



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
CURSO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7 EM  
AMELOBLASTOMA E TUMOR ODONTOGÊNICO ADENOMATOIDE**

**WALTER GLEYBSON ANTAS DE MORAIS**

Campina Grande/PB

2020

**WALTER GLEYBSON ANTAS DE MORAIS**

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7 EM  
AMELOBLASTOMA E TUMOR ODONTOGÊNICO ADENOMATOIDE**

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.

**Área de concentração:** Estudo das Alterações do Sistema Estomatognático.

**Orientadora: Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves**

Campina Grande/PB

2020

É expressamente proibido 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 do trabalho.

M828a Morais, Walter Gleybson Antas de.  
Avaliação imunistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatoide [manuscrito] / Walter Gleybson Antas de Morais. - 2020.  
109 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.  
"Orientação : Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves, Departamento de Odontologia - CCBS."  
1. Tumores odontogênicos. 2. Ameloblastoma. 3. Tumor odontogênico adenomatoide. 4. Galectinas. I. Título  
21. ed. CDD 616.249

**WALTER GLEYBSON ANTAS DE MORAIS**

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7 EM  
AMELOBLASTOMA E TUMOR ODONTOGÊNICO ADENOMATOIDE**

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.

**Área de concentração:** Estudo das Alterações do Sistema Estomatognático.

**Aprovado em: 10/07/2020**

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Profa. Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira / UFRN**

**Membro Titular (1º Examinador)**



---

**Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka / UEPB**

**Membro Titular (2º Examinador)**



---

**Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves / UEPB**

**Membro Titular (Orientador)**

# **DEDICATÓRIA**

---

Dedico este trabalho a **Deus**,  
A minha **família** por todo apoio e confiança,  
De maneira especial a minha  
**avó** pelo exemplo, zelo e cuidado de sempre,  
Aos meu **pais**,  
E a minha orientadora **Pollianna Muniz Alves**.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A minha orientadora querida! Professora **Pollianna Muniz Alves**, obrigado por ter me acolhido e ajudado desde o início. Mesmo com minhas dificuldades, sempre estive disposta a contribuir, para que trilhasse da melhor maneira possível, essa jornada que foi o mestrado. Confesso que no início achei que não iria conseguir chegar ao fim, por ter “caído de paraquedas” na patologia, pelo medo e insegurança. Porém, nunca vou esquecer da nossa primeira reunião, em que disse “Quer desistir? Se não, estou aqui para lhe ajudar”, e assim foi, passo a passo, mesmo diante das adversidades, com muito zelo e dedicação sempre estive disponível, tornando o mestrado não apenas um caminho para o título de mestre, mas sim, uma oportunidade de crescer e vislumbrar novos horizontes. És um exemplo de profissional, mestre e sobretudo de ser humano; durante esses dois anos aprendi muitas coisas graças ao cuidado, apoio e atenção que oferece aos seus orientandos. Compreensiva, paciente, preocupada, dedicada e responsável com o seu trabalho, são qualidades que vão refletir na construção do profissional que quero me tornar. Enfim, muito obrigado pela confiança, preocupação e cuidado de sempre, sou muito grato e feliz por fazer parte do grupo “*Team Polli Oral Pathology*”.

Aos meus Avós, **Dona Helena e João de Aurora**, por terem apostado tanto em mim, pelo cuidado, compreensão e confiança. Como diria minha avó “suas realizações são as minhas”, então mais uma vez, vibramos juntos uma conquista, e saiba Vovó Helena, que o seu exemplo e todos os seus conselhos, foram cruciais para que me tornasse quem sou, será sempre uma parte de mim e de tudo que eu construir na vida. Aos meus pais, **Maria Laércia e Silvio Romero**, obrigado pelo apoio de sempre, pela preocupação e por me receberem sempre com muito amor e orgulho. Também as minhas irmãs **Wanessa Moraes e Wanúbia Moraes**, que mesmo distantes, nossos laços sempre estiveram apertados, sabendo do apoio que podemos encontrar um no outro, “juntos somos mais fortes”. Minha gratidão a todos vocês que moram no meu coração.



## **AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

A **DEUS**, a quem entrego todos os dias a minha vida, meus sonhos e planos, meu futuro, minha família e meus amigos. Obrigado Senhor, por ouvir as minhas orações e pelas bênçãos recebidas e graças alcançadas.

Ao meu bisavô, **Pai Expedido**, que mesmo não entendendo muito sobre estudos, sempre mostrava cuidado e carinho por mim, tanto esperou por minha formação, sempre perguntando quantos anos faltavam, mas quis Deus levar-te antes para junto dele. Espero que de onde esteja, veja que tudo deu e está dando certo. Obrigado.

Aos meus amigos e irmãos de orientadora **Luan Éverton** e **Ingrid Morgana**, por terem sido tão gentis e prestativos desde sempre. Obrigado pela ajuda quando precisei, por tirarem minhas dúvidas e me ouvirem nos momentos de aflição. Que Deus abençoe vossos caminhos com muito sucesso.

Ao pessoal do Laboratório de Histopatologia da UEPB, **Luana Balduino**, **Emanuene Galdino**, **Amanda Lira**, **Daniella Lucena**, **Catarina Monteiro**, **Christany Rodrigues** e também ao professor **Tiago João**, obrigado pela ajuda, apoio, pelas conversas, brincadeiras e momentos felizes no laboratório.

Aos colegas da turma de mestrado 2018, em especial aqueles que se tornaram amigos para vida inteira. Muita admiração e carinho por **Allany de Oliveira Andrade**, obrigado pela ajuda e apoio de sempre, foram muitos momentos vividos, no laboratório, na sala, nossa inesquecível viagem à Minas Gerais pelo PROCAD, enfim, muitas histórias para contar e uma amizade que levarei para a vida inteira. **Wliana Pontes de Lima**, serena, inteligente, dedicada, sempre soube que em você encontraria uma amizade, obrigado por me ouvir, incentivar e estar sempre disponível a me ajudar, és um exemplo de força e determinação, guardo um carinho imenso por você. **Diego Felipe Bezerra da Silva**, como não destacar esse cara de um coração tão grande e bondoso, sempre pude contar contigo, obrigado por me ajudar, por ter estado comigo nessa jornada como um grande amigo, tens um espaço reservado em meu coração. **Carlus Alberto Oliveira dos Santos**, um exemplo de dedicação e capacidade, como mudou nesse curto espaço de tempo, e se tornou cada dia mais especial, obrigado por nossas risadas, conversas descontraídas, pelo carinho e atenção. **Ligia Natália Sobreira Duarte Bezerra**, obrigado pelas caronas no fim da

tarde, e por ser essa pessoa tão prestativa e especial. A vocês e aos demais, desejo todo sucesso do mundo, sou muito feliz por tê-los conhecido.

As técnicas do laboratório de histopatologia *Denize Núbia*, por tornar nossos dias mais felizes, com sua espontaneidade e imaginação sem limites, e *Ana Luzia*, por ser essa pessoa que reflete paz, muito atenciosa e disposta a ajudar no que for preciso. Obrigado pela dedicação de vocês enquanto profissionais, o que é crucial para as nossas pesquisas.

Aos professores titulares da banca de defesa desta dissertação, Profa. Dra. *Éricka Janine Dantas da Silveira* e Prof. Dr. *Cassiano Francisco Weege Nonaka*, obrigado pelo aceite em participar desta banca, pelo empenho, dedicação e pelas contribuições que virão para somar e melhorar este trabalho.

De maneira especial, ao professor *Cassiano Francisco Weege Nonaka*, por todo cuidado, disponibilidade e atenção. Sempre disposto a ajudar, tirando dúvidas, ensinado as atividades do laboratório, um grande exemplo de orientador. Muita admiração!

A todos os professores do PPGO UEPB, em especial profa. *Daniela Pita de Melo*, profa. *Edja Maria Melo de Brito Costa*, profa. *Ana Flávia Granville-Garcia*, pessoas iluminadas, que sempre demonstraram carinho e atenção.

Ao Prof. Dr. *Ricardo Alves de Mesquita*, por ter participado da qualificação e colaborado para a melhoria deste trabalho. Também por ter me recebido na UFMG, durante a missão do PROCAD em 2019, onde de maneira muito generosa prestou todo o apoio, cuidado e atenção de que precisava, sua ajuda permitiu que atingisse o objetivo da missão e voltasse para a UEPB cheio de gratidão por tudo que vivenciei.

A equipe técnica administrativa do Departamento de Odontologia e do PPGO UEPB, em especial a *Ayhanna Nóbrega*, pela dedicação e responsabilidade.

Aos meus amigos e amores que sempre me apoiaram e torceram por mim: *Germano de Oliveira, Karol Lins, Marcela Laís, Mirla Laís, Geisa Maciel, Milena Regis, Renato Antas e Solange Izídrio*.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (*CAPES*), pela concessão da bolsa de estudo, para realização da pesquisa, e também, para a missão do Programa de Cooperação Acadêmica (*PROCAD*) na UFMG.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desta pesquisa e fechamento deste ciclo. Muito obrigado!

## **EPÍGRAFE**

---

“Nada é tão nosso quanto nossos sonhos”.

**Nietzsche**

## **RESUMO**

---

## RESUMO

**Introdução:** O ameloblastoma (AM) e o tumor odontogênico adenomatoide (TOA) são tumores odontogênicos benignos com a mesma origem epitelial, porém, exibindo comportamentos clínicos distintos. Fato este que leva ao desenvolvimento de pesquisas que buscam melhor compreender as possíveis diferenças na patogênese e comportamento biológico destas lesões. As galectinas são proteínas envolvidas em diversos mecanismos patológicos da cavidade oral, no entanto, até o momento, seu papel em tumores odontogênicos ainda é pouco elucidado. **Objetivos:** Avaliar a imunexpressão das galectinas -1, -3 e -7 em uma série de casos de AM e TOA, comparando-a com parâmetros clinicomorfológicos. **Material e Métodos:** O estudo foi do tipo observacional e transversal, com amostra constituída por 31 casos de AM e 20 casos de TOA. Dados clínicos (sexo, idade, localização anatômica, características radiográficas e se a lesão é primária ou recidivante) foram coletados a partir de fichas de requisição de biópsia. Para o estudo morfológico, considerou-se a classificação proposta pela OMS (2017). Para a análise imunohistoquímica, foram estabelecidos percentuais de imunopositividade para as galectinas -1, -3 e -7, considerando os diferentes compartimentos celulares, em 10 campos microscópicos, no parênquima dos AMs e TOAs. No estroma, considerou-se ausência/presença de imunexpressão das galectinas. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio dos testes de Mann-Whitney e exato de Fisher ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Nas análises morfológica e clinicoradiológica, observou-se maior frequência de AM do tipo convencional ( $n=24$ ; 77,4%), e TOAs do tipo folicular ( $n=12$ ; 60%). Na análise imunohistoquímica, observou-se maior imunexpressão nuclear das galectinas -1 ( $p<0,001$ ), -3 ( $p<0,001$ ), e -7 ( $p<0,001$ ) nos AM. Houve diferença estatisticamente significativa da imunexpressão da galectina-1 nuclear com AM recidivantes ( $p<0,001$ ), galectina-1 citoplasmática com AM primários ( $p=0,028$ ), galectina-3 nuclear com AM sintomáticos ( $p=0,014$ ), galectina-7 nuclear com AM convencional ( $p=0,040$ ) e galectina-7 citoplasmática com AM sintomáticos ( $p=0,021$ ). Nos TOAs, observou-se maior imunexpressão citoplasmática das galectinas -3 ( $p=0,003$ ) e -7 ( $p=0,015$ ) e maior imunexpressão nuclear/citoplasmática das galectinas -1 ( $p=0,011$ ) e -3 ( $p=0,004$ ). Houve diferença estatisticamente significativa da imunexpressão da galectina-1 nuclear com TOAs localizados em mandíbula ( $p=0,009$ ). Quanto a expressão no estroma das lesões, observou-se diferença significativa para a galectina-1 com maior imunexpressão em AMs ( $p=0,007$ ). **Conclusões:** A expressiva marcação das galectinas -1, -3 e -7 em AM e TOA, indica suas participações na patogênese destes tumores. De maneira geral, a imunexpressão distinta das galectinas de acordo com os compartimentos celulares, pode justificar em parte, as diferenças no comportamento biológico dessas lesões.

**Palavras-chave:** Tumores odontogênicos. Ameloblastoma. Tumor odontogênico adenomatoide. Imunohistoquímica. Galectinas.



## ABSTRACT

---

## ABSTRACT

**Background:** Ameloblastoma (AM) and adenomatoid odontogenic tumor (AOT) are benign odontogenic tumors with epithelial origin, but exhibiting distinct clinical behavior. This fact leads to development of research that try to better understand the possible differences in the pathogenesis and biological behavior of these lesions. Galectins are proteins involved in various pathological mechanisms of the oral cavity, however, until the present moment, its role in odontogenic tumors is still poorly elucidated. **Objective:** To evaluate the immunoeexpression of galectins -1, -3 and -7 in a series of cases of AM and AOT, comparing it with clinicomorphological parameters. **Material and Methods:** A total of 31 cases of AM and 20 cases of AOT were analyzed in a retrospective and cross-sectional study. Clinical data (sex, age, anatomical location, radiographic aspects and primary or recurrent lesion) were collected from biopsy request forms. In the morphological study, classification proposed by the WHO (2017) was considered. For the immunohistochemical study, it were established percentages of immunopositives cells to galectins -1, -3 and -7, considering differents cell compartments, in 10 microscopy fields in the parenchyma of AM and AOT. In the stroma, absence/presence of galectin immunoeexpression was considered. Data obtained were submitted to statistical analysis using the Mann-Whitney and Fisher's exact tests ( $p < 0.05$ ). **Results:** In morphological analysis and clinicoradiographic was observed a higher frequency of AM conventional ( $n=24$ ; 77.4%), and AOT follicular ( $n=12$ ; 60.0%). In immunohistochemical analysis was observed higher nuclear immunoeexpression of galectins -1 ( $p < 0.001$ ), -3 ( $p < 0.001$ ), and -7 ( $p < 0.001$ ) in AM. There was significant difference of immunoeexpression of nuclear galectin-1 with AM recurrent ( $p < 0.001$ ), cytoplasmatic galectin-1 with AM primary ( $p=0.028$ ), nuclear galectin-3 with AM symptomatic ( $p=0.014$ ), nuclear galectin-7 with AM conventional ( $p=0.040$ ), and cytoplasmatic galectin-7 with AM symptomatic ( $p=0.021$ ). AOTs showed higher cytoplasmatic immunoeexpression of galectins -3 ( $p=0.003$ ) and -7 ( $p=0.015$ ), and higher nuclear/cytoplasmatic immunoeexpression of galectins -1 ( $p=0.011$ ) and -3 ( $p=0.004$ ). There was significant difference of immunoeexpression of nuclear galectin-1 with AOT mandibular. ( $p=0.009$ ). In tumour stroma, AM showed higher expression of galectin-1 than AOT ( $p=0.007$ ). **Conclusions:** Expressive marking of galectins -1, -3 and -7 in AM and AOT, indicates your participation on pathogenesis of these tumors. In general, different immunoeexpression of galectins according to cell compartments, may partly justify the differences in the biological behavior of these lesions.

**Keywords:** Odontogenic tumors. Ameloblastoma. Adenomatoid odontogenic tumor. Immunohistochemistry. Galectins.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AM:** Ameloblastoma.
- BCL-2:** Do inglês, *B cell lymphoma protein 2*, traduzido como proteína 2 de célula de linfoma.
- BCL-X:** Do inglês *Bcl-2 associated protein X*, traduzido como proteína X associada a Bcl-2.
- BMP-2:** Do inglês, *Bone Morphogenetic Protein 2*, traduzido como proteína óssea morfogenética 2.
- BMP-4:** Do inglês, *Bone Morphogenetic Protein 4*, traduzido como proteína óssea morfogenética 4.
- BMPR-IA:** Do inglês, *Bone Morphogenetic Protein Receptor-IA*, traduzido como receptor de proteína óssea morfogenéticas-IA.
- BRAF:** Do inglês, *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B* traduzido como Gene homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma de murino v- raf.
- V600E:** Mutação no gene BRAF/ Troca dos aminoácidos valina por ácido glutâmico na posição 600.
- CA125:** Do inglês, *Cancer Antigen 125*, traduzido como antígeno do câncer 125.
- CAPES:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- CEA:** Do inglês, *Carcinoembryonic Antigen*, traduzido como antígeno carcinoembrionário.
- CCEO:** Carcinoma de células escamosas oral.
- CD2:** Do inglês, *Cluster of differentiation 2*, traduzido como grupamento de diferenciação 2.
- CD3:** Do inglês, *Cluster of differentiation 3*, traduzido como grupamento de diferenciação 3.
- CD4:** Do inglês, *Cluster of differentiation 4*, traduzido como grupamento de diferenciação 4.
- CD7:** Do inglês, *Cluster of differentiation 7*, traduzido como grupamento de diferenciação 7.
- CD34:** Do inglês, *Cluster of differentiation 34*, traduzido como grupamento de diferenciação 34.

- CD43:** Do inglês, *Cluster of differentiation 43*, traduzido como grupamento de diferenciação 43.
- CD45:** Do inglês, *Cluster of differentiation 45*, traduzido como grupamento de diferenciação 45.
- CD90:** Do inglês, *Cluster of differentiation 90*, traduzido como grupamento de diferenciação 90.
- CD107:** Do inglês, *Cluster of differentiation 107*, traduzido como grupamento de diferenciação 107.
- CD138:** Do inglês, *Cluster of differentiation 138*, traduzido como grupamento de diferenciação 138.
- CK14:** Do inglês, *Cytokeratin 14*, traduzido como citoqueratina 14.
- CK19:** Do inglês, *Cytokeratin 19*, traduzido como citoqueratina 19.
- CM:** Centímetro.
- CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- DRC:** Do inglês *Carbohydrate Recognition Domain (CRD)*, traduzido como domínio de reconhecimento de carboidratos.
- ERK:** Quinase regulada por sinal extracelular.
- GLUT-1:** Do inglês, *Glucose transporter protein 1*, traduzido como transportador de glicose 1.
- GM1:** Monossialogangliosídeo.
- HBGp82:** Hemoglobina do anelídeo *Glossoscolex paulistus*.
- Ki-67:** Antígeno nuclear utilizado como marcador de proliferação celular.
- KRAS:** Proteína codificada pelo gene *KRAS*.
- MAC-2BP:** Glicoproteína do soro humano.
- MAPK:** Proteína quinase ativada por mitógeno.
- MCM-7:** Do inglês, *Minichromosome Maintenance Protein 7*, traduzido como proteína de manutenção de minicromossomas 7.
- MEC:** Matriz extra-celular.
- MMPs:** Do inglês *matrix metalloproteinase*, traduzido como metaloproteinase de matriz.

- MOC-31:** Do inglês, *Epithelial Specific Antigen/Ep-CAM*, traduzido como antígeno epitelial específico.
- OMS:** Organização Mundial da Saúde.
- P40:** Do inglês *protein 40*, refere-se ao gene *P40* ou a proteína P40.
- P53:** Do inglês *protein 53*, refere-se ao gene *P53* ou a proteína P53.
- P63:** Do inglês *protein 63*, refere-se ao gene *P63* ou a proteína P63.
- PCNA:** Do inglês *proliferating cell nuclear antigen*, traduzido como antígeno nuclear de proliferação celular.
- PTEN:** Do inglês *Phosphatase and Tensin Homolog*, traduzido como fosfatase homóloga a tensina.
- PITX-2:** Do inglês, *Paired-like homeodomain transcription factor 2*, traduzido como gene do fator 2 de transcrição de homeodomínio pareado.
- RNA<sub>m</sub>:** Ácido ribonucleico mensageiro.
- SPSS:** Do inglês *Statistical Package for Social Sciences*, traduzido como Programa Estatístico para Ciências Sociais.
- TOA:** Tumor odontogênico adenomatoide.
- TRIS:** Tris (hidroximetil) aminometano.
- UEPB:** Universidade Estadual da Paraíba.
- UFRN:** Universidade Federal do Rio Grande do Norte
- UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais
- USA:** Do inglês *United States of America*, traduzido como Estados Unidos da América.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Quadro 1.</b> Características das galectinas de acordo com a estrutura molecular. Adaptado de Wdowiak <i>et al.</i> , 2018 .....  | 38            |
| <b>Quadro 2.</b> Variáveis independentes analisadas no estudo.....   | 49            |
| <b>Quadro 3.</b> Variáveis dependentes analisadas no estudo.....   | 49            |
| <b>Quadro 4.</b> Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.   | 50            |
| <b>Figura 1.</b> A) Presença de imunopresão da galectina-1 no estroma (100x), e em destaque, evidencia-se imunopresão nuclear em áreas centrais de células neoplásicas arranjadas frouxamente (400X). B e C) Imunopresão nuclear das galectinas -3 e -7 em AM folicular e plexiforme, respectivamente (400x). D, E e F) Imunopresão predominantemente nuclear/citoplasmática das galectinas-1, -3 e -7 em estruturas enoveladas e “duct-like” (400X) ( <i>Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup></i> , scale bar= 351,76µm)..... | 75            |



## LISTA DE TABELAS

---

## LISTA DE TABELAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Tabela 1.</b> Distribuição dos casos de AM e TOA, de acordo com os parâmetros clínicos .....                             | 69            |
| <b>Tabela 2.</b> Avaliação da imunoexpressão das galectinas -1, -3 e -7 no parênquima dos casos de AM e TOA .....           | 70            |
| <b>Tabela 3.</b> Diferença da imunoexpressão da galectina-1 nos casos de AM e TOA de acordo com os parâmetros clínicos..... | 71            |
| <b>Tabela 4.</b> Diferença da imunoexpressão da galectina-3 nos casos de AM e TOA de acordo com os parâmetros clínicos..... | 72            |
| <b>Tabela 5.</b> Diferença da imunoexpressão da galectina-7 nos casos de AM e TOA de acordo com os parâmetros clínicos..... | 73            |
| <b>Tabela 6.</b> Avaliação da imunoexpressão das galectinas -1, -3 e -7 no estroma tumoral dos casos de AM e TOA .....      | 74            |

## SUMÁRIO

---

## SUMÁRIO

|            | <b>Página</b>                                       |
|------------|---|
| <b>1</b>   | <b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> ..... 29              |
| <b>1.1</b> | <b>Ameloblastoma</b> ..... 29                       |
| 1.1.1      | Considerações iniciais ..... 29                     |
| 1.1.2      | Características clinicomorfológicas..... 29         |
| 1.1.3      | Etiopatogenia..... 31                               |
| <b>1.2</b> | <b>Tumor Odontogênico Adenomatoide</b> ..... 33     |
| 1.2.1      | Considerações iniciais..... 33                      |
| 1.2.2      | Características clinicomorfológicas..... 34         |
| 1.2.3      | Etiopatogenia..... 34                               |
| <b>1.3</b> | <b>Galectinas</b> ..... 37                          |
| 1.3.1      | Galectinas x Processos neoplásicos malignos..... 40 |
| 1.3.2      | Galectinas x Lesões odontogênicas..... 43           |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS</b> ..... 46                           |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo geral</b> ..... 46                      |
| <b>2.2</b> | <b>Objetivos específicos</b> ..... 46               |
| <b>3</b>   | <b>METODOLOGIA</b> ..... 48                         |
| <b>3.1</b> | <b>Aspectos éticos</b> ..... 48                     |
| <b>3.2</b> | <b>Caracterização do estudo</b> ..... 48            |
| <b>3.3</b> | <b>População</b> ..... 48                           |
| <b>3.4</b> | <b>Amostra</b> ..... 48                             |
| 3.4.1      | Critérios de inclusão..... 48                       |
| 3.4.2      | Critérios de exclusão..... 48                       |
| <b>3.5</b> | <b>Variáveis</b> ..... 49                           |
| <b>3.6</b> | <b>Estudo clínico</b> ..... 50                      |
| <b>3.7</b> | <b>Estudo morfológico</b> ..... 50                  |
| <b>3.8</b> | <b>Estudo imunoistoquímico</b> ..... 50             |
| 3.8.1      | Método imunoistoquímico..... 50                     |
| 3.8.2      | Análise imunoistoquímica..... 52                    |
| <b>3.9</b> | <b>Análise estatística</b> ..... 53                 |
| <b>4</b>   | <b>ARTIGO</b> ..... 55                              |

|            |                                    |            |
|------------|------------------------------------|------------|
| <b>4.1</b> | <b>Apresentação.....</b>           | <b>55</b>  |
| <b>4.2</b> | <b>Artigo a ser submetido.....</b> | <b>56</b>  |
| <b>5</b>   | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>   | <b>77</b>  |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>            | <b>79</b>  |
|            | <b>ANEXOS.....</b>                 | <b>88</b>  |
|            | <b>APÊNDICES.....</b>              | <b>108</b> |

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

---

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.1 Ameloblastoma

#### 1.1.1 Considerações iniciais

O ameloblastoma (AM) é uma neoplasia benigna de origem odontogênica, apresentando crescimento lento, localmente invasivo e envolvendo a mandíbula, em aproximadamente 80% dos casos (YANG *et al.*, 2017; PETROVIC *et al.*, 2018). Esta neoplasia foi descrita pela primeira vez por Cusack em 1827. Etimologicamente, o nome deriva da antiga palavra francesa “*amel*”, que significa esmalte, e da palavra grega “*blastos*”, que significa germe ou broto. Ao longo do tempo, este tumor foi referido por muitos nomes diferentes, incluindo “cistosarcoma”, “epitelioma adamantine”, “adamantinoma”, e finalmente “ameloblastoma” (MCCLARY *et al.*, 2016).

O AM representa 1% de todos os tumores de cabeça e pescoço, sendo o tipo mais comum dos tumores odontogênicos de origem epitelial (MILMAN *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017). Com uma incidência anual de 0,5 novos casos para cada 1.000.000 pessoas, o AM é considerado uma neoplasia relativamente rara. No entanto, existem diferenças geográficas quanto a sua incidência, sendo maior na África, China e Índia, em comparação com o mundo ocidental (MACCLARY *et al.*, 2016; KREPPEL; ZOLLER, 2018; EFFIOM *et al.*, 2018).

Em um estudo multicêntrico sobre lesões císticas e tumores odontogênicos em idosos, realizado em três regiões do Brasil, o AM foi o tumor odontogênico benigno mais frequente, representando 68% dos casos (SILVA *et al.*, 2018). Geralmente, os AMs são encontrados em indivíduos com idade entre 30 e 60 anos (MACCLARY *et al.*, 2016; EFFIOM *et al.*, 2018), e apenas 10 a 15% dos casos ocorrem na população pediátrica, podendo chegar a 25% na África e na Ásia (BANSAL *et al.*, 2015). No que diz respeito ao sexo dos indivíduos acometidos, o AM ocorre mais frequentemente em mulheres, em uma proporção variando de 1,2:1 (KREPPEL; ZOLLER, 2018) a 2,4:1 (SILVA, *et al.*, 2018).

#### 1.1.2 Características clinicomorfológicas

A apresentação clínica mais comum para o AM é uma tumefação indolor da mandíbula ou maxila, sem sintomas específicos (MILMAN *et al.*, 2016; KREPPEL; ZOLLER, 2018) e grande parte destes tumores são identificados ocasionalmente através de exames de imagem realizados para outras finalidades (BCELLI *et al.*, 2002; ESSER *et al.*, 2015). A dor é incomum, mas pode ocorrer devido a hemorragia no tecido mole adjacente (KALLIANPUR *et al.*, 2014; KREPPEL; ZOLLER, 2018). O deslocamento dentário e a reabsorção radicular

são pouco frequentes. Parestesias são incomuns, com raros casos relatados de invasão perineural (MCCLARY *et al.*, 2016).

O AM assemelha-se, histologicamente, ao órgão do esmalte de um dente em desenvolvimento, que não tem o potencial de formar tecidos duros dentais, pois o estroma não possui as propriedades do mesênquima dentário (OLUSANYA *et al.*, 2013; MACCLARY *et al.*, 2016). Três tipos de AM são descritos na classificação da OMS para os tumores odontogênicos: O tipo sólido/multicístico (convencional), unicístico e extraósseo/periférico (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

O AM mais comum é o tipo convencional, representando cerca de 91% de todos os casos de AO, sendo mais frequente em região posterior de mandíbula (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; EFFIOM *et al.*, 2018; KREPPEL; ZOLLER, 2018). Histologicamente, o AM convencional apresenta dois padrões distintos mais comuns: folicular e plexiforme. O tipo folicular exhibe células epiteliais proliferativas odontogênicas dispostas em ilhas ou estruturas foliculares, onde, na periferia, encontram-se células colunares com núcleos hipercromáticos, exibindo polaridade invertida e padrão de organização enpaquetado, enquanto que na região central as células estão dispostas frouxamente, o que lembra o arranjo histológico do retículo estrelado do órgão do esmalte (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; EFFIOM *et al.*, 2018). Já o tipo plexiforme exhibe filamentos anastomosados ou lençóis de epitélio ameloblástico, delimitados por células colunares ou cúbicas, que circundam as células epiteliais arranjadas mais frouxamente. É frequente observar dentro da mesma lesão, dois ou mais padrões histológicos. Além desses dois tipos histológicos, outros subtipos microscópicos são relatados, como o de células granulares, acantomatoso e desmoplásico (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; EFFIOM *et al.*, 2018).

O AM unicístico é o segundo tipo de ameloblastoma mais frequente e representa cerca de 5 a 15% de todos os casos (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; EFFIOM *et al.*, 2018), sendo mais frequentemente observado em pacientes jovens, idade média de 26,1 anos e localização principal sendo a região de mandíbula posterior. Frequentemente apresenta-se como uma tumefação assintomática (BANSAL *et al.*, 2015; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Radiograficamente, a maioria dos AMs unicísticos assemelham-se, ao cisto dentífero devido à sua associação com um dente não irrompido. Histopatologicamente, a classificação da OMS (2017) considera três principais variantes do AM unicístico: luminal, intraluminal e mural (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

O AM periférico é a variante mais rara, representando apenas 1% de todos os casos de AM (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; EFFIOM *et al.*, 2018), desenvolvendo-se mais frequentemente na gengiva posterior ou no sulco alveolar inferior. Histologicamente, o AM periférico consiste



em ilhas de epitélio ameloblástico, localizadas na lâmina própria, sob o epitélio superficial, assemelhando-se ao padrão histológico folicular do AM convencional (MCCLARY *et al.*, 2016; EFFIOM *et al.*, 2018).

O tratamento padrão para o AM convencional é a ressecção cirúrgica radical com margens de segurança de 1 cm, com taxas de recorrência variando de 4% a 20% (YANG *et al.*, 2017; KREPPEL; ZOLLER, 2018; FAHRADYAN *et al.*, 2018). Para os casos de AM convencional, geralmente associados a um maior índice de recorrência, margens de ressecção ainda maiores podem ser necessárias (MASTHAN *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2015; MILMAN *et al.*, 2016). A cirurgia conservadora, incluindo enucleação e curetagem, apresenta taxas de recorrência acima de 50% (ALMEIDA *et al.*, 2016; FAHRADYAN *et al.*, 2018), e só é considerada viável para o AM unicístico com padrão de crescimento intraluminal, pois raramente se infiltra no tecido circundante (MCCLARY *et al.*, 2016).

O prognóstico do AM depende de vários fatores, dentre eles o tamanho, extensão, localização, classificação do tumor e tratamento realizado (MCCLARY *et al.*, 2016). As taxas de recorrência são ditadas pela adequação das margens cirúrgicas (EFFIOM *et al.*, 2018; KREPPEL; ZOLLER, 2018) e extensão da lesão para estruturas vitais, como base do crânio, órbita e seios paranasais. O AM, quando em maxila, é mais agressivo, em termos de extensão da doença e recorrência. Esse comportamento é justificado pela hipótese de que a espessura mais delgada da cortical maxilar com relação a mandibular, proporciona uma barreira mais fraca para a disseminação locorregional do tumor (MCCLARY *et al.*, 2016).

### 1.1.3 Etiopatogenia

O conhecimento dos fatores etiológicos associados ao AM evoluiu com o passar dos anos, porém, ainda são pouco compreendidos. Teorias anteriores estavam relacionadas a trauma, inflamação, deficiências nutricionais, irritação não específica por extrações e cárie dentária (BROWN; BETZ, 2015; EFFIOM *et al.*, 2018). Como o desenvolvimento de tumores odontogênicos foi associado aos remanescentes do epitélio migratório na alça cervical do órgão do esmalte, acredita-se que o desenvolvimento do AM está ligado ao órgão do esmalte, remanescentes do epitélio odontogênico e ao revestimento de cistos odontogênicos (EFFIOM *et al.*, 2018).

Uma série de alterações genéticas e moleculares parecem promover o desenvolvimento e a progressão dos tumores através de múltiplas etapas, e estudos têm identificado várias alterações moleculares responsáveis pelo desenvolvimento e progressão destes (KUMAMOTO, 2006; SHUKLA *et al.*, 2017). A determinação dos fatores responsáveis por essa proliferação

neoplásica ajuda a esclarecer as diferenças entre o comportamento biológico de vários tumores (KHISHNA, *et al.*, 2012), como o AM.

Mutações em genes que participam da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), têm sido identificadas em quase 90% dos AMs, sendo a mutação BRAFV600E a mais comum (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; DUARTE-ANDRADE, *et al.*, 2019). O *BRAF* é o principal gene ativador da via de sinalização MAPK e mutações nesse gene estão associadas a alterações metabólicas que podem ter papel importante na patogênese do AM (DUARTE-ANDRADE, *et al.*, 2019). Fregnani *et al.* (2017) investigaram a expressão do BRAF-V600E em AMs e observaram que os casos que exibiam essa mutação apresentavam comportamento mais agressivo, sugerindo, portanto, o uso futuro de inibidores de BRAF para terapia direcionada desta neoplasia. A participação de outros genes na patogenia dos AMs também tem sido investigada, como o gene *BCL2L11* (COSTA *et al.*, 2017) e *KIAA0125* (DINIZ *et al.*, 2019).

As proliferações epiteliais desempenham um papel significativo no desenvolvimento de lesões odontogênicas e são um importante preditor do comportamento biológico e da condição patológica tumoral (SHUKLA *et al.*, 2017). As metaloproteinases de matriz (MMPs), por exemplo, são proteases com a capacidade de atuar sobre os componentes da matriz extracelular (MEC), favorecendo a invasão e proliferação de células neoplásicas (RIBEIRO *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2009).

Ribeiro *et al.* (2009) avaliaram a imunexpressão de MMPs-1, -2 e -9 em 20 casos de AM convencional e 10 casos de TOA. Observaram uma diferença significativa na maior imunexpressão da MMP-1 em relação a MMP-2 e -9, nos AMs. Sugeriram, portanto, que as MMPs podem estar relacionadas ao crescimento, progressão e maior agressividade dos AMs. Em estudo semelhante, Freitas *et al.* (2009) avaliaram a imunexpressão da MMP-7 e -26 em 20 casos de AM convencionais, 10 casos de TOA e não observaram diferença significativa destas imunexpressões entre as lesões. Acrescentam, que imunexpressão destas matrilisinas indica suas participações no processo de remodelação tecidual e crescimento tumoral, contudo, não estão relacionadas aos distintos padrões de agressividade.

Salehinejad *et al.* (2011) avaliaram a expressão de p53 e PCNA em 30 casos de AM e 12 casos de TOA e observaram que houve diferença estatisticamente significativa para o p53. Sugeriram, portanto, que a superexpressão do p53 nos AMs indica o seu comportamento biológico mais agressivo. Já Bologna-Molina *et al.* (2013) além do PCNA, também avaliaram a imunexpressão do Ki-67 em 161 casos de AM e observaram que o mesmo seria um marcador celular mais específico, para avaliar a agressividade dos AMs.

Razavi *et al.* (2012) investigaram a imunoeexpressão do Ki-67 e Bcl-2 em 16 casos de AM e 16 casos de TOA, e identificaram uma maior imunoeexpressão desses marcadores no AM. Shurkla *et al.* (2017) estudaram a imunoeexpressão do Bcl-X em 15 casos de AM, 15 casos de TOA e 15 casos de ceratocistos odontogênicos, e identificaram sua maior imunoeexpressão nos AMs, sugerindo, assim, uma maior atividade de sobrevivência celular no AM, caracterizando maior agressividade, comparado as demais lesões estudadas.

Por meio destes estudos é possível perceber que muitos destes utilizam o AM e TOA para realizar uma comparação de seus resultados. Isso se deve ao fato destes tumores odontogênicos benignos terem a mesma origem no epitélio odontogênico, porém apresentando comportamentos clínicos distintos (RIBEIRO *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2009; NASCIMETO *et al.*, 2017).

## **1.2 Tumor Odontogênico Adenomatóide**

### **1.2.1 Considerações iniciais**

A nomenclatura atual do TOA foi proposto por Philipsen em 1969 e adotada pela primeira vez na primeira edição da classificação da OMS (1971) dos tumores odontogênicos, e mantida na segunda edição de 1992 (KRAMER *et al.*, 1992). Posteriormente, na terceira edição da OMS (2005) de Tumores de Cabeça e Pescoço, o TOA foi definido como um tumor odontogênico “composto de epitélio odontogênico em uma variedade de padrões histoarquitetônicos, distribuídos em um estroma maduro de tecido conjuntivo e caracterizado por um crescimento lento e progressivo” (BARNES *et al.*, 2005). Recentemente, na 4ª edição da OMS (2017) de Tumores de Cabeça e Pescoço, o TOA foi definido como “um tumor epitelial benigno que mostra estruturas semelhantes a ductos” (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; MONACA *et al.*, 2019).

Na literatura, tem se discutido sobre a natureza do TOA, com alguns autores considerando-o uma verdadeira neoplasia benigna, sem potencial agressivo e invasivo, enquanto outros acreditam que se trate de um crescimento odontogênico hamartomoso, não havendo ainda um conjunto de evidências ou um consenso sobre esta dualidade (THAKUR *et al.*, 2016). O TOA é uma lesão relativamente rara, responsável por menos de 5% de todos os tumores odontogênicos (MARRELLI *et al.*, 2014; EL-NAGGAR *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018), e exibindo características clinicomorfológicas e prognóstico distintos do AM (RIBEIRO *et al.*, 2009; SALEHINEJAD *et al.*, 2011; RAZAVI *et al.*, 2012; BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2013; FREGNANI *et al.*, 2017; SHURKLA *et al.*, 2017). Acomete com maior frequência indivíduos na segunda e terceira décadas de vida, mulheres em uma proporção de 2:1

aproximadamente e ocorre com mais frequência na região anterior de maxila (AL-SHIMARI *et al.*, 2017; EL-NAGGAR *et al.*, 2017; MONACA *et al.*, 2019).

### 1.2.2 Características clinicomorfológicas

Clinicamente, o TOA apresenta-se em pequenas proporções, medindo em torno de 1 a 3 cm de diâmetro, com crescimento levemente expansivo, assintomático, podendo ou não haver deslocamento dos dentes adjacentes, raramente associado a reabsorções radiculares (REDDY KUNDOOR *et al.*, 2016; AL-SHIMARI *et al.*, 2017; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Radiograficamente, os casos de TOA apresentam-se de forma bem definida como lesões radiolúcidas uniloculares e cerca de 10% dos casos demonstram algum grau de calcificação (KALIA *et al.*, 2015; AL-SHIMARI *et al.*, 2017).

Três variantes clinicoradiológicas distintas são descritas: as variantes intraósseas são a folicular, que representa 73% dos casos e está relacionada a um dente retido; e a extrafolicular, que representa 24% dos casos e está associada a dentes irrompidos. A variante periférica representa apenas 3% de todos os casos, localizado no tecido mole, em áreas adjacentes aos dentes (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; KARAM GENNO, *et al.*, 2017; CRHCANOVIC *et al.*, 2019).

Histologicamente, o TOA é composto por células epiteliais fusiformes dispostas em cordões, esferas epiteliais ou rosetas e células epiteliais cuboidais dispostas em estruturas semelhantes a ductos, com ou sem calcificações (SEO *et al.*, 2015, KALIA *et al.*, 2015; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). A natureza das calcificações varia, de inespecífica a glóbulos semelhantes a cimento (SEO *et al.*, 2015; AL-SHIMARI *et al.*, 2017). Esses tumores são sustentados por um estroma constituído de tecido conjuntivo fibroso que facilita a separação da lesão associada ao dente e ao osso adjacente, permitindo, em alguns casos, que o dente impactado possa ser preservado em casos do subtipo folicular (AL-SHIMARI *et al.*, 2017).

O tratamento de escolha para o TOA é a remoção cirúrgica conservadora através de curetagem simples ou enucleação (SALUJA *et al.*, 2013; AL-SHIMARI *et al.*, 2017; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). O prognóstico é bom e as recorrências são extremamente raras, estando associadas, em geral, a lesões extrafoliculares localizadas em mandíbula, que apresentam um comportamento mais agressivo (JINDWANI *et al.*, 2015; AL-SHIMARI *et al.*, 2017; EL-NAGGAR *et al.*, 2017; SHAIKH *et al.*, 2018).

### 1.2.3 Etiopatogenia

Diferentes hipóteses para a histogênese do TOA têm sido propostas, como seu surgimento a partir do órgão do esmalte (OLIVEIRA, *et al.*, 2016; KARAM GENNO *et al.*, 2017), do revestimento epitelial do cisto dentífero (THAKUR *et al.*, 2016) restos epiteliais de Malassez de um dente decíduo ou permanente (IDE *et al.*, 2013; SHAIKH *et al.*, 2018) ou remanescentes da lâmina dentária (VIRUPAKSSHAPPA *et al.*, 2014; KARAM GENNO, *et al.*, 2017). No entanto, nenhum destes estudos recebeu amplo suporte para definir a histogênese certa desta lesão (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; MONACA *et al.*, 2019). Para a variante folicular, há evidências histológicas e imunoistoquímicas de que ela provém do epitélio reduzido do órgão do esmalte, enquanto a origem da variante extrafolicular é pouco elucidada (IDE *et al.*, 2013; THAKUR *et al.*, 2016). Philipsen *et al.* (2007) argumentaram que a histologia idêntica em todas as variantes do TOA indica uma origem comum que consistiria na lâmina dentária ou seus restos.

Estudos que analisam a base genética do TOA ainda são escassos, no entanto mutações em alguns genes, como o *IGF2BP3* (GOMES *et al.*, 2016), *AMBN* (ameloblastina) (PERDIGÃO *et al.*, 2004) e, recentemente, o *KRAS* (COURA *et al.*, 2019) foram identificados.

Coura *et al.* (2019) investigaram mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS*, em um largo estudo de coorte de 38 casos de TOA intraósseos. Seus resultados mostraram que 71% (27/38) dos casos de TOA exibiam mutações do códon 12 do *KRAS*, embora sem associação significativa com nenhum parâmetro clinicomorfológico da lesão. Portanto, os autores sugerem que mutações no gene *KRAS* e ativação da via MAPK são características comuns do TOA, estando relacionadas a patogênese desta lesão. Bologna-Molina *et al.* (2019) também avaliaram mutações do gene *KRAS* e a associação destas mutações com a presença das proteínas da via de sinalização MAPK/ERK em 9 casos de TOA. Da mesma forma, identificaram a presença de mutações no códon 12 do gene *KRAS* e de proteínas da via MAPK / ERK nos casos avaliados, sugerindo que a presença desta mutação e destas proteínas estão relacionadas a patogênese dos TOAs.

Estudos imunoistoquímicos, através da expressão de marcadores específicos, têm buscado um melhor entendimento sobre a origem, desenvolvimento e comportamento do TOA. Koneru *et al.* (2014) avaliaram a expressão e o papel da calretinina em 30 casos de AM, 30 casos de TOA e 30 casos de ceratocisto odontogênico. A calretinina é uma proteína ligadora de cálcio, conhecida por sua imunexpressão epitelial nos tumores odontogênicos. Os resultados desse estudo mostraram que a imunexpressão da calretinina foi maior e mais intensa nos casos de AM (90%), seguido pelos ceratocistos odontogênicos (80%) e que nenhum dos casos de TOA mostrou reatividade. Sugeriu-se, através achados, que a calretinina pode ser usada como

um marcador imunistoquímico específico para os AMs e que este marcador pode desempenhar um papel importante na diferenciação da agressividade de diferentes tumores odontogênicos.

Etemad-Moghadam *et al.* (2017) estudaram a imunexpressão do sindecan-1 (CD138), proteína que desempenha papel importante na adesão e coesão celular, em 7 casos de TOA, 7 casos de fibroma ameloblástico e 5 casos de mixoma odontogênico, 10 casos de AM e 29 casos de ceratocisto odontogênico. Concluíram que o sindecan-1 pode estar envolvido na patogênese da TOA, fibroma ameloblástico, ceratocisto odontogênico e AM. No entanto, considerando os diferentes comportamentos desses tumores, juntamente com sua expressão semelhante de sindecan-1, sugeriram que seu efeito sobre a agressividade clínica é limitado.

Sudhakara *et al.* (2016) analisaram e correlacionaram a imunexpressão da CK14 e da vimentina em 15 casos de cisto dentífero e 16 casos de TOA, sendo 10 do tipo folicular e 6 do tipo extrafolicular. Seus resultados mostraram que, praticamente em toda a amostra houve imunopositividade para CK14. Enquanto que a vimentina foi positiva em apenas 56% dos casos de TOA. Os resultados demonstraram que perfil de imunexpressão de CK14 em TOA e cistos dentíferos, suporta sua natureza epitelial odontogênica específica.

Nascimento *et al.* (2017) avaliaram a imunexpressão de BMP-2 e BMP-4 e de seus receptores (BMPR-IA e BMPR-II) em 30 casos de AM convencional, 10 casos de AM unicístico e 30 casos de TOA. As BMPs são proteínas morfogenéticas ósseas que desempenham um papel importante na formação de tecidos mineralizados. Em AMs convencionais, foram observadas correlações positivas entre a expressão estromal e parenquimatosa de BMP-2 ( $p < 0,001$ ) e entre a expressão estromal de BMP-2 e BMP-4 ( $p = 0,020$ ), bem como entre a expressão estromal de BMPR-II e BMP-4 ( $p = 0,001$ ) e a expressão estromal e parenquimatosa do BMPR-II ( $p < 0,001$ ). Nos AMs unicísticos, foram observadas correlações entre a expressão estromal e parenquimatosa de BMP-4 ( $p = 0,035$ ) e entre a expressão estromal de BMP-4 e BMPR-IA ( $p = 0,022$ ). Nos TOAs, a análise da imunexpressão no parênquima revelou correlações positivas entre todas as proteínas. Os resultados indicam que as BMPs e seus receptores desempenham um papel importante na diferenciação e desenvolvimento de AMs e TOAs, porém, não podem explicar os diferentes comportamentos biológicos dessas lesões. Além disso, a correlação positiva observada nos TOAs pode estar relacionada à formação de material mineralizado nesse tumor.

Santos *et al.* (2017) investigaram a presença de miofibroblastos, através da imunexpressão da  $\alpha$ -SMA, em 10 casos de AO convencionais, 10 casos de AM unicísticos, 20 casos de ceratocisto odontogênico e 20 casos de TOA. Os achados imunistoquímicos foram

correlacionados aos achados de agressividade tumoral, e também foram analisadas a imunoeexpressão de TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ . Uma maior concentração de miofibroblastos foi observada em AMs convencionais. Não houve correlação significativa entre a imunoeexpressão de TGF- $\beta$ 1 ou IFN- $\gamma$  e a presença de miofibroblastos ( $p > 0,05$ ). Seus resultados sugerem que o maior número de miofibroblastos pode estar relacionado ao comportamento biológico mais agressivo dos AMs. A falta de correlação entre o número de miofibroblastos e a imunoeexpressão de TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$  indica que essas proteínas não estão envolvidas na diferenciação celular destas lesões.

Argyris *et al.* (2018) avaliaram a imunoeexpressão dos anticorpos p40 e p63 isolados e também combinados em 14 casos de AM, sendo 8 do tipo convencional, 4 unicísticos, 1 periférico e 1 com padrão incomum; 7 casos de TOA; 6 tumores odontogênicos epiteliais calcificantes; 1 tumor odontogênico escamoso; 4 carcinomas odontogênicos intraósseos primários, 5 cistos odontogênicos calcificantes, 4 cistos odontogênicos glandulares, 3 ceratocistos odontogênicos, 3 cistos dentígeros e 1 cisto radicular. Todos os tumores foram imunopositivos para os marcadores p40 e p63. A imunomarcagem foi negativa na camada de queratina dos ceratocistos odontogênicos e nas células ductais e mucosas dos cistos odontogênicos glandulares. Seus resultados indicaram que o imunofenótipo p63/p40 não é discriminatório em relação aos tumores e cistos odontogênicos, sejam eles, benignos ou malignos.


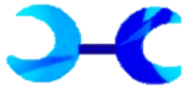

Tenório *et al.* (2019) avaliaram a imunoeexpressão das proteínas Bcl-2, Bax e p53, em 20 casos de AM, 20 casos de ceratocisto odontogênico e 20 casos de TOA. A imunoeexpressão dos três marcadores foi observada no componente epitelial de todas as lesões, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Contudo, foi identificada uma correlação positiva entre a expressão de p53 e Bcl-2 e uma correlação negativa entre as expressões p53 e Bax. Como estas proteínas são reguladoras da apoptose e do ciclo celular, seus achados sugerem que a imunoeexpressão das mesmas em lesões odontogênicas epiteliais, pode estar relacionada ao comportamento biológico de AMs e ceratocistos odontogênicos.

### 1.3 Galectinas

As galectinas foram identificadas na década de 1970 e inicialmente denominadas lectinas do tipo S, devido à sua solubilidade e à dependência de sulfidrilas das primeiras galectinas descobertas, mas sua nomenclatura tornou-se sistemática em 1994 (ADVEDISSIAN *et al.*, 2017). Desde então, a classificação baseou-se na ordem de descoberta das mesmas. Várias galectinas podem estar expressas na mesma espécie e 16 tipos já foram identificados em

mamíferos, sendo 12 destas em humanos (ADVEDISSIAN *et al.*, 2017; WDOWIAK *et al.*, 2018).

As galectinas são secretadas por uma via não convencional e, portanto, podem ser localizadas tanto em compartimentos extracelulares, como no meio intracelular, no citosol, núcleo, ou nas mitocôndrias (WENTWORTH *et al.*, 2010; WDOWIAK *et al.*, 2018). Elas podem ser classificadas em três grupos com base em sua estrutura: as galectinas do tipo protótipo que contêm um Domínio de Reconhecimento de Carboidratos (DRC) que pode formar homodímeros, incluindo as galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15 e -16; as galectinas do tipo repetido em série que contêm dois DRCs e estão unidas por um ligante flexível, incluindo as galectinas -4, -6, -8, -9 e -12; e a galectina-3 do tipo “quimera” que contém um domínio DRC e uma extensão N-terminal (ADVEDISSIAN *et al.*, 2017; DINGS *et al.*, 2018; BRINCHMANN *et al.*, 2018) (QUADRO 1).

| Subtipo           | Galectina  | Modelo  | Estrutura   |
|-------------------|--|---|---|
| Protótipo         | -1, -2, -5, -7,<br>-10, -11, -13,<br>-14, -15, -16 |   | Cada monômero de homodímero contém um DRC                     |
| Repetido em série | -4, -6, -8, -9, -12                                |  | Dois domínios do DRC conectados ao vinculador                 |
| Quimérico         | -3   |  | Estruturas multiméricas com um DRC em C-terminal e N-terminal |

**Quadro 1: Características das galectinas de acordo com a estrutura molecular.**  
Adaptado de Wdowiak *et al.*, 2018.

Mesmo que a ligação de carboidratos seja o modo mais comum de ação das galectinas, estas também podem interagir com outras proteínas livre de carboidratos. Os ligantes de galectina mais conhecidos são CD45, CD43, CD7, CEA, CD2, CD3, CD4, CD107, laminina, fibronectina, glicosaminoglicanos, integrinas, gangliosídeo GM1, polipeptídeo HBGP82, glicoproteína 90 K / MAC-2BP e antígeno CA125 (ELOLA *et al.*, 2005; BRINCHMANN *et al.*, 2018).



A expressão das galectinas pode sofrer variação, a depender do tipo de célula, ou do estado de ativação desse tipo celular. Todas as células parecem expressar pelo menos uma galectina, e cada galectina tende a ser expressa em alta concentração em diferentes tipos de células (LEFFLER, 2001; DINGS *et al.*, 2018). As galectinas podem ser translocadas para o núcleo ou para outros locais subcelulares após serem sintetizadas em ribossomos citosólicos. Elas possuem várias características em comum com proteínas citosólicas, como a carência de um peptídeo sinal de secreção ou segmentos transmembrana típicos. Esse perfil diverso de ocorrência das galectinas se reflete nos diferentes papéis biológicos multifuncionais que elas apresentam (LIU *et al.*, 2005; DINGS *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação extracelular das galectinas, geralmente, inicia-se com sua ligação aos sacarídeos associados aos glicoconjugados da superfície celular (BREWER *et al.*, 2002; DINGS *et al.*, 2018). A função geral de qualquer galectina pode variar consideravelmente, como por exemplo, induzir ou suprimir a apoptose dependendo do compartimento celular onde se encontram (ALVES *et al.*, 2011; MESQUITA *et al.*, 2016). Portanto, a atividade de qualquer galectina pode ser múltipla, e suas atividades relacionadas a auto-associação, interações com glicanos de superfície celular e interações com outras biomoléculas *in situ*, tanto extracelular como intracelularmente, podem exercer efeito significativo na função desta galectina (DINGS *et al.*, 2018).

A galectina-1 é um protótipo constituído de um DRC. É liberada por células do tecido adiposo, células estromais no timo, linfonodos, células endoteliais e células da placenta (BRINCHMANN *et al.*, 2018). Pode atuar ao nível intracelular como um efetor da duplicação de pré-mRNA, ou extracelularmente como uma proteína de ligação a numerosas glicoproteínas, glicolipídios e elementos da MEC (VERSCHUERE *et al.*, 2013). Além disso, a galectina-1 tem a capacidade de afetar a adesão e agregação de células, especialmente em células neoplásicas, podendo influenciar processos metastáticos (WDOWIAK *et al.*, 2018). A apoptose de células T ativadas, ou seja, iniciadas pelo antígeno, também tem sido associada a essa galectina, favorecendo assim a imunossupressão. Desta forma, a galectina-1 pode regular a homeostase de células T pela supressão da expansão clonal e indução da apoptose (STURM *et al.*, 2004; BRINCHMANN *et al.*, 2018).

A galectina-3 é a única quimera por ser constituída de um DRC C-terminal e um prolongamento N-terminal. Pode ser encontrada em tecidos saudáveis e neoplásicos, e está envolvida em processos como inflamação, adesão celular, angiogênese, crescimento celular, proliferação e apoptose (NEWLACZYL *et al.*, 2011; WDOWIAK *et al.*, 2018). A galectina-3, assim como a galectina-1, pode induzir a apoptose de células T (FUKUMORI *et al.*, 2003;

BRINCHMANN *et al.*, 2018); a extremidade terminal N e a coordenada do DRC induzem as vias de sinalização, levando à ativação da caspase-9. A inibição da extremidade N-terminal com um anticorpo cessa o estímulo da apoptose (XUE *et al.*, 2017). Esta galectina pode apresentar-se como antiapoptótica ou pró-apoptótica, quando presente no citoplasma e núcleo respectivamente (ALVES *et al.*, 2011; MESQUITA *et al.*, 2016). O efeito antiapoptótico é dependente da fosforilação da serina 6 na galectina-3 e da presença intracelular da galectina-3 (YOSHII *et al.*, 2002; BRINCHMANN *et al.*, 2018); fosforilada, a galectina-3 pode ser translocada do núcleo para o citoplasma para atuar na inibição da apoptose (TAKENAKA *et al.*, 2004; BRINCHMANN *et al.*, 2018).

A galectina-7 é uma galectina prototípica, com um único DRC, capaz de formar homodímeros divalentes. É principalmente expressa em epitélios estratificados, estando envolvida em atividades como apoptose, proliferação, diferenciação, adesão e migração celular (ADVEDISSIAN *et al.*, 2017; BRINCHMANN *et al.*, 2018). Entre as galectinas, a galectina-7 é anormalmente expressa em vários tipos de câncer, mais proeminentemente em carcinomas, e está envolvida na progressão e metástase destas lesões, porém, suas funções na biologia do tumor ainda não são bem compreendidas. Estudos têm mostrado o papel da galectina-7 na resposta celular à apoptose (SAUSSEZ *et al.*, 2006; ADVEDISSIAN *et al.*, 2017; DINGS *et al.*, 2018). No entanto, de acordo com as condições experimentais, a galectina-7, exerceu papel como fator pró-apoptótico e como fator antiapoptótico, indicando que sua atividade na apoptose varia de acordo com o contexto celular ou estímulo apoptótico (BRINCHMANN *et al.*, 2018).

### 1.3.1 Galectinas x Processos Neoplásicos Malignos

Devido às diversas funções que possuem, como na apoptose, angiogênese, migração celular e escape imune de tumores, as galectinas podem afetar a sinalização celular e homeostase dos tecidos, e quando presentes em níveis alterados têm sido implicadas na biologia e surgimento do câncer (RABINOVICH *et al.*, 2007; THIJSEN *et al.*, 2015). Em células tumorais, as galectinas intracelulares podem reduzir a apoptose promovendo o desenvolvimento e proliferação tumoral (NAKAHARA *et al.*, 2008; CHOU *et al.*, 2018). Diversos estudos têm demonstrado a participação das galectinas na carcinogênese de mama (CAMPION *et al.*, 2013), tireoide (ARCÓLIA *et al.*, 2017), ovário (SCHULZ *et al.*, 2017), glândulas salivares (ANDISHEH-TADBIR *et al.*, 2018) e de câncer de cabeça e pescoço (ALVES *et al.*, 2011; MESQUITA *et al.*, 2016).

Campion *et al.* (2013) analisaram a imunexpressão da galectina-7 em células de câncer de mama, buscando elucidar o papel desta galectina na agressividade desta neoplasia. Diante

dos resultados, onde elevados níveis de imunexpressão da galectina-7 foram observados, os autores sugeriram, que esta lectina pode participar diretamente do desenvolvimento neoplásico, e também está envolvida em uma via comum usada pela p53 mutante, para promover a progressão do câncer.

Arcólia *et al.* (2017) avaliaram a imunexpressão das galectinas -1 e -3 em 69 casos de lesões da tireoide e observaram que os níveis citoplasmáticos de ambas as galectinas aumentaram significativamente nas células neoplásicas. Seus achados suportam a utilização da galectina-1 como um marcador de diagnóstico confiável para carcinomas de tireoide. Seu envolvimento na proliferação celular, migração, invasão e crescimento tumoral também indicam a participação efetiva da galectina-1 na progressão do carcinoma de tireoide, sugerindo seu potencial como alvo terapêutico.

Schulz *et al.* (2017) analisaram a imunomarcção das galectinas -1, -3 e -7 em 156 casos de câncer de ovário. Seus resultados mostraram que a imunexpressão da galectina-1 no parênquima e no estroma pode servir como fator prognóstico negativo para o câncer de ovário, assim como a galectina-7 localizada no citoplasma das células tumorais. Em contrapartida, a imunexpressão da galectina-3 no núcleo das células tumorais pode ser um novo marcador prognóstico positivo para esta neoplasia.

Andisheh-Tadbir *et al.* (2018) avaliaram os níveis séricos de galectina-3 em 105 casos de neoplasias de glândulas salivares comparando com 56 indivíduos saudáveis. Estes níveis foram mais elevados em pacientes com câncer de glândula salivar em comparação com a população saudável. Seus resultados mostram também diferença significativa entre pacientes com tumores benignos e malignos. Portanto, os autores sugerem que a avaliação dos níveis séricos da galectina-3 pode auxiliar no diagnóstico de neoplasias malignas de glândula salivar.

Wang *et al.* (2018) revisaram o papel das galectinas -1, -3, -7 e -9 no câncer de colo de útero. A partir de seus achados, concluíram que as galectinas desempenham papel importante na tumorigênese, e que os quatro tipos estudados podem ser preditores para a progressão deste tipo de neoplasia, bem como marcadores prognósticos e uma opção para a terapia genética alvo no futuro.

Hu *et al.* (2019) objetivaram validar o valor prognóstico da galectina-4 em uma coorte de pacientes com câncer pancreático submetidos a tratamento cirúrgico. Seus achados indicam a expressão da galectina-4 como sendo um novo biomarcador para recidiva e mortalidade após cirurgia de ressecção desta neoplasia.

Zheng *et al.* (2019) revisaram o papel e diferentes mecanismos das galectinas envolvidos no desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de leucemia. Observaram

que as galectinas -1, -3, -9 e -12 desempenham importante papel na etiopatogenia de diferentes tipos de leucemia, e concluíram que as galectinas e seus receptores correspondentes podem servir como novos alvos farmacológicos no manejo da leucemia.

As galectinas têm sido bastante utilizadas em estudos imunoistoquímicos como ferramentas sensíveis, confiáveis e de fácil utilização para descrever alterações que ocorrem em células tumorais (ALVES *et al.*, 2011). Em distúrbios potencialmente malignos orais (CARVALHO *et al.*, 2013, LOPES *et al.*, 2016) e em neoplasias malignas, como o carcinoma de células escamosas oral (CCEO) (ALVES *et al.*, 2011; MESQUITA *et al.*, 2016), estas lectinas têm sido bem estudadas e com resultados que mostram o seu papel na biologia e desenvolvimento destas lesões.

Carvalho *et al.* (2013) analisaram a imunoposição das galectinas -1, -3 e -7 em 50 casos de displasia epitelial oral. A galectina-1 foi imunoposita em 33 casos, a galectina-3 em 27 casos e a galectina-7 em 44 casos. Seus achados levaram à conclusão de que os diferentes graus de imunoposição destes marcadores em displasia epitelial oral sugerem o envolvimento destas proteínas na progressão das displasias. Lopes *et al.* (2016) além destas galectinas, avaliaram também, a imunoposição da galectina-9 em 65 casos de queilite actínica e concluíram, que existe o envolvimento destas galectinas na patogênese e progressão morfológica da queilite actínica, em especial as galectinas -3 e -9.

Alves *et al.* (2011) analisaram a expressão imunoistoquímica de galectinas -1, -3, -4 e -7 em 65 casos de carcinoma de células escamosas em língua e correlacionaram essa expressão com dados clínicos como o desfecho da doença, presença de metástase e estágio clínico, e com parâmetros morfológicos como o grau histológico de malignidade. Após análise, concluíram que a intensa imunoposição das galectinas -1, -3 e -7 sugere a participação dessas proteínas na carcinogênese e sua utilização como marcadores de comportamento biológico e progressão tumoral no carcinoma de células escamosas da língua.

Mesquita *et al.* (2016) estudaram a expressão imunoistoquímica de galectinas -3 e -7 em 32 casos de CCEO de pacientes jovens e correlacionaram essa expressão com parâmetros clínicos e morfológicos. Constatou-se imunoposição de galectina-3 em 65,6% dos casos analisados, mas sem associação significativa com nenhum dos parâmetros clínicos estudados (estadiamento clínico, e sistemas de classificação histológica de malignidade). A imunoposição da galectina-7 foi observada em 96,9% dos casos e foi significativamente associada aos sistemas de classificação histológica de malignidade da OMS e de Bryne ( $p < 0,05$ ). Os resultados levaram os autores a concluir e sugerir o uso de galectina-7 como marcador de comportamento biológico e progressão tumoral no CCEO em pacientes jovens.

### 1.3.2 Galectinas x Lesões Odontogênicas

No que diz respeito a participação das galectinas na patogênese de lesões odontogênicas, poucos estudos foram realizados (OLIVEIRA *et al.*, 2014; BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2017; BRITO *et al.*, 2018; CLEMENTINO, 2018; WEBER *et al.*, 2019). Oliveira *et al.* (2014) avaliaram a expressão *in situ* de receptores toll-like (TLRs) -2, -4 e galectinas -3 e -9 em 30 casos de cisto radicular, 27 casos de granuloma periapical e 5 amostras de tecido pulpar que constituíram o grupo controle. Em seus resultados, observaram que galectinas -3, -9 e TLR-2 foram significativamente imunoexpressos em ambas as lesões em comparação com o controle. Os autores concluíram que a expressão das galectinas e TLRs em granulomas periapicais e cistos radiculares está associada à inflamação periapical reativa, e sugerem a regulação positiva destas moléculas bioativas para modulação de lesões inflamatórias periapicais.

Brito *et al.* (2018) avaliaram as imunoexpressões das galectinas -1, -3 e -7 em 20 casos de granuloma periapical, 20 casos de cisto radicular e 20 casos de cisto radicular residual. Os resultados mostraram uma maior expressão citoplasmática/membranar das galectinas -1 e -7 no tecido conjuntivo de granulomas periapicais quando comparado as outras duas lesões. No componente epitelial, uma maior expressão nuclear da galectina-7 pôde ser observada em cistos radiculares residuais. Correlações positivas foram observadas entre a expressão nuclear e citoplasmática /membranar da galectina-1 no tecido conjuntivo ( $p < 0,05$ ), e da galectina-7 no tecido epitelial dos cistos ( $p < 0,05$ ). Seus resultados permitiram destacar importantes papéis das galectinas -1 e -7 na patogênese destas lesões e sugerem um envolvimento menor da galectina-3.

Clementino (2018) investigou a imunoexpressão das galectinas -1, -3 e -7 em 20 ceratocistos odontogênicos isolados e 20 casos de ceratocistos odontogênicos associados a síndrome de Gorlin. Ambos os grupos de lesões, apresentaram maior frequência de casos negativos para as galectinas -1 e -3, enquanto que a galectina-7 foi imunoexpressa em todos os casos de ceratocisto odontogênico avaliados, com percentuais de positividade relativamente altos e predomínio da imunorreatividade em camada parabasal/superficial destas lesões. Os dois grupos avaliados apresentaram correlação positiva entre as expressões nucleares e citoplasmática/membranar, tanto para a galectina-3 quanto para a galectina-7 ( $p < 0,05$ ). Seus achados demonstraram que as diferenças no comportamento biológico dos dois grupos de ceratocisto avaliados não estão relacionadas a imunoexpressão das galectinas. Contudo, a galectina-7 pode desempenhar importantes funções na patogênese dos ceratocistos odontogênicos.

Weber *et al.* (2019) com o objetivo de obter uma melhor compreensão da fisiopatologia da inflamação e reabsorção óssea em lesões periapicais, avaliaram a imunexpressão da galectina-3 em 41 casos de granuloma periapical, 23 casos de cisto radicular e 23 casos de cisto dentífero. Além da galectina-3, os autores também avaliaram o papel das seguintes proteínas: HLA-DR, CD83, MCSF, RANK-L, CD-4 e CD8. Como resultados para a galectina-3, observaram que esta proteína foi significativamente maior nos cistos radiculares em comparação com os granulomas periapicais. Em conclusão os autores sugerem que as proteínas avaliadas podem atuar como marcadores inflamatórios, e que o aumento da inflamação associada a maior reabsorção óssea, pode promover a formação de cistos radiculares.

Em tumores odontogênicos, imunexpressão da galectina-3 foi avaliada por Bologna-Molina *et al.* (2017) em uma série de quatro casos de tumor odontogênico primordial. Além da galectina-3, os autores também investigaram o papel das seguintes proteínas: amelogenina, CK19, CK14, vimentina, calretinina, syndecan-1, GLUT-1, Ki-67, MCM-7, ciclina D1, PTEN, p-53, PITX2, caveolin-1, BRAFV600E, MOC-31, CD-34, CD105, CD-90, Bcl-X, Bcl-2 e survivina. Como resultados para a galectina-3, observaram que este marcador foi variavelmente expresso em células epiteliais que circundam a periferia do tumor, sobretudo no citoplasma destas células, sugerindo seu possível papel na proliferação celular do tumor odontogênico primordial.

## **OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar, comparativamente, por meio da imunoistoquímica, a expressão das galectinas -1, -3 e -7 em uma série de casos de AMs benignos e TOAs.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Traçar o perfil dos dados clínicos, radiográficos e morfológicos de uma série de casos de AM e TOA.
- Estabelecer os percentuais de células imunopositivas para as galectinas -1, -3 e -7, nos casos de AM e TOA.
- Avaliar e comparar a imunoexpressão das galectinas -1, -3 e -7, quanto a presença ou ausência no estroma tumoral dos AM e TOA.
- Determinar os percentuais de imunoexpressão das galectinas -1, -3 e -7, no parênquima tumoral dos AMs e TOAs, quanto ao compartimento celular (nuclear, citoplasmática, nuclear/citoplasmática).
- Relacionar a imunoexpressão das galectinas -1, -3 e -7 com os parâmetros clinicomorfológicos (localização da lesão, classificação, tipo e sintomatologia) dos AMs e TOAs.



## METODOLOGIA

---

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Aspectos éticos**

O projeto de pesquisa foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e submetido à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), obtendo parecer favorável de nº 3.373.525 (ANEXO A).

### **3.2 Caracterização do estudo**

O estudo consiste em uma pesquisa observacional, com corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das imunopropriedades das galectinas -1, -3 e -7 em casos de AM e TOA.

### **3.3 População**

A população do estudo foi constituída por todos os casos de AM e TOA diagnosticados e arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, e também, alguns casos de TOA do Serviço de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### **3.4 Amostra**

A amostra, que foi do tipo não probabilística, por conveniência, constituída por 31 casos de AM e 20 casos de TOA, todos emblocados em parafina.

#### **3.4.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos na amostra, apenas casos de AM e TOA provenientes de biópsias excisional ou ressecção cirúrgica que contivessem material suficiente para análise. Além disso, foram incluídos no estudo, os casos cujas fichas clínicas contivessem informações relativas à idade e sexo dos pacientes, a localização anatômica, características radiográficas, sintomatologia e recidiva da lesão.

#### **3.4.2 Critérios de exclusão**

Para ambos os grupos de lesões (AM e TOA), foram excluídos da pesquisa casos que não contivessem as informações de interesse preenchidas nas fichas clínicas, e casos de AM submetidos previamente à descompressão.

### 3.5 Variáveis

As variáveis independentes e dependentes analisadas no presente estudo estão listadas nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

**Quadro 2.** Variáveis independentes analisadas no estudo.

| VARIÁVEL  | DEFINIÇÃO                                    | CATEGORIA                              |
|---|--|--|
| Idade   | Idade do paciente                            | Anos                                   |
| Sexo  | Sexo do paciente                             | Masculino/Feminino                     |
| Localização   | Localização anatômica                        | Maxila/Mandíbula<br>Anterior/Posterior |
| Classificação dos TOAs OMS (EL-NAGGAR <i>et al.</i> , 2017) | Variantes do tumor odontogênico adenomatoide | Folicular/Extrafolicular               |
| Classificação dos AMs OMS (EL-NAGGAR <i>et al.</i> , 2017)  | Subtipos de ameloblastoma                    | Convencional/Unicístico                |
| Sintomatologia  | Sintomas associados a lesão                  | Presente/Ausente                       |
| Recidiva  | Lesão recidivante                            | Sim/Não                                |

**Quadro 3.** Variáveis dependentes analisadas no estudo.

| VARIÁVEL                      | DEFINIÇÃO  | CATEGORIA   |
|-------------------------------|--|---|
| Imunoexpressão da galectina-1 | Percentual das células positivas no parênquima /<br>Imunomarcação no estroma | Parênquima: Nuclear /<br>Citoplasmática / Membranar.<br>Estroma: Presente/Ausente |
| Imunoexpressão da galectina-3 | Percentual das células positivas no parênquima /<br>Imunomarcação no estroma | Parênquima: Nuclear /<br>Citoplasmática / Membranar.<br>Estroma: Presente/Ausente |
| Imunoexpressão da galectina-7 | Percentual das células positivas no parênquima /<br>Imunomarcação no estroma | Parênquima: Nuclear /<br>Citoplasmática / Membranar.<br>Estroma: Presente/Ausente |

### 3.6 Estudo clínico

Os dados clínicos (sexo, idade, localização anatômica, características radiográficas, sintomatologia e recidiva) foram coletados a partir das fichas clínicas dos pacientes e transcritos para uma ficha específica, elaborada pelo próprio pesquisador (APÊNDICE A).

### 3.7 Estudo morfológico

A partir do material emblocado em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 5µm, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina com hematoxilina e eosina. Em sequência, os cortes histológicos foram analisados em microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) por um examinador previamente treinado e classificados, morfológicamente, quanto ao padrão de arranjo celular, de acordo com a Classificação da OMS (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

### 3.8 Estudo imunoistoquímico

#### 3.8.1 Método imunoistoquímico

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 preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, Advanced Biosystems Inc., 44 Redwood, CA, USA). As secções de tecido foram incubadas com os anticorpos monoclonal anti-galectina-1, policlonais anti-galectina-3 e anti-galectina-7. (QUADRO 4)

**Quadro 4.** Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

| Especificidade | Clone   | Fabricante                           | Diluição | Recuperação antigênica           | Incubação |
|----------------|---------|--------------------------------------|----------|----------------------------------|-----------|
| Galectina-1    | (E-2)   | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX | 1: 3000  | Citrato, pH = 6,0, vapor, 60 min | 60 min    |
| Galectina-3    | (H-160) | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX | 1: 1000  | Citrato, pH = 6,0, vapor, 60 min | 60 min    |
| Galectina-7    | (H-8)   | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX | 1: 4000  | Sem tratamento                   | 60 min    |

O controle positivo foi constituído por cortes histológicos de hiperplasia fibrosa inflamatória. Já o controle negativo, foi feito a partir da omissão dos anticorpos primários, no protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Odontologia da UEPB, descrito a seguir:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);
- ⇒ Reidratação 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)
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 4);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ 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);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*EnVision Flex antibody diluent*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (QUADRO 4);
- ⇒ Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário conjugado com polímero de dextrano, (*Amplifier*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP conjugate*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);

- ⇒ Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ substrate system*, 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 (2,5 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em álcool absoluto:
  - 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-polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

### 3.8.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) por um examinador previamente treinado. Para as análises imunoistoquímicas, foi realizado o mascaramento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. Foram consideradas positivas, tanto no estroma quanto no parênquima, as células com coloração acastanhada. No estroma tumoral do AM e TOA, as imunoexpressões das galectinas-1, -3 e -7 foram avaliadas, quanto a presença ou ausência. No parênquima tumoral, a expressão das galectinas foi avaliada de acordo com compartimento celular em que estavam imunoexpressas (núcleo e/ou citoplasma e/ou membrana).

Para a análise da imunoexpressão das galectinas -1, -3, e -7, foram adaptadas as metodologias utilizadas nos estudos de Ribeiro *et al.* (2009) e Brito *et al.* (2018). Por meio de um microscópio de luz, em aumento de 100x, foram identificadas as áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos. Sob aumento de 400x, 10 campos de maior imunorreatividade foram fotomicrografados (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH). Em seguida, as imagens foram transferidas para um computador e a contagem de células realizada com o auxílio do programa ImageJ (*Imaging Processing and Analysis in Java*,

National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Para a imunexpressão no parênquima tumoral, foi determinado o número de células positivas e negativas em cada campo microscópico, de acordo com o compartimento celular, e em seguida, os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o percentual de células positivas em relação ao total de células contadas. Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas previamente elaboradas pelo próprio pesquisador (APÊNDICE B).

### **3.9 Análise estatística**

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 17.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a análise imunoistoquímica, para o parênquima, foram submetidos à análise de distribuição, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Como os dados apresentaram distribuição não-normal, foram realizadas comparações das medianas dos percentuais de imunopositividade para galectinas -1, -3 e -7 pelo teste de Mann-Whitney, de acordo com o tipo de lesão e características clínicomorfológicas. Comparação da imunexpressão no estroma tumoral foi avaliada por meio do teste Exato de Fisher. Considerou-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os testes aplicados.

ARTIGO

---



## 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 desse projeto, um artigo será apresentado nesta dissertação: **“Perfil imunoistoquímico das galectinas -1, -3 e -7 em ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatoide”**.

O referido artigo será submetido ao periódico *Archives of Oral Biology* (ISSN: 0003-9969, Fator de impacto: 1.663, Qualis A1), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

## 4.2 Artigo a ser submetido

### **PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DAS GALECTINAS -1, -3 E -7 EM AMELOBLASTOMA E TUMOR ODONTOGÊNICO ADENOMATOIDE**

### **PROFILE IMMUNOHISTOCHEMICAL OF GALECTINS -1, -3 AND -7 IN AMELOBLASTOMA AND ADENOMATOID ODONTOGENIC TUMOR**

**Running title: Galectin-1, -3 and -7 in odontogenic tumors**

Walter Gleybson Antas de Moraes<sup>1</sup>, Luan Éverton Galdino Barnabé<sup>1</sup>, Éricka Janine Dantas da Silveira DDS PhD<sup>2</sup>, Ricardo Alves de Mesquita DDS PhD<sup>3</sup>, Manuel Antônio Gordón Núñez<sup>1</sup> DDS PhD, Cassiano Francisco Weege Nonaka DDS PhD<sup>1</sup>, Pollianna Muniz Alves DDS PhD<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>*Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil.*

<sup>2</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.*

<sup>3</sup>*Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.*

Corresponding Author

Profa. Pollianna Muniz Alves, Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Odontologia, Rua Baraúnas, 351, Universitário, Campina Grande, PB CEP 58429-600, Brazil.

E-mail: pmunizalves@gmail.com

**Abstract**

**Objectives:** To investigate the profile immunohistochemical of galectins -1, -3 and -7 in ameloblastoma (AM) and adenomatoid odontogenic tumor (AOT), comparing it with clinicomorphological parameters.

**Design:** A total of 31 cases of AM and 20 cases of AOT were analyzed in a retrospective and cross-sectional study. Immunoexpression analysis of the galectin-1, -3 and -7 was performed in parenchyma (quantitatively) and stroma (presence or absent). In the parenchyma was too considered cell compartment (nucleus and/or cytoplasm) of immunopositivity. For statistical analysis was used the nonparametric Mann-Whitney test and Fisher's exact test ( $p < 0.05$ )

**Results:** In parenchyma, AM showed highest nuclear expression of galectin-1 ( $p < 0.001$ ), galectin-3 ( $p < 0.001$ ) and galectin-7 ( $p < 0.001$ ). Significant differences were observed in the immunoexpression of nuclear galectin-1 with recurrent AM ( $p < 0.001$ ) and nuclear galectin-7 with conventional AM ( $p = 0.040$ ). In tumour stroma, AM showed higher expression of galectin-1 than AOT ( $p = 0.007$ ). AOT exhibited highest expression of cytoplasmatic galectin-3 ( $p = 0.003$ ) and galectin-7 ( $p = 0.015$ ), and nuclear/cytoplasmatic galectin-1 ( $p = 0.011$ ) and galectin-3 ( $p = 0.004$ ). Significant differences were observed in the immunoexpression of nuclear galectin-1 with AOT in mandible ( $p = 0.009$ ).

**Conclusions:** Galectins -1, -3 and -7 play role on pathogenesis of AM and AOT. Stromal galectin-1 in AO suggest a possible role in tissue remodeling these tumours. Nuclear expression of galectins -1 and -7 in recurrent and conventional AM, it suggests a possible function proliferative and/or antiapoptotic these galectins, thus, related to distinct pattern of aggressiveness of ameloblastoma.

**Keywords:** Ameloblastoma; Tumor Odontogênico Adenomatoides; Galectinas; Imunoistoquímica.

## 1 Introdução

Os tumores odontogênicos compreendem um grupo de lesões heterogêneas que, do ponto de vista biológico, podem ser representados por proliferações não neoplásicas com diversos graus de diferenciação ou neoplasias benignas e malignas, e algumas destas últimas com potencial metastático (Lawal *et al.*, 2013; Gómez-Herrera *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS), classifica esses tumores de acordo com a sua origem tecidual, podendo ser epitelial, como o ameloblastoma (AM) e o tumor odontogênico adenomatoide (TOA), mesenquimal ou mista (El-Naggar *et al.*, 2017).

Apesar do AM e TOA terem a mesma origem no epitélio odontogênico, estes tumores apresentam comportamentos clínicos bem distintos. O AM, principalmente o subtipo convencional, tem um padrão de crescimento localmente agressivo, com altos índices de recorrência, podendo chegar a 70% dos casos, dependendo do tratamento preconizado (Devilliers *et al.*, 2011; Effiom *et al.*, 2018; Tenório *et al.*, 2018). Em contrapartida, o TOA apresenta um curso clínico indolente, com recorrências extremamente raras (Al-Shimari *et al.*, 2017; Tenório *et al.*, 2018).

Essa diferença do comportamento biológico entre AMs e TOAs tem sido alvo de numerosas investigações científicas por meio da análise específica de proteínas e marcadores relacionados ao ciclo celular (Kumar *et al.*, 2011; Ravazi *et al.*, 2017; Tenório *et al.*, 2018), moléculas de adesão (Entemad-Moghadam & Alaeddini, 2017), fatores relacionados com apoptose (Salehinejad *et al.*, 2011; Ravazi *et al.*, 2017; Tenório *et al.*, 2018), e as metaloproteinases de matriz (MMPs) (Freitas *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009). Como exemplo de proteínas relacionadas ao ciclo celular e as vias de apoptose, podem se citar as galectinas (Alves *et al.*, 2011, Brinchmann *et al.*, 2018).

As galectinas, membros da família das lectinas, são proteínas ligantes de carboidratos que possuem afinidade por  $\beta$ -galactosídeos, cujos papéis têm sido amplamente investigados através de estudos imunistoquímicos, em diversas lesões da cavidade oral, como carcinoma de células escamosas de língua (Alves *et al.*, 2011), displasias epiteliais orais (Carvalho *et al.*, 2013), queilite actínica (Lopes *et al.*, 2016) e neoplasias de glândulas salivares (Allo *et al.*, 2020). Essas proteínas são importantes moduladores de processos e funções celulares, como o controle do processamento de pré-mRNA, ciclo celular, divisão celular e apoptose (Shimura *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2013; Pugliese *et al.*, 2014; Labrie, *et al.*, 2015; Brinchmann *et al.*, 2018).

Em relação ao papel das galectinas -1, -3 e -7 nas lesões odontogênicas, a literatura ainda é bastante escassa. Em cistos odontogênicos, tem sido avaliadas, até o momento, em cistos radiculares (Brito *et al.*, 2018) e cisto dentífero (Weber *et al.*, 2019). Nos tumores

odontogênicos, apenas a galectina-3 tem sido investigada no tumor odontogênico primordial (Bologna-Molina *et al.*, 2017) e AM (Pereira Prado *et al.*, 2020). Portanto, baseado neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil imunistoquímico das galectinas -1, -3 e -7 em AM e TOA, comparando-o com parâmetros clínicomorfológicos.

## **2 Material e métodos**

### *2.1 Desenho do estudo*

Trata-se de um estudo retrospectivo transversal, caracterizado pela análise, registro e quantificação das imunoexpressões das galectinas-1, -3 e -7, em 31 casos de AM e 20 casos de TOA, obtidos no Serviço de Histopatologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram incluídos no estudo casos que continham nas fichas clínicas informações necessárias a pesquisa (idade, sexo dos pacientes, localização anatômica, sintomatologia, características radiográficas e recidiva das lesões. Foram excluídos do estudo casos que não apresentavam material biológico suficiente para a realização das análises, que fossem provenientes de biópsia incisional e aqueles casos de AM submetidos previamente à descompressão. Este estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UEPB (Parecer nº 3.373.525).

### *2.2 Análise morfológica*

Cortes histológicos com 5µm de espessura foram obtidos de material biológico incluído em parafina e, subsequentemente, corados em hematoxilina e eosina (HE). Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), um patologista oral experiente analisou os casos, morfológicamente, de acordo com a classificação proposta pela OMS (El-Naggar *et al.*, 2017). Os AM foram classificados como convencional e unicístico (El-Naggar *et al.*, 2017).

### *2.3 Estudo Imunoistoquímico*

Cortes histológicos com 3µm de espessura foram obtidos e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo a base de organosilano. Os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica. Em sequência, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Após incubação com os anticorpos primários monoclonais anti-galectina-1 (clone E-2, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, diluição de 1:300, 60 minutos) e policlonais anti-galectina-3 (H-160, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, diluição

de 1:1000, 60 minutos) e anti-galectina-7 (clone H-8, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, diluição de 1:400, 60 minutos) os cortes teciduais foram lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, CA, USA). A atividade da peroxidase foi visualizada por meio da imersão dos cortes em diaminobenzidina, resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Por fim, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com lamínula. Cortes histológicos de hiperplasia fibrosa inflamatória foram empregados como controle positivo. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito anteriormente.

#### 2.4 Análise imunoistoquímica

Os cortes teciduais foram analisados sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por um examinador previamente treinado. Foram consideradas imunopositivas, as células que exibiam núcleo, citoplasma ou núcleo/citoplasma acastanhados. No parênquima das lesões, a análise da imunexpressão das galectinas-1, -3, e -7 foi adaptada da metodologia utilizada no estudo de Brito *et al.* (2018). Sob aumento de 200×, foram identificados 10 campos de maior imunorreatividade aos anticorpos utilizados. Cada campo foi fotomicrografado (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), sob aumento de 400×, e as imagens obtidas foram transferidas para o programa ImageJ® (Imaging Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Em cada um dos campos fotomicrografados, a imunomarcção foi quantificada de acordo com os diferentes compartimentos celulares (núcleo, citoplasma e núcleo/citoplasma). Com isso, foi possível estabelecer o percentual de células positivas em relação ao total de células contadas. No estroma, foi verificada apenas a presença ou ausência da imunomarcção (Ribeiro *et al.*, 2009).

#### 2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. A análise do percentual de imunopositividade celular para as galectinas -1, -3 e -7 foi analisada pelo teste Komogorov-Smirnov, que demonstrou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para as galectinas -1, -3 e -7, entre as lesões estudadas e com parâmetros clinicopatológicos. O teste Exato de Fisher foi utilizado para comparar a

imunoeexpressão das galectinas no estroma dos AM e TOAs. Para todos os testes estatísticos, foi considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3 Resultados

#### 3.1 Estudo Clinicomorfológico

Os resultados das análises clinicomorfológicas estão resumidos na Tabela 1. Para o AM foi observada uma maior frequência de indivíduos do sexo feminino ( $n=20$ ; 65,5%) e média de idade  $37,79 \pm 18,89$  anos. A maioria dos casos eram assintomáticos ( $n=25$ ; 80,6%) e a localização mais predominante foi a região posterior de mandíbula ( $n=22$ ; 71%). Foi observado um maior número de casos classificados como convencional ( $n=24$ ; 77,4%) e do tipo primário ( $n=25$ ; 80,6%). Para o TOA foi observada uma maior frequência de indivíduos do sexo feminino ( $n=12$ ; 60%) e média de idade  $16,25 \pm 10,91$  anos. A maioria dos casos era assintomático ( $n=17$ ; 85%) e a localização mais predominante foi a região anterior de maxila ( $n=11$ ; 55%). A maioria dos casos foi classificado como folicular ( $n=12$ ; 60%) e do tipo primário ( $n=17$ ; 85%).

#### 3.2 Imunoexpressão das Galectinas -1, -3 e -7

Com relação a imunoexpressão no parênquima, observou-se que as galectinas -1 e -3 foram imunopositivas em todos os casos de AM e TOA, enquanto que a galectina-7 exibiu imunoexpressão em 96,7% ( $n=30$ ) dos casos de AM e em todos os casos de TOA. No AM com padrão histológico folicular observou-se predomínio de imunomarcção em células da região central, arranjadas frouxamente, enquanto que no tipo unicístico, a imunomarcção foi maior nas células superficiais, distantes da camada basal (Fig.1A, 1B e 1C). Nos TOA observou-se predomínio de imunomarcção nas áreas enoveladas e nas estruturas “*duct like*” (Fig1D, E e F).

No parênquima, houve maior imunoexpressão nuclear da galectina-1 ( $p < 0,001$ ), galectina-3 ( $p < 0,001$ ) e galectina-7 ( $p < 0,001$ ) no AM comparado ao TOA (Tabela 2). Quando avaliada a imunoexpressão das galectinas com os parâmetros clínicos, observou-se maior expressão da galectina-1 nuclear em AM recidivante ( $p=0,001$ ) e galectina-1 citoplasmática em casos de AM primários ( $p=0,028$ ) (Tabela 3). Observou-se também maior expressão da galectina-3 nuclear em AM assintomáticos ( $p=0,014$ ) (Tabela 4), galectina-7 nuclear em AM convencional ( $p=0,040$ ) e da galectina-7 citoplasmática em AM sintomáticos ( $p=0,021$ ) (Tabela 5). No que diz respeito aos TOAs, houve diferença estatisticamente significativa da imunoexpressão da galectina-1 nuclear/citoplasmática ( $p=0,011$ ), galectina-3 citoplasmática

( $p=0,003$ ) e nuclear/citoplasmática ( $p=0,004$ ), e também da galectina-7 citoplasmática ( $p=0,015$ ) (Tabela 2). Quando comparada a imunexpressão das galectinas com os parâmetros clínicos, observou-se maior expressão da galectina-1 nuclear em TOA em mandíbula ( $p=0,009$ ) (Tabela 3).

Com relação a imunexpressão no estroma, observou-se maior expressão da galectina-1 em AM ( $p=0,007$ ). A galectina-3 foi expressa em 61,3% ( $n=19$ ) dos casos de AM e em 35% ( $n=7$ ) dos casos de TOA, e a galectina-7 foi expressa em 6,5% ( $n=2$ ) dos casos de AO e 5% ( $n=1$ ) dos casos de TOA, conforme mostra a Tabela 6.

#### 4 Discussão

AM e TOA são tumores odontogênicos que compartilham a mesma origem epitelial, porém, apresentam comportamentos clínicos bastante distintos (Ribeiro *et al.*, 2009; Salehinejad *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2017; Tenório *et al.*, 2018). O presente estudo mostrou maior imunexpressão nuclear das galectinas -1, -3 e -7 nos AM, associadas com casos convencionais e recorrentes, o que pode ser indicativo que essas galectinas podem exercer influência no potencial proliferativo desta neoplasia. Estudos têm mostrado que o papel das galectinas pode variar de acordo com sua localização nos diferentes compartimentos celulares e de acordo com o tipo celular (Alves *et al.*, 2011; Viguier *et al.*, 2014; Mesquita *et al.*, 2015). Considerando essa premissa, sugere-se que, no TOA, a maior expressão das galectinas no citoplasma refletem um possível papel pró-apoptótico.

Diversos estudos têm demonstrado o papel das galectinas na proliferação celular e nas vias de apoptose (Shimura *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2010; Harazono *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2018). Gao *et al.* (2018) observaram que a interação da galectina-1 nuclear com o *FOXP3*, medeia a perda de função supressora de tumor do gene *FOXP3*, promovendo, assim, proliferação celular neoplásica. No estudo de Elad-Sfadia *et al.* (2002), foram analisados os mecanismos de ativação do gene *RAS* em cultura de células embrionárias (células HEK-293) e observaram que a galectina-1 intracelular interage com o H-*RAS*, prolongando ativação seletiva deste gene em relação ao *RAF-1*, promovendo ativação da via *ERK* e, assim, aumentando a proliferação celular. Os resultados encontrados em nosso estudo, mostrando maior expressão nuclear da galectina-1 em AM recidivante e convencional pode reforçar seu possível papel proliferativo neste tipo de neoplasia. Este possível papel proliferativo também poderia ser justificado nos casos de TOA mandibulares, uma vez que, nossos resultados demonstraram uma maior expressão da galectina-1 nuclear com casos de TOA localizados em mandíbula. A



literatura mostra que a variante mais agressiva do TOA representa os casos diagnosticados em mandíbula (Shaikh *et al.*, 2018).

No que diz respeito a imunexpressão das galectinas no estroma tumoral, nossos resultados demonstraram significativa expressão da galectina-1 nos casos de AM. Sabe-se que o microambiente tumoral exerce grande importância no desenvolvimento de neoplasias (Freitas *et al.*, 2009; Karathanasi *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2016; Bologna-Molina *et al.*, 2020). Zheng *et al.* (2016), verificaram, através de cultura de células, uma superexpressão da galectina-1 em fibroblastos de carcinoma gástrico, e também observaram que a galectina-1 inibia a apoptose destas células, a partir da interação com o *TGF-β*. Segundo Nagi *et al.* (2016), o *TGF-β*, mediado por proteínas SMAD, exerce importante papel na infiltração tumoral, sobretudo nos casos de ameloblastomas mais agressivos.

Em relação à galectina-3, seus efeitos na proliferação e controle do ciclo celular podem estar relacionados a capacidade de translocação nuclear pela ligação com importina e interação com diversas ciclinas (Nakahara *et al.*, 2006). Song *et al.* (2009) observaram, em cultura de células de câncer de cólon, que a galectina-3 regula níveis de  $\beta$ -catenina nuclear, sugerindo, assim, um papel da galectina-3 na regulação positiva da via Wnt/ $\beta$ -catenina. A via Wnt/ $\beta$ -catenina também tem demonstrado participação no desenvolvimento tumoral de AM (Tanahashi *et al.*, 2008) e TOA (Harnet *et al.*, 2013), sendo que nos casos de AM a maior expressão da  $\beta$ -catenina é nuclear e nos casos de TOA é citoplasmática. Estudos também tem demonstrado que a galectina-3 nuclear pode promover ativação da via *PI3K/AKT*, atuando como sinalização de pró-sobrevivência e inibindo sinais pró-apoptóticos (Harazono *et al.*, 2014). Segundo Scheper *et al.* (2008), no AM a sinalização aberrante na via *PI3K/AKT* e *mTOR* promove maior proliferação e sobrevivência celular, podendo ser uma das vias responsáveis pelo comportamento mais agressivo destes tumores.

Quanto à maior expressão nuclear da galectina-7 em AM que foi evidenciada em nossa pesquisa, estudos em outros tipos de patologias também têm demonstrado seu possível papel antiapoptótico e proliferativo (Suassez *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2011). Estudos comentam que a galectina-7 inibe a expressão do p53, induz a secreção de MMP-9 e ativa a via *PI3K/AKT*, favorecendo a proliferação celular e crescimento tumoral (Zhu *et al.*, 2010). Acrescentando, estudos mostram que há maior expressão da MMP-9 em AM quando comparado ao TOA (Ribeiro *et al.*, 2009; Jhamb & Kramer, 2014).

No entanto, a galectina-7 também pode ativar a via *JNK*, promover a liberação de citocromo C e a ligação de Bcl-2 à membrana mitocondrial, promovendo apoptose celular (Kim *et al.*, 2013). Kuwabara *et al.* (2002) comentaram que a galectina-7 citoplasmática é ativada

pelo p53 e aumenta a liberação do citocromo C, atuando, assim, como proteína pró-apoptótica. Acrescentando, Labrie *et al.* (2015) comentam que a galectina-7 citoplasmática pode inibir a função do Bcl-2, exercendo, desta forma, um papel pró-apoptótico. A ação pró-apoptótica exercida por esta galectina foi mais evidente nos casos de TOA da presente pesquisa.

Em resumo, nossos resultados indicam a participação das galectinas -1, -3 e -7 no desenvolvimento tumoral do AM e TOA. No entanto, pode se observar que o papel desempenhado por cada galectina, varia de acordo com o compartimento celular. A maior imunoexpressão nuclear das galectinas no AM, estando associadas a casos recidivantes e convencionais, sugere possível função proliferativa e/ou antiapoptótica destas proteínas, estando assim, relacionadas a maior agressividade do AM.

Declaração de interesse: nenhuma.

Aprovação ética: este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB, Campina Grande, Brasil (número de protocolo: 3.373.525).

Agradecimentos: Este estudo foi apoiado pelo Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Financiamento: Recursos próprios

## Referências

- Allo, V. C. M., Hauk, V., Sarbia, N., Pinto, N., Croci, D. O., Dalotto-Moreno, T., Morales, R. M., Gatto, S. L., Cocco, M. N M., Stupirski, J. C., Deladoey, A., Marona, E., Marcaida, P., Durigan, V., Secco, A., Mamani, M., SantosA., Pellet, A. C., Leiros, C. P., Rabinovich, G. A., & Toscano, M. A. (2020). Suppression of age-related salivary gland autoimmunity by glycosylation-dependent galectin-1-driven immune inhibitory circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(12), 6630-6639. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922778117>
- Alves, P. M., Godoy, G. P., Gomes, D. Q., Medeiros, A. M. C., Souza, L. B., Silveira, E. J. D., Vasconcelos, M. G., & Queiroz, L. M. G. (2011). Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Pathology, Research and Practice*, 207(4), 236-240. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.02.004>
- Al-Shimari, F., Chandra, S., & Oda. D. (2017). Adenomatoid odontogenic tumor: Case series of 14 with wide range of clinical presentation. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(11), e1315-e1321. <https://doi.org/10.4317/jced.54216>
- Bologna-Molina, R., Mikami, T., Pereira-Prado, V., Pires, F. R., Bregni, R. C. & Taylor, A. M. (2017). Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal*, 22(3), 314-323. <https://doi.org/10.4317/medoral.21859>

- Bologna-Molina, R., Pereira-Prado, V., Sánchez-Romero, C., González-González, R., & Mosqueda-Taylor, A. (2020). Primordial odontogenic tumor: A systematic review. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 25(3), e388-e394. <https://doi.org/10.4317/medoral.23432>
- Brinchmann, M. F., Patel, M. D., & Iversen, M. H. (2018). The role of galectins as modulators of metabolism and inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2018, 9186940. <https://doi.org/10.1155/2018/9186940>
- Brito, L. N. S., Almeida, M. M. R., Souza, L. B., Alves, P. M., Nonaka, C. F. W., & Godoy, G. P. (2018). Immunohistochemical Analysis of Galectins-1, -3, and -7 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts. *Journal of Endodontics*, 44(5), 728-733. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.01.008>
- Carvalho, M. V., Pereira, J. S., Alves, P. M., Silveira, E. J. D., Souza, L. B., & Queiroz, L. M. G. (2013). Alterations in the immunoexpression of galectins-1, -3 and -7 between different grades of oral epithelial dysplasia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 42(2), 174–179. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2012.01199.x>
- DeVilliers, P., Suggs, C., Simmons, D., Murrah, V., & Wright, J. T. (2011). Microgenomics of ameloblastoma. *Journal of Dental Research*, 90(4), 463-469. <https://doi.org/10.1177/0022034510391791>
- Effiom, O. A., Ogundana, O. M., Akinshipo, A. O., & Akintoye, S. O. (2018). Ameloblastoma: current etiopathological concepts and management. *Oral Diseases*, 24(3), 307-316. <https://doi.org/10.1111/odi.12646>
- El-Naggar, A. K., Chan, J. K. C., Grandis, J. R., Takata, T., & Slootweg, P. J. (2017). WHO Classification of Head and Neck Tumours. Lyon: França: International Agency for Research on Cancer.
- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., Gabius, H. J., & Kloog, Y. (2002). Galectin-1 Augments Ras Activation and Diverts Ras Signals to Raf-1 at the Expense of Phosphoinositide 3-Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37169-37175. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205698200>
- Etemad-Moghadam, S., & Alaeddini, M. (2017). A comparative study of syndecan-1 expression in different odontogenic tumors. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 7(1), 23-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2016.11.001>
- Freitas, V. S., Araújo, C. R. F., Alves, P. M., Souza, L. B., Galvão, H. C., & Freitas, R. A. (2009). Immunohistochemical expression of matrilysins (MMP-7 and MMP-26) in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 108(3), 417-424. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.03.035>
- Gao, Y., Li, X., Shu, Z., Zhang, K., Xue, X., Li, W., Hao, Q., Wang, Z., Zhang, W., Wang, S., Zeng, C., Fan, D., Zhang, W., Zhang, Y., Zhao, H., Li, M., & Zhang, C. (2018). Nuclear

- galectin-1-FOXP3 interaction dampens the tumor-suppressive properties of FOXP3 in breast cancer. *Cell Death and Disease*, 9(4), 416-430. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0448-6>
- Gómez-Herrera, Z., Molina-Frechero, N., Damián-Matsumura, P., & Bologna-Molina, R. (2018). Proteoglycans as potential biomarkers in odontogenic tumors. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 22(1), 98-103. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_151\\_17](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_151_17)
- Harazono, Y., Kho, D. H., Balan, V., Nakajima, K., Zhang, T., Hogan, V., & Raz, A. (2014). Galectin-3 leads to attenuation of apoptosis through Bax heterodimerization in human thyroid carcinoma cells. *Oncotarget*, 5(20), 9992-10001. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2486>
- Harnet, J. C., Pedeutour, F., Raybaud, H., Ambrosetti, D., Fabas, T., & Lombardi, T. (2013). Immunohistological Features in Adenomatoid Odontogenic Tumor: Review of the Literature and First Expression and Mutational Analysis of b-Catenin in This Unusual Lesion of the Jaws. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 71(4), 706-713. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2012.10.006>
- Jhamb, T., & Kramer, J. M. (2014). Molecular concepts in the pathogenesis of ameloblastoma: Implications for therapeutics. *Experimental and Molecular Pathology*, 97(3), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.09.001>
- Karathanasi, V., Tosios, K. I., Nikitakis, N. G., Piperi, E., Koutlas, I., Trimis, G., & Sklavounou, A. (2012). TGF- $\beta$ 1, Smad-2/-3, Smad-1/-5/-8, and Smad-4 signaling factors are expressed in ameloblastomas, adenomatoid odontogenic tumors, and calcifying cystic odontogenic tumors: an immunohistochemical study. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 42(5), 415-423. <https://doi.org/10.1111/jop.12016>
- Kim, H. J., Jeon, H. K., Lee, J. K., Sung, C. O., Do, I. G., Choi, C. H., Kim, T. J., Kim, B. G., Bae, D. S., & Lee, J. W. (2013). Clinical Significance of Galectin-7 in Epithelial Ovarian Cancer. *Anticancer Research*, 33, 1555-1562. <http://ar.iiarjournals.org/content/33/4/1555.long>
- Kumar, H., Vandana, R., & Kumar, G. S. (2011). Immunohistochemical expression of cyclin D1 in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 15(3), 283-287. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.86685>
- Kuwabara, I., Kuwabara, Y., Yang, R. Y., Schuler, M., Green, D. R., Zuraw, B. L., Hsu, D. K., & Liu, F. T. (2002). Galectin-7 (PIG1) Exhibits Pro-apoptotic Function through JNK Activation and Mitochondrial Cytochrome *c* Release. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), 3487-3497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109360200>
- Labrie, M., Vladoiu, M., Leclerc, B. G., Grosset, A. A., Gaboury, L., Stagg, J., & St-Pierre, Y. (2015). Expression and functions of galectin-7 in ovarian cancer. *PLoS One*, 10(7), e0131307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131307>
- Lawal, A. O., Adisa, A. O., & Olusanya, A. A. (2013). Odontogenic tumours: A review of 266 cases. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 5(1), e13-7. <https://doi.org/10.4317/jced.50949>
- Lopes, M. L., Nonaka, C. F., Queiroz, L. M., Souza, L. B., Miguel, M. C., & Silveira, E. J. (2016). Pattern of galectins expression in actinic cheilitis with different risks of malignant

transformation. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 45(8), 621-626.  
<https://doi.org/10.1111/jop.12410>

Mesquita, J. A., Queiroz, L. M. G., Silveira, E. J. D., Gordon-Nunez, M. A., Godoy, G. P., Nonaka, C. F. W., & Alves, P. M. (2015). Association of immunoeexpression of the galectins-3 and -7 with histopathological and clinical parameters in oral squamous cell carcinoma in young patients. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 273(1), 237-243.  
<https://doi.org/10.1007/s00405-014-3439-y>

Nascimento, M. A., Nonaka, C. F. W., Barboza, C. A. G., Freitas, R. A., Pinto, L. P., & Souza, L. B. (2017). Immunoeexpression of BMP-2 and BMP-4 and their receptors, BMPR-IA and BMPR-II, in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Archives of Oral Biology*, 73, 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.022>

Nagi, R., Sahu, S., & Rakesh, N. (2016). Molecular and genetic aspects in the etiopathogenesis of ameloblastoma: An update. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 20(3), 497-504. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.190954>

Nakahara, S., Hogan, V., Inohara, H., & Raz, A. (2006). Importin-mediated Nuclear Translocation of Galectin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39649-39659.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M608069200>

Pereira-Prado, V., Vigil-Bastitta, G., Sánchez-Romero, C., Arocena, M., Molina-Frechero, N., González-González, R., Meleti, M., & Bologna-Molina, R. (2020). Immunoeexpression of galectin-3 and its potential relation to hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in ameloblastomas. *Biotechnic & Histochemistry*, 2020, 1-6. <https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1800819>

Pugliese, G., Iacobini, C., Ricci, C., Fantauzzi, C. B., & Menini, S. (2014). Galectin-3 in diabetic patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52(10), 1413-1423.  
<https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0187>

Razavi, S. M., Tabatabaie, S. H., Hoseini, A. T., Hoseini, E. T., & Khabazian, A. (2017). A comparative immunohistochemical study of Ki-67 and Bcl-2 expression in solid ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 21(1), 51-57. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.95235>

Ribeiro, B. F., Iglesias, D. P. P., Nascimento, G. J. F., Galva, H. C., Medeiros, A. M. C., & Freitas, R. A. (2009). Immunoeexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Diseases*, 15(7), 472-477.  
<https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01575.x>

Salehinejad, J., Mahmoodabadi, R. Z., Saghafi, S., Jafarian, A. H., Ghazi, N., Rajaei, A. R., & Marouzi, P. (2011). Immunohistochemical Detection of p53 and PCNA in Ameloblastoma and Adenomatoid Odontogenic Tumor. *Journal of Oral Science*, 53(2), 213-217.  
<https://doi.org/10.2334/josnusd.53.213>

Saussez, S., Decaestecker, C., Lorfèvre, F., Chevalier, D., Mortuaire, G., Kaltner, H., & Marouzi, P. (2008). Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour progression in

hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. *Histopathology*, 52(4), 483-493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.02973.x>

Scheper, M. A., Chaisuparat, R., Nikitakis, N. G., & Sauk, J. J. (2008). Expression and alterations of the PTEN/AKT/mTOR pathway in ameloblastomas. *Oral Diseases*, 14, 561–568. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01421.x>

Shaikh, S., Bansal, S., Desai, R. S., & Ahmad, I. (2018). Aggressive adenomatoid odontogenic tumor of the mandible: A rare case report and review of the literature. *Journal of Oral and Maxillo Facial Pathology*, 22, S11-S15. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_69\\_15](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_69_15)

Shimura, T., Takenaka, Y., Tsutsumi, S., Hogan, V., Kikuchi, A., & Raz, A. (2004). Galectin-3, a Novel Binding Partner of  $\beta$ -Catenin. *Cancer Research*, 64(18), 6363-6367. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1816>

Silva, L. P., Serpa, M. S., Sobral, A. P. V., Arruda, J. A. A., Silva, L. V. O., Noronha, M. S., Kato, C. O., Mesquita, R. A., Schuch, L. F., Gomes, A. P. N., Vasconcelos, A. C. U., Souza, L. B. (2018). A retrospective multicentre study of cystic lesions and odontogenic tumours in older people. *Gerodontology*, 35(4), 325-332. <https://doi.org/10.1111/ger.12354>

Song, S., Mazurek, N., Liu, C., Sun, Y., Ding, Q. Q., Liu, K., Hung, M. C., & Bresalier, R. S. (2009) Galectin-3 Mediates Nuclear  $\beta$ -Catenin Accumulation and Wnt Signaling in Human Colon Cancer Cells by Regulation of GSK-3 $\beta$  Activity. *Cancer Research*, 69(4), 1343–1349. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4153>

Tanahashi, J., Daa, T., Yada, N., Kashima, K., Kondoh, Y., & Yokoyama, S. (2008). Mutational analysis of Wnt signaling molecules in ameloblastoma with aberrant nuclear expression of  $\beta$ -catenin. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 37(9), 565-570. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00645.x>

Tenório, J. R., Santana, T., Queiroz, S. I., Oliveira, D. H., & Queiroz, L. M. (2018). Apoptosis and cell cycle aberrations in epithelial odontogenic lesions: An evidence by the expression of p53, Bcl-2 and Bax. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 23(2), 120-125. <https://doi.org/doi:10.4317/medoral.22019>

Viguiet, M., Advedissian, T., Delacour, D., Poirier, F., & Deshayes, F. (2014). Galectins in epithelial functions. *Tissue Barriers*, 2, e29103. <https://doi.org/10.4161/tisb.29103>

Weber, M., Ries, J., Büttner-Herold, M., Geppert, C-I., Kesting, M., & Wehrhan, F. (2019). Differences in inflammation and bone resorption between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. *Journal of Endodontics*, 45(10), 1200-1208. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.06.014>

Zheng, L., Xu, C., Guan, Z., Su, X., Xu, Z., Cao, J., & Teng, L. (2016). Galectin-1 mediates TGF- $\beta$ -induced transformation from normal fibroblasts into carcinoma-associated fibroblasts and promotes tumor progression in gastric cancer. *American Journal of Translational Research*, 8(4), 1641-1658. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859895/>

Zhu, X., Ding, M., Yu, M. L., Feng, M. X., Tan, L. J., & Zhao, F. K. (2010) Identification of galectin-7 as a Potential Biomarker for Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Proteomic Analysis. *BMC Cancer*, 10, 290-302. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-290>

**Tabela 1**

*DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE AM E TOA, DE ACORDO COM OS PARÂMETROS CLÍNICOS.*

|                      | AM                   | TOA                |
|----------------------|----------------------|--------------------|
| Variáveis clínicas   |                      |                    |
| Idade (em anos)      | 37,79 ±18,89 (11-85) | 16,25±10,91 (6-53) |
| Sexo                 |                      |                    |
| Masculino            | 11 (35,5%)           | 6 (30%)            |
| Feminino             | 20 (65,5%)           | 12 (60%)           |
| Localização do tumor |                      |                    |
| Mandíbula posterior  | 22 (71%)             | 3 (15%)            |
| Mandíbula anterior   | 3 (9,7%)             | 4 (20%)            |
| Maxila posterior     | 4 (12,9%)            | 1 (5%)             |
| Maxila anterior      | 2 (6,5%)             | 10 (50%)           |
| Sintomatologia       |                      |                    |
| Presente             | 6 (19,4%)            | 1 (5%)             |
| Ausente              | 25 (80,6%)           | 17 (85%)           |
| Classificação        |                      |                    |
| Convencional         | 24 (77,4%)           | -----              |
| Unicístico           | 7 (22,6%)            | -----              |
| Folicular            | -----                | 12 (60%)           |
| Extra-folicular      | -----                | 6 (30%)            |
| Tipo                 |                      |                    |
| Primário             | 25 (80,6)            | 17 (85%)           |
| Recidiva             | 6 (19,4)             | 1 (5%)             |

Tabela 2

*AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DAS GALECTINAS -1, -3 E -7 NO PARÊNQUIMA  
DOS CASOS DE AM E TOA.*

|                        | AM      |                                   | TOA     |                                   | P                |
|------------------------|---------|-----------------------------------|---------|-----------------------------------|------------------|
|                        | Mediana | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | Mediana | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> |                  |
| <b>Galectina-1</b>     |         |                                   |         |                                   |                  |
| Nuclear                | 11,70   | 2,11-23,28                        | 0,57    | 0,18-2,09                         | <b>&lt;0,001</b> |
| Citoplasmática         | 26,41   | 5,79-45,82                        | 22,10   | 7,32-38,74                        | 0,685            |
| Nuclear/Citoplasmática | 9,34    | 3,16-21,09                        | 28,73   | 6,58-50,00                        | <b>0,011</b>     |
| <b>Galectina-3</b>     |         |                                   |         |                                   |                  |
| Nuclear                | 3,00    | 1,85-5,70                         | 0,06    | 0,00-0,08                         | <b>&lt;0,001</b> |
| Citoplasmática         | 6,30    | 2,09-22,34                        | 26,24   | 18,11-43,85                       | <b>0,003</b>     |
| Nuclear/Citoplasmática | 5,09    | 1,05-15,78                        | 37,47   | 4,46-52,77                        | <b>0,004</b>     |
| <b>Galectina-7</b>     |         |                                   |         |                                   |                  |
| Nuclear                | 2,84    | 1,05-9,92                         | 0,52    | 0,16-1,39                         | <b>&lt;0,001</b> |
| Citoplasmática         | 5,83    | 2,25-12,94                        | 9,72    | 6,58-21,78                        | <b>0,015</b>     |
| Nuclear/Citoplasmática | 6,85    | 3,94-17,87                        | 10,98   | 3,47-18,65                        | 0,657            |

\* Teste de Mann-Whitney

$p < 0.05$  = valor de significância



Tabela 3

COMPARAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA GALECTINA-1 NOS CASOS DE AM E TOA DE ACORDO COM OS PARÂMETROS CLÍNICOS.

| Parâmetros     | Grupos         | n  | Gal-1 Nuclear (N) |                                   |              | Gal-1 Citoplasmática (C) |                                   |              | Gal-1 N/C |                                   |       |
|----------------|----------------|----|-------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------|-----------|-----------------------------------|-------|
|                |                |    | Mediana           | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | P            | Mediana                  | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | P            | Mediana   | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | P     |
| <b>AM</b>      |                |    |                   |                                   |              |                          |                                   |              |           |                                   |       |
| Localização    | Mandíbula      | 25 | 10,31             | 1,41 - 20,3                       | 0,089        | 26,69                    | 5,51 – 47,12                      | 0,689        | 9,34      | 2,93 -19,99                       | 0,549 |
|                | Maxila         | 6  | 22,26             | 14,07 – 26,94                     |              | 23,46                    | 12,06 - 35,35                     |              | 13,17     | 3,65 -33,66                       |       |
| Classificação  | Convencional   | 24 | 11,92             | 2,69 – 25,17                      | 0,813        | 26,72                    | 7,02 – 47,77                      | 0,508        | 11,06     | 5,31 – 26,25                      | 0,073 |
|                | Unicístico     | 7  | 9,01              | 1,63 – 21,13                      |              | 23,58                    | 5,79 – 41,51                      |              | 3,16      | 1,20 – 10,70                      |       |
| Tipo           | Primário       | 25 | 9,01              | 1,41 – 16,77                      | <b>0,001</b> | 26,75                    | 14,44 – 52,07                     | <b>0,028</b> | 10,84     | 3,21 – 28,52                      | 0,099 |
|                | Recidiva       | 6  | 28,27             | 23,67 – 45,26                     |              | 9,46                     | 2,92 – 23,30                      |              | 5,00      | 1,52 – 7,15                       |       |
| Sintomatologia | Presente       | 6  | 12,43             | 3,37 – 23,51                      | 0,960        | 44,26                    | 23,51 – 62,05                     | 0,080        | 19,98     | 3,91 – 32,86                      | 0,230 |
|                | Ausente        | 25 | 11,70             | 1,87 – 24,54                      |              | 24,45                    | 4,86 – 43,01                      |              | 6,77      | 2,93 – 17,63                      |       |
| <b>TOA</b>     |                |    |                   |                                   |              |                          |                                   |              |           |                                   |       |
| Localização    | Mandíbula      | 7  | 1,61              | 0,76 – 4,03                       | <b>0,009</b> | 6,13                     | 1,26 – 13,57                      | 0,081        | 6,45      | 1,51 – 58,72                      | 0,315 |
|                | Maxila         | 11 | 0,23              | 0,00 – 0,63                       |              | 33,66                    | 12,83 – 41,83                     |              | 34,08     | 13,80 – 50,13                     |       |
| Classificação  | Folicular      | 12 | 0,31              | 0,00 – 2,69                       | 0,191        | 17,34                    | 6,13 – 38,79                      | 0,396        | 28,66     | 6,45 – 50,12                      | 0,955 |
|                | Extrafolicular | 6  | 1,01              | 0,51 – 3,35                       |              | 10,90                    | 3,21 – 37,72                      |              | 21,48     | 1,14 – 67,74                      |       |

\* Teste de Mann-Whitney  
 $p < 0.05$  = valor de significância

**Tabela 4**

*COMPARAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA GALECTINA-3 NOS CASOS DE AM E TOA DE ACORDO COM OS PARÂMETROS CLÍNICOS.*

| Parâmetros            | Grupos                | N  | Gal-3 Nuclear (N) |                                   |              | Gal-3 Citoplasmática (C) |                                   |       | Gal-3 N/C |                                   |       |
|-----------------------|-----------------------|----|-------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------------------|-------|-----------|-----------------------------------|-------|
|                       |                       |    | Mediana           | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | P            | Mediana                  | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | P     | Mediana   | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | P     |
| <b>AM</b>             |                       |    |                   |                                   |              |                          |                                   |       |           |                                   |       |
| <b>Localização</b>    | <b>Mandíbula</b>      | 25 | 3,00              | 1,82 – 5,59                       | 0,689        | 6,16                     | 1,55 – 20,29                      | 0,194 | 3,90      | 0,98 – 11,17                      | 0,177 |
|                       | <b>Maxila</b>         | 6  | 3,82              | 1,97 -13,99                       |              | 20,66                    | 4,29 – 31,47                      |       | 12,81     | 1,98 – 24,14                      |       |
| <b>Classificação</b>  | <b>Convencional</b>   | 24 | 2,62              | 1,80 -5,44                        | 0,881        | 9,45                     | 2,15 -22,73                       | 0,368 | 6,23      | 1,00 -15,81                       | 0,453 |
|                       | <b>Unicístico</b>     | 7  | 5,25              | 3,00 -8,02                        |              | 6,30                     | 2,06 – 20,19                      |       | 1,68      | 1,15 – 9,74                       |       |
| <b>Tipo</b>           | <b>Primário</b>       | 25 | 3,00              | 1,84 – 6,37                       | 0,881        | 5,11                     | 1,55 – 22,60                      | 0,368 | 5,09      | 0,98 – 11,17                      | 0,453 |
|                       | <b>Recidiva</b>       | 6  | 3,56              | 1,81 -5,99                        |              | 14,18                    | 5,96 – 22,04                      |       | 9,84      | 1,62 – 16,38                      |       |
| <b>Sintomatologia</b> | <b>Presente</b>       | 6  | 2,07              | 1,02 -2,36                        | <b>0,014</b> | 26,76                    | 3,95 – 37,92                      | 0,121 | 12,84     | 5,35 -39,01                       | 0,110 |
|                       | <b>Ausente</b>        | 25 | 4,79              | 2,11 – 7,39                       |              | 6,16                     | 2,07 – 19,59                      |       | 3,09      | 1,02 – 11,17                      |       |
| <b>TOA</b>            |                       |    |                   |                                   |              |                          |                                   |       |           |                                   |       |
| <b>Localização</b>    | <b>Mandíbula</b>      | 7  | 0,00              | 0,00-0,08                         | 0,797        | 21,10                    | 15,76 – 44,46                     | 0,874 | 7,60      | 0,89 – 43,03                      | 0,491 |
|                       | <b>Maxila</b>         | 11 | 0,00              | 0,00-0,17                         |              | 26,85                    | 14,46 – 41,85                     |       | 21,42     | 3,52 – 51,24                      |       |
| <b>Classificação</b>  | <b>Folicular</b>      | 12 | 0,00              | 0,0-0,07                          | 0,679        | 34,95                    | 15,76 – 44,46                     | 0,234 | 18,56     | 1,77 -48,17                       | 0,955 |
|                       | <b>Extrafolicular</b> | 6  | 0,00              | 0,00-0,18                         |              | 21,10                    | 9,91 – 34,62                      |       | 21,42     | 2,38 – 49,29                      |       |

\* Teste de Mann-Whitney

$p < 0.05$  = valor de significância

Tabela 5

COMPARAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA GALECTINA-7 NOS CASOS DE AM E TOA DE ACORDO COM OS PARÂMETROS CLÍNICOS.

| Parâmetros     | Grupos         | N  | Gal-7 Nuclear (N) |                                   |              | Gal-7 Citoplasmática (C) |                                   |              | Gal-7 N/C |                                   |       |
|----------------|----------------|----|-------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------|-----------|-----------------------------------|-------|
|                |                |    | Mediana           | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | P            | Mediana                  | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | P            | Mediana   | Q <sub>25</sub> – Q <sub>75</sub> | P     |
| <b>AM</b>      |                |    |                   |                                   |              |                          |                                   |              |           |                                   |       |
| Localização    | Mandíbula      | 25 | 2,68              | 1,03 -9,60                        | 0,653        | 5,46                     | 2,08 – 13,60                      | 0,438        | 6,71      | 1,25 - 17,60                      | 0,162 |
|                | Maxila         | 06 | 3,36              | 1,84 – 10,91                      |              | 7,05                     | 3,35 - 14,49                      |              | 11,97     | 7,90 – 21,33                      |       |
| Classificação  | Convencional   | 24 | 6,01              | 2,91 -15,14                       | <b>0,040</b> | 2,92                     | 1,05 - 7,76                       | 0,925        | 8,55      | 4,34 -17,92                       | 0,238 |
|                | Unicístico     | 07 | 2,00              | 0,63 -6,60                        |              | 2,29                     | 0,76 – 12,17                      |              | 6,71      | 0,63 -7,01                        |       |
| Tipo           | Primário       | 25 | 2,68              | 1,03 - 9,31                       | 0,617        | 5,83                     | 2,20 - 13,60                      | 0,861        | 6,71      | 2,73 -13,19                       | 0,089 |
|                | Recidiva       | 06 | 3,47              | 1,71 – 10,99                      |              | 5,83                     | 2,01 – 13,44                      |              | 22,08     | 9,10 -34,87                       |       |
| Sintomatologia | Presente       | 06 | 3,36              | 1,45 -- 9,01                      | 0,920        | 14,23                    | 6,04 -17,01                       | <b>0,021</b> | 10,37     | 4,11 - 12,75                      | 0,920 |
|                | Ausente        | 25 | 2,68              | 1,03 – 10,72                      |              | 3,72                     | 2,08 - 9,52                       |              | 6,77      | 2,73 - 22,12                      |       |
| <b>TOA</b>     |                |    |                   |                                   |              |                          |                                   |              |           |                                   |       |
| Localização    | Mandíbula      | 07 | 0,45              | 0,00 – 1,84                       | 0,633        | 9,46                     | 5,16 -13,64                       | 0,101        | 11,65     | 3,35 -30,37                       | 0,958 |
|                | Maxila         | 11 | 0,41              | 0,15 – 0,91                       |              | 16,79                    | 8,22 -30,25                       |              | 11,95     | 6,77 – 18,48                      |       |
| Classificação  | Folicular      | 12 | 0,34              | 0,16 - 0,97                       | 0,532        | 9,98                     | 8,17 -29-64                       | 0,396        | 11,95     | 4,08 -18,83                       | 0,865 |
|                | Extrafolicular | 06 | 0,45              | 0,20 - 1,83                       |              | 10,40                    | 6,06 -15,21                       |              | 9,47      | 4,29 -28,09                       |       |

\* Teste de Mann-Whitney

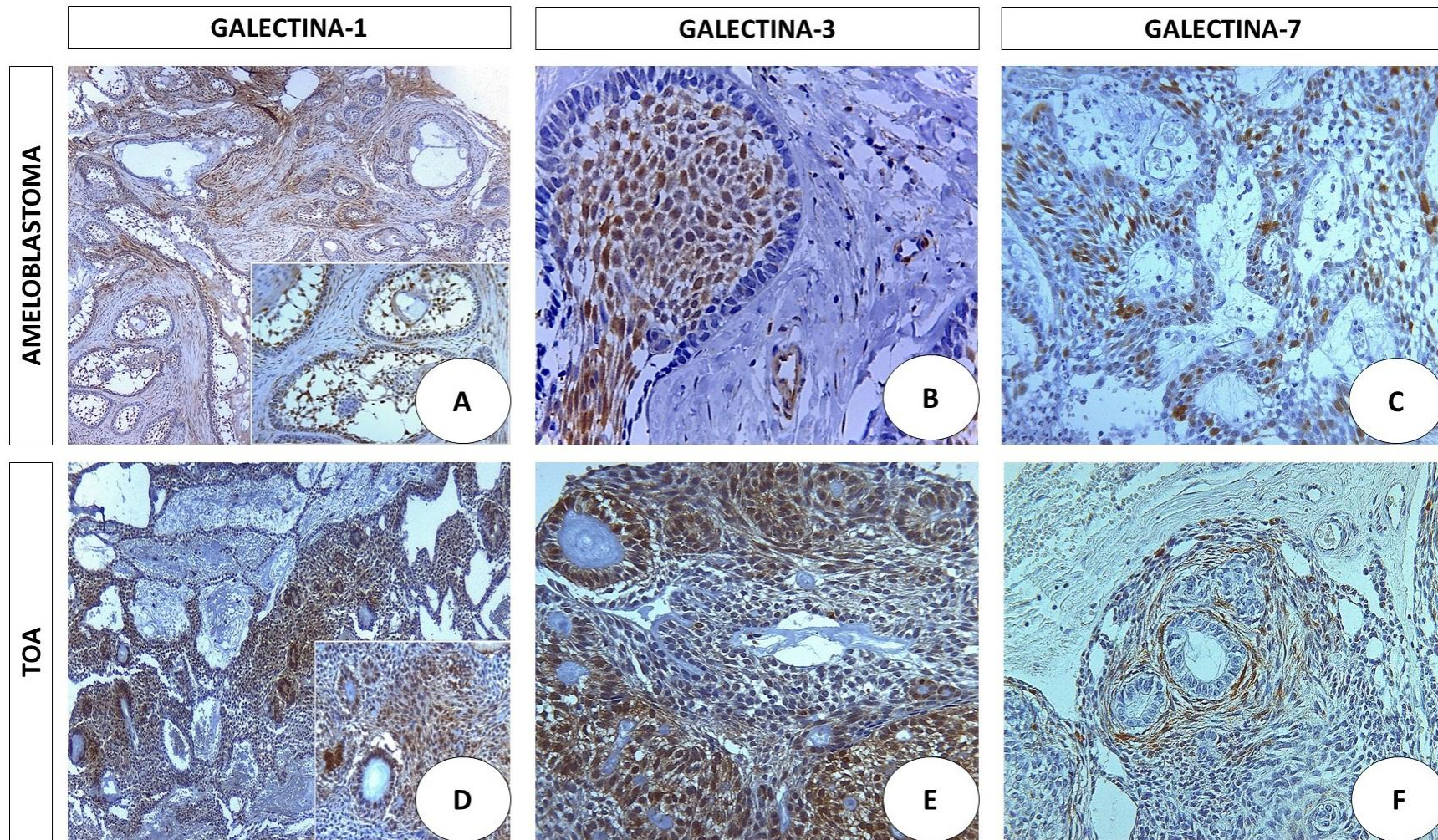
$p < 0.05$  = valor de significância

**Tabela 6**

*AValiação da Imunoexpressão das Galectinas -1, -3 e -7 no Estroma Tumoral dos Casos de AM e TOA.*

|            | Galectina 1  |          | <i>P</i>                | Galectina 3 |            | <i>P</i>  | Galectina 7 |            | <i>P</i> |
|------------|--------------|----------|-------------------------|-------------|------------|-----------|-------------|------------|----------|
|            | Presente     | Ausente  |                         | Presente    | Ausente    |           | Presente    | Ausente    |          |
| <b>AM</b>  | 31<br>(100%) | 0 (0%)   | <b>0,00</b><br><b>7</b> | 19 (61,3%)  | 12 (38,7%) | 0,08<br>9 | 02 (6,5%)   | 29 (93,5%) | 1,000    |
| <b>TOA</b> | 15 (75%)     | 05 (25%) |                         | 07 (35%)    | 13 (63%)   |           | 01 (5%)     | 19 (95%)   |          |

\* Teste exato de Fisher  
 $p < 0.05$  = valor de significância



**Figura 1.** A) Presença de imunoposição da galectina-1 no estroma (100x), e em destaque, evidencia-se imunoposição nuclear em áreas centrais de células neoplásicas arranjadas frouxamente (400X). B e C) Imunoposição nuclear das galectinas -3 e -7 em ameloblastoma folicular e plexiforme, respectivamente (400x). D, E e F) Imunoposição predominantemente nuclear/citoplasmática das galectinas -1, -3 e -7 em estruturas enoveladas e “duct-like” (400X) (*Immunohistoprobe Plus<sup>TM</sup>*, scale bar= 351,76µm).



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por apresentarem a mesma origem tecidual e comportamentos clínicos distintos, os AMs e TOAs têm sido estudados na perspectiva de uma melhor compreensão das suas etiopatogêneses. Nesse contexto, os estudos imunistoquímicos são utilizados como ferramentas confiáveis para avaliar componentes proteicos que podem estar relacionados ao desenvolvimento de tumores. Em nosso estudo, analisamos a imunexpressão das galectinas por serem importantes moduladores de processos e funções celulares, com participação no desenvolvimento de diferentes neoplasias, contudo, no que se refere a lesões de origem odontogênica, estudos da imunexpressão das galectinas -1, -3 e -7 em AMs e TOAs ainda são escassos.

Os resultados do presente estudo são importantes, pois demonstram a participação destas galectinas no desenvolvimento tanto de AMs quanto de TOAs, e nesse sentido, diante da significativa imunexpressão destas lectinas nesses tumores, estas, podem estar participando de diferentes processos celulares, como proliferação e apoptose. A sugestão da possível mudança no papel desempenhado por estas galectinas, de acordo com sua localização celular (núcleo, citoplasma ou núcleo/citoplasma), baseia-se nos resultados de diferentes estudos, que demonstram a capacidade dessas proteínas de desenvolver papéis distintos, de acordo o compartimento celular onde estão imunexpressas.

## REFERÊNCIAS

---



## REFERÊNCIAS

ADVEDISSIAN, T.; DESHAYES, F.; VIQUIER, M. Galectin-7 in epithelial homeostasis and carcinomas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2760, 2017.

ARGYRIS, P. P.; MALZ, C.; TALEB, R.; KOUTLAS, I. G. Benign and malignant odontogenic neoplasms of the jaws show a concordant non discriminatory p63/p40 positive immunophenotype. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 126, n. 6, p. 506-512, 2018.

ALVES, P. M. *et al.* Significance of galectins -1, -3, -4 and -7 in the progression of squamouscell carcinoma of the tongue. **Pathology Research and Practice**, v. 207, p.236–240, 2011.

ANDISHEH-TADBIR, A.; MARDANI, M.; MALEKZADEH, M.; TAFTI, T. A.; KHADEMI, B. Galectin-3 serum levels could help clinicians screen for salivary gland tumor patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 3, p. 689-692, 2018.

ALMEIDA, R. A. C.; ANDRADE, E. S.; BARBALHO, J. C.; VAJGEL, A.; VASCONCELOS, B. C. Recurrence rate following treatment for primary multicystic ameloblastoma: Systematic review and meta-analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, p. 359–367, 2016.

AL-SHIMARI, F., CHANDRA, S., ODA, D. Adenomatoid odontogenic tumor: case series of 14 with wide range of clinical presentation. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 9, n. 11, p. 1315–1321, 2017.

ARCÓLIA, V. *et al.* Galectin-1 is a diagnostic marker involved in thyroid cancer progression. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 3, p. 760-770, 2017.

BANSAL, S. *et al.* The occurrence and pattern of ameloblastoma in children and adolescents: an Indian institutional study of 41 years and review of the literature. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 6, p. 725-737, 2015.

BARNES, L.; EVESON, J. W., REICHART, P.; SINDRANSKY, D. **WHO Classification of Tumours, Pathology & Genetics**. International Agency for Research on Cancer, 2005, p. 430.

BECELLI, R.; CARBONI, A.; CERULLI, G.; PERUGINI, M.; IANNETTI, G. Mandibular Ameloblastoma: Analysis of surgical treatment carried out in 60 patients between 1977 and 1998. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 13, n. 3, p. 395-400, 2002.

BOLOGNA-MOLINA, R.; MOSQUEDA-TAYLOR, A.; MOLINA-FECHERO, N.; MORI-ESTEVEZ, A. D.; SÁNCHEZ-ACUÑA, G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 18, n. 2, p. 174-179, 2013.

BOLOGNA-MOLINA, R. *et al.* Primordial odontogenic tumor: An immunohistochemical profile. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 22, n. 3, p. 314-323, 2017.

- BOLOGNA-MOLINA, R. *et al.* Detection of MAPK/ERK pathway proteins and KRAS mutations in adenomatoid odontogenic tumors. **Oral Diseases**, v. 25, n. 2, p. 481-487, 2019.
- BRINCHMANN, M. F.; PATEL, M. D.; IVERSEN, M. H. The role of galectins as modulators of metabolism and inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 9186940, 2018.
- BRITO, L. N. S. *et al.* Immunohistochemical analysis of galectins-1, -3, and -7 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 5, p. 728-733, 2018.
- BREWER, C. F.; MICELI, M. C.; BAUM, L. G. Clusters, bundles, arrays and lattices: Novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 5, p. 616–623, 2002.
- BROWN, N. A.; BETZ, B. L. Ameloblastoma: a review of recent molecular pathogenetic discoveries. **Biomarkers in Cancer**, v. 7, p. 19–24, 2015.
- CAMPION, C. G.; LABRIE, M.; LAVOIE, G.; ST-PIERRE, Y. Expression of galectin-7 is induced in breast cancer cells by mutant p53. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72468, 2013.
- CARVALHO, M. V. Alterations in the immunoexpression of galectins-1, -3 and -7 between different grades of oral epithelial dysplasia. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, n. 2, p. 174–179, 2013.
- CLEMENTINO, M. A. **Estudo da imunoexpressão das galectinas -1, -3 e -7 em ceratocistos odontogênicos isolados e associados a síndrome de Gorlin**. 2018. Tese. (Doutorado em Clínica Odontológica) - PPGO/UEPB. Campina Grande, 2018.
- CHOU, F. C.; CHEN, H. Y.; KUO, C. C.; SYTWU, H. K. Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. e430, 2018.
- CHRCANOVIC, B. R.; GOMEZ, R. S. Adenomatoid odontogenic tumor: An updated analysis of the cases reported in the literature. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 48, n. 1, p. 10-16, 2019.
- COSTA, S. *et al.* DNA methylation pattern of apoptosis-related genes in ameloblastoma. **Oral Diseases**, v. 23, n.6, p. 779-783, 2017.
- COURA, B. P. *et al.* KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. **Modern Pathology**, v. 2019, 2019.
- DINGS, R. P. M.; MILLER, M. C.; GRIFFIN, R. J.; MAYO, K. H. Galectins as molecular targets for therapeutic intervention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. e905, 2018.
- DINIZ, F. G. *et al.* The long noncoding RNA KIAA0125 is upregulated in ameloblastomas. **Pathology, Research and Practice**, v. 2015, n. 3, p. 466-469, 2019.

DINIZ, M. G. *et al.* Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. **Tumor Biology**, v. 36, n. 7, p. 5649-5653, 2015.

DUARTE-ANDRADE, F. F. *et al.* The importance of BRAF-V600E mutation to ameloblastoma metabolism. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 2019.

EFFIOM, O. A.; OGUNDANA, O. M.; AKINSHIPO, A. O.; AKINTOYE, S. O. Ameloblastoma: current etiopathological concepts and management. **Oral Diseases**, v. 24, n. 3, p. 307-316, 2018.

EL-NAGGAR, A. K. *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. International Agency for Research on Cancer, 4 ed., 2017, p. 343.

ELOLA, M. T.; CHIESA, M. E.; ALBERTI, A. F.; MORDOH, J.; FINK, N. E. Galectin-1 receptors in different cell types. **Journal of Biomedical Science**, v. 12, n. 1, p. 13–29, 2005.

ESSER, M.; HORGER, M.; LOANOVICU, S. D.; BÖSMÜLLER, H. Imaging diagnosis of ameloblastoma. **Rofo**, v. 187, n. 10, p. 847–852, 2015.

ETEMAD-MOGHADAM, S.; ALAEDDINI, M. A comparative study of syndecan-1 expression in different odontogenic tumors. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 7, n. 1, p. 23-26, 2017.

FAHRADYAN, A.; ODONO, L.; HAMMOUDEH, J. A.; HOWELL, L. K. Ameloblastic carcinoma in situ: review of literature and a case presentation in a pediatric patient. **Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v. 56, n. 1, p. 94-100, 2018.

FREITAS, V. S. *et al.* Immunohistochemical expression of matrilysins (MMP-7 and MMP-26) in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 108, n. 3, p. 417-424, 2009.

FREGNANI, E. R. *et al.* BRAF-V600E expression correlates with ameloblastoma aggressiveness. **Histopathology**, v. 70, n. 3, p. 473-484, 2017.

FUKUMORI, T. *et al.* CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Research**, v. 63, n. 23, p. 8302-8311, 2003.

GOMES, C. C. *et al.* Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. **Oral Oncology**, v. 56, p. 3-5, 2016.

HU, D. *et al.* Galectin 4 is a biomarker for early recurrence and death after surgical resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 54, n. 1, p. 95-100, 2019.

IDE, F. *et al.* An expanded and revised early history of the adenomatoid odontogenic tumor. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 115, n. 5, p. 646-651, 2013.

JINDWANI, K.; PAHARIA, Y. K.; KUSHWAH, A. P. Surgical management of peripheral variant of adenomatoid odontogenic tumor: A rare case report with review. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 6, n. 1, p. 128-130, 2015.

KALLIANPUR, S.; JADWANI, S.; MISRA, B.; SUDHEENDRA, U. S. Ameloblastic carcinoma of the mandible: Report of a case and review. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 18, p. 96-102, 2014.

KALIA, V.; KALRA, G.; KAUSHAL, N.; SHARMA, V.; VERMANI, M. Maxillary adenomatoid odontogenic tumor associated with a premolar. **Annals of Maxillofacial Surgery**, v. 5, n. 1, p. 119-122, 2015.

KARAM GENNO, N.; AOUND, N.; EL-TOUM, S. Adenomatoid odontogenic tumor associated with an impacted maxillary lateral incisor: a case report with five-year follow-up. **Case Reports in Dentistry**, v. 2017, p. 1709492, 2017.

KONERU, A.; HALLIKERI, K.; NELLITHADY, G. S.; KRISHNAPILLAI, R.; PRABHU, S. Immunohistochemical expression of calretinin in ameloblastoma, adenomatoid odontogenic tumor, and keratocystic odontogenic tumor: a comparative study. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 22, n. 10, p. 762-767, 2014.

KRAMER, I. R.; PINDGORG, J. J.; SHEAR, M. The WHO histological typing of odontogenic tumours. A commentary on the second edition. **Cancer**, v. 70, n. 12, p. 2988-2994, 1992.

KREPPPEL, M.; ZÖLLER, J. Ameloblastoma - Clinical, radiological, and therapeutic findings. **Oral Diseases**, v. 24, n. 1-2, p. 63-66, 2018.

KRISHNA, A. *et al.* Overexpression of MDM2 protein in ameloblastomas as compared to adenomatoidodontogenic tumor. **Journal of Cancer Research**, v. 8, n. 2, p. 232-237, 2012.

KUMAMOTO, H. Molecular pathology of odontogenic tumors. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 35, n. 2, p. 65-74, 2006.

LEFFLER, H. Galectins structure and function - A synopsis. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 33, p. 57-83, 2001.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29-41, 2005.

LOPES, M. L. *et al.* Pattern of galectins expression in actinic cheilitis with different risks of malignant transformation. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 8, p. 621-626, 2016.

MARRELLI, M., *et al.* Diagnosis and treatment of a rare case of adenomatoid odontogenic tumor in a young patient affected by attenuated familial adenomatosis polyposis (aFAP): case report and 5 years follow-up. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 265-269, 2014.

MASTHAN, K. M.; ANITHA, N.; KRUPAA, J.; MANIKKAM, S. Ameloblastoma. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 7, p. 167–170, 2015.

MCCLARY, A. C. *et al.* Ameloblastoma: A clinical review and trends in management. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 7, p. 1649–1661, 2016.

MESQUITA, J. A. *et al.* Association of immunoexpression of the galectins-3 and -7 with histopathological and clinical parameters in oral squamous cell carcinoma in young patients. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 1, p. 237–243, 2016.

MILMAN, T.; YNG, G. S.; PAN, W.; LIVOLSI, V. Ameloblastoma: 25 years experience at a single institution. **Head & Neck Pathology**, v. 10, n. 4, p. 513–520, 2016.

MONACA, G. *et al.* Surgical management of extrafollicular variant of adenomatoid odontogenic tumor in the maxillary posterior region. **Case Reports in Dentistry**, v. 2019, p. 3787696, 2019.

NAKAHARA, S.; RAZ, A. Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 22–36, 2008.

NASCIMENTO, M. A. *et al.* Immunoexpression of BMP-2 and BMP-4 and their receptors, BMPR-IA and BMPR-II, in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 223–229, 2017.

NEWLACZYL, A. U.; YU, L. Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer. **Cancer Letters**, v. 313, n. 2, p. 123–128, 2011.

OLIVEIRA, R. C. M. *et al.* Higher expression of galectin-3 and galectin-9 in periapical granulomas than in radicular cysts and an increased toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 expression are associated with reactivation of periapical inflammation. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p. 199–203, 2014.

OLIVEIRA, M. R. *et al.* Unusual adenomatoid odontogenic tumor. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 27, n. 2, p. 139–141, 2016.

OLUSANYA, A. A.; ADISA, A. O.; LAWAL, A. O.; AROTIBA, J. T. Gross surgical features and treatment outcome of ameloblastoma at a Nigerian tertiary hospital. **African journal of medicine and medical sciences**, v. 42, n. 1, p. 59–64, 2013.

PERDIGÃO, P. F.; GOMEZ, R. S.; PIMENTA, F. J. G. S.; DE MARCO, L. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. **Oral Oncology**, v. 40, n. 8, p. 841–846, 2004.

PETROVIC, I. D. *et al.* Ameloblastomas of the mandible and maxilla. **Ear, Nose & Throat Journal**, v. 97, n. 7, p. E26–E32, 2018.

PHILIPSEN, H. P. *et al.* An updated clinical and epidemiological profile of the adenomatoid odontogenic tumour: a collaborative retrospective study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 36, n. 7, p. 383–393, 2007.

RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M.A.; JACKSON, S.S.; VASTA, G.R. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 5, p. 513–520, 2007.

RAZAVI, S. M.; TABATABAIE, S. H.; HOSEINI, A. T.; HOSEINI, E. T.; KHABAZIAN, A. A comparative immunohistochemical study of Ki-67 and Bcl-2 expression in solid ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. **Dental Research Journal**, v. 9, n. 2, p. 192-197, 2012.

REDDY KUNDOOR, V. K.; MALOTH, K. N.; GUGULOTH, N. N.; KESIDI, S. Extra-follicular adenomatoid odontogenic tumor: an unusual case presentation. **Journal of Dentistry**, v. 17, n. 4, p. 370-374, 2016.

RIBEIRO, B. F. *et al.* Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. **Oral Diseases**, v.15, n. 7, p. 472-477, 2009.

SANTOS, P. P. A.; NONAKA, C. F. W.; FREITAS, R. A.; PEREIRA PINTO, L. SOUZA, L. B. Immunohistochemical analysis of myofibroblasts, TGF- $\beta$ 1 and IFN- $\gamma$  epithelial odontogenic lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 5, p. 365-370, 2017.

SALEHINEJAD, J. *et al.* Immunohistochemical detection of p53 and PCNA in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. **Journal of Oral Science**, v. 53, n. 2, p. 213-217, 2011.

SALUJA, R.; KAUR, G.; SINGH, P. Aggressive adenomatoid odontogenic tumor of mandible showing root resorption: A histological case report. **Dental Research Journal**, v. 10, n. 2, p. 279-282, 2013.

SHAIKH, S.; BANSAL, S.; DESAI, R. S.; AHMAD, I. Aggressive adenomatoid odontogenic tumor of the mandible: a rare case report and review of the literature. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 22, n. 4, p. 11-15, 2018.

SCHULZ, H. *et al.* Galectins-1, -3, and -7 are prognostic markers for survival of ovarian cancer patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. e1230, 2017.

SHURKLA P.; PRABHU, S.; JOSE, M.; SRIPATHI RAO, B. H. Comparative immunohistochemical study of Bcl-X in ameloblastoma, keratocystic odontogenic tumor and adenomatoid odontogenic tumor. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v.21, n. 1, p. 51–57, 2017.

SEO, W. G.; KIM, C. H.; PARK, H. S.; JANG, J. W.; CHUNG, W. Y. Adenomatoid odontogenic tumor associated with an unerupted mandibular lateral incisor: a case report. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 41, n. 6, p. 342-345, 2015.

SILVA, L. P. *et al.* A retrospective multicentre study of cystic lesions and odontogenic tumours in older people. **Gerodontology**, v. 35, n. 4, p. 325-332, 2018.

STURM, A. *et al.* Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 6, p. 3825-3837, 2004

SAUSSEZ, S.; KISS, R. Galectin-7. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 3, p. 686-697, 2006.

SUDHAKARA, M. *et al.* Expression of CK14 and vimentin in adenomatoid odontogenic tumor and dentigerous cyst. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v.20, n. 3, p. 369-376, 2016.

TAKENAKA, Y. *et al.* Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 10, p. 4395-4406, 2004.

TENÓRIO, J. R.; SANTANA, T.; QUEIROZ, S.I.; DE OLIVEIRA, D.H.; QUEIROZ, L.M. Apoptosis and cell cycle aberrations in epithelial odontogenic lesions: An evidence by the expression of p53, Bcl-2 and Bax. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 23, n. 2, p 125-125, 2018.

THAKUR, A.; TUPKARI, J.V.; JOY, T.; HANCHATE, A.V. Adenomatoid odontogenic tumor: what is the true nature?. **Medical Hypotheses**, v. 97, p. 90-93, 2016.

THIJSEN, V. L.; HEUSSCHEN, R.; CAERS, J.; GRIFFIOEN, A.W. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1855, n. 2, p. 235–247, 2015.

VERSCHUERE, T. *et al.* Altered galectin-1 serum levels in patients diagnosed with high-grade glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 115, n. 1, p. 9–17, 2013.

VIRUPAKSHAPPA, D.; RAJASSHEKHARA, B. S.; MANJUNATHA, B. S.; DAS, N. Adenomatoid odontogenic tumour in a 20-year-old woman. **BMJ Case Reports**, v. 2014, p. bcr2013010436, 2014.

WANG, L.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; WU, X. The role of galectins in cervical cancer biology and progression. **Biomed Research International**, v. 2018, p. 2175927, 2018.

WDOWIAK, K. *et al.* Galectin targeted therapy in oncology: current knowledge and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 210-231, 2018.

WEBER, M. *et al.* Differences in inflammation and bone resorption between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 10, p. 1200-1208, 2019.

WENTWORTH, J. M. *et al.* Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1648–1656, 2010.

XUE, H. *et al.* The N-terminal tail coordinates with carbohydrate recognition domain to mediate galectin-3 induced apoptosis in T cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 49824-49838, 2017.

YANG, R.; LIU, Z.; PENG, C.; CAO, W.; JI, T. Maxillary ameloblastoma: Factors associated with risk of recurrence. **Head Neck**, v. 39, n. 5, p. 996-1000, 2017.

YOSHII, T. *et al.* Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 6852-6857, 2002.

ZHENG, Y. *et al.* Galectins as potential emerging key targets in different types of leucemia. **European Journal of Pharmacology**, v. 844, p. 73-78, 2019.



ANEXOS

---

## ANEXOS

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA  
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO E



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação Imunoistoquímica das Galectinas -1, -3 e -7 em Ameloblastomas e Tumor Odontogênico Adenomatóide

**Pesquisador:** POLLIANNA MUNIZ ALVES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 14656619.0.0000.5187

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.373.525

**Apresentação do Projeto:**

1.O projeto encontra-se bem elaborado, contendo resumo, revisão da literatura e metodologia exequível. o título e os objetivos se complementam. Atendendo as exigências da Resolução 466/12.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar, comparativamente, por meio da imunoistoquímica, a expressão das galectinas-1, -3 e -7 em uma série de casos de ameloblastoma e TOA.

Traçando o perfil dos dados clínicos, radiográficos e morfológicos de uma série de casos de ameloblastoma e TOA.

- Analisar e comparar a imunoe expressão das galectinas-1, -3 e -7, quanto a presença ou ausência, tipo e compartimento celular, desta imunomarcacão, em uma série de casos de ameloblastoma e TOA.
- Estabelecer os percentuais de células imunopositivas para as galectinas-1, -3 e -7, nos casos de ameloblastoma e TOA.
- Estabelecer correlações entre as imunoe expressões das galectinas-1, -3, -7 nos casos de ameloblastoma e TOA.

**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 - PRÓ-REITORIA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 3.373.525

|   |   |                        |                                 |        |
|---|---|------------------------|---------------------------------|--------|
| Declaração de Pesquisadores               | TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_UTILIZACAO_DE_DADOS_DE_ARQUIVO.pdf                      | 08/05/2019<br>12:13:11 | WALTER GLEYBSON ANTAS DE MORAIS | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores               | JUSTIFICATIVA_PARA_DISPENSA_DO_TCLE.pdf   | 08/05/2019<br>12:11:03 | WALTER GLEYBSON ANTAS           | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores               | TERMO_DE_COMPROMISSO_DO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL_EM_CUMPRIR_OS_TERMOS_DA_RESOLUCAO | 08/05/2019<br>12:10:30 | WALTER GLEYBSON ANTAS DE MORAIS | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores               | DECLARACAO_DE_CONCORDANCIA.pdf  | 08/05/2019<br>12:09:47 | WALTER GLEYBSON ANTAS           | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Mestrado_CEP.pdf  | 08/05/2019<br>11:57:54 | WALTER GLEYBSON ANTAS DE MORAIS | Aceito |
| Folha de Rosto                            | FOLHA_DE_ROSTO.pdf  | 08/05/2019<br>11:52:28 | WALTER GLEYBSON ANTAS           | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CAMPINA GRANDE, 06 de Junho de 2019

Assinado por:

Dóris Nóbrega de Andrade Laurentino  
(Coordenador(a))

**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

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

## **GUIDE FOR AUTHORS**

Editors-in-Chief:

*Professor G B Proctor, London, UK Professor S W  
Cadden, Dundee, Scotland*

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
- salivary biology
- mastication and swallowing
- comparative anatomy
- paleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only 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. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

*Page charges*

This journal has no page charges.

**Submission checklist**

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

*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

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts* (where applicable)

*Highlights* (where applicable) *Supplemental*

*files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- 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 Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center

**BEFORE YOU BEGIN****Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### **Studies in humans and animals**

If the work involves the use of 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. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

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.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

### **Submission declaration and verification**

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 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), 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 in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck.

#### *Preprints*

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example.

### **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.

#### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

#### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). 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. 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.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

#### *Author rights*

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

#### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

#### **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.

### **Open access**

Please visit our Open Access page for more information.

#### *Elsevier Researcher Academy*

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### *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 Author Services.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

## **PREPARATION**

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The

Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

#### *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). 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 minimize 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 occasionally 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 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.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are 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.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### **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 are: 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 as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. 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 and even these should be avoided if possible.

## *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.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

## *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## **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 published version.

- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

*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 Author Services 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**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in

accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

#### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies

will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

#### *Reference style*

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept.,

P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.



*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article.

*Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article.

*Heliyon*, 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

## **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### *Research data*

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page . For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process,

after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

#### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. 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 use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. 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.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. 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 Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **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  $P<0.0005$ .

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

## APÊNDICES

---



