



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ESTUDO DA IMUNOEXPRESSIONÃO DOS TRANSPORTADORES DE GLICOSE 1 E 3
E DO ÍNDICE ANGIOGÊNICO EM TUMORES ODONTOGÊNICOS
CERATOCÍSTICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN**

RAFAELLA BASTOS LEITE

CAMPINA GRANDE/ PB

2014

RAFAELLA BASTOS LEITE

**ESTUDO DA IMUNOEXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES DE GLICOSE 1 E 3
E DO ÍNDICE ANGIOGÊNICO EM TUMORES ODONTOGÊNICOS
CERATOCÍSTICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

CAMPINA GRANDE/ PB

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

L536e Leite, Rafaella Bastos.

Estudo da imunoexpressão dos transportadores de Glicose 1 e 3 e do índice angiogênico em tumores odontogênicos ceratocísticos isolados e associados a Síndrome de Gorlin [manuscrito] / Rafaella Bastos Leite. - 2014.
82 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Departamento de Odontologia".

1. Tumor odontogênico ceratocístico. 2. Transportador de glicose. 3. Síndrome de Gorlin. I. Título.

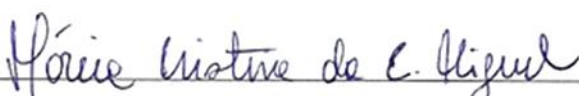
21. ed. CDD 616.31

RAFAELLA BASTOS LEITE

**ESTUDO DA IMUNOEXPRESSIONÃO DOS TRANSPORTADORES DE GLICOSE 1 E 3
E DO ÍNDICE ANGIOGÊNICO EM TUMORES ODONTOGÊNICOS
CERATOCÍSTICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN**

DATA DA DEFESA: 30/07/2014

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel/ UFRN

Membro titular (1º Examinador)



Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy/ UEPB

Membro titular (2ª Examinador)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka/ UEPB

Membro titular (Orientador)

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

*A **Deus**, pela presença constante na minha vida, pelo seu amor infinito mesmo que em alguns momentos não compreendidos por mim.*

*Aos Meus pais, **Rosa e Emilson**, pelo apoio ao longo da minha trajetória, por compartilharem dos meus sonhos sem medir esforços.*

*Ao meu marido, **Marco Antônio**, por seu amor e companheirismo em todas as horas, por compreender as minhas ausências ao longo desses dois anos.*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Rosa Maria Bastos e Antônio Emilson Leite**, por sempre terem me incentivado a estudar, jamais se furtando de me fornecer o material que fosse necessário para meus estudos, e por todo amor que sempre me devotaram.

Aos meus irmãos **Ana Katarina, Suyane e Edilson**, por toda paciência, compreensão e carinho que tiveram comigo.

Ao meu marido, **Marco Antônio**, que desde antes do meu ingresso na graduação em Odontologia, sempre esteve ao meu lado, ajudando-me a traçar e cumprir meus objetivos, e pelo amor paciente e puro que me oferece.

Aos meus avôs, **Edilson Leite e Geraldo**, que apesar de não estarem mais fisicamente presentes, deixaram, em suas passagens por aqui, um legado intelectual e moral que me orientam em minhas condutas. E as minhas avós, **Rivonilda e Tidinha**, por todo o amor e incentivo que me deram desde meus primeiros anos de vida.

Ao meu orientador, **Professor Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, trabalhando ao seu lado, descobri o universo fascinante da pesquisa científica e fui presenteada com seu exemplo de postura ética. E, principalmente, pelas suas lições, que me despertaram o interesse e a admiração pela Patologia, tornando a Odontologia ainda mais estimulante.

Ao **professor Dr. Gustavo Pina Godoy**, pelo exemplo de humildade, dedicação e competência.

A minha amiga, **Danielle**, por toda contribuição, paciência e dedicação nas etapas mais necessárias dessa pesquisa e do meu Mestrado.

A **Hellen**, uma amiga que conquistei nesses últimos anos, por sua imensa contribuição no meu trabalho. E por me ajudar nas horas de angústia acadêmica.

A minha amiga, **Ianny** pela amizade, por dividir os bons e maus momentos nesses últimos sete anos da nossa trajetória acadêmica.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, pelo aprendizado que me passaram ao longo da minha vida estudantil.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação: **Julyanna, Janaína, Thiara, Thaíse, Patrícia, Andréia, Ivison, Emmanuel, Kevan, Monalisa, Eveline e Marayza**, pelos momentos de alegria, ensinamento e aprendizado.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia Oral da UEPB, **Denize e Ana Luzia** pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

À **professora Dra. Lélia Batista de Souza** pelas contribuições para o desenvolvimento desse trabalho.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), por todas as oportunidades de aprendizado oferecidas durante a Graduação e Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

RESUMO

RESUMO

O tumor odontogênico ceratocístico (TOC) se destaca entre as demais lesões odontogênicas em virtude do comportamento biológico potencialmente agressivo e por sua associação, em alguns casos, à síndrome de Gorlin. Pesquisas tem sugerido um comportamento biológico mais agressivo para os TOCs associados à síndrome de Gorlin, em comparação aos TOCs isolados, caracterizado por maior capacidade de crescimento e infiltração óssea e maior tendência a recorrência. O presente estudo se propôs a avaliar, descritiva e comparativamente, a imunoposição dos transportadores de glicose-1 (GLUT-1) e -3 (GLUT-3) e o índice angiogênico (CD34) em TOCs isolados primários e recorrentes e TOCs associados à síndrome de Gorlin. A amostra foi composta por 21 TOCs isolados (14 primários e 7 recorrentes) e 14 TOCs associados à síndrome de Gorlin. A expressão dos GLUTs foi avaliada no componente epitelial das lesões, estabelecendo-se o percentual de células imunopositivas, de acordo com os escores: escore 0 (negativo), escore 1 ($\leq 25\%$ das células positivas), escore 2 (26% - 50% das células positivas), escore 3 (51% - 75% das células positivas) e escore 4 ($\geq 76\%$ das células positivas). Para o índice angiogênico, foi empregada a técnica da contagem microvascular (MVC), quantificando-se os microvasos imunomarcados pelo anticorpo anti-CD34. Em relação às medianas para os escores de imunopositividade para GLUT-1 e para o índice angiogênico, as comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para o GLUT-3, os dados obtidos com a avaliação da expressão epitelial desta proteína foram submetidos apenas à análise estatística descritiva. Possíveis correlações entre os escores de imunopositividade para GLUT-1 e o índice angiogênico nas lesões foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). A análise da imunoposição epitelial de GLUT-1 revelou predomínio de casos com escore 4 nos TOCs isolados primários ($n = 9$; 64,3%) e nos TOCs associados à síndrome de Gorlin ($n = 8$; 57,1%). Nos TOCs isolados recorrentes, foi identificada frequência discretamente maior para os casos com escores 4 ($n = 3$; 42,9%) e 2 ($n = 2$; 28,6%). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,406$). Em relação ao GLUT-3, todos os grupos estudados revelaram maior frequência de casos negativos. Os poucos TOCs positivos para GLUT-3 foram classificados como escore 1 ($\leq 25\%$ das células positivas), revelando uma baixa expressão desta proteína no componente epitelial. O número médio de microvasos foi de 63,80 nos TOCs isolados primários, 61,11 nos TOCs associados a síndrome de Gorlin e 65,88 nos TOCs isolados recorrentes, sem diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,965$). Os resultados do presente estudo sugerem que as diferenças no comportamento biológico de TOCs isolados e TOCs associados à síndrome de Gorlin não foram relacionadas com a expressão de GLUTs-1 e -3 ou com o índice angiogênico (CD34) nas lesões. A alta expressão de GLUT-1 em TOCs sugere um importante papel para esta proteína na captação de glicose pelas células epiteliais destes tumores.

Palavras-chave: Tumor odontogênico ceratocístico, transportador de glicose, GLUT-1, GLUT-3, índice angiogênico, CD34.

ABSTRACT

ABSTRACT

The keratocystic odontogenic tumor (KOT) stands out among the other odontogenic lesions in view of the potentially aggressive biological behavior and its association in some cases, with the Gorlin syndrome. Some studies have suggested a more aggressive biological behavior for KOTs associated with Gorlin syndrome, compared to isolated KOTs, characterized by greater growth capacity and bone infiltration and higher tendency to recur. The present study aimed to evaluate, descriptively and comparatively, by means of immunohistochemistry, the expression of glucose transporter-1 (GLUT-1) and -3 (GLUT-3) and the angiogenic index (CD34) in isolated primary and recurrent KOTs and in KOTs associated with Gorlin syndrome. The sample was composed by 21 isolated KOTs (14 primary and 7 recurrent) and 14 KOTs associated with Gorlin syndrome. The expression of GLUTs was evaluated in the epithelial component of the lesions, establishing the percentage of immunopositive cells, according to the scores: score 0 (negative), score 1 ($\leq 25\%$ of positive cells), score 2 (26% - 50% of positive cells), score 3 (51% - 75% of positive cells), and score 4 ($\geq 76\%$ positive cells). For the angiogenic index, the microvessel count (MVC) technique was applied, quantifying the microvessels immunoreactive to anti-CD34 antibody. Regarding the median scores for immunopositivity for GLUT-1 and the angiogenic index, comparisons between groups were performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test. For GLUT-3, the data obtained from the evaluation of epithelial expression of this protein were submitted to descriptive statistical analysis. Possible correlations between the scores of immunopositivity for GLUT-1 and angiogenic index in the lesions were evaluated using the Spearman correlation test. The level of significance was set at 5% ($p < 0.05$). The analysis of epithelial GLUT-1 immunoreactivity revealed predominance of score 4 in isolated primary KOTs ($n = 9$, 64.3%) and in KOTs associated with Gorlin syndrome ($n = 8$; 57.1%). In isolated recurrent KOTs, it was identified a slightly higher frequency of cases with scores 4 ($n = 3$; 42.9%) and 2 ($n = 2$; 28.6%). The nonparametric Kruskal-Wallis test showed no statistically significant difference between groups ($p = 0.406$). Regarding the GLUT-3, all groups showed higher frequency of negative cases. The few KOTs positive for GLUT-3 were classified as score 1 ($\leq 25\%$ of positive cells), showing a low expression of this protein in the epithelial component. The mean number of microvessels was 63.80 in isolated primary KOTs, 61.11 in KOTs associated with the Gorlin syndrome, and 65.88 in isolated recurrent KOTs, without significant differences between groups ($p = 0.965$). The results of this study suggest that the differences in biological behavior of isolated KOTs and KOTs associated with Gorlin syndrome may not be related to the expression of GLUTs-1 and -3, or to the angiogenic index in the lesions. The high expression of GLUT-1 in KOTs suggests an important role for this protein in glucose uptake by the epithelial cells of these tumors.

Key-words: Keratocystic odontogenic tumor, Glucose transporter, GLUT-1, GLUT-3, angiogenic index, CD34.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Quadro 1. Critérios diagnósticos para síndrome de Gorlin, de acordo com Evans <i>et al.</i> (1993).....	29
Quadro 2. Elenco de variáveis analisadas no estudo.....	31
Quadro 3. Especificidade, nº do catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	32
Figura 1. (A) Imunorreatividade para GLUT-1 no componente epitelial (score 4) de TOC associado à síndrome de Gorlin (Advance, 400×). (B) Fotomicrografia demonstrando a imunoexpressão de GLUT-1 no componente epitelial (score 2) de TOC isolado primário (Advance, 400×). (C) Fotomicrografia revelando a imunoexpressão de GLUT-3 no componente epitelial (score 1) de TOC isolado recorrente. (D) Imunorreatividade para GLUT-3 no componente epitelial (score 1) de TOC associado à síndrome de Gorlin (Advance, 400×). (E) Vasos imunomarcados com anticorpo anti-CD34 em espécime de TOC associado à síndrome de Gorlin (Advance, 100×). (F) Vasos de calibres variados, imunomarcados com anticorpo anti-CD34, em espécime de TOC isolado primário (Advance, 100×).....	53

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Especificidade, nº do catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários.....	56
Tabela 2. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística (<i>p</i>) para os escores de imunexpressão epitelial de GLUT-1, em relação aos grupos de TOCs.....	56
Tabela 3. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística (<i>p</i>) para o índice angiogênico (CD34), em relação aos grupos de TOCs.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **ATP:** Do inglês *Adenosine triphosphate*, traduzido como trifosfato de adenosina.
- **BSA:** Do inglês *bovine serum albumin*, traduzido como albumina de soro bovino.
- **CD34:** Do inglês *cluster of differentiation 34*, traduzido como grupamento de diferenciação 34.
- **GLI:** Refere-se à família de fatores de transcrição GLI.
- **GLUT 1-14:** Diferentes isoformas dos transportadores de glicose.
- **GLUT:** Do inglês *glucose transporter*, traduzido como transportador de glicose.
- **kDa:** Do inglês *kilodalton*, traduzido como quilodálton.
- **Mm:** miliMol.
- **MMPs:** Do inglês *matrix metalloproteinases*, traduzido como metaloproteinases de matriz.
- **MVC:** Do inglês *microvessel count*, traduzido como contagem microvascular.
- **MVD:** Do inglês *microvessel density*, traduzido como densidade microvascular.
- **MVV:** Do inglês *microvessel volume*, traduzido como volume microvascular.
- **OMS:** Organização Mundial de Saúde.
- **P16:** Do inglês *protein 16*, refere-se ao gene P16 ou à proteína P16
- **PBS:** Do inglês *phosphate buffered saline*, traduzido como tampão fosfato-salino.
- **PTCH:** Do inglês *patched*, refere-se ao gene *PTCH* ou à proteína PTCH.
- *ptch:* Do inglês *patched*, refere-se ao gene *ptch*.
- **SHH:** Do inglês *Sonic hedgehog*, refere-se ao gene *SHH*, à proteína SHH ou à via de sinalização SHH.
- **SMO:** Do inglês *Smoothened*, refere-se ao gene *SMO* ou à proteína SMO.

- **TOC:** Tumor odontogênico ceratocístico
- **TRIS-HCl:** Tris-hidroximetil-aminometano.
- **TSLC1:** Do inglês *tumor suppressor in lung cancer 1*, refere-se ao gene TSLC1.
- **UEPB:** Universidade Estadual da Paraíba
- **UNIFOR:** Universidade de Fortaleza

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Página
1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	22
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 METODOLOGIA	29
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	29
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	29
3.3 POPULAÇÃO.....	29
3.4 AMOSTRA	29
3.4.1 Critérios de inclusão	30
3.4.2 Critérios de exclusão	31
3.5 VARIÁVEIS.....	31
3.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	32
3.6.1 Método imuno-histoquímico	32
3.6.2 Análise imuno-histoquímica	34
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4 ARTIGO	37
4.1 APRESENTAÇÃO.....	37
4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	66
ANEXOS	69

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O tumor odontogênico ceratocístico (TOC) tem se apresentado como uma das entidades patológicas mais controversas da região oral e maxilofacial (MENDES; CARVALHO; VAN DER WALL, 2010). Em comparação com outras lesões odontogênicas, os TOCs se destacam pelo comportamento clínico potencialmente agressivo, com tendência a recorrências, e por estarem associados, em alguns casos, à síndrome de Gorlin (MATEUS *et al.*, 2008; SUYAMA *et al.*, 2009; FIGUEROA *et al.*, 2010; HAKIM *et al.*, 2011).

O primeiro relato da Síndrome de Gorlin é atribuído a Jarish (1894), o qual descreveu o caso de um paciente com numerosos carcinomas basocelulares, escoliose e dificuldades de aprendizagem. Posteriormente, Howell e Caro (1959) associaram outras desordens sistêmicas e anomalias cutâneas aos achados reportados por Jarish (1894) e, subsequentemente, Gorlin e Goltz (1960) caracterizaram a condição como uma verdadeira Síndrome, destacando como achados principais: múltiplos carcinomas basocelulares, TOCs e anomalias esqueléticas.

O diagnóstico da Síndrome de Gorlin permanece um processo baseado eminentemente na análise de dados clínicos e radiográficos (HIGH; ZEDAN, 2005; TAYLOR; COOK; LEATHERBARROW, 2006; GARCÍA DE MARCOS *et al.*, 2009). Dentre os sistemas utilizados para diagnóstico desta síndrome, destacam-se os propostos por Evans *et al.* (1993) e Kimonis *et al.* (1997), os quais elencam critérios principais e secundários. Independente do sistema utilizado, a Síndrome é diagnosticada ao se observar dois achados principais ou um achado principal associado a dois achados secundários.

A Síndrome de Gorlin revela padrão de transmissão autossômico dominante, com penetrância completa e expressão variável (LO MUZIO, 2008; LI *et al.*, 2010; VISIOLI *et al.*, 2010). Contudo, 20% a 60% dos indivíduos afetados não possuem histórico familiar de associação a síndrome, possivelmente representando novas mutações (MANFREDI *et al.*, 2004; TAYLOR; COOK; LEATHERBARROW, 2006; LO MUZIO, 2008).

Estudos moleculares sugeriram que mutações no gene localizado no cromossomo 9 (q22.3-q31) seriam responsáveis pelo desenvolvimento da Síndrome de Gorlin. Por meio de clonagens posicionais, constatou-se que o gene localizado nesta região consistia no homólogo humano do gene *ptch* da mosca *Drosophila*, sendo, desta forma, designado de gene *PTCH* (MANFREDI *et al.*, 2004; PASTORINO *et al.*, 2005). A proteína PTCH, oriunda da

transcrição do gene *PTCH*, atua como receptor na via de sinalização que envolve as proteínas SHH e SMO, produtos das transcrições dos genes homônimos, e uma família de fatores de transcrição, denominados de GLI (EPSTEIN, 2008; KIM *et al.*, 2009).

Estudos tem reportado que os TOCs associados à síndrome de Gorlin, em comparação aos TOCs isolados, apresentam maior capacidade de crescimento e infiltração óssea (KIMI *et al.*, 2001) e maior tendência à recorrência (AHN *et al.*, 2004; MANFREDI *et al.*, 2004; DÍAZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2005). Resultados provenientes de investigações sobre a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e a apoptose, a remodelação óssea e a componentes da matriz extracelular, suportam a existência de um comportamento biológico distinto entre TOCs isolados e associados à síndrome de Gorlin (KIMI *et al.*, 2001; KOLÁŘ *et al.*, 2006; CAVALCANTE *et al.*, 2008; LEONARDI *et al.*, 2010; LEONARDI *et al.*, 2013; HONG *et al.*, 2014).

O transporte de glicose é de fundamental importância para a transformação energética celular. O meio utilizado pela membrana plasmática no transporte de glicose é uma característica comum a várias células, desde as menos complexas até às mais especializadas. A via glicolítica é empregada por vários tecidos para degradação de glicose e posterior fornecimento de energia, na forma de trifosfato de adenosina (ATP), como também de intermediários para outras vias metabólicas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010; ABBAS 2012).

O GLUT 1 foi o primeiro transportador de glicose a ser isolado. Tal proteína foi localizada na linhagem celular HepG2, derivada de hepatoma humano, a qual expressa características similares às dos hepatócitos (MUECKLER *et al.*, 1985). O GLUT 1, também denominado de transportador de glicose de eritrócitos, apresenta peso molecular de 45-55 quilodáltons (kDa) e é expresso, usualmente em pequenas concentrações, em vários tecidos adultos e fetais (THORENS; MUECKLER, 2009; BRAUER *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013; GRIMM *et al.*, 2014). O GLUT 1 é o transportador de glicose indispensável em células normais quando os níveis circulantes de glicose estão na faixa de 1-5 mM.

A expressão do GLUT 3 foi observada em várias células humanas com necessidade de glicose bem específicas, abrangendo espermatozoides, embriões pré-implantados, células brancas do sangue e uma gama de linhagens celulares de carcinomas. O gene que codifica o GLUT-3 localiza-se no cromossomo 12p13.3 (MUECKLER *et al.*, 1994; MENESES *et al.*, 2007; TSUKIOKA *et al.*, 2007; AYALA *et al.*, 2010) e sua superexpressão foi observada em lesões malignas localizadas no ovário (YOUNES, *et al.*, 1997), pulmão (ITO *et al.*, 1998), intestino (NOGUCHI *et al.*, 2000), mama (MATSUZU *et al.*, 2004) e na tireoide (SIMPSON

et al., 2008).

Em cada tipo celular, a translocação de GLUT-3 acontece em resposta ao acréscimo substancial na exigência de energia durante a ativação celular. No caso das plaquetas, por exemplo, a ativação da trombina induz uma cascata de eventos dependentes de energia, processo que rapidamente triplica o consumo de ATP, levando a sua escassez na mitocôndria. Este é repostado através da glicólise e, assim, a diminuição no ATP disponível beneficiará a assimilação de glicose por intermédio do GLUT-3 (MACHEDA; ROGERS; BEST, 2005).

A formação de novos vasos sanguíneos pode ocorrer pelos processos de vasculogênese ou angiogênese. A vasculogênese baseia-se na criação de vasos sanguíneos *de novo* a partir de precursores celulares, os quais se diferenciam em células endoteliais, formam lumens e originam uma rede vascular primitiva. Por outro lado, a angiogênese representa a formação de novos vasos sanguíneos a partir da migração e proliferação de células endoteliais da vasculatura pré-existente (CLAPP *et al.*, 2009; NIKITENKO, 2009; UCUZIAN *et al.*, 2010).

No que se refere às técnicas de mensuração da angiogênese, utilizadas na avaliação dos tecidos submetidos ao processamento imuno-histoquímico, a avaliação dos trabalhos existentes na literatura aponta como mais constantemente empregadas as da densidade microvascular (MVD), do volume microvascular (MVV) e da contagem microvascular (MVC) (HANNEN; RIEDIGER, 2004; EL-GAZZAR; MACCLUSKEY; OGDEN, 2005; FREITAS *et al.*, 2005; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007; DAVEY *et al.*, 2008).

A técnica da MVD foi descrita por Weidner *et al.* (1991), em um estudo com carcinomas de mama. Sob microscopia de luz, com aumentos de 40× e 100×, são identificadas três áreas de maior vascularização no espécime. Em seguida, sob aumento de 200×, são quantificados os microvasos encontrados em cada uma destas áreas. O resultado, designado de MVD alta, fundamenta-se no maior número de microvasos presentes em uma destas áreas. Dessa forma, não é estabelecido um valor médio, sendo o resultado apresentado sob a forma de microvasos/mm².

A posteriori, embasada na metodologia descrita por Weidner *et al.* (1991), foi recomendada uma variação da MVD alta, designada de MVD média (SCHOR *et al.*, 1998a; SCHOR *et al.*, 1998b). Nesta técnica, sob aumento de 200×, são quantificados os microvasos em 10 – 15 campos microscópicos aleatórios. Com os valores obtidos em cada um destes campos é estabelecido o número médio de microvasos do espécime. Na análise da MVD média, os resultados são apresentados sob a forma de média de microvasos ± desvio padrão.

O MVV constitui-se de uma técnica estereológica para determinação do volume dos

microvasos. Neste processo, sob microscopia de luz (aumento de 200×), com o auxílio de uma ocular contendo um retículo com 100 pontos marcados, são avaliados 15 campos microscópicos aleatórios, perfazendo um total de 1.500 pontos. Em cada um destes campos, são quantificados os vasos que coincidem com os pontos do retículo. Finalmente, o resultado é expresso em porcentagem de volume (PAZOUKI *et al.*, 1997; SCHOR *et al.*, 1998a).

A técnica da MVC foi descrita por Maeda *et al.* (1995), em estudo com carcinomas gástricos. Sob microscopia de luz, com aumento de 5×, são identificadas cinco áreas de maior vascularização no espécime. Em seguida, sob aumento de 200×, são quantificados os microvasos presentes em cada uma destas áreas. Nesta análise, o resultado alcançado é exposto como o número médio de microvasos em cada secção histológica. Além de constituir uma técnica de fácil execução (FREITAS *et al.*, 2005), a MVC se destaca por apresentar relevância prognóstica em diversos tumores (NANASHIMA *et al.*, 2008; NANASHIMA *et al.*, 2009).

A angiogênese e os fatores envolvidos neste processo têm se constituído objeto de investigações em inúmeras lesões, correlacionando-se com o prognóstico. Numericamente, as pesquisas realizadas com lesões císticas (EL-LABBAN; AGHABEIGI, 1990; TSAI *et al.*, 2002; LEONARDI *et al.*, 2003; GRAZIANI *et al.*, 2006; JURISIC *et al.*, 2008; NONAKA *et al.*, 2008; MITROU *et al.*, 2009; RUBINI *et al.*, 2010) são superiores às desenvolvidas com tumores odontogênicos (KUMAMOTO; OOYA, 2006; ALAEDDINI *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2009; NONAKA *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo se propôs a avaliar, descritiva e comparativamente, por meio de imuno-histoquímica, a expressão dos GLUTs-1 e -3 e o índice angiogênico em TOCs isolados primários e recorrentes e TOCs associados à síndrome de Gorlin, com a finalidade de fornecer subsídios para melhor compreensão das diferenças, descritas na literatura, no comportamento biológico entre lesões isoladas e associadas a esta síndrome.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os escores de imunoexpressão dos GLUTs-1 e -3 no componente epitelial das lesões e compará-los de acordo com os grupos de estudo (TOCs isolados primários, TOCs isolados recorrentes e TOCs associados à síndrome de Gorlin);
- Determinar os índices angiogênicos (CD34) nas lesões, por meio da técnica da MVC, e compará-los de acordo com os grupos de estudo (TOCs isolados primários, TOCs isolados recorrentes e TOCs associados à síndrome de Gorlin);
- Estabelecer correlações entre as imunoexpressões dos GLUTs-1 e -3 e o índice angiogênico nos TOCs.

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A presente pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e submetida à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Conforme parecer nº 631.261 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo desenvolvido consistiu em uma pesquisa de caráter observacional, com corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das expressões dos GLUTs-1 e -3, e do índice angiogênico (CD34), por meio da imuno-histoquímica, em TOCs primários e recorrentes e TOCs associados a síndrome de Gorlin.

3.3 POPULAÇÃO

A população objeto do presente estudo foi constituída por todos os casos de TOCs, diagnosticados e arquivados nos Laboratórios de Patologia Oral da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e do Departamento de Odontologia da UEPB.

3.4 AMOSTRA

A amostra foi constituída por 14 casos de TOCs isolados primários, 14 casos de TOCs associados à síndrome de Gorlin e 7 casos de TOCs isolados recorrentes, selecionados

de acordo com os critérios de inclusão. Todos emblocados em parafina, obtidos nos arquivos dos Serviços referenciados anteriormente.

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de TOCs que apresentavam material biológico suficiente para realização do estudo imuno-histoquímico e cujos blocos de parafina estivessem em bom estado de conservação. Para constituição do grupo de lesões sindrômicas, foram selecionados apenas os casos cujas fichas clínicas dos pacientes, mantidas nos Serviços referenciados anteriormente, contivessem informações suficientes para a confirmação do diagnóstico da síndrome de Gorlin, conforme critérios propostos por Evans *et al.* (1993) (QUADRO 1).

Quadro 1. Critérios diagnósticos para síndrome de Gorlin, de acordo com Evans *et al.* (1993).

Critérios Principais
<ul style="list-style-type: none"> • Mais de dois carcinomas de células basais, sendo um destes antes dos 30 anos de idade; ou mais de dez nevos basocelulares • Qualquer ceratocisto odontogênico (diagnosticado histologicamente) ou cisto ósseo polioestótico • Três ou mais fossetas palmares ou plantares • Calcificações ectópicas em pacientes abaixo dos 20 anos de idade (calcificações lamelares ou precoces da foíce do cérebro) • História familiar positiva para síndrome de Gorlin
Critérios Secundários
<ul style="list-style-type: none"> • Anomalias esqueléticas congênitas (costelas bífidas, fusionadas ou ausentes; vértebras bífidas ou fusionadas) • Circunferência occípito-frontal maior que o percentil 97, com bosselamento frontal • Fibromas ovarianos ou cardíacos • Meduloblastomas • Cistos linfo-mesentéricos • Malformações congênitas como fendas lábio-palatais, polidactilismo e anomalias oculares (catarata e colobomas)

Para o grupo dos TOCs isolados recorrentes, a seleção de casos foi baseada em informações sobre a localização anatômica e a intervenção cirúrgica instituída, coletadas a partir das fichas clínicas dos pacientes. Foram incluídos no grupo de lesões recorrentes, apenas os casos situados na mesma localização anatômica da lesão primária. Além disso, só fizeram parte do grupo das lesões recorrentes, os casos cujas lesões primárias tivessem sido submetidas à enucleação, enucleação com terapia adjuvante, ressecção ou biópsia excisional.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa os casos provenientes de biópsia incisional e os casos que se apresentavam, após análise histopatológica, secundariamente inflamados.

3.5 VARIÁVEIS

As variáveis independentes e dependentes, analisadas no presente estudo, estão listadas no Quadro 2.

Quadro 2. Elenco de variáveis analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA	TIPO
TOC	Classificação da lesão considerando sua natureza (primária ou recorrente) e associação ou não com a síndrome de Gorlin.	- Isolado primário - Isolado recorrente - Síndrômico	Independente
GLUT-1	Marcação membranar e/ ou citoplasmática para GLUT-1 em células epiteliais.	Percentual de células positivas	Dependente
GLUT-3	Marcação membranar e/ ou citoplasmática para GLUT-3 em células epiteliais.	Percentual de células positivas	Dependente
CD34	Marcação citoplasmática para CD34 em microvasos presentes no tecido conjuntivo.	Média de vasos imunomarcados	Dependente

3.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

3.6.1 Método imuno-histoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*ADVANCETM HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), utilizando anticorpos monoclonais anti-GLUT-1, anti-GLUT-3 e anti-CD34 (QUADRO 3).

Quadro 3. Especificidade, nº do catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Nº catálogo	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
GLUT-1	GTX 15309	Gene Tex	1:400	Citrato, pH 6,0 Pascal, 121°C, 3 min	60 minutos
GLUT-3	GTX 15311	Gene Tex	1:400	Citrato, pH 6,0 Pascal, 121°C, 3 min	60 minutos
CD34	QBEnd-10	Dako	1:50	Tris-EDTA, pH 9,0 Pascal, 3 min	<i>Overnight</i> (18 horas)

Como controle interno positivo, foram utilizados os eritrócitos para o anticorpo anti-GLUT-1 e as células inflamatórias para o anticorpo anti-GLUT-3. Para o anticorpo anti-CD34, o controle positivo foi realizado com cortes histopatológicos de granuloma piogênico. O controle negativo, para todos os anticorpos, consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);
- ⇒ Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- ⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)
- ⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 3);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpos primários, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário (*ADVANCETM HRP Link*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*ADVANCETM HRP Enzyme*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (7 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico 80°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em resina *Permout*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

3.6.2 Análise imuno-histoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imuno-histoquímico, cada espécime foi analisado sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por dois examinadores previamente treinados. Destaca-se que a análise imuno-histoquímica foi realizada sem que os examinadores tivessem conhecimento se o caso em questão referia-se a uma lesão associada à síndrome de Gorlin ou isolada.

A análise da expressão dos GLUTs-1 e -3 foi realizada no componente epitelial das lesões, com base em uma adaptação da metodologia empregada no estudo de Nonaka *et al.* (2008). Sob aumento de 100×, o componente epitelial das lesões foi avaliado em toda sua extensão, estabelecendo-se o percentual de células positivas, de acordo com os seguintes escores: escore 0 (negativo), escore 1 ($\leq 25\%$ das células positivas), escore 2 (26% - 50% das células positivas), escore 3 (51% - 75% das células positivas) e escore 4 ($\geq 76\%$ das células positivas). Os dados obtidos com a avaliação da imunexpressão dos GLUTs no componente epitelial das lesões foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE A).

O índice angiogênico foi avaliado por meio da determinação da MVC, adaptando-se a metodologia empregada no estudo de Maeda *et al.* (1995). Sob aumento de 100×, imediatamente abaixo do revestimento epitelial, foram selecionados 5 campos de maior imunorreatividade ao anticorpo anti-CD34. Posteriormente, sob aumento de 200×, foram quantificados os microvasos em cada um destes campos. Os valores obtidos em cada campo foram somados, estabelecendo-se o número total de microvasos. Finalmente, com este último

dado, foi calculada a média de microvasos para cada caso. Baseado nos critérios descritos por Weidner *et al.* (1991), foram considerados como microvasos as células imunopositivas isoladas, bem como os grupos de células imunopositivas, independente da presença de um lúmen conspícuo. Além disso, grupos de células endoteliais isoladas que poderiam constituir secções distintas do mesmo microvaso foram considerados como microvasos distintos. Os dados obtidos com a avaliação do índice angiogênico foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE B).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises imuno-histoquímicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Em relação aos escores de imunoexpressão dos GLUTs no componente epitelial das lesões, a comparação das medianas para o GLUT-1, entre TOCs isolados primários, TOCs isolados recorrentes e TOCs síndrômicos, foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em virtude do pequeno número de casos imunopositivos para GLUT-3, os dados obtidos com a avaliação da expressão epitelial desta proteína foram submetidos apenas à análise estatística descritiva.

Para avaliação do índice angiogênico, os dados obtidos com a MVC foram submetidos à análise de distribuição, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, a comparação das medianas para o índice angiogênico entre TOCs isolados primários, TOCs isolados recorrentes e TOCs associados à síndrome de Gorlin foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Correlações entre os escores de imunoexpressão do GLUT-1 e o índice angiogênico nas lesões foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman.

Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 ARTIGO

4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução deste projeto, 1 artigo é apresentado nesta dissertação: Estudo da imunexpressão dos transportadores de glicose 1 e 3 e do índice angiogênico em tumores odontogênicos ceratocísticos isolados e associados à síndrome de Gorlin. O referido artigo será submetido ao periódico *Archives of Oral Biology* (Qualis Odontologia A2/ Fator de Impacto: 1.549), cujas normas para submissão de trabalhos se encontram no Anexo B.

4.1 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Estudo da imunexpressão dos transportadores de glicose 1 e 3 e do índice angiogênico em tumores odontogênicos ceratocísticos isolados e associados à síndrome de Gorlin

Rafaella Bastos Leite¹, Roberta Barroso Cavalcante², Renato Luiz Maia Nogueira³, Lélia Batista de Souza⁴, Leão Pereira Pinto⁴, Cassiano Francisco Weege Nonaka⁵

¹*Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, PB, Brasil.*

²*Professora do Curso de Odontologia, Universidade de Fortaleza, UNIFOR, Fortaleza, CE, Brasil.*

³*Professor do Departamento de Cirurgia Oral, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, CE, Brasil.*

⁴*Professor do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, RN, Brasil.*

⁵*Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, PB, Brasil.*

Autor correspondente:

Cassiano Francisco Weege Nonaka, DDS, PhD

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Juvêncio Arruda, s/n – Bodocongó – Campina Grande – PB – Brasil

CEP 58429-600 Phone/ Fax: +55 83 3315-3471

e-mail:cfwnonaka@gmail.com

Resumo

Objetivo: Analisar a expressão dos transportadores de glicose-1 (GLUT-1) e -3 (GLUT-3) e o índice angiogênico em tumores odontogênicos ceratocísticos (TOCs) isolados primários, TOCs isolados recorrentes e TOCs associados à síndrome de Gorlin.

Material e Métodos: Trinta e cinco casos de TOCs (14 isolados primários, 7 isolados recorrentes e 14 associados à Síndrome de Gorlin) foram analisados por imuno-histoquímica, utilizando anticorpos anti-GLUT-1 e anti-GLUT-3. O índice angiogênico foi determinado por contagem microvascular (MVC), utilizando o anticorpo anti-CD34.

Resultados: A análise do GLUT-1 revelou uma alta imunoe expressão epitelial desta proteína nos TOCs, sem diferenças estatisticamente significativas entre lesões isoladas primárias e recorrentes e associadas à síndrome de Gorlin ($p = 0,406$). Em relação ao GLUT-3, todos os grupos estudados revelaram maior frequência de casos negativos. Os poucos TOCs positivos para GLUT-3 revelaram baixa expressão desta proteína no componente epitelial. O número médio de microvasos foi de 63,80 nos TOCs isolados primários, 61,11 nos TOCs associados à síndrome de Gorlin e 65,88 nos TOCs isolados recorrentes ($p = 0,965$). Para todos os grupos, não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre a expressão de GLUT-1 e o índice angiogênico ($p > 0,05$).

Conclusão: Os resultados do presente estudo sugerem que as diferenças relatadas no comportamento biológico de TOCs isolados e TOCs associados à síndrome de Gorlin não foram relacionadas com a expressão de GLUTs-1 e -3 ou com o índice angiogênico nas lesões. A alta expressão de GLUT-1 em TOCs sugere um importante papel para esta proteína na captação de glicose pelas células epiteliais destes tumores.

Palavras-chave

Tumor odontogênico ceratocístico, GLUT-1, GLUT-3, CD34, Imuno-histoquímica.

Introdução

O tumor odontogênico ceratocístico (TOC), classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um neoplasma cístico benigno¹, se destaca entre as demais lesões odontogênicas em virtude do comportamento biológico potencialmente agressivo, com tendência a recorrências, e por se apresentar associado, em alguns casos, à síndrome de Gorlin²⁻⁵.

Estudos têm sugerido que os TOCs isolados, em comparação aos TOCs associados à síndrome de Gorlin, possuem menor capacidade de crescimento e infiltração⁶ e menor tendência à recorrência⁷⁻⁸. Análises sobre a composição da matriz extracelular¹⁰ e sobre a expressão de proteases e de proteínas envolvidas no ciclo celular, na apoptose e na remodelação óssea^{6,11-15}, alicerçam a existência de um comportamento biológico distinto entre TOCs isolados e associados à síndrome de Gorlin.

A expressão de proteínas envolvidas no transporte da glicose e a formação de novos vasos sanguíneos são eventos importantes para o aumento da absorção de nutrientes em células metabolicamente ativas¹⁶. Dentre as diversas proteínas envolvidas na captação de glicose para o meio intracelular, merecem destaque os transportadores de glicose-1 (GLUT-1) e -3 (GLUT-3), cujas expressões já foram identificadas em diversos tecidos humanos normais, bem como em neoplasias malignas¹⁷⁻²⁰. Nestas últimas, a superexpressão destes GLUTs tem sido associada a um comportamento biológico mais agressivo das lesões, caracterizado pela presença de metástase linfonodal, recorrência da doença e menores taxas de sobrevivência dos pacientes^{16, 21-24}.

A formação de novos vasos sanguíneos a partir de estruturas vasculares pré-existentes, denominada angiogênese, envolve a participação de diversas vias de sinalização intracelulares, com funções tanto pró-angiogênicas como antiangiogênicas²⁵⁻²⁷. Este processo complexo, que pode ser mensurado pela determinação do índice angiogênico, é importante para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos, tanto em processos fisiológicos como patológicos, incluindo embriogênese, cicatrização e progressão tumoral²⁸⁻³⁰.

A importância da angiogênese tem sido destacada no desenvolvimento e progressão de cistos e tumores odontogênicos, incluindo os TOCs³¹⁻³⁵. De acordo com alguns desses estudos, lesões odontogênicas com comportamento biológico mais agressivo apresentam maior expressão de proteínas pró-angiogênicas, bem como maior índice angiogênico³³⁻³⁵. Por outro lado, até o momento, não há pesquisas na literatura em língua inglesa sobre a expressão dos GLUTs-1 e -3 em lesões odontogênicas (Pubmed Database – Acesso em 22/07/2014).

Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar, descritiva e comparativamente, por meio de imuno-histoquímica, a expressão dos GLUTs-1 e -3 e o índice angiogênico em TOCs isolados primários e recorrentes e TOCs associados à síndrome de Gorlin, com a finalidade de fornecer subsídios para melhor compreensão das diferenças, descritas na literatura, no comportamento biológico entre lesões isoladas e associadas a esta síndrome.

Materiais e métodos

Trinta e cinco espécimes de TOC, incluindo 14 TOCs isolados primários, 7 TOCs isolados recorrentes e 14 TOCs associados à síndrome de Gorlin, todos emblocados em parafina, obtidos nos arquivos dos Laboratórios de Patologia Oral da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), foram selecionados para o presente estudo, de acordo com critérios descritos abaixo.

O tamanho da amostra foi definido pelo número de casos disponíveis nos arquivos dos laboratórios referenciados anteriormente. Em todos os casos, o diagnóstico histopatológico foi baseado na terceira classificação dos tumores odontogênicos da OMS³⁶. Todos os pacientes com síndrome de Gorlin foram diagnosticados de acordo com os critérios propostos por Evans et al.³⁷ e apresentavam múltiplos TOCs. Os pacientes com TOCs isolados apresentavam lesões únicas e foram submetidos à análise clínica e radiográfica para excluir a presença de outras manifestações da síndrome de Gorlin. Foram incluídos na amostra, apenas os casos de TOCs que apresentaram material biológico suficiente para realização do estudo imuno-histoquímico. Foram excluídos da pesquisa os casos de TOCs que se apresentavam, após exame histopatológico, secundariamente inflamados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB, Campina Grande, Brasil.

Imuno-histoquímica

A partir do material fixado em formol a 10% e emblocado em parafina, cortes com 3µm de espessura foram obtidos e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano. Os cortes teciduais foram desparafinizados e, em seguida, imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Os cortes teciduais foram então lavados em tampão fosfato-salino (PBS). Os clones, diluições e recuperações antigênicas dos anticorpos anti-GLUT-1, anti-GLUT-3 e anti-CD34 são demonstrados na Tabela 1. Em sequência, os cortes teciduais foram incubados com os anticorpos primários em câmara úmida. Posteriormente, os cortes teciduais foram submetidos à dupla lavagem com PBS e tratados com complexo à base de polímero (*ADVANCETM HRP*,

Dako, Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi visualizada através da imersão dos cortes teciduais em diaminobenzidina (*Liquid DAB+*, Dako, Carpinteria, CA), resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Finalmente, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Mayer e montados com lamínula.

Como controle interno positivo, foram utilizados os eritrócitos para o anticorpo anti-GLUT-1 e as células inflamatórias para o anticorpo anti-GLUT-3. Para o anticorpo anti-CD34, o controle positivo foi realizado com cortes histopatológicos de granuloma piogênico. Para o controle negativo, no protocolo descrito anteriormente, os anticorpos primários foram substituídos por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

Análise imuno-histoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imuno-histoquímico, cada espécime foi analisado sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por dois examinadores previamente treinados. Destaca-se que a análise imuno-histoquímica foi realizada sem que os examinadores tivessem conhecimento se o caso em questão referia-se a uma lesão associada à síndrome de Gorlin ou isolada primária ou recorrente.

A análise da expressão dos GLUTs-1 e -3 foi realizada no componente epitelial das lesões, com base em uma adaptação da metodologia empregada no estudo de Nonaka et al.³². Sob aumento de 100×, o componente epitelial das lesões foi avaliado em toda sua extensão, estabelecendo-se o percentual de células positivas, de acordo com os seguintes escores: escore 0 (negativo), escore 1 ($\leq 25\%$ das células positivas), escore 2 (26% - 50% das células positivas), escore 3 (51% - 75% das células positivas) e escore 4 ($\geq 76\%$ das células positivas).

O índice angiogênico foi avaliado por meio da determinação da MVC, adaptando-se a metodologia empregada no estudo de Maeda et al.³⁸. Sob aumento de 100×, imediatamente abaixo do revestimento epitelial, foram selecionados 5 campos de maior imunorreatividade ao anticorpo anti-CD34. Posteriormente, sob aumento de 200×, foram quantificados os microvasos em cada um destes campos. Os valores obtidos em cada campo foram somados, estabelecendo-se o número total de microvasos. Finalmente, com este último dado, foi calculada a média de microvasos para cada caso. Foram considerados como microvasos as células imunopositivas isoladas, bem como os grupos de células imunopositivas, independente da presença de um lúmen conspícuo. Além disso, grupos de células endoteliais

isoladas que poderiam constituir secções distintas do mesmo microvaso foram considerados como microvasos distintos³⁹.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Em relação aos escores de imunoposição dos GLUTs no componente epitelial das lesões, a comparação das medianas para o GLUT-1, entre TOCs isolados primários, TOCs isolados recorrentes e TOCs síndromicos, foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em virtude do pequeno número de casos imunopositivos para GLUT-3, os dados obtidos com a avaliação da expressão epitelial desta proteína foram submetidos apenas à análise estatística descritiva.

Para avaliação do índice angiogênico, os dados obtidos com a MVC foram submetidos à análise de distribuição, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, a comparação das medianas para o índice angiogênico entre TOCs isolados primários, TOCs isolados recorrentes e TOCs associados à síndrome de Gorlin foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Correlações entre os escores de imunoposição do GLUT-1 e o índice angiogênico nas lesões foram avaliadas por meio do teste de correlação de Spearman.

Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Imunoposição de GLUT-1

A análise da imunoposição de GLUT-1, no componente epitelial das lesões, revelou positividade em todos os casos estudados. No grupo dos TOCs isolados primários, foi observado predomínio de casos com escore 4 ($n = 9$; 64,3%), seguidos dos casos com escores 3 ($n = 4$; 28,6%) e 2 ($n = 1$; 7,1%). No grupo dos TOCs isolados recorrentes, foi identificada frequência discretamente maior para os casos com escores 4 ($n = 3$; 42,9%) e 2 ($n = 2$; 28,6%), em comparação com os escores 3 ($n = 1$; 14,3%) e 1 ($n = 1$; 14,3%). Para TOCs associados à síndrome de Gorlin, foi constatada maior frequência de casos com escore 4 ($n = 8$; 57,1%), seguidos dos casos com escores 3 ($n = 4$; 28,6%) e 1 ($n = 2$; 14,3%). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos

($p = 0,406$; Tabela 2; Figura 1A-B).

Imunoexpressão de GLUT-3

A análise da imunoexpressão epitelial de GLUT-3 revelou, para todos os grupos estudados, maior frequência de casos negativos para esta proteína. Os poucos casos positivos para GLUT-3 revelaram baixa expressão desta proteína no componente epitelial, sendo todos classificados como escore 1. Nos TOCs isolados primários, apenas 3 (21,4%) dos 14 casos revelaram imunopositividade para GLUT-3. Para os TOCs isolados recorrentes, 2 (28,6%) dos 7 casos exibiram imunopositividade para esta proteína. Para os TOCs associados à síndrome de Gorlin, apenas 1 (7,1%) dos 14 casos revelou imunoexpressão para GLUT-3 no componente epitelial (Figura 1B-C).

Índice angiogênico

Foi observada imunorreatividade para o anticorpo anti-CD34 em células endoteliais de vasos com lumens distintos, bem como em grupos de células endoteliais sem um lúmen vascular distinto e em células endoteliais isoladas. A análise do índice angiogênico, por meio da MVC, revelou um número médio de 63,80 (variação: 41,60 – 88,60) vasos para os TOCs isolados primários e de 61,11 (variação: 34,00 – 104,40) vasos para os TOCs isolados recorrentes. Para as lesões associadas a síndrome de Gorlin, foi observado um número médio de 65,88 (variação: 37,80 – 83,00) vasos. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,965$; Tabela 3; Figura 1D-E).

Não foram constatadas correlações estatisticamente significativas entre os escores de imunoexpressão epitelial de GLUT-1 e o índice angiogênico nos TOCs associados à síndrome de Gorlin ($p = 0,147$; $r = -0,379$), nos TOCs isolados primários ($p = 0,085$; $r = 0,476$) e nos TOCs isolados recorrentes ($p = 0,984$; $r = -0,009$).

Discussão

Os TOCs, à semelhança de várias neoplasias, exibem perdas de heterozigidade em genes supressores tumorais, como *P16*, *TSLC1*, *FHIT* e *PTCH*^{2,40}. Mutações no gene *PTCH*, relacionadas com o desenvolvimento da síndrome de Gorlin^{8,41,42}, tem sido identificadas como a alteração genética mais importante nos TOCs⁴². Embora TOCs isolados e associados à síndrome de Gorlin aparentemente compartilhem uma patogênese comum, representada pela ativação aberrante da via de sinalização SHH em decorrência de mutações no gene *PTCH*⁴³⁻⁴⁷,

estudos tem sugerido uma menor capacidade de crescimento e infiltração, bem como uma menor tendência à recorrência nas lesões isoladas⁶⁻⁹.

A expressão de proteínas envolvidas no transporte da glicose e a formação de novos vasos sanguíneos são eventos importantes para o aumento da absorção de nutrientes em células metabolicamente ativas¹⁶. No contexto do transporte da glicose para o meio intracelular, merecem destaque os GLUTs-1 e -3. A superexpressão destas proteínas tem sido relacionada com o comportamento biológico mais agressivo em diversas neoplasias malignas, caracterizado pela presença de metástase linfonodal, recorrência da doença e menores taxas de sobrevida dos pacientes^{16,21-24}. Apesar destes achados importantes, até o momento, não há estudos sobre a expressão dos GLUTs-1 e -3 em lesões odontogênicas (Pubmed Database – Acesso em 22/07/2014).

No presente trabalho, a análise da imunexpressão do GLUT-1 no componente epitelial dos TOCs revelou positividade em todos os casos avaliados. Para todos os grupos, foi observada maior frequência de casos classificados como escore 4 ($\geq 76\%$ das células positivas), denotando uma alta expressão de GLUT-1 no componente epitelial destas lesões e sugerindo um importante papel para esta proteína na captação de glicose pelas células epiteliais dos TOCs. Esses dados estão em concordância com os estudos de Zhou et al.⁴⁸, Grimm et al.⁴⁹ e Ayala et al.²³ que encontram uma alta expressão do GLUT-1 em carcinomas de células escamosas orais. Esses resultados também foram encontrados em carcinomas de mama, endométrio e coloretal^{16,20,23,50,51}.

Por outro lado, no presente estudo, não foi encontrada relação entre a imunexpressão de GLUTs-1 com o comportamento biológico, corroborando os estudos de Grimm et al.⁴⁹ e Ayala et al.²³, sugerindo que as diferenças relacionadas ao comportamento biológico destas lesões não estão relacionadas a expressão desta proteína.

Para todos os grupos de TOCs, foi observada maior frequência de casos negativos para GLUT-3. Além disso, os poucos casos positivos para GLUT-3 revelaram baixa expressão desta proteína no componente epitelial, caracterizada pela classificação como escore 1 ($\leq 25\%$ das células positivas). Tais achados sugerem que a utilização de GLUT-3 para captação de glicose pelas células epiteliais desta lesão pode constituir um mecanismo eventual, realizado por um pequeno número de células do componente epitelial dos TOCs. Adicionalmente, os resultados ora obtidos sugerem que as diferenças no comportamento biológico de TOCs isolados e associados à síndrome de Gorlin não estejam relacionadas com a expressão do GLUT-3.

Em relação ao GLUT-3, alguns trabalhos constataram relação da expressão desta

proteína com o comportamento biológico de lesões. Neste sentido, em estudo com carcinomas de células escamosas orais, Ayala et al.²³ observaram que casos positivos para GLUT-3 apresentavam associação com o estadiamento clínico avançado e estavam relacionados com um prognóstico desfavorável. Adicionalmente, resultados semelhantes aos do presente estudo também foram encontrados nas pesquisas de Zhou et al.³⁸, em carcinomas de cabeça e pescoço, onde não houve expressão dessa proteína.

Outros trabalhos, como os de Krzeslak et al.⁵² e Ayala et al.²³, analisando a imunexpressão de GLUT-3 em carcinomas de mama e endométrio, revelaram uma associação da expressão desta proteína com estadiamento clínico mais avançado das lesões. Em conjunto, tais achados sugerem uma relação entre a expressão de GLUT-3 nestas lesões e um prognóstico menos favorável para os pacientes.

A angiogênese é um processo complexo, regulado por várias vias intracelulares. Esse processo pode ser avaliado pela determinação do índice angiogênico, sendo crítico para o desenvolvimento e progressão de cistos e tumores odontogênicos^{26,27}.

Chen et al.³⁴ utilizando a técnica da densidade microvascular (MVD) observaram um aumento gradativo desse índice em tumores ceratocísticos odontogênicos, ameloblastomas recorrentes e carcinomas ameloblásticos, seguindo esta ordem. Assim como perceberam correlação positiva entre o aumento da MVD e a superexpressão do VEGF.

Seifi et al.⁵⁴ verificaram uma maior MVD nos ameloblastomas em comparação aos TOCs e cistos dentígeros. De acordo com estes autores, a angiogênese tem papel importante no desenvolvimento dessas lesões e poderia constituir um dos fatores responsáveis pelas diferenças no comportamento biológico de ameloblastomas, TOCs e cistos dentígeros. Tais sugestões foram corroboradas em outro estudo recente,⁵⁵ realizado com as mesmas lesões odontogênicas avaliadas no estudo de Seifi et al.⁵⁴

De modo semelhante, Alaeddini et al.³³ encontraram um maior aumento da MVD em ameloblastomas quando comparados a TOCs e cistos dentígeros. Adicionalmente, em estudo mais recente de Alaeddini et al.,⁵⁶ foi avaliado um possível efeito da inflamação sobre a angiogênese em TOCs. De acordo com estes autores, os achados sugerem que o efeito da inflamação sobre a formação de novos vasos sanguíneos nos TOCs não é significativo.

No presente estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos do estudo em relação ao índice angiogênico ($p > 0,05$), sugerindo que, nos TOCs, um comportamento biológico mais ou menos agressivo não estaria relacionado a uma maior ou menor formação de novos vasos sanguíneos nas lesões. Esses achados estão em concordância com o estudo de Nonaka et al.,⁵⁷ que também não encontraram associação entre

o índice angiogênico e o comportamento biológico em 52 casos de TOCs.

Em conclusão, os achados do presente estudo sugerem que as diferenças no comportamento biológico de TOCs isolados e associados à síndrome de Gorlin não estão relacionadas com a expressão dos GLUTs-1 e -3 e ao índice angiogênico das lesões.

Referências

1. Philipsen HP. Keratocystic odontogenic tumor. In: Barnes L, Eveson JW Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumors – Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press, 2005.
2. Agaram NP, Collins BM, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P, et al. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. *Arch Pathol Lab Med* 2004;**128**:313–7.
3. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, et al. Cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* 2005;**34**:280–6.
4. Ali, MAA. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in odontogenic cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;**106**:258–63.
5. Figueroa A, Currenti M, Avila M, Andrea A, DeVillirs P, Rivera H. Keratocystic odontogenic tumor associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome: similar behavior to sporadic type? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;**142**:179–83.
6. Kimi K, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Immunohistochemical analysis of cell-cycle- and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2001;**30**:434–42.
7. Ahn SG, Lim YS, Kim DK, Kim SG, Lee SH, Yoon JH. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a retrospective analysis of 33 affected Korean individuals. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;**33**:458–62.
8. Manfredi M, Vescovi P, Bonanini M, Porter S. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;**33**:117–24.
9. Díaz-Fernández JM, Infante-Cossío P, Belmonte-Caro R, Ruiz-Laza L, García-Perla-García A, Gutiérrez-Pérez JL. Basal cell nevus syndrome. Presentation of six cases and literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;**10**:57–66.
10. Amorim RF, Godoy GP, Galvão HC, Souza LB, Freitas RA. Immunohistochemical assessment of extracellular matrix components in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Oral Dis* 2004; **10**:265–70.

11. Kolár Z, Geierová M, Bouchal J, Pazdera J, Zboril V, Tvrđý P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2006;**35**:75–80.
12. Cavalcante RB, Pereira KM, Nonaka CF, Nogueira RL, de Souza LB. Immunohistochemical expression of MMPs 1, 7, and 26 in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;**106**:99–105
13. Leonardi R, Matthews JB, Caltabiano R, Greco M, Lombardo C, Loreto C, et al. MMP-13 expression in keratocyst odontogenic tumor associated with NBCCS and sporadic keratocysts. *Oral Dis* 2010;**16**:795–800.
14. Leonardi R, Matthews JB, Loreto C, Musumeci G, Campise G, Lo Muzio L, et al. Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. *Histol Histopathol* 2013;**28**:1175–84.
15. Hong YY, Yu FY, Qu JF, Chen F, Li TJ. Fibroblasts regulate variable aggressiveness of syndromic keratocystic and non-syndromic odontogenic tumors. *J Dent Res*. In Press 2014.
16. Macheda LM, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Commun Signal* 2005;**202**:654–62.
17. Fukuzumi M, Hamakawa H, Onishi A, Sumida T, Tanioka H. Gene expression of GLUT isoforms and VHL in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2000;**161**:133–40.
18. Medina RA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res* 2002;**35**:9–26.
19. Menezes R, Bramante C, Paiva K, Letra A, Carneiro E, Zambuzze W, et al. Receptor activator NFκB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*.2002; **102**:404-9.
20. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;**298**:141–5.
21. Baer S, Casaubon L, Schwartz MR, Marcogliese A, Younes M. Glut3 Expression in biopsy specimens of laryngeal carcinoma is associated with poor survival. *Laryngoscope* 2002;**112**:393–6.
22. Roh JL, Cho KJ, Kwon GY, Ryu CH, Chang HW, Choi SH, et al. The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. *Oral Cancer* 2009;**45**:63–8.

23. Ayala FRR, Rocha RM, Carvalho KC, Carvalho AL, Cunha IW, Lourenço SV, et al. Glut1 and Glut3 as potential prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. *Molecules* 2010;**15**:2374–87.
24. Ogane N, Yasuda M, Shimizu M, Miyazawa M, Kamoshida S, Ueda A, et al. Clinicopathological implications of expressions of hypoxia-related molecules in esophageal superficial squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2010;**14**:23–9.
25. Nguyen A, Hoang V, Laquer V, Kelly KM. Angiogenesis in cutaneous disease: part 1. *J Am Acad Dermatol* 2009;**61**:921–42.
26. Gordon MS, Mendelson DS, Kato G. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. *Int J Cancer* 2010;**126**:1777–87.
27. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res* 2010;**31**:158–75.
28. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 2009; **89**:1177–215.
29. Nikitenko LL. Vascular endothelium in cancer. *Cell Tissue Res* 2009; **335**:223–40.
30. Nanashima A, Shibata K, Nakayama T, Tobinaga S, Araki M, Kunizaki M, et al. Clinical significance of microvessel count in patients with metastatic liver cancer originating from colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009;**16**:2130-7.
31. Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Association between vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and tumor angiogenesis in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2002; **31**:28–34.
32. Nonaka CF, Maia AP, Nascimento GJ, de Almeida Freitas R, Batista de Souza L, Galvão HC. Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;**106**:896–902.
33. Alaeddini M, Salah S, Dehghan F, Eshghyar N, Etemad-Moghadam S. Comparison of angiogenesis in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous cysts and ameloblastomas. *Oral Dis* 2009;**15**:422–7.
34. Chen WL, Ouyang KX, Li HG, Huang ZQ, Li JS, Wang JG. Expression of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in ameloblastoma. *J Craniofac Surg* 2009;**20**:171–5.
35. Mitrou GK, Tosios KI, Kyroudi A, Sklavounou A. Odontogenic keratocyst expresses vascular endothelial growth factor: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 2009;**38**:470–5.

36. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumors – Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press, 2005.
37. Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA. Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet* 1993;**30**:460–4.
38. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T, et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1995;**72**:319–23.
39. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;**324**:1–8.
40. Henley J, Summerlin DJ, Tomich C, Zhang S, Cheng L. Molecular evidence supporting the neoplastic nature of odontogenic keratocyst: a laser capture microdissection study of 15 cases. *Histopathology* 2005;**47**:582–6.
41. Pastorino L, Cusano R, Nasti S, Faravelli F, Forzano F, Baldo C, et al. Molecular characterization of Italian nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Human Mutat* 2005;**788**:1–7.
42. Gomes CC, Diniz MG, Gomez RS. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. *Oral Oncol* 2009;**45**:1011–4.
43. Barreto DC, Bale AE, De Marco L, Gomez RS. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2000;**79**:1418–22.
44. Gu XM, Zhao HS, Sun LS, Li TJ. PTCH mutations in sporadic and Gorlin-syndrome-related odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2006; **85**:859–63.
45. Pan S, Li TJ. PTCH1 mutations in odontogenic keratocysts: are they related to epithelial cell proliferation? *Oral Oncol* 2009;**45**:861–5.
46. Sun LS, Li XF, Li TJ. PTCH1 and SMO gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. *J Dent Res* 2008;**87**:575–9.
47. Hakim SG, Kosmehl H, Sieg P, Trenkle T, Jacobsen HC, Attila Benedek G. Altered expression of cell-cell adhesion molecules β -catenin/ E-cadherin and altered Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors. *Clin Oral Invest* 2011;**15**:321–8.
48. Zhou S, Wang S, Wu Q, Fan J, Wang Q. Expression of glucose transporter-1 and -3 in the head and neck carcinoma - the correlation of the expression with the biological behaviors. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2008;**70**:189–94.
49. Grimm M, Munz A, Teriete P, Nadtoetschi T, Reinert S. GLUT-1(+)/TKTL1(+)

- coexpression predicts poor outcome in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;**117**:743–53.
50. Brauer HA, Makowski L, Hoadley KA, Casbas-Hernandez P, Lang LL, Romàn-Pèrez E. Impact of tumor microenvironment and epithelial phenotypes on metabolism in breast cancer *Clin Cancer Res* 2012;**19**:571–85.
51. Kim S, Kim DH, Jung WH. Metabolic phenotypes in triple-negative breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;**34**:1699–712.
52. Krzeslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, Jozwiak P, Romanowicz H, Bienkiewicz A, et al. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. *Pathol Oncol Res* 2012;**18**:721–8.
53. Eckert AW, Kappler M, Schubert J, Taubert H. Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Maxillofac Surg* 2012;**16**:189–96.
54. Seifi S, Shafaie S, Ghadiri S. Microvessel density in follicular cysts, keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;**12**:351–6.
55. Seifi S, Feizi F, Khafri T, Aram M. Histomorphometric comparative study of blood vessels and their pattern in follicular cyst, odontogenic keratocyst, and ameloblastoma. *J Craniofac Surg* 2013;**24**:439–45.
56. Alaeddini M, Mostafaloo E, Mirmohammadkhani O, Eshghyar N, Etemad-Moghadam S. Exploring the concept of “inflammatory angiogenesis” in keratocystic odontogenic tumor. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013;**18**:241–5.
57. Nonaka CF, Cavalcante RB, Nogueira RL, de Souza LB, Pinto LP. Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Arch Oral Biol* 2012;**57**:230–7.

Legendas das figuras

Figura 1. (A) Imunorreatividade para GLUT-1 no componente epitelial (escore 4) de TOC associado à síndrome de Gorlin (Advance, 400×). (B) Fotomicrografia demonstrando a imunoexpressão de GLUT-1 no componente epitelial (escore 2) de TOC isolado primário (Advance, 400×). (C) Fotomicrografia revelando a imunoexpressão de GLUT-3 no componente epitelial (escore 1) de TOC isolado recorrente. (D) Imunorreatividade para GLUT-3 no componente epitelial (escore 1) de TOC associado à síndrome de Gorlin (Advance, 400×). (E) Vasos imunomarcados com anticorpo anti-CD34 em espécime de TOC associado à síndrome de Gorlin (Advance, 100×). (F) Vasos de calibres variados, imunomarcados com anticorpo anti-CD34, em espécime de TOC isolado primário (Advance, 100×).

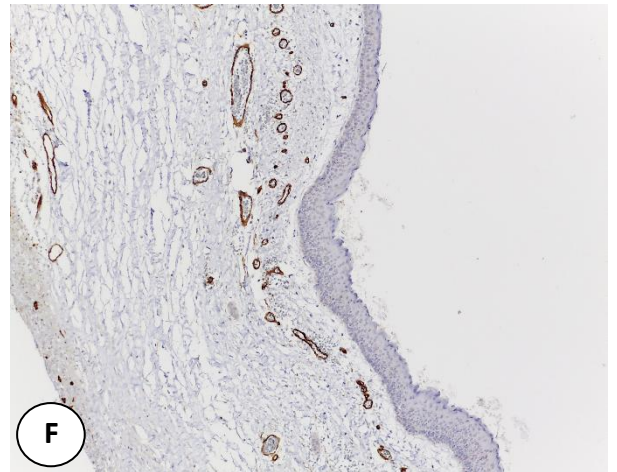
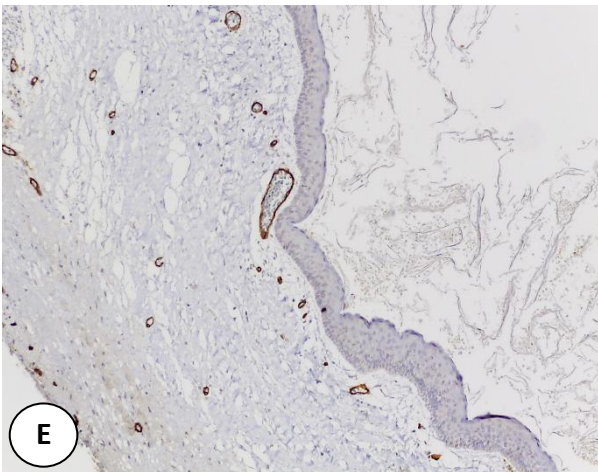
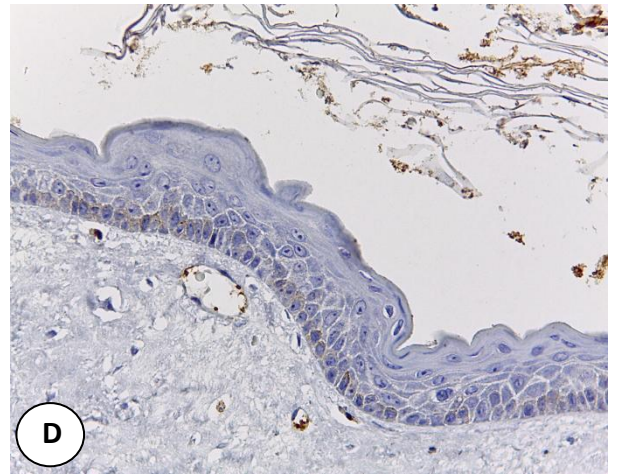
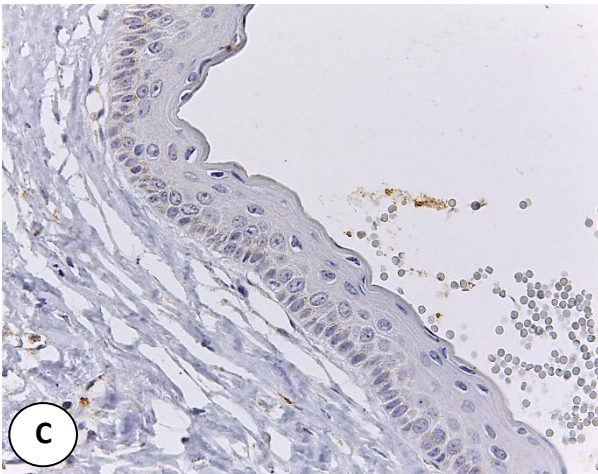
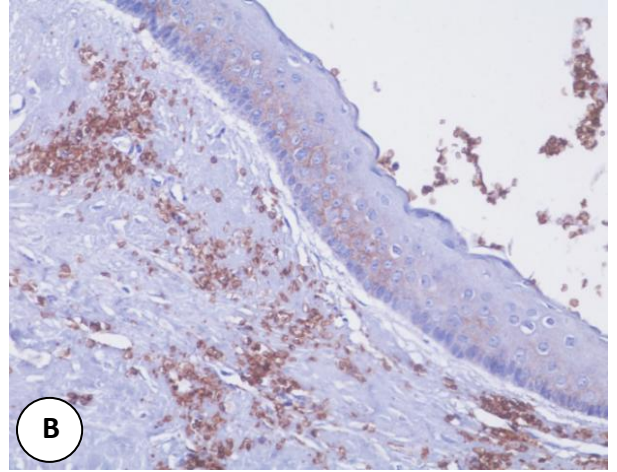
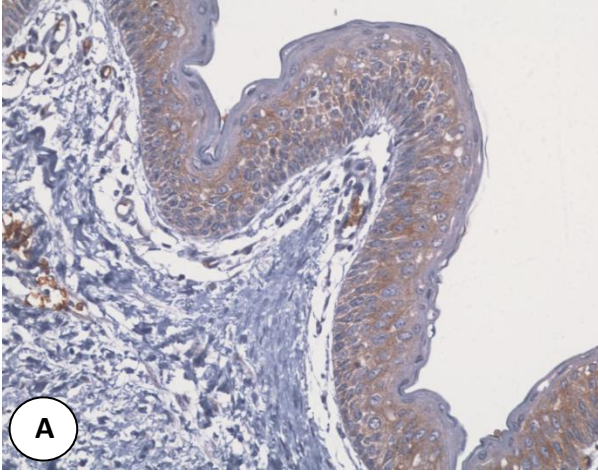


Tabela 1. Especificidade, nº do catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários.

Especificidade	Nº catálogo	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
GLUT-1	GTX 15309	Gene Tex	1:400	Citrato, pH 6,0 Pascal, 121°C, 3 min	60 min
GLUT-3	GTX 15311	Gene Tex	1:400	Citrato, pH 6,0 Pascal, 121°C, 3 min	60 min
CD34	QBEnd-10	Dako	1:50	Tris-EDTA, pH 9,0 Pascal, 3 min	18 h (<i>Overnight</i>)

Tabela 2. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística (*p*) para os escores de imunexpressão epitelial de GLUT-1, em relação aos grupos de TOCs.

Grupos	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	KW	<i>P</i>
TOC isolado primário	14	4,00	3,00 – 4,00	19,89	1,801	0,406
TOC isolado recorrente	7	3,00	2,00 – 4,00	14,21		
TOC síndrômico	14	4,00	3,00 – 4,00	18,00		

Tabela 3. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística KW e significância estatística (*p*) para o índice angiogênico (CD34), em relação aos grupos de TOCs.

Grupos	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	KW	<i>P</i>
TOC isolado primário	14	64,10	55,30 – 70,05	18,50	0,072	0,965
TOC isolado recorrente	7	60,40	57,60 – 80,80	18,07		
TOC síndrômico	14	62,50	51,05 – 71,45	17,46		

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O TOC tem se apresentado como objeto de intensa investigação científica, com diversas pesquisas voltadas ao esclarecimento das alterações e dos mecanismos moleculares responsáveis pelo comportamento biológico potencialmente agressivo deste neoplasma cístico benigno odontogênico. Neste sentido, destacam-se os estudos direcionados à elucidação dos mecanismos responsáveis pelo comportamento mais agressivo, descrito na literatura, dos TOCs associados à síndrome de Gorlin em comparação aos TOCs isolados.

A expressão de proteínas envolvidas no transporte da glicose e a formação de novos vasos sanguíneos são eventos importantes para o aumento da absorção de nutrientes em células metabolicamente ativas, os quais tem sido associados com o comportamento mais agressivo em diversas lesões. Embora vários estudos enalteçam o papel da angiogênese no desenvolvimento e progressão de cistos e tumores odontogênicos, até o momento, pouco se sabe sobre a expressão dos GLUTs nestas lesões.

Nesse sentido, os resultados do presente estudo sugerem um importante papel para GLUT-1 na captação de glicose pelas células epiteliais dos TOCs. Por outro lado, os achados da pesquisa ora realizada revelam que a utilização de GLUT-3 para captação de glicose pelas células epiteliais desta lesão pode constituir um mecanismo eventual, realizado por um pequeno número de células do componente epitelial dos TOCs. Os resultados obtidos sugerem que as diferenças no comportamento biológico de TOCs isolados e associados à síndrome de Gorlin não estejam relacionadas com a expressão dos GLUTs-1 e -3.

Em relação ao índice angiogênico, no presente trabalho, não foram constatadas diferenças significativas entre TOCs isolados e associados à síndrome de Gorlin. Tais achados não descartam a possibilidade de possíveis diferenças qualitativas na vascularização destas lesões, como constatado em outros cistos e tumores odontogênicos. Tais observações revelam possíveis caminhos para novas investigações direcionadas ao esclarecimento das diferenças no comportamento biológico entre TOCs isolados e associados à síndrome de Gorlin

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 560p., 2012.
- AGARAM, N.P. et al. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 128, p. 313-17, 2004.
- AHN, S.G. et al. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a retrospective analysis of 33 affected Korean individuals. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.** v. 33, p. 458-62, 2004.
- ALAEDDINI, M. et al. Comparison of angiogenesis in keratocystic odontogenic tumors, dentigerous cysts and ameloblastomas. **Oral. Dis.** v. 15, p. 422-27, 2009.
- ALAEDDINI, M. et al. Exploring the concept of “inflammatory angiogenesis” in keratocystic odontogenic tumor. **Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.** v. 18, p. 241-45, 2013.
- AMORIM, R.F.B. et al. Immunohistochemical assessment of extracellular matrix components in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. **Oral. Dis.** v. 10, p. 265-70, 2004.
- AYALA, F. R. R. et al. Glut1 and Glut3 as potential prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. **Molecules.** v. 15, p. 2374-87, 2010.
- BAER, S. et al. Glut3 Expression in biopsy specimens of laryngeal carcinoma is associated with poor survival. **Laryngoscope.** v. 112, p. 393-96, 2002.
- BARRETO, D.C. et al. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. **J. Dent. Res.** v. 79, p. 1418-22, 2000.
- BARNERS, L. et al. *World Health Organization Classification of Tumors – Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press, 2005.
- BRAUER, H.A. et al. Impact of tumor microenvironment and epithelial phenotypes on metabolism in breast cancer. **Clin. Cancer. Res.** v. 19, p. 571-85, 2012.
- CAVALCANTE, R.B. et al. Immunohistochemical expression of MMPs 1, 7, and 26 in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.** v. 106, p. 923-29, 2008.
- CHEN, W.L. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in ameloblastoma. **J. Craniofac. Surg.** v. 20, p. 171-75, 2009.
- CLAPP, C. et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. **Physiol. Rev.** v. 89, p. 1177-215, 2009.
- DAVEY, K.J. et al. Assessment of vascularity as an index of angiogenesis in periradicular granulomas. Comparison with oral carcinomas and normal tissue counterparts. **Int. Endod. J.** v. 41, p. 987-96, 2008.

DÍAZ-FERNÁNDEZ, J.M. et al. Basal cell nevus syndrome: Presentation of six cases and literature review. **Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.** v. 10, p. 57-66, 2005.

EL-GAZZAR, R.F.; MACCLUSKEY, M.; OGDEN, G.R. The effect of the antibody used and method of quantification on oral mucosal vascularity. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.** v. 34, p. 895-99, 2005.

EL-LABBAN, N.G.; AGHABEIGI, B. A comparative stereologic and ultrastructural study of blood vessels in odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. **J. Oral. Pathol. Med.** v. 19, p. 442-46, 1990.

EVANS, D.G. et al. Complications of the nevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. **J. Med. Genet.** v. 30, p. 460-64, 1993.

EPSTEIN, E.H. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. **Nat. Rev. Cancer.** v. 8, p. 743-54, 2008.

ECKERT, A.W. et al. Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. **Oral. Maxillofac. Surg.** v. 16, p. 189-96, 2012.

FIGUEROA, A. et al. Keratocystic odontogenic tumor associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome: similar behavior to sporadic type? **Otolaryngol. Head. Neck. Surg.** v. 142, p. 179-83, 2010.

FREITAS, T.M.C. et al. Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. **Exp. Mol. Pathol.** v. 79, p. 79-85, 2005.

FUKUZUMI, M. et al. Gene expression of GLUT isoforms and VHL in oral squamous cell carcinoma. **Cancer. Lett.** v. 161, p. 133-40, 2000.

GARCÍA DE MARCOS, J.A. et al. Basal cell nevus syndrome: clinical and genetic diagnosis. **Oral. Maxillofac. Surg.** v. 13, p. 225-30, 2009.

GORDON, M.S.; MENDELSON, D.S.; KATO, G. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. **Int. J. Cancer.** v. 126, p. 1777-87, 2010.

GORLIN, R.J.; GOLTZ, R.W. Multiple naevoid basal cell epithelioma, jaw cysts, bifid rib: a syndrome. **N. Engl. J. Med.** v. 262, p. 908-11, 1960.

GOMES, C.C.; DINIZ, M.G.; GOMEZ, R.S. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. **Oral. Oncol.** v. 45, p. 1011-4, 2009.

GU, X.M. et al. PTCH mutations in sporadic and Gorlin-syndrome-related odontogenic keratocysts. **J. Dent. Res.** v. 85, p. 859-63, 2006.

GRAZIANI, F. et al. Microvessel density and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human radicular cysts. **Am. J. Dent.** v. 19, p. 11-4, 2006.

GRIMM, M. et al. GLUT-1(+)/TKTL1(+) coexpression predicts poor outcome in oral

squamous cell carcinoma. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol.** v. 117, p.743-53, 2014.

HANNEN, E.J.M.; RIEDIGER, D. The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer: a review. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.** v. 33, p. 2-7, 2004.

HAKIM, S.G. et al. Altered expression of cell-cell adhesion molecules β -catenin/ E-cadherin and altered Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors. **Clin. Oral. Invest.** v.15, p. 321-8, 2011.

HENLEY, J. et al. Molecular evidence supporting the neoplastic nature of odontogenic keratocyst: a laser capture microdissection study of 15 cases. **Histopathology.** v. 47, p. 582-86, 2005.

HIGH, A.; ZEDAN, W. Basal cell nevus syndrome. **Curr. Opin. Oncol.** v. 17, p. 160-6, 2005.

HONG, Y.Y. et al. Fibroblasts regulate variable aggressiveness of syndromic keratocystic and non-syndromic odontogenic tumors. **J. Dent. Res.** (in Press), p.1-7, 2014.

HOWELL, J.; CARO, M.R. The basal cell nevus. Its relationship to multiple cutaneous cancer and associated anomalies of development. **Arch. Dermatol.** v. 79, p. 67, 1959.

ITO, T. et al. Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage. **Mod. Pathol.** v. 11, p. 437-43, 1998.

JARISH, W. Zur lehre von den autgeschwulsten. **Archiv. Jur. Dermatologic. und. Syphilologic.** v. 28, p. 163-222, 1894.

JURISIC, V. et al. The concentration of TNF- α correlate with number of inflammatory cells and degree of vascularization in radicular cysts. **Oral. Dis.** v. 14, p. 600-5, 2008.

KICHI, E. et al. Cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. **J. Oral. Pathol. Med.** v. 34, p. 280-86, 2005.

KIM, K.H. et al. Expression of sonic hedgehog signaling molecules in normal, hyperplastic and carcinomatous endometrium. **Pathol. Int.** v. 59, p. 279-87, 2009.

KIM, S.; KIM, D.H.; JUNG, W.H.; Metabolic phenotypes in triple-negative breast cancer. **Int J. Clin. Exp. Pathol.** v. 34, p. 1699-712, 2013.

KIMI, K. et al. Immunohistochemical analysis of cell-cycle- and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. **J. Oral. Pathol. Med.** v. 30, p. 434-42, 2001.

KOLÁŘ, Z. et al. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. **J. Oral. Pathol. Med.** v. 35, p. 75-80, 2006.

KUMAMOTO, H.; OHKI, K.; OOYA, K. Association between vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and tumor angiogenesis in ameloblastomas. **J. Oral. Pathol. Med.** v. 31, p. 28-34, 2002.

- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1504p.
- KUMAMOTO, H.; OOYA, K. Immunohistochemical detection of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase and angiopoietins in ameloblastic tumors. **J Oral Pathol. Med.** v. 35, p. 606-12, 2006.
- KRZESLAK, A et al. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. **Pathol. Oncol. Res.** v. 18, p.721–28, 2012.
- LEONARDI, R. et al. Detection of vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor in periapical lesions. **J. Endod.** v. 29, p. 180-3, 2003.
- LEONARDI, R. et al. MMP-13 expression in keratocyst odontogenic tumor associated with NBCCS and sporadic keratocysts. **Oral. Dis.** v. 16, p.795-800, 2010.
- LEONARDI, R. et al. Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. **Histol. Histopathol.** v. 28, p. 1175-84, 2013.
- LI, J. et al. Analysis of mutation in exon 17 of PTCH in patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Mol. Biol. Rep.** v. 37, p. 359-62, 2010.
- LO MUZIO, L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). **Orphanet. J. Rare. Dis.** v. 3, p. 32, 2008.
- MAEDA, K. et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **Br. J. Cancer.** v. 72, p. 319-23, 1995.
- MACHEDA, L. M; ROGERS, S.; BEST, J. D. Molecular and Cellular regulation of Glucose Transporter (GLUT) Proteins in Cancer. **J. Cell Commun. Signal.** v. 202, p. 654-62, 2005.
- MANFREDI, M. et al. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.** v. 33, p. 117-24, 2004.
- MATEUS, G.C.P. Cell proliferation and apoptosis in keratocystic odontogenic tumors. **Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.** v. 13, p. 697-702, 2008.
- MATSUZU, K. et al. Differential expression of glucose transporters in normal and pathologic thyroid tissue. **Thyroid.** v. 14, p. 806-12, 2004.
- MEDINA, R.A.; OWEN G.I. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. **Biol. Res.** v. 35, p. 9-26, 2002.
- MENDES, R.A.; CARVALHO, J.F.C.; VAN DER WALL, I. Biological pathways involved in aggressive behavior of the odontogenic keratocystic tumor and possible implications for molecular oriented treatment. **Oral. Oncol.** v. 46, p. 19-24, 2010.

- MENEZES R. et al. Receptor activator NF κ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.** v. 102, p. 404-9, 2002.
- MENESES, A.N. et al. Regulation of GLUT3 and Glucose Uptake by the Camp Signalling Pathway in the Breast Cancer Cell Line ZR-75. **J. Cell. Physiol.** v. 214, p. 110-6, 2007.
- MITROU, G.K. et al. Odontogenic keratocyst expresses vascular endothelial growth factor: an immunohistochemical study. **J. Oral. Pathol. Med.** v. 38, p. 47-5, 2009.
- MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **Eur. J. Biochem.** v. 219, p. 713-25, 1994.
- MUECKLER, M. et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. **Science.** v. 229, p. 941-5, 1985.
- NANASHIMA, A. et al. Relationship between microvessel count and post-hepatectomy survival in patients with hepatocellular carcinoma. **World. J. Gastroenterol.** v. 14, p. 4915-22, 2008.
- NANASHIMA, A. et al. Clinical significance of microvessel count in patients with metastatic liver cancer originating from colorectal carcinoma. **Ann. Surg. Oncol.** v. 16, p. 2130-7, 2009.
- NONAKA, C.F.W. et al. Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.** v. 106, p. 896-902, 2008.
- NONAKA, C.F. et al. Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. **Arch. Oral. Biol.** v. 57, p. 230-7, 2012.
- NGUYEN, A. et al. Angiogenesis in cutaneous disease: part 1. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 61, p. 921-42, 2009.
- NOGUCHI, Y. et al. Suppression of facilitative glucose transporter 1 mRNA can suppress tumor growth. **Cancer. Lett.** v. 154, p. 175-82, 2000.
- NIKITENKO, L.L. Vascular endothelium in cancer. **Cell. Tissue. Res.** v. 335, p. 223-40, 2009.
- OGANE, N. Clinicopathological implications of expressions of hypoxia-related molecules in esophageal superficial squamous cell carcinoma. **Ann. Diagn. Pathol.** v. 14, p. 23-9, 2010.
- PAN, S.; LI, T.J. PTCH1 mutations in odontogenic keratocysts: are they related to epithelial cell proliferation? **Oral. Oncol.** v. 45, p. 861-5, 2009.
- PASTORINO, L. et al. Molecular characterization of Italian nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. **Human. Mutat.** v. 788, p. 1-7, 2005.
- PAZOUKI, S. et al. The association between tumor progression and vascularity in the oral

mucosa. **J. Pathol.** v. 183, p. 39-43, 1997.

PHILIPSEN, H.P. Keratocystic odontogenic tumor. In: BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHAERT, P.; SIDRANSKY, D. World Health Organization Classification of Tumors – Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press, 2005. p. 306-7.

ROH, J.L. et al. The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. **Oral. Cancer.** v. 45, p. 63-8, 2009.

RUBINI, C. et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in different types of odontogenic cysts. **Clin. Oral. Invest.** v. 15, p. 757-61, 2010.

SEIFI, S.; SHAFIAIE, S.; GHADIRI, S. Microvessel density in follicular cysts, keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas. **Asian. Pac. J. Cancer. Prev.** v. 12, p. 351-56, 2011.

SEIFI, S. et al. Histomorphometric comparative study of blood vessels and their pattern in follicular cyst, odontogenic keratocyst, and ameloblastoma. **J. Craniofac. Surg.** v. 24, p. 439-45, 2013.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHÜRMAN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **J. Parenter. Enteral. Nutr.** v. 28, p. 364-71, 2004.

SCHOR, A.M. et al. Assessment of vascularity in histological sections: effects of methodology and value as an index of angiogenesis in breast tumours. **Histochem. J.** v. 30, p. 849-56, 1998a.

SCHOR, A.M. et al. Heterogeneity in microvascular density in lung tumours: comparison with normal bronchus. **Br. J. Cancer.** v. 77, p. 946-51, 1998b.

SIMPSON, I. A. et al. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am. J. Physiol.* **Endocrinol. Metab.** v. 295, p. 242-53, 2008.

SOUZA, G.F.M.; FREITAS, R.A.; MIRANDA, J.L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. **Cienc. Odontol. Bras.** v. 10, p. 12-18, 2007.

SUN, L.S.; LI, X.F.; LI, T.J. PTCH1 and SMO gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. **J. Dent. Res.** v. 87, p. 575-79, 2008.

SUYAMA, Y. et al. Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in odontogenic keratocysts. **J. Oral. Pathol. Med.** v. 38, p. 476-80, 2009.

TAYLOR, S.F.; COOK, A.E.; LEATHERBARROW, B. Review of patients with basal cell nevus syndrome. **Ophtal. Plast. Reconstr. Surg.** v. 22, p. 259-65, 2006.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol.* **Endocrinol. Metab.** v. 298, p. 141-5, 2010.

TSAI, C.H. et al. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-2 in radicular cysts. **Int. Endod. J.** v. 35, p. 854-58, 2002.

- TSUKIOKA, M. et al. Expression of glucose transporters in epithelial ovarian carcinoma: Correlation with clinical characteristics and tumor angiogenesis. **Oncology. Reports.** v. 18, p. 361-67, 2007.
- VISIOLI, F. et al. Is nevoid basal cell carcinoma syndrome so rare? Proposal for an investigative protocol based on a case series. **J. Oral. Maxillofac. Surg.** v. 68, p. 903-8, 2010.
- UCUZIAN, A.A. et al. Molecular mediator of angiogenesis. **J. Burn. Care. Res.** v. 31, p. 158-75, 2010.
- ZHOU, S. et al. Expression of glucose transporter-1 and -3 in the head and neck carcinoma—the correlation of the expression with the biological behaviors. **ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.** v. 70, p. 189–94, 2008.
- WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. **N. Engl. J. Med.** v. 324, p. 1-8, 1991.
- WOOD, I. S.; TRAYHUM, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **Br. J. Nutr.** v. 89, p. 3-9, 2003.
- YOUNES, M. et al. Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. **Cancer.** v. 80, p. 1046-51, 1997.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - UEPB / PRÓ-
REITORIA DE PÓS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA IMUNOEXPRESSIONE DOS TRANSPORTADORES DE GLICOSE 1 E 3 E DO ÍNDICE ANGIOGÊNICO EM CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN

Pesquisador: Cassiano Francisco Weege Nonaka

Área Temática:

Versão:...1

CAAE: 30354814.3.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB / Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB / Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesqui

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 631.261

Data da Relatoria: 16/04/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "ESTUDO DA IMUNOEXPRESSIONE DOS TRANSPORTADORES DE GLICOSE 1 E 3 E DO ÍNDICE ANGIOGÊNICO EM CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN.", apresenta-se como proposta de Projeto de Pesquisa executável e, tem como objetivo geral "Avaliar descritiva e comparativamente, por meio de imuno-histoquímica, a expressão dos GLUTs-1 e -3 e o índice angiogênico em ceratocistos odontogênicos isolados primários e recorrentes e ceratocistos odontogênicos associados à síndrome de Gorlin, com a finalidade de fornecer subsídios para melhor compreensão das diferenças, descritas na literatura, no comportamento biológico entre lesões isoladas e associadas a esta síndrome", tem relevância social e científica.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar descritiva e comparativamente, por meio de imuno-histoquímica, a expressão dos GLUTs-1 e -3 e o índice angiogênico em ceratocistos odontogênicos isolados primários e recorrentes e ceratocistos odontogênicos associados à síndrome de Gorlin.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente Projeto de Pesquisa e estudo não importa riscos, tendo em vista tratar-se de uma

Endereço: Av. das Baraúnas, 351- Campus Universitário
Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - UEPB / PRÓ-
REITORIA DE PÓS-



Continuação do Parecer: 631.261

pesquisa que realizará a coleta de dados em fichas clínicas e utilizará lâminas histológicas e espécimes biológicos mantidos em

arquivo, os riscos potenciais implicados na participação nesta pesquisa não estão ao alcance de percepções. Portanto, não há riscos previsíveis.

Benefícios:

Ao permitir que o material biológico das lesões sejam incluídos na pesquisa, os participantes contribuirão para o esclarecimento dos possíveis mecanismos responsáveis pelas diferenças no comportamento biológico entre ceratocistos odontogênicos isolados e associados à síndrome de Gorlin.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente proposta de Projeto de Pesquisa é de suma importância quanto papel e atribuições das Instituições de Ensino Superior (IES), mormente de pesquisa com fins de produção de dissertação de conclusão do Mestrado em Odontologia, realizada no âmbito da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, estando dentro do perfil de construção do ensino-aprendizagem significativa, perfilando a formação profissional baseada na tríade conhecimento-habilidade-competência, preconizada pelo MEC. Portanto, tem retorno social, caráter de pesquisa científica e, contribuição na formação de profissionais da área de Odontologia e área afins.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentaram, dentro da conformidade e quanto requisitos da Resolução de n. 466/2012 do CNS, bem como concorde Protocolo de Projeto de Pesquisa do CEP UEPB, todos os documentos obrigatórios.

Recomendações:

Estando o presente Projeto de Pesquisa, com fim destinado a desenvolvimento de Projeto de Pesquisa para conclusão de Pós-Graduação, concorde Protocolo do CEP UEPB, bem como, conforme a Resolução de n. 466/2012 do CNS, não há o que se recomendar tendo em vista que todas as exigências foram atendidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pelo exposto, sou pela APROVAÇÃO do Projeto de Pesquisa para fins de Pesquisa para conclusão de curso de pós-graduação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. das Baraúnas, 351- Campus Universitário
Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - UEPB / PRÓ-
REITORIA DE PÓS-



Continuação do Parecer: 631.261

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este Colegiado mantém a referida aprovação.

CAMPINA GRANDE, 30 de Abril de 2014

Assinador por:
Doralúcia Pedrosa de Araújo
(Coordenador)

ANEXO B – Normas para submissão de trabalhos para o periódico *Archives of Oral Biology*.

Archives of Oral Biology

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland, Ann Arbor, MI, USA

Professor G B Proctor, London, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed. Reviews may be submitted in outline prior to full submission.

Page charges

This journal has no page charges.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse

- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including

notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is

unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to Index Medicus, or left in full, year, volume with part number in brackets, and first and last pages. For example:

1. Walsh NP, Montague JC, Callow N and Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Arch Oral Biol* 2004;49(2):149-154.

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2003.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>. Electronic manuscripts should be submitted as a rich text document (RTF format), and the figures submitted as JPEG, GIF, TIF or EPS file. Full instructions for electronic submission are given at the above website. Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.