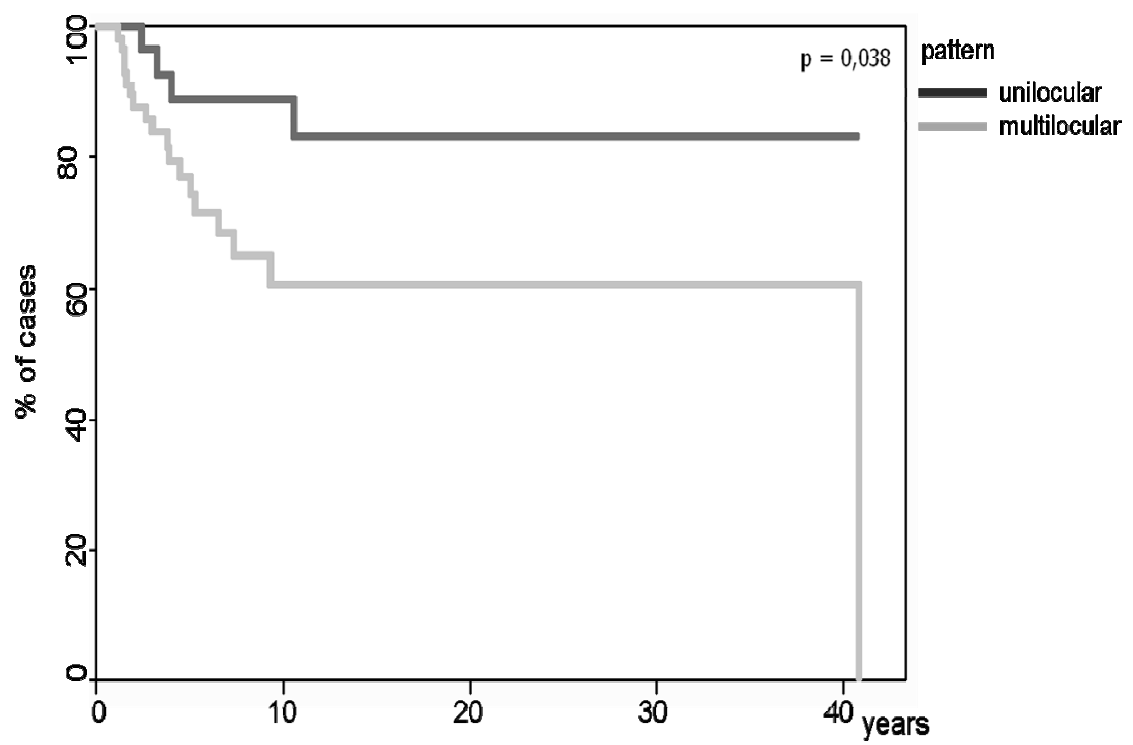
*Chi-square test: p=0.252

Table 3: Recurrences of 113 cases of solid ameloblastomas according to the treatment modality. There were no statistical differences between treatment modalities and recurrences*

Variable	Category	N total	N with recurrence (%)	HR	CI 95%	p
Age (Years)	< 18	16	4 (25.0)	1.00		
	18 a 32	50	15 (30.0)	1.37	0.45 – 4.16	0.581
	> 32	47	6 (12.8)	0.45	0.13 – 1.60	0.216
Ethnic	Afro Brazilian	27	6 (22.2)	1.00		
	Caucasian	86	19 (23.2)	0.90	0.36 – 2.28	0.830
Gender	Male	54	10 (18.5)	1.00		
	Female	59	15 (25.4)	1.94	0.85 – 4.46	0.117
Time of complaining (months)	≤ 12	58	13 (22.4)	1.00		
	> 12	47	10 (21.3)	1.04	0.45 – 2.45	0.923
Clinical tumor size (cm)	< 5	35	6 (17.1)	1.00		
	5 a 10	39	12 (30.8)	1.97	0.73 – 5.34	0.183
	> 10	6	0 (0.0)	-	-	-
Tumor site	Mandible	102	24 (23.5)	1.00		
	Maxilla	11	1 (9.1)	0.35	0.05 – 2.56	0.299
Soft tissue infiltration	No	67	13 (19.4)	1.00		
	Yes	41	11 (26.8)	1.30	0.57 – 2.97	0.535
Previous treatment	No	84	14 (16.7)	1.00		
	Yes	29	11 (37.9)	2.04	0.90 – 4.59	0.086
Treatment	Wide resection	47	8 (17.0)	1.00		
	Bone curettage + cryotherapy	47	14 (29.8)	1.91	0.77 – 4.75	0.161
	Bone curettage	19	3 (15.8)	0.94	0.24 – 3.65	0.932
Radiographic pattern	Unilocular	38	4 (10.5)	1.00		
	Multilocular	62	18 (29.0)	3.02	1.01 – 9.04	0.048
Cortical bone V e L(P)	Teared	28	8 (28.6)	1.00		
	Expanded	65	13 (20.0)	0.57	0.23 – 1.40	0.224
	Preserved	7	0 (0.0)	-	-	-
Basal cortical bone	Teared	11	6 (54.5)	1.00		
	Expanded	34	7 (20.6)	0.24	0.08 – 0.74	0.013
	Preserved	40	7 (17.5)	0.15	0.05 – 0.49	0.002
Pathologic fracture	No	101	23 (22.8)	1.00		
	Yes	4	0 (0.0)	-	-	-
Main histopathological pattern	Follicular	38	12 (31.6)	1.00		
	Plexiform	60	8 (13.3)	0.31	0.12 – 0.80	0.015
	Others ¹	15	5 (33.3)	0.90	0.32 – 2.56	0.844

¹ Other histological pattern: acantomathous (7 cases/ 3 recurrences), desmoplastic (2 cases/ 1 recurrence), granular cell (5 cases, no recurrences) and haemangiomatous (1 case/ 1 recurrence). HR= hazard ratio; CI= confidence interval.

Fig. 1 Disease-free survival function curves according to the radiographic pattern



Anexo 4 - Artigo científico submetido para publicação à revista Journal of Oral Pathology e Medicine

Myofibroblasts in the stroma of ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical

Eduardo Rodrigues Fregnani ^{a*}, Lays M. Sobral ^b, Fabio Abreu Alves ^a, Fernando Augusto Soares ^c, Luis Paulo Kowalski ^d, Ricardo D. Coletta ^b

^a Department of Stomatology, A. C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, São Paulo, Brazil.

^b Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil

^c Department of Pathology, A. C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil

^d Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil

* Corresponding author. Telephone number: +55 11 2189-5129, FAX number: +55 11 2189-5100, E-mail: erfreg@terra.com.br

Summary

Presence of myofibroblasts in the stroma of neoplasm has been correlated with tumor infiltration and progression, contributing to their biological behavior. In the present study, we evaluated the presence of myofibroblasts in intra-osseous solid multicystic ameloblastomas and determined whether their presence is associated with clinicopathological features of the tumors. Fifty seven ameloblastomas were analyzed for the presence of myofibroblasts by immunohistochemical detection of isoform α of the smooth muscle actin (α -SMA). Myofibroblasts were found in the stroma, in close contact with tumor epithelial cells, of ~58% (n=33) of the ameloblastomas. Areas of tumor-free stroma demonstrated a complete lack of α -SMA myofibroblasts. Abundant presence of myofibroblast in the stroma of the tumors was significantly correlated with rupture of the osseous cortical (p=0.0001), which has been considered an important prognostic marker of ameloblastoma aggressiveness. Ours results suggest that abundant presence of myofibroblasts in the stroma of solid ameloblastomas may be associated with a more aggressive infiltrative behavior, and may be useful to predict the prognosis of patients affected by this odontogenic tumor.

KEYWORDS: Ameloblastoma, myofibroblasts, prognosis.

Running title: Myofibroblasts in solid ameloblastomas.

Introduction

Myofibroblasts are specialized stromal cells that exhibit a hybrid phenotype between fibroblasts and smooth muscle cells, and are characterized by expression of the specific isoform α of the smooth muscle actin (α -SMA).¹ Several reports have shown the presence of cells with myofibroblastic features in normal tissues and in a variety of pathological situations, such as benign and malignant neoplasms.²⁻⁴ Furthermore, myofibroblasts are the main cellular type involved in extracellular matrix deposition during tissue repair and fibrotic diseases.⁵⁻⁷ Through expression and secretion of cytokines, chemokines, growth factors, extracellular matrix molecules, adhesion molecules and receptors, myofibroblasts promote epithelial-mesenchymal interactions, including neoplastic growth and invasion.^{4,8-13} Solid ameloblastomas demonstrate an aggressive biological behavior by exhibiting a great infiltrative potential and a high recurrence rate.¹⁴ Thus, identification of prognostic markers of the ameloblastoma biologic behavior is of considerable importance for determining the most appropriate therapeutic approach and establishing the prognosis of patient. Since recent reports have demonstrated that identification of myofibroblasts have a prognostic role in many neoplasms,^{2,12,15,16} the aim of the present study was to analyze the presence of myofibroblasts in intra-osseous solid multicystic ameloblastoma to establish their prognostic significance.

Material and Methods

Samples

Fifty seven patients diagnosed with intra-osseous solid multicystic ameloblastoma and treated at the A. C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil were included in this study. The patients, 28 of which were males, ranged in age between 6 and 74 years, with a median of 28 years (mean 33.2 ± 17.6 years). Patients had their symptoms for 1 to 240 months with a median of 12 months (mean 43.2 ± 64.1 months), and facial swelling was the most common presenting complaint (92.9%) of the patients, followed by pain in 14 (25%). Clinical size of the tumor ranged between 2 and 25 cm, with a median of 5 cm (mean 5.63 ± 3.72 cm), and 28 (50%) of the tumor infiltrated the surrounding soft tissues. Mandible (87.7%), particularly in the posterior areas (92%), was more affected than maxilla. Twenty three patients

(47.9%) had a unilocular radiolucent lesion, whereas 25 (52.1%) had a multilocular lesion. Rupture of the osseous cortical was observed in 17 (33%) of the patients. Plexiform histological type was observed in 33 (57.9%) patients, followed by follicular (29.8%), acanthomatous (8.8%), granular cell type (1.75%), and hemangiomatous (1.75%). Most patients (54.4%) had resection as treatment of the tumor, while 6 (10.5%) had enucleation and 20 (35.1%) had enucleation in association with cryotherapy. Recurrence, after a mean follow up of 149 months, was observed in 20 patients (35.1%), and only in those treated by enucleation or enucleation and cryotherapy. The study was carried out with approval of the Human Research Ethics Committee of the hospital.

Histological and immunohistochemical analysis

New sections were cut from the paraffin blocks and used for hematoxylin and eosin staining or immunohistochemistry. Immunohistochemical analysis was performed using the streptavidin-biotin peroxidase complex method. Following deparaffinization and hydration in graded alcohol solutions, the sections were treated with 3% H₂O₂ followed by antigen retrieval with 10 mM citric acid, pH 6.0, in a microwave for 24 min. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), the sections were treated with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS for 1 h, and then incubated with monoclonal mouse anti- α -SMA (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) diluted 1:200 for 16 h at 4°C. Subsequent incubations were with biotinylated IgG followed by streptavidin-biotin peroxidase complex (StrepABC Complex/HRP Duet kit, Dako). Reactions were developed by incubating the sections with 0.6 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) containing 0.01% H₂O₂ and counterstained with Mayer's hematoxylin. Positive and negative controls were included in all reactions. The presence of α -SMA-positive cells was classified as negative (0), scanty (1) or abundant (2) in a blinded analysis performed by 2 of the authors, and any disagreement was settled by discussion.

Statistical analysis

For statistical purposes, tumors with lack or scanty presence of myofibroblast were combined and compared with tumors with abundant presence of myofibroblasts. Correlations between presence of myofibroblasts and clinicopathological parameters of the tumors were evaluated by Fisher's exact test (for frequency data in contingency tables) or Mann-Whitney U-test. Statistical significance was at $p \leq 0.05$.

Results

All samples demonstrated positivity for α -SMA in the smooth muscle of the blood vessel walls, which worked as an internal positive control. Immunohistochemical reaction for α -SMA showed positive cells in the stroma of 57.9% (n=33) of the ameloblastomas.. Scanty presence of myofibroblasts was observed in 20 (60.6%) out of ameloblastoma-positive samples, whereas 13 (39.4%) samples demonstrated an abundant distribution of myofibroblasts. Myofibroblasts were located in the stroma in close contact to epithelial cells, and areas of tumor-free stroma demonstrated a complete lack of α -SMA myofibroblasts (Fig. 1). Myofibroblasts were found in the tumor stroma in a reticular or fascicular pattern of distribution (Fig. 1). Twenty samples (60.6%) demonstrated a reticular pattern, and 13 (39.4%) demonstrated a fascicular pattern of myofibroblast distribution. Interestingly, 10 out of 13 samples with abundant myofibroblasts showed a fascicular pattern of distribution.

The clinicopathological correlations with the presence of myofibroblasts are listed in Table 1. Abundant presence of myofibroblast in the stroma of the solid ameloblastomas was significantly correlated with rupture of the osseous cortical ($p=0.001$). Presence of myofibroblasts was not associated with age, gender, ethnic, symptoms or duration of it, anatomic location and extent to soft tissues, radiographic pattern, and histological type. There was also no association between presence of myofibroblasts and treatment modality or recurrence.

Discussion

Activation of myfibroblasts in the stroma is predicted to be a critical step in tumor growth and progression.^{17,18} Furthermore, recent reports demonstrated that increased presence of myfibroblasts in the stroma of several cancers, including those of the oral cavity, is correlated with a worse prognosis for the patients.^{2,11-13,19} In oral squamous cell carcinomas, increased amount of myfibroblasts was significantly correlated with lymph node metastasis, vascular, lymphatic and perineural invasion of the tumor cells, and patient's shorter overall survival.¹⁹ Moreover, α -SMA myfibroblasts were not found in the stroma of normal oral mucosa and pre-malignant leucoplakias with dysplasia histologically confirmed, but approximately 60% of the oral squamous cell carcinomas contained a significantly proportion of myfibroblasts.¹⁹ Similarly, Lewis et al.²⁰ demonstrated that myfibroblasts were not found in the adjacent stroma of invasive tumors of the oral cavity and in benign oral mucosal polyps, which contained a hyperplastic squamous epithelium, while 14 out of 15 oral squamous cell carcinomas contained myfibroblasts independent of the tumor differentiation. Interestingly, highly polymorphic ductal carcinoma in situ of breast and non-invasive urothelial carcinoma of bladder induced myfibroblast appearance in the stroma surrounding the cancer cells,^{21,22} demonstrating that factors derived from aggressive tumor cells are able to diffuse through basement membrane stimulating myfibroblast transformation. Indeed, we have previously demonstrated oral squamous carcinoma cells induced transdifferentiation of normal fibroblasts to myfibroblasts via secretion of transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1), and in turn, myfibroblasts secreted factors that stimulated tumor cell proliferation, which favor tumor growth.¹⁶ Since increased expression of TGF- β 1 is found in ameloblastomas,²³ further investigation should be done to elucidate whether myfibroblast emergency occurs through TGF- β 1-released by ameloblastoma-tumor cells.

Presence of myfibroblasts in odontogenic tumors has been reported in few studies. However, those were isolated case reports^{24,25} or studies comparing the presence of myfibroblasts in aggressive and non-aggressive

odontogenic tumors.^{26,27} Vered et al.²⁷ demonstrated, in a small group of tumors, that the number of myofibroblasts in solid ameloblastomas is significantly higher than in unicystic variants, suggesting that myofibroblasts can contribute to the biological behavior of aggressive lesions. In the present study, we found an elevated number of solid ameloblastomas contained myofibroblasts. Interestingly, there were no α -SMA-positive myofibroblasts in the tumor-free stroma of the samples, suggesting that a close contact is needed for ameloblastoma cells induction of myofibroblast transdifferentiation. More importantly, we have demonstrated that abundant presence of myofibroblasts leads to a more aggressive behavior of the ameloblastomas, as revealed by the significant correlation with rupture of the osseous cortical. This is, to our knowledge, the first evidence that elevated myofibroblast may be useful to predict the prognosis of ameloblastoma patients, since rupture of the osseous cortical is one of the major prognostic factors of aggressiveness in patients with ameloblastomas^{28, 29}. Patients with cortical rupture show significantly higher recurrence rates than those with preserved cortical³⁰. However, we did not find any association between myofibroblasts and disease recurrences. The reason for that is probably the type of surgery performed. All patients in this study with rupture of the osseous cortical were treated by dentoalveolar segmental resection of the lesion.

The correlation between abundant presence of myofibroblasts and bone cortical rupture is not unexpected, considering that both TGF- β 1 and tumor necrosis factor alpha (TNF α), which are produced in elevated amounts by myofibroblasts, induce osteoclastogenesis.^{31,32} Furthermore, TNF α stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion by myofibroblasts, contributing to bone resorption³³. In human bladder carcinoma, the reticular pattern is predominantly observed in the non-invasive carcinomas, whereas the fascicular pattern is chiefly seen in the invasive carcinoma.²² In our samples, fascicular pattern was predominant in ameloblastomas with abundant presence of myofibroblasts, suggesting that more aggressive ameloblastomas evoke a change in the distribution of the myofibroblasts. In the study of Vered et al.²⁷ the number of myofibroblasts in solid

ameloblastomas did not differ from that observed in oral squamous cell carcinomas. In our series, we found that the number and distribution of myofibroblasts is markedly different than those observed in oral squamous cell carcinoma (data not shown). Myofibroblasts in oral squamous carcinomas tend to be in higher number, in a fascicular pattern of distribution, and localized predominantly in the invasive front of the tumors.

In summary, the results presented here demonstrate that an elevated number of solid ameloblastomas contain myofibroblasts, and that abundant presence of myofibroblasts leads to a more aggressive behavior, such as rupture of the osseous cortical. Further investigations are needed to confirm the potential prognostic value of myofibroblasts in solid ameloblastomas, as well as in other locally aggressive odontogenic tumors. However, the clinical behavior of ameloblastomas will be better understood when clinical and microscopic data are considered in conjunction with new molecular techniques that are becoming available.

Conflict of interest statement

We declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, São Paulo, Brazil for RDC. L. M. Sobral is supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, São Paulo, Brazil.

References

1. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005;**13**(1):7-12.
2. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004;**48**(5-6):509-17.

3. Kuroda N, Shimasaki N, Miyazaki E, Hamauzu T, Toi M, Hiroi M, et al. The distribution of myofibroblasts and CD34-positive stromal cells in normal renal pelvis and ureter and their cancers. *Histol Histopathol* 2006;**21**(12):1303-7.
4. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;**289**(1):G2-7.
5. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* 2007;**257**:143-79.
6. Bitu CC, Sobral LM, Kellermann MG, Martelli-Junior H, Zecchin KG, Graner E, et al. Heterogeneous presence of myofibroblasts in hereditary gingival fibromatosis. *J Clin Periodontol* 2006;**33**(6):393-400.
7. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003;**200**(4):500-3.
8. Kunz-Schughart LA, Knuechel R. Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue. *Histol Histopathol* 2002;**17**(2):623-37.
9. Kunz-Schughart LA, Knuechel R. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 2002;**17**(2):599-621.
10. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 2007;**132**(4):1311-21.
11. Mukaratirwa S, Koninkx JF, Gruys E, Nederbragt H. Mutual paracrine effects of colorectal tumour cells and stromal cells: modulation of tumour and stromal cell differentiation and extracellular matrix component production in culture. *Int J Exp Pathol* 2005;**86**(4):219-29.
12. Offersen BV, Nielsen BS, Hoyer-Hansen G, Rank F, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J, et al. The myofibroblast is the predominant plasminogen activator inhibitor-1-expressing cell type in human breast carcinomas. *Am J Pathol* 2003;**163**(5):1887-99.
13. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 2006;**5**(15):1597-601.

14. Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;**31B**(2):86-99.
15. Suh KS, Crutchley JM, Koochek A, Ryscavage A, Bhat K, Tanaka T, et al. Reciprocal modifications of CLIC4 in tumor epithelium and stroma mark malignant progression of multiple human cancers. *Clin Cancer Res* 2007;**13**(1):121-31.
16. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: Induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol* 2007, doi:10.1016/j.oraloncology.2007.07.001.
17. Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007;**6**(4):1186-97.
18. Casey TM, Eneman J, Crocker A, White J, Tessitore J, Stanley M, et al. Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. *Breast Cancer Res Treat* 2007, doi:10.1007/s10549-007-9684-7.
19. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. *Histopathology* 2007;In Press.
20. Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, Anderson WP, Speight PM, Marshall JF, et al. Tumour-derived TGF-beta1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Br J Cancer* 2004;**90**(4):822-32.
21. Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. *J Clin Pathol* 2003;**56**(4):271-6.
22. Shimasaki N, Kuroda N, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Hiroi M, et al. The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness. *Histol Histopathol* 2006;**21**(4):349-53.

23. Takata T, Miyauchi M, Ogawa I, Kudo Y, Takekoshi T, Zhao M, et al. Immunoexpression of transforming growth factor beta in desmoplastic ameloblastoma. *Virchows Arch* 2000;**436**(4):319-23.
24. Smith SM, Bartov SA. Ameloblastoma with myofibroblasts: first report. *J Oral Pathol* 1986;**15**(5):284-6.
25. Rothhouse LS, Majack RA, Fay JT. An ameloblastoma with myofibroblasts and intracellular septate junctions. *Cancer* 1980;**45**(11):2858-63.
26. Lombardi T, Morgan PR. Immunohistochemical characterisation of odontogenic cysts with mesenchymal and myofilament markers. *J Oral Pathol Med* 1995;**24**(4):170-6.
27. Vered M, Shohat I, Buchner A, Dayan D. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. *Oral Oncol* 2005;**41**(10):1028-33.
28. Carlson ER, Marx RE. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;**64**(3):484-94.
29. Ueno S, Mushimoto K, Shirasu R. Prognostic evaluation of ameloblastoma based on histologic and radiographic typing. *J Oral Maxillofac Surg* 1989;**47**(1):11-5.
30. Sampson DE, Pogrel MA. Management of mandibular ameloblastoma: the clinical basis for a treatment algorithm. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;**57**(9):1074-7; discussion 78-9.
31. Di Sabatino A, Pender SL, Jackson CL, Prothero JD, Gordon JN, Picariello L, et al. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology* 2007;**133**(1):137-49.
32. Weicht B, Maitz P, Kandler B, Fischer MB, Watzek G, Gruber R. Activated platelets positively regulate RANKL-mediated osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 2007, doi:10.1002/jcb.21360.
33. Porter KE, Turner NA, O'Regan DJ, Ball SG. Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin. *Cardiovasc Res* 2004;**64**(3):507-15.

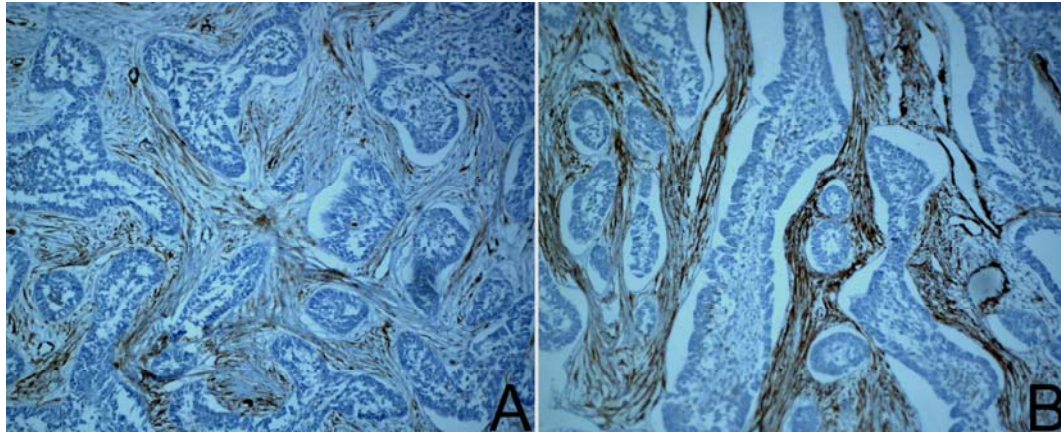


Figure 1. Presence of myofibroblasts in intra-osseous solid multicystic ameloblastomas. α -SMA immunohistochemical expression of representative samples of this study classified as abundant presence of myofibroblasts. Myofibroblasts showed a reticular (A) or a fascicular (B) pattern of distribution. Myofibroblasts were found immediately adjacent to the islands of tumor cells, whereas areas of tumor-free stroma demonstrated a complete lack of α -SMA myofibroblasts. The smooth muscle of the blood vessel walls was positive in all samples. (Original magnification x100)

Table 1. Clinicopathological correlation of the presence of myofibroblasts in ameloblastomas.

Parameters	Myofibroblasts ¹		P value
	0/1 n (%)	2 n (%)	
Age			
< 28 years	21 (47.72)	6 (46.15)	0.92
≥ 28 years	23 (52.28)	7 (53.85)	
Gender			
Male	24 (54.55)	4 (30.77)	0.13
Female	20 (45.45)	9 (69.23)	
Symptoms			
Without pain	31 (72.09)	11 (84.61)	0.36
With pain	12 (27.91)	2 (15.39)	
Duration of the symptoms			
< 12 months	14 (34.14)	6 (46.15)	0.43
≥ 12 months	27 (65.86)	7 (53.85)	
Tumor size			
< 5 cm	12 (33.34)	7 (58.34)	0.12
≥ 5 cm	24 (66.66)	5 (41.66)	
Soft tissue infiltration			
No	22 (51.16)	6 (46.15)	0.75
Yes	21 (48.84)	7 (53.85)	
Localization			
Maxilla	4 (9.09)	3 (23.07)	0.17
Mandible	40 (99.91)	10 (76.93)	
Radiographic presentation			
Unilocular	19 (50)	4 (33.34)	0.57
Multilocular	19 (50)	6 (66.66)	
Rupture of the osseous cortical			
No	31 (79.48)	2 (18.18)	0.0001
Yes	8 (20.52)	9 (81.82)	
Histological type			
Plexiform	23 (52.27)	10 (76.92)	0.11
Others ²	21 (47.73)	3 (23.08)	
Treatment			
Resection	23 (52.27)	8 (61.54)	0.60
Enucleation	6 (13.62)	0	
Enucleation + Cryotherapy	15 (34.09)	5 (38.46)	
Recurrence			
No	28 (63.64)	9 (69.23)	0.71
Yes	16 (36.36)	4 (30.77)	

¹Presence of myofibroblast: (0) negative, (1) scanty, and (2) abundant.

²Others: follicular (n=17), acanthomatous (n=5), granular cell (n=1), and hemangiomatous (n=1) histological variants.

CASE REPORT

Synchronous ameloblastoma and orthokeratinized odontogenic cyst of the mandible

Eduardo Rodrigues Fregnani¹, Danyel Elias da Cruz Perez¹, Fernando Augusto Soares², Fábio Abreu Alves¹

Departments of ¹Stomatology and ²Pathology, A. C. Camargo Cancer Hospital, Sao Paulo, Brazil

The simultaneous occurrence of ameloblastomas with odontogenic cysts or other non-odontogenic lesions have already been described as combined lesions. However, we are unaware of any report in the English literature of simultaneous occurrence of ameloblastoma and orthokeratinized odontogenic cyst (OOC) occurring as completely distinct lesions. This report shows a case of synchronous ameloblastoma and OOC, located on posterior regions of the mandible, but in distinct sides.

J Oral Pathol Med (2006) 35: 573–5

Keywords: ameloblastoma; odontogenic lesions; orthokeratinized odontogenic cyst; synchronous

Case report

A 21-year-old white man was referred to the Department of Stomatology, AC Camargo Cancer Hospital, Sao Paulo, Brazil, complaining of a painful swelling on the right posterior mandible for 4 months of evolution. On extraoral examination, there was a facial asymmetry due to swelling on the region of right body of the mandible, painful to palpation. Intra-oral examination revealed an expansion of all vestibular bone cortical of the right body and ascending ramus of the mandible, measuring 7.0 × 5.0 cm of extension. The lesion presented hard consistency and the superficial mucosa was intact and presenting normal colour.

The panoramic radiography showed a large multilocular radiolucency of the right angle and ascending ramus of the mandible, which included a displaced impacted third molar and apparently caused disruption of cortical bone in the region of angle. Interestingly, on the left side of the mandible, it was observed a well-defined unilocular radiolucency on the body of the

mandible that was also associated with the impacted third molar (Fig. 1). Computerized tomography showed both lesions to be well circumscribed and defined, characterized by low-density masses involving the right and left ascending ramus, causing enlargement of lingual and vestibular bone cortical (Fig. 2). The main clinical and radiographic hypothesis of diagnosis was multiple odontogenic lesions, probably multiple odontogenic keratocysts (OK).

Incisional biopsy of both lesions was performed and histopathological diagnoses of the lesions were plexiform ameloblastoma (right side) and OK (left side). Under general anaesthesia, the patient underwent bilateral tumour resection and both were carried out conservatively with extensive bone curettage associated with exodontias of the right and left inferior second molars and both impacted third molars, without trans- or post-operative complications.

Microscopically, the lesion localized on the right mandible presented multiple coalescent cords and islands of epithelial cells where the peripheral cells resemble ameloblasts with inverted polarity of their nuclei, embedded in a loosely stroma (Fig. 3). The other lesion, sited on the left side, showed a cystic cavity lined by squamous and stratified epithelium with a thick layer of orthokeratin in all its extension. Prominent keratohyaline granules were observed adjacent to orthokeratin layer and no prominent basal cell layer was observed (Fig. 4). According to clinical, radiographic and histopathological features, the diagnosis of synchronous plexiform ameloblastoma (right mandible) and orthokeratinized odontogenic cyst (OOC; left mandible) was established.

After 8 years of clinical and radiographic follow up, no signs of recurrences are observed (Fig. 5).

Comments

According to the World Health Organization (1), OOC is a developmental cyst that could be compared with the uncommon orthokeratinized type of OK but only based on histology. However, OOC occurs mainly in patients during the fourth and fifth decades of life (OK occurs

Correspondence: Eduardo Rodrigues Fregnani, Department of Stomatology, A. C. Camargo Cancer Hospital, Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – CEP: 01509-010, São Paulo/SP, Brazil. Tel: +55 11 2189 5129, Fax: +55 11 2189 5083, E-mail: erfreg@terra.com.br

Accepted for publication March 28, 2006



Figure 1 Panoramic radiography showing a multilocular radiolucency of the right posterior mandible and on the left side a unilocular radiolucency on the body of the mandible associated with the impacted third molar.



Figure 2 Computerized tomography (coronal view) showing well circumscribed and defined lesions causing enlargement of lingual and vestibular bone cortical.

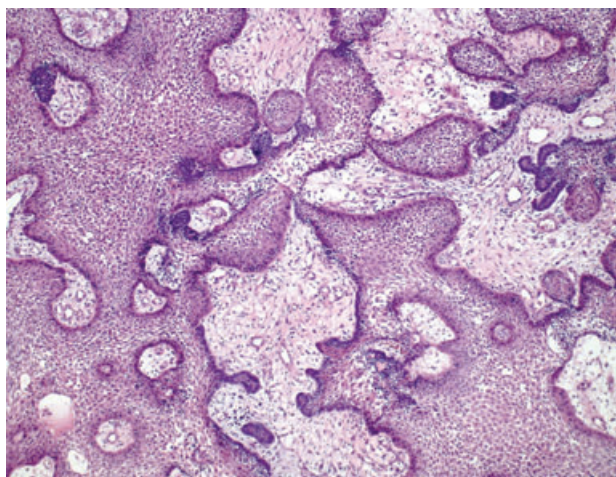


Figure 3 Plexiform ameloblastoma presenting multiple coalescent epithelial cell cords where the peripheral cells resemble ameloblasts (haematoxylin and eosin, original magnification, $\times 100$).

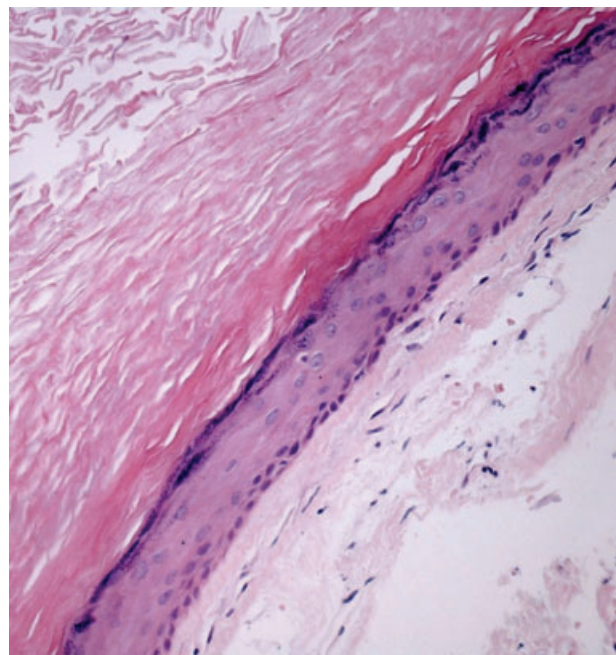


Figure 4 Histopathology of orthokeratinized odontogenic cyst showing a cystic cavity lined by squamous epithelium with a large layer of orthokeratin in all its extension (haematoxylin and eosin, original magnification, $\times 100$).



Figure 5 Panoramic radiography showing bone formation and no signs of recurrences after 8 years.

commonly in the second and third decades), and it has no tendency to recur and is not related to the nevroid basal cell carcinoma syndrome, as it is observed in OK. Moreover, OCC presents histopathological and immunohistochemical features different from OK, strongly suggesting that these are distinct entities (2). In our case, different from OK, the epithelial lining was fully recovered by non-corrugated orthokeratin, with evident granular layer extended through all epithelium, and no prominent basal cell layers arranged in palisaded were observed.

All previous reports that showed the occurrence of simultaneous odontogenic lesions or simultaneous odontogenic and non-odontogenic lesions, described combined lesions, some times called hybrid lesions (3–5). Differently, the case described here represents the

occurrence of two completely independent lesions. In our case, the presence of two mandibular radiolucent lesions led us to suspect multiple OKs. However, an incisional biopsy allowed a definitive diagnosis as two pathological distinct lesions before surgery.

The patient was treated by surgical excision associated with extensive curettage. The conservative approach to treatment of solid ameloblastomas is still a matter of critics, although recent studies showed good results (6). In our case, a long follow-up period (8 years) without recurrence confirms its success. Occurrence of two distinct and simultaneous odontogenic lesions in the same patient is extremely uncommon. To our knowledge, synchronous ameloblastoma and OOC occurring as distinct lesions have not been previously reported in the English language literature.

References

1. WHO Classification of Tumours. *Pathology & genetics, head and neck tumors*. Eds. Barnes E, Iveson JW, Reichart P, Sodransky D. Lyon, France: IARC Press, 2005.
2. Silva MJA, Sousa SOM, Correa L, Carvalhosa AA, Araujo VC. Immunohistochemical study of the orthokeratinized odontogenic cyst: a comparison with the odontogenic keratocyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; **94**: 732–7.
3. Siar CH, Ng KH. ‘Combined ameloblastoma and odontogenic keratocyst’ or ‘keratinising ameloblastoma’. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1993; **31**: 183–6.
4. Nishimura T, Nagakura R, Ikeda A, Kita S. Simultaneous occurrence of a squamous cell carcinoma and an ameloblastoma in the maxilla. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; **58**: 1297–300.
5. Yoon JH, Kim SG, Lee SH. Simultaneous occurrence of an odontogenic keratocyst and giant cell granuloma-like lesion in the mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; **33**: 615–7.
6. Nakamura N, Higuchi Y, Mitsuyasu T, Sandra F, Ohishi M. Comparison of long-term results between different approaches to ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; **93**: 13–20.