



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**AMANDA LIRA RUFINO DE LUCENA**

**IMUNOEXPRESSÃO DA QUIMIOCINA CXCL12 E SEU RECEPTOR CXCR4 EM  
CARCINOMAS ADENOIDES CÍSTICOS DE GLÂNDULAS SALIVARES**

**CAMPINA GRANDE/ PB**

**2018**

**AMANDA LIRA RUFINO DE LUCENA**

**IMUNOEXPRESSÃO DA QUIMIOCINA CXCL12 E SEU RECEPTOR CXCR4 EM  
CARCINOMAS ADENOIDES CÍSTICOS DE GLÂNDULAS SALIVARES**

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

**Orientador: Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez**

**CAMPINA GRANDE / PB**

**2018**

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.

L935i Lucena, Amanda Lira Rufino de.  
Imunoexpressão da quimiocina cxcl12 e seu receptor cxcr4 em carcinomas adenoides císticos de glândulas salivares [manuscrito] / Amanda Lira Rufino de Lucena. - 2018.  
93 p.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.  
"Orientação : Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez ,  
Coordenação do Curso de Odontologia - CCTS."  
1. Glândula salivar. 2. Carcinoma adenoide cístico. 3. Neoplasia. 4. CXCR4. 5. CXCL12. I. Título  
21. ed. CDD 612.313

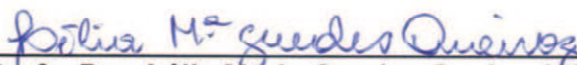
AMANDA LIRA RUFINO DE LUCENA

IMUNOEXPRESSÃO DA QUIMIOCINA CXCL12 E SEU RECEPTOR CXCR4 EM  
CARCINOMAS ADENOIDES CÍSTICOS DE GLÂNDULAS SALIVARES

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.

Aprovada em 18/ 07/ 2018

BANCA EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz/ UFRN  
Membro titular (1º Examinador)



---

Prof. Dr. Cassiano Francisco WeegeNonaka/ UEPB  
Membro titular (2º Examinador)



---

Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez/ UEPB  
Membro Titular (Orientador)



***DEDICATÓRIA***



*Dedico este trabalho*

**Primeiramente à Deus,**

Por sempre guiar meus passos e me ajudar nessa caminhada longa e árdua.

**A minha filha, Maria Luísa,**

Por me mostrar o que é verdadeiramente um amor incondicional.

**Aos meus amados pais, Leonilson Lins de Lucena e Adriana Lira Rufino de  
Lucena,**

Por todo suporte e confiança que depositam em mim.

**Aos meus irmãos, Leonilson Lins de Lucena Filho e Brunna Lira Rufino de  
Lucena,**

Por me fazer sempre dar o melhor de mim para ser exemplo para vocês.

**Ao meu tio, Ednaldo Tavares Rufino Filho,**

Por todo seu apoio e por ser exemplo de determinação.

**Ao meu marido, Valdecir Alves dos Santos Júnior**

Por todo amor e companheirismo.

**AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

---

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Manuel**, os meus sinceros agradecimentos pelas oportunidades, confiança, paciência e incentivo constante de acreditar no meu potencial. Ficam aqui meu respeito, carinho e admiração. Lembro-me de uma conversa que tivemos ainda na época da graduação no qual me contou uma parte da sua história. Desde aquele dia a minha apreciação pelo senhor aumentou consideravelmente. É exemplo não apenas de professor, mas de ser humano. Obrigada de verdade por fazer parte da minha história.

Ao professor **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, exemplo de pesquisador, que juntamente com Manuel teve papel fundamental na construção do meu conhecimento e formação profissional. Agradeço pela atenção, disponibilidade e dedicação. O senhor foi extremamente essencial para que o meu objetivo fosse alcançado.

As minhas amigas, **Emannuene e Fabianna** serei grata eternamente por toda ajuda para a realização dessa pesquisa. No momento que mais precisei vocês não mediram esforços para me ajudar.

**AGRADECIMENTOS**

---

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** pelas bênçãos concedidas. Ao seu modo, pude realizar o meu sonho e me tornar quem sou hoje, com a saúde e força necessária para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais, **Leonilson e Adriana**, pelo apoio e por tudo que sempre fizeram por mim, pela simplicidade, amizade e carinho, fundamentais na construção do meu caráter. Agradeço por serem as mãos que sempre me acolhe e sustenta nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, **Dadi, Leonilson Filho e Brunna**, que nos momentos de minha ausência, em que me dediquei aos estudos, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Aos **demais familiares**, por sempre acreditarem no meu potencial e torcer pela minha vitória.

Aos meus avós, **Laudicéa, Alaice e Ednaldo (*in memoriam*) e Leondiniz**, embora fisicamente ausente, sentia sua presença ao meu lado, dando-me força.

Ao meu marido, **Valdecir Júnior**, por toda paciência, compreensão e amor. Por ter vivenciado comigo todo esse percurso e pela paciência nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas, **Geday, Janaina, Júlia e Thais**, pela amizade e companheirismo, que construímos ao longo da graduação e continua até hoje.

Aos meus amigos, **Yane, Reginaldo, Pammella, Gustavo, Janaina, Gilson, Renata, Ricardo, Karé, Nacib, Diana e Daniel**, pelos momentos diversão nas horas livres e todas as palavras de apoio.

Aos **colegas de turma** Adeilton, Elisa, Gabriella, Gal, Gilderlania, Handerson, Ítalo, Jussara, Larissa, Robeci, Tamyres, Walesca com os quais tive o

prazer de conviver esses dois anos e dividir cada conquista. Obrigada por todo o apoio. Sucesso para vocês.

A todos os amigos que fazem ou fizeram parte do laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB: **Ingrid, Luan, Luana, Geisa, Rodolfo, José Matheus, Alencar Neto** por todo aprendizado, sempre contribuindo e deixando suas marcas e transmitindo seus conhecimentos adquiridos aos que chegam!

Ao Professor **Hugo Costa Neto** por toda assistência para a execução da pesquisa.

As técnicas do Laboratório de Patologia Oral da UEPB, **Denize e Ana Luzia**, por todas as vezes que precisei terem sido tão solícitas. Vocês foram fundamentais.

Aos meus professores da graduação, obrigada por acreditarem e me apoiarem sempre.

A professora **Dra. Pollianna Muniz Alves**, obrigada pelo carinho e conselhos dados em diversos momentos dessa caminhada. A senhora é um exemplo a ser seguido.

As professoras **Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes e Kátia Simone Alves dos Santos** por todos os conselhos não só profissionais, mas pessoais e por tornar minha caminhada durante esses dois anos mais leve.

Aos demais professores do PPGO e colaboradores (Prof. **Dr. Alessandro Leite Cavalcanti**, Profa. **Dra. Ana Flávia Granville-Garcia**, Profa. **Dra. Daniela Pita de Melo**, Profa. **Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa**, Profa. **Dra. Jozinete Vieira Pereira**, Prof. **Dr. Kenio Lima**, Profa. **Dra. Maria Helena Chaves de V. Catão**, Profa. **Dra. Renata Cardoso Rocha Madruga**, Profa. **Dra. Rilva Suely de Castro Cardoso Lucas**, Profa. **Dra. Ana Marly Araújo Maia**, Profa. **Dra. Patrícia Meira Bento** e Prof. **Dr. Sérgio d'Ávila Lins B. Cavalcanti** obrigada por toda dedicação. Vocês serão sempre lembrados por todo o aprendizado que me proporcionaram.

Aos professores **Lélia Maria Guedes Queiroz e Gustavo Pina Godoy** | pelo aceite em compor a minha banca de defesa do mestrado.

Aos **funcionários** do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, especialmente **Dio** pela amizade e por sempre me ajudar nos momentos que precisei e **Dione**, pelo exemplo de dedicação e esforço!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desta pesquisa! Muito obrigada!



## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

**Ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba/PB e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba/PB.**

**A Universidade de Fortaleza e Universidade Federal do Rio Grande do Norte** pela ajuda nas amostras avaliadas no presente trabalho.

**Ao Hospital Napoleão Laureano** na pessoa da diretora **Maria Tereza Lira Batista Gama**

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão de bolsa de Mestrado.



## RESUMO

O carcinoma adenoide cístico (CAC) é um tumor maligno de origem epitelial, com curso clínico imprevisível, cuja patogenia ainda não é bem esclarecida. A interação da quimiocina CXCL12 (SDF-1) com o seu receptor CXCR4 (CD184) induz sinalizações intracelulares importantes na patogenia neoplásica, regulando a proliferação, diferenciação, apoptose, quimiotaxia e metástase celulares. O complexo CXCL12/CXCR4 tem sido associado a diversos eventos associados à progressão tumoral maligna em humanos, porém pouco se conhece do seu papel em neoplasias malignas de glândulas salivares. Objetivou-se analisar a expressão imunoistoquímica da CXCL12/CXCR4 em carcinomas adenoides císticos de glândulas salivares relacionando-a com parâmetros histopatológicos. Foram pesquisados os índices de positividade (IP) intratumoral, peritumoral e geral de anticorpos contra CXCL12 e CXCR4 e analisada em relação a parâmetros histomorfológicos caracterizados através do sistema de classificação histopatológica da OMS e o sistema de gradação histopatológica de malignidade proposto por van Weert et al em 17 CAC. Foram avaliados 17 CAC com predominância do padrão histopatológico tubular e casos de alto grau histopatológico de malignidade. Houve tendência a maior IP de expressão de CXCL12 na região intratumoral do padrão cribriforme e na região peritumoral do padrão sólido. O IP geral de expressão da CXCL12 foi semelhante nos padrões histopatológicos. Observou-se diferença estatisticamente significativa do IP de CXCL12 intratumoral ( $p=0,005$ ) e do IP geral ( $p=0,009$ ). Verificou-se associação significativa do IP intratumoral de CXCL12 em relação ao grau de malignidade, principalmente em casos de baixo grau ( $p=0,005$ ). O IP geral da quimiocina teve associação significativa com o grau histopatológico de malignidade ( $p=0,009$ ). Houve tendência a maior expressão de CXCR4 na região intratumoral e peritumoral do padrão tubular. O IP geral de CXCR4 tendeu a decrescer nos padrões sólido, cribriforme e tubular. Não houve associação significativa do IP de CXCR4 das regiões avaliadas em relação ao grau histopatológico de malignidade. Não houve correlação estatisticamente significativa da expressão de CXCL12 e CXCR4 nas regiões tumorais no baixo e alto grau histológico de malignidade. Conclui-se que a imunoexpressão de CXCL12 e de CXCR4 em carcinoma adenoide cístico glandular salivar é praticamente equivalente na região intratumoral e na peritumoral. Porém considerando os subtipos histológicos do CAC, a tendência a maior imunoexpressão da quimiocina na região intratumoral sugere algum papel dessa quimiocina na regulação dos mecanismos que garantem a proliferação e manutenção da viabilidade celular neoplásica ao interagir com o receptor CXCR4 que foi fortemente expresso em todas as regiões tumorais. Além disso, esse receptor também estaria, por sua vez, tornando as células neoplásicas aptas para invadir e/ou metastatizar.

**Palavras chave:** CXCL12. CXCR4. Neoplasia. Glândula salivar. Carcinoma adenoide cístico.

***ABSTRACT***

---

## ABSTRACT

Cystic adenoid carcinoma (ACC) is a malignant tumor of epithelial origin, with an unpredictable clinical course and its pathogenesis is not well understood. The interaction of the CXCL12 (SDF-1) chemokine with its CXCR4 (CD184) receptor induces, through several pathways, important intracellular signaling in neoplastic pathogenesis, regulating events such as proliferation, differentiation, apoptosis, chemotaxis and metastasis. The CXCL12/CXCR4 complex has been associated with several events associated with malignant tumor progression in humans, but little is known about its role in malignant salivary gland neoplasm. The objective of this study was to analyze the immunohistochemical expression of CXCL12 / CXCR4 in cystic adenoid carcinomas of the salivary glands, related to histopathological parameters, aiming to obtain information about the role of such proteins in the pathogenesis, biological behavior and prognosis of this neoplasm. Through the immunocytochemistry, the intratumoral, peritumoral and antibody positive indexes were investigated against CXCL12 and CXCR4 and analyzed in relation to histomorphological parameters characterized by the WHO histopathological classification system and the system of histopathological grading of malignancy proposed by van Weert et al in 17 CAC. Were evaluated 17 ACCs with predominance of the tubular histopathological pattern and cases of high histopathological grade of malignancy. There was a trend towards higher expression of CXCL12 in the intratumoral region of the cribriform pattern and in the peritumoral region of the solid pattern. The general IP of expression of CXCL12 was similar in histopathological patterns. A statistically significant difference was observed for the intratumoral expression of CXCL12 ( $p = 0.005$ ) and general index of expression ( $p = 0.009$ ). There was a significant association of the intratumoral expression of CXCL12 in relation to the degree of malignancy, especially in low grade cases ( $p = 0.005$ ). The general index expression of CXCL12 was significantly associated with the histopathological grade of malignancy ( $p = 0.009$ ). There was a tendency for greater expression of CXCR4 in the intratumoral and peritumoral region of the tubular pattern. The general index of expression of CXCR4 tended to decrease in solid, cribriform and tubular patterns. There was no significant association of intratumoral, peritumoral and general expression of CXCR4 in relation to the histopathological grade of malignancy of the sample. There was no statistically significant correlation between the expression of CXCL12 and CXCR4 in the tumor regions evaluated in both the low and high histological grade of malignancy. It was concluded that the immunoexpression of CXCL12 and CXCR4 in salivary glandular cystic adenoid carcinoma is practically equivalent in the intratumoral and peritumoral regions. However, considering the histological subtypes of CAC evaluated here, there was a trend towards greater immunoexpression of the chemokine in the intratumoral region, suggesting some role of this chemokine in the regulation of the mechanisms that guarantees the proliferation and maintenance of neoplastic cell viability when interacting with the CXCR4 receptor that was strongly expressed in all tumor regions. In addition, this receptor would also be, in turn, making the neoplastic cells apt to invade and / or metastasize.

**Key words:** CXCL12. CXCR4. Neoplasm. Salivary Gland. Cystic adenoid carcinoma.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BSA:** Do inglês *Bovine serum albumin*, traduzido como albumina sérica bovina.
- CAC:** Carcinoma adenoide cístico.
- CME:** Carcinoma mucoepidermoide.
- CXCL12:** Do inglês (*SDF1*) *stromal cell derived fator-1*, traduzido como Fator derivado de células do estroma 1.
- CXCR4:** Do inglês *CXC chemokine receptor-4*, traduzido como Receptor de quimiocina CXC 4.
- ERK:** Do inglês *Extracellular signal-regulated kinase*, traduzido como proteína quinase regulada por sinais extracelulares.
- FAK:** Do inglês *focal adhesion quinase*, traduzido como quinase de adesão focal.
- IL-1:** Do inglês *Interleukin 1*, traduzido como interleucina 1.
- KDa:** Quilodalton.
- OMS:** Organização Mundial da Saúde.
- MEC:** Matriz extracelular.
- RNAm:** Ácido ribonucleico mensageiro.
- UNIFOR** Universidade de Fortaleza
- UFRN:** Universidade Federal do Rio Grande do Norte
- NGS:** Neoplasias de glândulas salivares.
- P53:** Do inglês *protein 53*, refere-se ao gene P53 ou a proteína P53.
- RT-PCR:** Do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*, traduzido como reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase.
- SPSS:** Do inglês *Statistical Package for Social Sciences*, traduzido como Programa Estatístico para Ciências Sociais.
- TCLE:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- TNF:** Do inglês *Tumor necrosis fator*, traduzido como Fator de necrose tumoral.
- TNM:** Tumor-Nodo-Metástase.
- TRIS:** Do inglês, *Tris-hydroximetil-aminometano*. traduzido como Tris-hidroximetil-aminometano.
- UEPB:** Universidade Estadual da Paraíba.

- IL-8:** Do inglês *interleukyne-8*, traduzido como interleucina-8.
- CXCR2:** Do inglês *CXC chemokine receptor-2*, traduzido como Receptor de quimiocina CXC 2.
- CXCR7:** Do inglês *CXC chemokine receptor-7*, traduzido como Receptor de quimiocina CXC 7.





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
<b>Figura 1A.</b> Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em CAC tubular.....	66
<b>Figura 1B.</b> Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em CAC cribriforme.....	66
<b>Figura 1C.</b> Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em CAC sólido.....	66
<b>Figura 1D.</b> Imunoexpressão epitelial de CXCR4 em CAC tubular .....	66
<b>Figura 1E.</b> Imunoexpressão celular epitelial de CXCR4 em CAC cribriforme.....	66
<b>Figura 1F.</b> Imunoexpressão celular epitelial de CXCR4 em CAC sólido..	66
<b>Figura 2A.</b> Boxplots relativos aos IP da quimiocina CXCL12 nas regiões intratumoral, peritumoral e IP geral de imunoexpressão em relação ao grau de malignidade tumoral.....	67
<b>Figura 2B.</b> Boxplots relativos IP do receptor CXCR4 nas regiões intratumoral, peritumoral e IP geral de imunoexpressão em relação ao grau de malignidade tumoral.....	67



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Quadro 1.</b> Variáveis independentes.....	40
<b>Quadro 2.</b> Variáveis dependentes.....	40
<b>Quadro 3.</b> Classificação dos padrões histopatológicos dos CAC de acordo com Ellis e Auclair (1996).....	41
<b>Quadro 4.</b> Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	43
<b>Tabela 1.</b> Dados descritivos do índice de positividade da CXCL12 e do CCR4 em região intratumoral, região peritumoral e IP geral de imunexpressão dos marcadores em relação ao padrão histopatológico dos CACs.....	64
<b>Tabela 2.</b> Correlação do IP de imunexpressão da CXCL12, do CXCR4 grau histopatológico de malignidade nas regiões avaliadas.....	65



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>	
<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	36
2.1	OBJETIVO GERAL.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	38
3.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	38
3.2	CARACTERIZAÇÃO DE ESTUDO.....	38
3.3	POPULAÇÃO.....	38
3.4	AMOSTRA.....	39
<b>3.4.1</b>	<b>Critérios de inclusão.....</b>	39
<b>3.4.2</b>	<b>Critérios de exclusão.....</b>	39
3.5	VARIÁVEIS.....	39
3.6	ESTUDO MORFOLÓGICO.....	40
3.7	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	41
<b>3.8.1</b>	<b>Método Imunoistoquímico.....</b>	41
<b>3.8.2</b>	<b>Análise imunoistoquímica.....</b>	44
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>4</b>	<b>ARTIGO.....</b>	47
4.1	APRESENTAÇÃO.....	48
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	48
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	69
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	71
	<b>ANEXOS</b>	
	<b>APÊNDICE</b>	



## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.1 Carcinoma adenoide cístico

O carcinoma adenoide cístico (CAC) é uma das neoplasias malignas de glândula salivar. Inicialmente descrito por Theodor Billroth em 1859, e originalmente denominada cilindroma, e este termo ainda é algumas vezes utilizados como sinônimo para esta neoplasia, entretanto, o uso desse termo deve ser evitado porque não representa a natureza maligna do tumor, e também pelo fato de o mesmo ser aplicado para um tumor de anexos cutâneos que possui apresentação clínica e prognóstica marcadamente distinta (ELLIS; AUCLAIR, 1996; SPIES, 1930). Ocorrem principalmente nas parótidas e glândulas salivares menores intrabucais, particularmente no palato, seguidas das glândulas submandibulares e raramente acometem as glândulas sublinguais (KIM et al, 1994; LOPES et al, 1999, BUCHNER; MERRELL; CARPENTER, 2007; BJORNDAL et al, 2011).

O CAC é responsável por apenas 1% de todos os tumores malignos da região da cabeça e do pescoço e 10% de todas as neoplasias das glândulas salivares. É mais comum na quinta e sexta décadas de vida, mas podem aparecer em quase todas as idades. O sexo feminino é o mais acometido e a média de idade é cerca de 57 anos (ELLIS, 1996; CHUMMUN, 2001; ELLIES, 2006; BARRETT; SPEIGHT, 2009; STENMAN et al, 2017).

Sugere-se que o CAC origina-se de células dos ductos intercalados e células mioepiteliais (ALTMAN et al., 1997, BELL et al, 2014). Macroscopicamente, os CACs são sólidos, bem circunscritos, mas não encapsulados. Mostram-se como massas leves e firmes, com tamanhos variáveis e invariavelmente infiltrativos. O CAC comumente mostra-se como um aumento de volume de crescimento lento. A dor é o achado clínico mais comum e mais significativo, ocorrendo ocasionalmente na fase precoce do curso da doença antes que haja uma tumefação clinicamente detectável. Os pacientes geralmente se queixam de uma dor inespecífica, constante e de baixo grau, que aumenta de intensidade gradativamente. Os tumores de parótida podem causar paralisia do nervo facial. As lesões em palato podem apresentar superfície lisa ou ulcerada. Os casos que se originam no palato ou no seio maxilar geralmente exibem características radiográficas de destruição óssea (SPIRO; HUVOS, 1974; NEVILLE et al, 2016).



Histopatologicamente, o CAC pode apresentar-se de forma variável, através de três padrões principais: cribriforme, tubular e sólido. O padrão cribriforme, o mais clássico, caracteriza-se por ilhas de células epiteliais basaloides, pequenas ou cuboidais, exibindo núcleo extremamente basofílico, com pouco citoplasma e múltiplos espaços císticos lembrando *queijo suíço*. Nos espaços císticos é observado material mucoide basofílico ou produto eosinofílico hialinizado, bem como a combinação de ambos. No padrão tubular, as células epiteliais estão arranjadas em múltiplos ductos pequenos ou túbulos, envolvidos no estroma hialino e na variante sólida, ilhas ou lençóis que apresentam pouca tendência a formar ductos ou espaços císticos (ELLIS; AUCLAIR, 1996; FRIERSON et al, 2002; NEVILLE et al, 2016) Distintamente do padrão cribriforme e tubular, no padrão sólido é observado pleomorfismo celular e atividade mitótica, bem como focos de necrose nos centros das ilhas das células neoplásicas (BARRETT; SPEIGHT, 2009).

A mesma lesão pode apresentar os três diferentes padrões microscópicos, havendo, entretanto, a predominância de um deles. Existe uma relação nítida entre a agressividade da lesão, tipo microscópico e o estágio de desenvolvimento tumoral, tendo um predomínio de pior prognóstico obedecendo a uma escala decrescente em relação aos tipos microscópicos: sólido, cribriforme e tubular (NAMAZIE et al, 2001).

Verifica-se na literatura a existência de diversos sistemas de gradação histopatológica do CAC, os quais se baseiam em comportamento biológico associação às características histopatológicas predominantes nos tumores, como os propostos por Spiro et al (1974) e Perzi (1978)/Szanto (1984). Esses sistemas de gradação consideram pacientes com pobre prognóstico baseados na quantidade de áreas sólidas no arranjo tumoral, sendo assim, Spiro et al (1974) apontam que se o tumor possui até 50% de áreas com arranjo sólido, pode ser considerado um CAC de alto grau de malignidade, enquanto que para Perzi (1978)/Szanto (1984) esse percentual é de 30%, portanto, não há um consenso entre esses sistemas. Considerando essa subjetividade, um novo sistema foi sugerido por Weert et al. (2015) que classificam os CACs em Baixo e Alto grau, considerando a ausência ou presença de áreas de proliferação celular neoplásica com arranjo sólido, independentemente da sua quantidade.

A sintomatologia dolorosa normalmente esta associada a lesão e é principalmente atribuída ao comportamento invasivo tumoral, cujas células com tendência a invasão disseminam-se periféricamente aos fascículos nervosos

(COHEN et al, 2004). Metástases tardias e recorrências locais são frequentes. Metástases podem ocorrer à distância mesmo nas fases precoces do desenvolvimento ou até 20 anos depois da ressecção tumoral, sendo esse fato associado a um pior prognóstico (WAHLBERG et al, 2002; KOKEMUELLER et al, 2004). Estudos relatam que as metástases ocorrem preferencialmente para pulmões (80%), ossos (15%), fígado e em menor grau para outras localizações anatômicas (5%) (GUZZO et al, 2010).

No estudo de DeAngelis et al, as taxas de sobrevida global foram de 92% em cinco anos, 72% em 10 anos e 54% em 20 anos. Eles demonstraram que a taxa de sobrevida do paciente diminui consideravelmente em série, com um seguimento de mais de 15 anos (ANGELIS, TSUI, WIESENFELD, 2011).

Estudos afirmam que 80% a 90% dos pacientes morrem por conta da lesão entre 10 e 15 anos após o diagnóstico. A taxa de recidiva local varia de 16 a 85%. O envolvimento de linfonodos é incomum, mas foi relatado, podendo variar de 5 a 25%. Tipicamente em tumores da glândula submandibular é frequente a disseminação contígua em vez de metástase. A incidência de metástases à distância é estimada em 25-55%. Apenas 20% dos pacientes com metástases à distância sobrevivem aos cinco anos. Alguns estudos afirmam que a invasão perineural constitui um achado histopatológico comum, sendo considerada uma possível via de disseminação das células tumorais (KO et al, 2007; BARRETT; SPEIGHT, 2009). O envolvimento perineural acontece entre 22% - 46% dos casos de CAC, sendo este em nível macro ou microscópico (BARRETT; SPEIGHT, 2009).

O tratamento proposto é a cirurgia associada à radioterapia pós-operatória, alcançando-se controle local razoável. A alta probabilidade de metástases à distância limita a sobrevida do paciente. (LIU et al, 2012; ADAMS; WARNER; NOR, 2013; MEYERS et al, 2016).

## 1.2 Quimiocina CXCL12 e receptor CXCR4

As células tumorais epiteliais, além de diversas células de tecidos humanos produzem quimiocinas ou citocinas quimiotáticas, que constituem uma família de aproximadamente 50 proteínas, de 8 a 12kD. São divididas em quatro classes, baseado no número e localização dos resíduos de cisteína N-terminais (KUFAREVA;

SALANGA; HANDEL, 2015). As principais classes de quimiocinas são CC ( $\beta$ ), em que os resíduos de cisteína são adjacentes, e classe CXC ( $\alpha$ ) quando existe um aminoácido intercalado entre os resíduos de cisteína (DEVRIES et al, 2006; ABBAS et al, 2011).

Os leucócitos, células endoteliais e fibroblastos produzem as quimiocinas de classe CC e CXC, podendo ter produção induzida pelo fator de crescimento tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1). A classe CC regula células T, B e recrutamento de células da medula óssea, tais como monócitos e células dendríticas. A quimiocina CXC regula o recrutamento de linfócitos, e neutrófilos (DEVRIES et al, 2006; HEMBRUFF; CHENG, 2009; ROSTÈNE; BUCKINGHAM, 2007).

A quimiocina CXCL12 é uma proteína de aproximadamente 8 kDa, produzida por diversos tipos celulares, formada por cerca de 68 aminoácidos e tem como função a quimiotaxia de linfócitos T e monócitos, regulação do ciclo celular e apoptose (WANG et al, 2006). Órgãos e tecidos, como o pulmão, fígado, cérebro, rim, coração, medula óssea, músculo esquelético e pele expressam constitutivamente a CXCL12. Além disso, a expressão dessa quimiocina pode ser observada em tecidos alvo de lesão celular, como enfarte cardíaco, isquemia, danos tóxicos ao fígado, hemorragia excessiva, tecidos irradiados ou submetidos a quimioterapia (HEMBRUFF; CHENG, 2009; TEICHER; FRICKER, 2010).

Os receptores de quimiocinas desempenham importantes papéis no desenvolvimento da metástase, facilitando a disseminação tumoral em cada um dos eventos do processo, incluindo aderência das células tumorais ao endotélio, extravasamento para os vasos sanguíneos, colonização metastática, angiogênese, proliferação e proteção contra resposta do hospedeiro através da ativação de vias de sobrevivência celular. (KAKINUMA; HWANG, 2006; SINGH et al, 2007).

A proteína CXCR4 é um receptor transmembranar acoplado a proteína G, formado por cerca de 3502 aminoácidos. Considera-se um regulador crítico da produção, mobilização e recrutamento de células-tronco durante o desenvolvimento e hematopoiese (WANG et al, 2006; WENDT et al, 2006). Sua expressão tem sido relatada em células hematopoiéticas, cerebrais, pulmonares, cardíacas, hepáticas, renais, endoteliais, epiteliais da microglia, neuronais, progenitoras endoteliais e musculares lisas. Embora a CXCL12 possa se ligar a outros receptores, o CXCR4 constitui o receptor principal para essa quimiocina (BALKWILL, 2004; TEICHER; FRICKER, 2010).

A interação entre CXCL12 e CXCR4 participa da patofisiologia de várias doenças. Esta interação pode aumentar a sobrevivência de células-tronco malignas, bem como sua proliferação, invasão e metástase, levando a disseminação do tumor em diversos tipos de cânceres, incluindo câncer de mama, próstata, tumores cerebrais e leucemias (LAPTEVA et al, 2005; BALKWILL, 2004; KAKINUMA; HWANG, 2006; SALVATORE et al, 2010).

A interação da quimiocina CXCL12 com o receptor CXCR4 estimula alterações no citoesqueleto e polimerização de miosina e actina. As fibras de actina se ancoram nas áreas de adesões focais (ligações entre a célula e a matriz extracelular (MEC), formado por quinase de adesão focal (FAK) e vinculina, que juntam as integrinas para o citoesqueleto de actina) permitindo a tração celular e reorganização da MEC. Os sinais gerados modificam a conformação das integrinas de superfície celular, ampliam a afinidade com os respectivos ligantes e permitem a migração celular (TEICHER; FRICKER, 2010; NASSER et al, 2011; KUFAREVA; SALANGA; HANDEL, 2015).

Com a presença de CXCL12, as células neoplásicas que expressam CXCR4 funcional exibem potencial de migração ou invasão. A CXCL12 tem aptidão de mobilizar e recrutar as células para locais neo-angiogênicos, promovendo a revascularização do tecido isquêmico e o crescimento do tumor (BALKWILL, 2004).

Em vários tipos de neoplasias, por exemplo, câncer de mama e de pâncreas, o CXCR4 apresenta expressão aumentada (NASSER et al, 2011; SHEN et al, 2013). Em neoplasias malignas de órgãos sólidos a expressão do receptor CXCR4 tem sido relacionada a um pior prognóstico. Na amostra avaliada no estudo de Balkwill (2004) a expressão do CXCR4 contribuiu para o potencial metastático (BALKWILL, 2004).

As interações da CXCL12 com o CXCR4 iniciam vias de sinalização divergentes, que podem levar a várias respostas, incluindo quimiotaxia, sobrevivência e/ou proliferação celular, aumento dos níveis de cálcio intracelular e transcrição gênica. Um estudo *in vitro* e *in vivo* relatou que as interações de CXCL12/CXCR4 no microambiente tumoral podem promover o crescimento local. Além disso, sugeriu-se que a expressão elevada de CXCR4 em células tumorais aumenta o potencial invasivo e metastático dessas (SU et al, 2005).

A quimiocina CXCL12, que tem como receptor principal o CXCR4, é altamente expressa em células de câncer primário de pulmão, bem como em células tumorais da medula óssea, fígado, glândulas supra-renais e cérebro, que são locais

para a metástase do câncer pulmonar (WALD; SHAPIRA; IZHAR, 2013). As interações quimiotáticas entre CXCL12/CXCR4, CXCR2 e CXCL8/IL8, bem como CCR7/CCL19, podem ser potentes mecanismos de indução de diferenciação tumoral, metástase linfonodal e invasão vascular no carcinoma pulmonar. Nesse contexto a CXCL12 pode funcionar como fator de crescimento autócrino e/ou parácrino, promovendo a progressão tumoral, e ser associada a um maior estadiamento TNM. Considerando que a CXCL12 é expressa em células tumorais pulmonares e sua interação com CXCR4 facilita a migração celular, sugere-se que o bloqueio do seu receptor poderia representar uma estratégia alvo em terapias antitumorais úteis no controle de metástase linfonodal e invasão vascular em câncer de pulmão (LIU et al, 2015).

Uchida et al (2013) avaliaram o papel do receptor CXCR4 no comportamento metastático de neoplasias malignas glandulares salivares. Observaram a expressão funcional do CXCR4, demonstrada pela capacidade das linhagens avaliadas de CAC e carcinoma mucoepidermóide (CME) migrarem através de um gradiente SDF-1 que ativa sinalizações extracelulares regulados por kinases (ERK)1/2. A análise imunoistoquímica demonstrou a expressão nuclear e citoplasmática do CXCR4 em 16 dos 20 CACs e em 4 de 6 CMEs. Concluíram que o CXCR4 poderia ser importante na avliação do potencial mestastático das neoplasias malignas de glândulas salivares.

Phattarataratip e Dhanuthai (2017) avaliaram 18 casos de CAC e 7 (38,9%) observando expressão de CXCR4 em mais de 80% das células neoplásicas. E apenas três casos exibiram imunoexpressão inferior a 10 %. Nos casos positivos, as células ductais exibiram imunorreatividade tanto no citoplasma quanto no núcleo, enquanto a marcação nuclear foi observada na maioria das células mioepiteliais.

Embora existam informações sobre o papel do complexo CXCL12/CXCR4 na patogenia de neoplasias diversas em humanos, podendo associado a progressão tumoral, angiogênese, metástase e sobrevivência celular neoplásica, no entanto, a literatura é escassa sobre a influência de tal complexo na patogenia do CAC de glândulas salivares, fato que justificou pesquisar a imunoexpressão dessas proteínas nesse tumor.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo avaliou a expressão imunoistoquímica da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em CACs de glândulas salivares relacionando-a com parâmetros histopatológicos tumorais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se existe diferença na expressão imunoistoquímica de CXCL12 e CXCR4 em relação à região intratumoral e periferia do tumor de carcinomas adenoides císticos;
- Analisar se existe relação entre a expressão imunoistoquímica de CXCL12 e CXCR4 e o padrão histopatológico de CAC de glândula salivar;
- Relacionar a expressão imunoistoquímica de CXCL12 e CXCR4 com o grau histopatológico de malignidade de CAC de glândula salivar.





### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo foi registrado na Plataforma Brasil, de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde e submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB. Conforme parecer nº 1.435.401, seu protocolo foi aprovado (ANEXO A).

As informações nesta pesquisa foram coletadas através de cortes histológicos dos blocos parafinados pertencentes ao arquivo do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, Campus I, da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e o Hospital Napoleão Laureano.

#### **3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO**

Foi realizado um estudo com delineamento transversal de caráter descritivo correlacional entre as características histomorfológicas de uma série de CACs com a análise quantitativa da expressão imunoistoquímica das proteínas CXCR4 e CXCL12.

#### **3.3 POPULAÇÃO**

A população do presente estudo foi constituída por todos os casos de CACs diagnosticados e arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB/ Campina Grande, no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, no Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Odontologia da UFRN e da UNIFOR.

#### **3.4 AMOSTRA**

A amostra do estudo foi intencional, baseada na quantidade de material disponível no bloco e constituída por 17 amostras teciduais de CACs de glândulas salivares maiores e menores.

#### **3.5 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA**

### **3.5.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos espécimes provenientes de biópsia excisional e incisional de glândulas salivares maiores e menores cujos blocos em parafina estavam em bom estado e com quantidade suficiente de material para análises morfológicas e imunoistoquímicas e casos que não foi tratado com radioterapia previamente.

### **3.5.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos da pesquisa os casos de CAC em glândulas salivares maiores e menores que não apresentaram quantidades suficientes de material biológico para realização dos estudos morfológicos e imunoistoquímicos.

## **3.6 VARIÁVEIS**

### **3.6.1 Variáveis dependentes**

- Localização, topografia, distribuição e índice de positividade da expressão imunoistoquímica de CXCL12 e CXCR4 nos espécimes selecionados.

### **3.6.2 Variáveis independentes**

- Características morfológicas dos espécimes selecionados;
- Padrão histopatológico dos CACs;
- Grau histopatológico de malignidade dos CAC

## **3.7 Operacionalização das variáveis**

As variáveis independentes e dependentes, analisadas no presente estudo estão listadas nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

**Quadro 1.** Variáveis independentes.

Variável	Descrição	Categorias
Histodiferenciação dos CACs	Características do componente epitelial em relação aos tipos celulares predominantemente proliferantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células luminais</li> <li>• Células mioepiteliais</li> </ul>
Padrões histopatológicos dos CACs (Ellis e Auclair, 1996).	Características do componente epitelial em relação aos arranjos histológicos tipos celulares.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Padrão tubular</li> <li>• Padrão cribriforme</li> <li>• Padrão sólido</li> </ul>
Grau histopatológico (van Weert et al, 2015)	Sistema de gradação histopatológica dos CACs considerando a presença ou ausência de áreas com arranjo sólido no espécime, independentemente da sua quantidade.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixo grau: ausência de áreas sólidas</li> <li>• Alto grau: presença de áreas sólidas</li> </ul>

**Quadro 2.** Variáveis dependentes.

Variável	Descrição	Categorias
Localização	Local exato predominante da expressão imunohistoquímica das proteínas avaliadas nas estruturas císticas/tubulares do componente epitelial da amostra avaliada.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células luminais</li> <li>• Células mioepiteliais</li> <li>• Ambas</li> </ul>
Distribuição	Disposição predominante da expressão imunohistoquímica das proteínas avaliadas no componente epitelial da amostra avaliada.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Focal</li> <li>• Difusa</li> </ul>
Índice de positividade	Percentual de células epiteliais imunopositivas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (0) – negativo</li> <li>• (+) Fraca - &lt;25% das células positivas</li> <li>• (++) Moderada – 25 a 50% das células positivas</li> <li>• (+++) Forte - &gt;50% das células positiva</li> </ul>

### 3.9 ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO

Nos espécimes selecionados foi realizada análise histomorfológica em microscopia de luz com cortes de 5 µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro e corados pela técnica da hematoxilina e eosina. A análise morfológica foi realizada por um examinador previamente treinado.

Para a classificação dos padrões histológicos dos CAC foram considerados os critérios estabelecidos por Ellis e Auclair (1996) (Quadro 3).

**Quadro 3.** Classificação dos padrões histopatológicos dos CAC de acordo com Ellis e Auclair (1996).

PADRÃO HISTOPATOLÓGICO	
Padrão tubular	Áreas tubulares sem componentes sólidos.
Padrão cribiforme	Tumores cribiformes puros ou associados com <30% de áreas sólidas
Padrão sólido	Predominantemente sólido

Uma vez realizada a análise e classificação dos padrões histopatológicos dos casos, foi utilizado o sistema de gradação histopatológica de malignidade que classifica os CACs em Baixo e Alto grau, considerando a ausência e presença de áreas de proliferação celular neoplásica com arranjo sólido, independentemente da sua quantidade (van WEERT et al, 2015).

### 3.11 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

#### 3.11.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (*3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Reveal HRP System, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA*), utilizando os anticorpos primários policlonais anti-CXCL-12 e anti-CXCR4 (QUADRO 04)

Para verificação da efetividade da técnica foram utilizados como controle positivo para a CXCL12, CXCR4 cortes de Hiperplasia fibrosa inflamatória oral. O controle negativo omissão da substituição do anticorpo primário.

A técnica seguiu o protocolo utilizado no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Odontologia da UEPB, conforme descrito a seguir:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 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 5);

⇒ 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 de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*Antibody diluent, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida;

⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Incubação com anticorpo secundário (*Complement, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);

⇒ Passagens rápidas em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (2 trocas);

⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP Conjugate, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);

⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*DAB Substrate system, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA*) (10 minutos);

- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (8 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em álcool absoluto:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em resina *PermOUNT*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

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

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
CXCL-12	P- 159X	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Steamer, 90°C, 30min. Citrato pH 6.0	Overnight
CXCR-4	12 G5	Santa Cruz Biotechnology	1:750	Sem recuperação antigênica	60 minutos

### 3.11.2 Análise do perfil imunoistoquímico

A análise da expressão imunoistoquímica de CXCL12 e CXCR4 foi realizada de forma quantitativa por um único examinador, previamente calibrado. Para isso, os espécimes foram escaneados pelo Scanner Panoramic MIDI (3DHISTECH Kft 29-33, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary). Com auxílio desse programa, foi possível visualizar toda a extensão do espécime e identificar a região do tumor que apresentava o maior número de células positivas para cada um dos marcadores avaliados.

Na escala de 2000  $\mu\text{m}$  foram selecionadas áreas com maior quantidade de células imunomarcadas em cada imagem, independentemente da intensidade de marcação imunoistoquímica. Seguidamente, a expressão imunoistoquímica das proteínas utilizadas foi analisada considerando a presença de imunoexpressão do anticorpo nas células neoplásicas (coloração acastanhada citoplasmática, membranar ou nuclear, dependendo do tipo de anticorpo), tais células foram contadas através da análise das imagens escaneadas na escala de 50  $\mu\text{m}$  selecionando cinco campos peritumorais e cinco intratumorais, totalizando dez campos histológicos representativos aleatórios. A imagem de cada campo foi capturada e salva em formato JPG. Utilizando-se o *software Imaging Processing and Analysis in Java* (Image J), National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada campo foi realizada contagem de células tumorais imunopositivas e negativas. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se, o número de células imunopositivas para as proteínas na região intratumoral e peritumoral e, em seguida, somado as duas regiões foi obtido um índice de Positividade geral (IP) Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE B).

Foi considerada ainda a topografia celular da expressão dos marcadores em membrana nuclear e/ou citoplasma. A localização da marcação foi categorizada em: células luminiais, mioepiteliais ou ambas (APÊNDICE C).

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados morfológicos e imunoistoquímicos 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. Os dados obtidos com o estudo imunoistoquímico foram analisados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual 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 CXCR4 e CXCL12, de acordo com o grau histopatológico de malignidade dos CACs. Diferenças entre as imunoexpressões de CXCR4 e CXCL12, de acordo com as regiões tumorais, foram avaliadas com o auxílio do teste não paramétrico de Wilcoxon. Por fim, correlações entre as imunoexpressões de CXCR4 e CXCL12 foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes estatísticos, foi considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).





## 4 ARTIGO

### 4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo será apresentado nesta dissertação: **“imunoexpressão da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em carcinomas adenoides císticos de glândulas salivares”**.

O referido artigo será submetido ao periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine* (ISSN: 1600-0714, Fator de impacto: 2.237, Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

#### 4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

### **IMUNOEXPRESSÃO DO COMPLEXO CXCL12/CXCR4 EM CARCINOMAS ADENOIDES CÍSTICOS DE GLÂNDULAS SALIVARES**

Título breve: CXCL12/CXCR4 em carcinoma adenoide cístico glandular salivar

Amanda Lira Rufino de Lucena<sup>1</sup>, Manuel Antonio Gordón-Núñez<sup>1</sup>

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

Autor correspondente:

Manuel Antonio Gordón-Núñez

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

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

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

## Resumo

**Introdução:** O complexo CXCL12/CXCR4 tem sido associado a sinalizações importantes na patogenia de tumores, porém pouco se conhece da sua ação em neoplasias glandulares salivares como o carcinoma adenoide cístico que permitam entender melhor a patogenia, comportamento biológico e prognóstico dessa neoplasia.

**Métodos:** Foi pesquisado o perfil de imunexpressão de anticorpos contra CXCL12 e CXCR4 e analisada em relação a parâmetros histomorfológicos mediante a classificação histológica da OMS e o sistema de gradação histopatológica de malignidade de van Weert et al em 17 CAC.

**Resultados:** O IP geral de expressão da CXCL12 foi semelhante nos padrões histopatológicos. Houve diferença significativa do IP de CXCL12 intratumoral ( $p=0,005$ ) e do IP geral. Verificou-se associação significativa do IP intratumoral de CXCL12 em relação ao grau de malignidade, principalmente em casos de baixo grau. O IP geral da quimiocina teve associação significativa com o grau de malignidade. O IP geral de CXCR4 teve tendência decrescente em CAC sólidos, cribriformes e tubulares. Não foi observada associação significativa do IP de CXCR4 intratumoral, peritumoral e IP geral com o grau de malignidade dos CAC. Não houve correlação significativa de CXCL12 e CXCR4 nas regiões tumorais avaliadas tanto no baixo e alto grau histológico de malignidade.

**Conclusões:** Independentemente dos subtipos histológicos do CAC a tendência a maior imunexpressão intratumoral da quimiocina CXCL12 sugere algum papel desta na regulação dos mecanismos que garante a proliferação e a viabilidade celular neoplásica. A expressão do CXCR4 em todas as regiões tumorais sugere sua ação para tornar as células neoplásicas aptas para invadir e/ou metastatizar.

**Palavras chave:** CXCL12. CXCR4. Neoplasia. Glândula salivar. Carcinoma adenoide cístico.

## **Introdução**

O carcinoma adenoide cístico (CAC) é um tumor maligno de origem epitelial, caracterizado por cinética de crescimento lento e invasão perineural<sup>1</sup>. Suas células podem ser encontradas além dos limites clínicos do tumor<sup>2</sup>. Compreender os mecanismos de invasão, proliferação e sobrevivência celular dessa neoplasia pode, portanto, fornecer ou direcionar uma nova estratégia para sua terapia.

O CAC pode apresentar mecanismos mediados por quimiocina durante o processo de metástase<sup>3</sup>. As quimiocinas são pequenas proteínas quimiotáticas que coordenam a circulação de células inflamatórias no organismo. Por este fato, as quimiocinas e seus receptores de superfície celular são relacionados a diversas condições fisiológicas e patológicas, incluindo o câncer. Essas moléculas são expressas por células neoplásicas ou estromais e têm efeitos no local primário do tumor, estimulando a angiogênese e motilidade de células tumorais, e linfonodos por meio de um gradiente para a migração direta de células neoplásicas<sup>4</sup>.

A quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 têm sido relacionados a uma grande variedade tumores, promovendo o crescimento tumoral, angiogênese e disseminação do tumor. A superexpressão do CXCL12/CXCR4 nos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço parece ativar funções em células neoplásicas como, motilidade, invasão e metástase<sup>5</sup>. Zushi et al<sup>3</sup> relataram que a expressão do CXCR4, padrões histológicos e potencial metastático estão intimamente relacionados no CAC.

Este estudo avaliou a expressão imunoistoquímica da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em CACs de glândulas salivares relacionando-a com parâmetros histopatológicos tumorais no intuito de obter maiores informações que contribuam no conhecimento do papel de tais proteínas na patogenia, comportamento biológico e prognóstico dessa neoplasia.

## **Métodos**

### *Espécimes*

A amostra foi constituída por 17 CACs de glândulas salivares registrados e diagnosticados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de

Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)/ Campina Grande-PB, do Laboratório de Histopatologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)/Natal-RN, Laboratório de Histopatologia Oral da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)/Fortaleza-CE e no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa-PB. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da UEPB mediante o parecer 1.435.401.

#### *Análise histomorfológica*

Da amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foram obtidos cortes de 5µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro e corados pela técnica da hematoxilina e eosina.

A análise histológica foi realizada em microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), considerando os critérios estabelecidos por Ellis e Auclair<sup>7</sup> Uma vez realizada a análise e classificação dos padrões histopatológicos dos casos, foi utilizado o sistema de gradação histopatológica de malignidade baseada em Weert<sup>8</sup> que classifica os CACs em Baixo e Alto grau, considerando a ausência e presença de áreas de proliferação celular neoplásica com arranjo sólido, independentemente da sua quantidade<sup>8</sup>.

#### *Imunoistoquímica*

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano (*3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*). Os cortes teciduais foram desparafinados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica e incubados com os anticorpos primários policlonais anti-CXCL12 e anti-CXCR4 (Tabela 01), utilizando o método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Reveal HRP System, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA*). A peroxidase endógena foi inativada mediante duas imersões dos cortes em peróxido de hidrogênio. As reações foram desenvolvidas com diaminobenzidina (Spring) 0,03% como cromógeno e contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Os controles positivos foram cortes de hiperplasia fibrosa inflamatória oral. O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário.

### *Análise imunoistoquímica*

A análise da expressão imunoistoquímica de CXCL12 e CXCR4 foi realizada de forma quantitativa por um único examinador, previamente calibrado. Para isso, os espécimes foram escaneados pelo Scanner Panoramic MIDI (3DHISTECH Kft 29-33, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary). Com auxílio do Viewer, foi possível visualizar toda a extensão do espécime e identificar a região do tumor que apresentava o maior número de células positivas para cada um dos marcadores avaliados.

Na escala de 2000 µm foram selecionadas áreas com maior quantidade de células positivas em cada imagem, independentemente da intensidade de marcação imunoistoquímica.

As células foram contadas através da análise de imagens escaneadas, utilizando a escala de 50 µm para selecionar cinco campos intratumorais e cinco peritumorais, totalizando dez campos histológicos representativos do tumor. A expressão imunoistoquímica das proteínas foi analisada considerando a presença de imunoexpressão dos anticorpos nas células neoplásicas (coloração acastanhada citoplasmática ou nuclear, dependendo do tipo de anticorpo).

Foi considerada a topografia celular da expressão dos marcadores em citoplasma e/ou nuclear. A distribuição de marcação foi considerada focal ou difusa. A localização da marcação foi categorizada em: células luminiais, não liminais (mioepiteliais) ou ambas.

A imagem de cada campo foi capturada e salva em formato JPG e utilizando o *software Imaging Processing and Analysis in Java* (ImageJ), National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) foi realizada contagem de células tumorais imunopositivas e negativas. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se, o número de células imunopositivas para as proteínas na região intratumoral e peritumoral, seguidamente, somado as contagens duas regiões foi obtido um índice de Positividade geral (IP) do tumor. Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas.

### *Análise estatística*

Os resultados clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos 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. Os dados obtidos com o estudo imunoistoquímico foram analisados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual 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 CXCR4 e CXCL12, de acordo com o grau histopatológico de malignidade dos CACs. Diferenças entre as imunoexpressões de CXCR4 e CXCL12, de acordo com as regiões tumorais, foram avaliadas com o auxílio do teste não paramétrico de Wilcoxon. Por fim, correlações entre as imunoexpressões de CXCR4 e CXCL12 foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes estatísticos, foi considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados**

### *Resultados morfológicos*

Dos 17 casos de CAC avaliados, três (17,6%) foram classificados como sólidos, seis (35,3%) como cribriforme e oito (47,1%) como tubular. Considerando o grau histopatológico de malignidade,<sup>8</sup> seis (35,3%) CACs foram classificados como de baixo grau de malignidade e onze (64,7%) como de alto grau de malignidade.

### *Resultados imunoistoquímicos*

A expressão imunoistoquímica da quimiocina CXCL12 foi predominantemente nuclear e citoplasmática, difusamente distribuída, principalmente em células luminiais de estruturas ductais e císticas. Observou-se maior imunoexpressão dessa proteína nas estruturas ductulares pequenas ou em formação, enquanto que naquelas maiores houve uma tendência a menor imunoexpressão. Verificou-se que 14 (82,4%) casos foram imunopositivos na região intratumoral e peritumoral, um (5,8%) foi negativo na periferia tumoral e dois casos (11,8%) foram completamente negativos.

A tabela 02 apresenta os dados referentes ao IP de expressão da CXCL12 nas regiões intratumoral, peritumoral e o IP geral de imunoexpressão em relação aos padrões histopatológicos dos CAC (Figuras 1A, 1B e 1C). Verificou-se uma



tendência a maior expressão dessa proteína na região intratumoral do padrão cribriforme e na região peritumoral do padrão sólido. O IP geral de imunexpressão da CXCL12 apresentou uma tendência semelhante nos padrões sólido, cribriforme e tubular.

Na região intratumoral, peritumoral e geral dos CACs foram observadas diferença estatisticamente significativa do IP de expressão da CXCL12 em relação ao grau histopatológico de malignidade, sendo maior a expressão em casos de baixo grau de malignidade ( $p=0,005$  e  $p=0,015$  e  $p=0,009$ ). (Figura 2A). Foi reformulado

A expressão imunoistoquímica do receptor CXCR4 foi detectada predominantemente em citoplasma e núcleo de células neoplásicas, distribuída difusamente, principalmente em células luminais e mioepiteliais de estruturas ductulares e estruturas císticas. À diferença da CXCL12, observou-se imunexpressão intensa e uniforme em todos os arranjos celulares neoplásicos. Verificou-se que todos os casos (100%) foram imunopositivos nas regiões intratumoral e na peritumoral.

A tabela 02 apresenta os dados referentes ao IP de expressão da CXCR4 nas regiões intratumoral, peritumoral e o IP geral de imunexpressão desse receptor em relação aos padrões histopatológicos dos CAC (Figuras 1D, 1E e 1F). Verificou-se uma tendência a maior expressão dessa proteína na região intratumoral e peritumoral do padrão tubular. O IP de imunexpressão geral do CXCR4 apresentou uma tendência maior no padrão tubular e semelhante nos padrões sólido e cribriforme.

Não foi observada associação estatisticamente significativa do IP de imunexpressão do CXCR4 na região intratumoral, peritumoral e do IP geral em relação ao grau histopatológico de malignidade dos CAC ( $p=0,840$ ;  $p=0,800$ ;  $p=0,801$ , respectivamente) (Figura 2B), no entanto, descritivamente observou-se que os casos de alto grau de malignidade foram os de maior IP de imunomarcção.

De acordo com o teste estatístico de Spearman, não houve correlação estatisticamente significativa do IP de expressão da CXCL12 com o IP de expressão do CXCR4 nas regiões tumorais avaliadas nos CAC de baixo e alto grau histopatológico de malignidade ( $p<0,05$ ). Para a CXCL12 intratumoral houve relação estatisticamente significativa no IP geral em CAC de alto grau de malignidade ( $p<0,05$ ). Para o CXCR4, houve relação estatisticamente significativa dos IP de

expressão intratumoral, peritumoral e IP geral de imunexpressão desse receptor em CAC de alto grau de malignidade ( $p < 0,05$ ).

## **Discussão**

O CAC constitui uma das neoplasias malignas de glândulas salivares mais intrigantes devido à sua diversidade histopatológica e ao seu comportamento biológico diferenciado, caracterizado por padrões histopatológicos tubular, cribiforme e sólido, os quais têm sido associados às suas particularidades clínicas como a extensa invasão local, tropismo celular neoplásico por estruturas nervosas e capacidade metastática à distância tardia. Devido à sua raridade, há alguma controvérsia sobre os aspectos clínicos e histológicos, fatores que afetam a sobrevida dos pacientes com CAC<sup>9</sup>.

Considerando os padrões de arranjo histopatológico da proliferação celular neoplásica do CAC, a prevalência do padrão tubular observada neste estudo diverge dos dados da literatura, uma vez que estudos como o de Uchida et al<sup>10</sup> e Gao et al<sup>11</sup> apontaram o padrão cribiforme como o mais frequente, enquanto que o sólido predominou em outras pesquisas<sup>12,13</sup>. Face ao exposto, sugere-se que a amostra deste estudo provavelmente possuiria um perfil clínico-patológico associado a um melhor prognóstico, uma vez que relatasse que os casos que apresentam maior arranjo celular neoplásico tubular é associado a melhor prognóstico, enquanto que tumores com predominância do padrão sólido tendem a possuir pior prognóstico<sup>9</sup>.

Considerando o antes exposto, sugere-se que o sistema de classificação histopatológica da Organização Mundial da Saúde (OMS) é passível de subjetividade, sendo assim, a categorização preconizada por Weert et al.<sup>8</sup> utilizada no presente estudo, que categoriza o tumor em dois graus histopatológicos de malignidade, parece representar um sistema de classificação mais confiável com boa reprodutibilidade e baixa variabilidade interobservador. Partindo dessa perspectiva, os resultados deste estudo mostram outro perfil patológico para a amostra avaliada, uma vez que houve predomínio de casos com alto grau de malignidade, devido à presença de áreas de proliferação celular neoplásica com arranjo sólido, independentemente da sua quantidade.

A interação da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 estão bem estabelecidos como uma via de sinalização desempenhando um papel importante na

progressão e malignidade de carcinomas. Leucócitos tumorais infiltrantes, fibroblastos, células endoteliais e especialmente células tumorais epiteliais são capazes de produzir quimiocinas e expressar receptores de quimiocinas, determinando um gradiente de quimiocinas que influenciam a diferenciação, proliferação, crescimento, sobrevivência, migração e invasão de células tumorais<sup>14,15</sup>, eles podem interferir diretamente com as vias de sinalização intracelular MAPK e PI3K/AKT, promover a angiogênese, estimular a ação de interleucinas e recrutar células mieloides promotoras de tumor derivadas da medula óssea para o local do tumor<sup>16</sup>.

A predominância da imunexpressão citoplasmática e nuclear da quimiocina CXCL12 na amostra avaliada, na maioria dos casos, corrobora os dados da literatura, onde estudos como o de Albert et al<sup>5</sup> observaram índices de expressão variando de 40% a 93% em amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Diferentemente, o estudo de Zhong et al<sup>17</sup> que avaliaram a expressão dessa quimiocina e do seu receptor em amostras de tumor pancreático, tecido adjacente ao tumor, pâncreas normal e linfonodos próximos ao pâncreas, observando baixa expressão de CXCL12 no tecido tumoral pancreático quando comparado aos outros tipos de amostra, porém alta expressão de CXCR4 em tecido tumoral pancreático, tecido pancreático adjacente ao tumor e nos gânglios linfáticos próximos ao tumor.

Considerando os dados descritivos deste estudo, o menor IP de imunexpressão da CXCL12 nas regiões intratumoral e peritumoral nos tumores e no IP geral de CAC de alto grau de malignidade constitui um dado importante a ser discutido, uma vez que, embora tenham analisado amostras teciduais diferentes às desta pesquisa, Clatot et al<sup>18</sup>, sugerem uma relação da expressão intratumoral de CXCL12 com a sobrevida do paciente e evolução tumoral para metástase. Baixos índices de expressão intratumoral da mesma poderiam implicar na perda de adesões celulares e migração celular neoplásica para sítios metastáticos. Nesse contexto cita-se que a baixa imunexpressão intratumoral de CXCL12 pode decorrer da metilação do promotor dessa proteína<sup>19</sup>.

Em relação a imunexpressão da quimiocina CXCL12 observada nesta pesquisa, os dados referentes ao receptor CXCR4 mostraram uma expressão citoplasmática e nuclear do mesmo na totalidade da amostra, corroborando os achados de Uchida et al<sup>10</sup> numa amostra de 20 casos de CAC com alto potencial

metastático, onde 80% da amostra apresentou imunomarcagem semelhante à deste estudo.

Considerando a tendência crescente do IP do CXCR4 nas áreas intratumorais e peritumorais dos padrões histopatológicos sólido, cribriforme e tubular dos CAC que constituíram a amostra deste estudo, sugere-se que este receptor talvez tenha um papel mais preponderante na diferenciação celular que garante a população neoplásica e na manutenção das interações celulares do CAC que permitem a sobrevivência de tais células, favorecendo o crescimento tumoral. Essa sugestão encontra apoio no relato de que vias de sinalizações mediadas pelo CXCR4 podem levar à transcrição de genes envolvidos na migração, sobrevivência e progressão do ciclo celular<sup>5, 20, 21</sup>.

A tendência crescente do IP geral de imunopositividade do receptor CXCR4 nos padrões sólido, cribriforme e tubular, respectivamente, observada neste estudo contraria os achados de Zushi et al<sup>3</sup>, que observaram a expressão desse receptor em espécimes de CAC através da imunohistoquímica e em modelos *in vivo* de CAC em ratos, verificando fraca imunopositividade na maioria dos CAC exibindo arranjo em padrão tubular, e cribriforme sem metástase enquanto que naqueles com padrões cribriforme e sólido, com metástase, houve forte imunomarcagem, e que a forte marcação foi mais destacada em tumores com metástase, sugerindo, segundo os autores que parece existir uma relação da expressão desse receptor com os padrões histopatológicos e a capacidade metastática do CAC, uma vez que o padrão tubular é associado a melhor prognóstico e o sólido a prognóstico sombrio.

Embora tenha sido sugerido que a superexpressão desse receptor de quimiocina em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e em linhagens celulares de CAC pareça estar associada a pobre sobrevivência<sup>5,22</sup>, infelizmente, pela ausência de informações nos prontuários sobre o desfecho dos casos avaliados na amostra do presente estudo, não foi possível realizar uma abordagem mais consistente do papel desse receptor no comportamento do CAC. Contudo considerando a gradação histopatológica de malignidade, a ocorrência de maiores IP de CXCR4 nas regiões tumorais de casos de baixo grau de malignidade, pode sugerir que nessa amostra o perfil de imunomarcagem desse receptor estaria associado a um melhor prognóstico, no entanto, o pequeno tamanho da amostra ainda é evidência insuficiente para sustentar essa hipótese.

Relata-se que a sinalização CXCL12/CXCR4 em carcinomas epidermóides orais pode ocorrer de maneira parácrina, mas ocasionalmente de forma autócrina<sup>23</sup>. Nesse contexto cita-se que a sinalização parácrina do complexo CXCL12/CXCR4 pode favorecer metástases linfonodais ou à distância, enquanto que a sinalização autócrina é um evento crítico no desenvolvimento de um fenótipo metastático mais agressivo<sup>5</sup>.

Em neoplasias malignas glandulares salivares, embora não tenha sido observada correlação da expressão de CXCL12 com CXCR4 nas regiões tumorais avaliadas, o fato de que no presente estudo foi observada uma forte imunexpressão dessas proteínas, principalmente do receptor CXCR4 em todas as regiões tumorais, constitui um dado interessante, uma vez que, provavelmente as células neoplásicas estejam utilizando mecanismos autócrinos para a expressão de tais proteínas, talvez para a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular, além da possibilidade de estarem expressando altos índices de CXCR4, principalmente na periferia tumoral, propiciando assim os mecanismos que permitam a invasão e capacidade metastática dessa neoplasia glandular salivar.

A correlação significativa do IP de imunexpressão de CXCR4 tanto na região peritumoral, quanto no IP geral de imunexpressão, principalmente em CAC de baixo grau de malignidade, poderia ser justificada pelo relatado na literatura de que células tumorais expressando CXCR4 são capazes de responder a estímulos quimiotáticos de células estromais e/ou parenquimais que expressam constitutivamente a quimiocina CXCL12, criando um gradiente quimiotático que facilitaria a migração, invasão e metástase do tumor<sup>24</sup>. Novas abordagens, utilizando marcadores que avaliem essas atividades da patogenia tumoral serão necessárias para explicar consistentemente essa informação, uma vez que pelo tamanho reduzido da amostra aqui avaliada e pela ausência de outros marcadores, podemos apenas sugerir que esse mecanismo, talvez esteja associado à agressividade e capacidade metastática do CAC.

Numa amostra de carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço a expressão de CXCR4 / CXCL12 permitiu classificar os pacientes de acordo com o risco de recidiva regional da doença. Pacientes com baixa expressão de CXCR4 tiveram baixo risco de recidiva regional. A recidiva regional em pacientes com alta expressão de CXCR4 dependeu da expressão de CXCL12. Pacientes com alta expressão de CXCR4 e CXCL12 tiveram baixo risco de recorrência regional,



enquanto aqueles com alta expressão de CXCR4 e baixa de CXCL12 tiveram maior risco de recorrência regional<sup>25</sup>.

Embora o CXCL12 seja o principal ligante específico do CXCR4, achados recentes documentaram que o fator inibitório de migração de macrófagos (FIM), uma quimiocina pró-inflamatória, também pode atuar como ligante para esse receptor<sup>26</sup>.

A quimiocina CXCL12 não apenas liga-se ao CXCR4, o CXCR7 é considerado um receptor que apresenta alta afinidade a esta quimiocina, no entanto este interage também com a quimiocina CXCL11 (I-TAC)<sup>27</sup>. Diferentemente de outros receptores, a ativação dos ligantes do CXCR7 não causa mobilização de  $Ca^{2+}$  ou migração celular. No entanto, a expressão de CXCR7 proporciona às células uma vantagem de crescimento, sobrevivência e propriedades de adesão aumentadas<sup>28</sup>.

Esforços têm sido focados em maneiras de identificar antagonistas de receptores de quimiocinas que possam auxiliar às modalidades terapêuticas atuais contra o câncer<sup>3</sup>. Tem sido mostrado que o bloqueio das quimiocina e/ou seu receptor compromete o crescimento do tumor, a invasão e metástase em alguns tipos de câncer *in vivo*<sup>29,30</sup>. Atualmente, o CXCR4 tem sido alvo de múltiplos antagonistas, tais como os bicyclams (AMD3100), e T22, TN14003, CTCE-9908, ALX40-4C, que são análogos e peptídeos projetados para a região amino-terminal da quimiocina, CXCL12<sup>29</sup>. O bloqueador AMD3100, comercialmente nomeado como Plerixafor tem sido aplicado em modelos *in vitro* de invasão perineural de CAC glandular salivar, verificando-se inibição da invasividade celular<sup>31</sup>.

Conclui-se que ocorre uma maior imunoexpressão do receptor CXCR4 em CAC glandular salivar na região intratumoral e na peritumoral, quando comparado com a expressão do CXCL12. Porém considerando os subtipos histológicos do CAC aqui avaliados, percebeu-se uma tendência a maior imunoexpressão da quimiocina na região intratumoral, sugerindo algum papel dessa quimiocina na regulação dos mecanismos que garante a proliferação e manutenção da viabilidade celular neoplásica ao interagir com o receptor CXCR4 que foi fortemente expresso em todas as regiões tumorais. Além disso, esse receptor também estaria, por sua vez, tornando as células neoplásicas aptas para invadir e/ou metastatizar.

Baseado nos resultados deste estudo sugere-se a necessidade de maiores pesquisas que venham a contribuir com conhecimentos sobre a biologia celular do

CAC associada aos papéis das proteínas CXCL12 e CXCR4 no intuito de contribuir na preconização de agentes terapêuticos efetivos no manejo dessa lesão.

## Referências

1. Dillon, PM, Chakraborty, S., Moskaluk, CA, et al. Adenoid cystic carcinoma: A review of recent advances, molecular targets, and clinical trials *Head Neck* 2016; 38: 620-627.
2. Li Jiao, Zhuqiang Jia, Jing Kong, et al. Carcinoma-associated fibroblasts lead the invasion of salivary gland adenoid cystic Carcinoma Cells by Creating an Invasive Track. *PLoS One* 2016; 11: e0150247.
3. Zushi Y, Noguchi K, Hashitani S, et al. Relations among expression of CXCR4, histological patterns, and metastatic potential in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *International journal of oncology* 2008; 33: 1133-1139.
4. Da Silva JM, et al. Significance of chemokine and chemokine receptors in head and neck squamous cell carcinoma: A critical review. *Oral oncology* 2016; 56:8-16.
5. Albert S, Riveiro ME, Halimi C, et al. Focus on the role of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2013; 35:1819-28.
6. El- Naggat AK, Chan JKC, Grandis JR, et al. WHO Classification of Head and Neck Tumours . 4 Ed. IARC: Lyon 2017.
7. ELLIS G.L; AUCLAIR, P.L. Tumors of the salivary glands. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.
8. Weert V, Waal IVD, Witte BI, et al. Histopathological grading of adenoid cystic carcinoma of the head and neck: analysis of currently used grading systems and proposal for a simplified grading scheme. *Oral Oncology* 2015; 51:71-76.
9. He S, Li P, Zhong Q, et al. Clinicopathologic and prognostic factors in adenoid cystic carcinoma of head and neck minor salivary glands: A clinical analysis of 130 cases. *Am J Otolaryngol* 2017 ; 38:157-162.
10. Uchida D, Kuribayashi N, Kinouchi M. et al. Expression and function of CXCR4 in human salivary gland cancers. *Clin Exp Metastasis* 2013, 30: 133–142.
11. Gao, M., Hao Y, Huang MX, et al. Clinicopathological study of distant metastases of salivary adenoid cystic carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2013; 42: 923–928.
12. Khan AJ, DiGiovanna MP, et al. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. *Int J Cancer* 2001; 96: 149-58.
13. Bianchi B, Copelli C, Cocchi R, et al. Adenoid cystic carcinoma of intraoral minor salivary glands. *Oral Oncol* 2008; 44: 1026-31.

14. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:540-550.
15. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; **12**, 313-3.
16. Balkwill F.R. The chemokine system and cancer. *J Pathol.* 2012; **226**:148–157.
17. Zhong W, Chen W, Zhang D, et al. CXCL12-CXCR4 axis plays pivotal roles in the organ-specific metastasis of pancreatic adenocarcinoma: A clinical study. *Exp Ther Med* 2012; **4**:363-369.
18. Clatot F, Picquenot JM, Choussy O, et al. Intratumoural level of SDF-1 correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; **47**:1062–1068.
19. Wendt MK, Johanesen PA, Kang-Decher N, et al. Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. *Oncogene* 2006; **25**: 4986-97.
20. Teicher, BA; Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 2010; 16:2927-2931.
21. De Colle , Mönnich D, Welz S, et al. SDF-1/CXCR4 expression in head and neck cancer and outcome after postoperative radiochemotherapy. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2017; **14**;5:28-36.
22. Muller A, Sonkoly E, Eulert C, et al. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. *Int. J Cancer* 2005; **11**: 2937-46.
23. Uchida, D., begum, N.M., Almofti, A., et al. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Experimental Cell Research* 2003; **290**:289–302.
24. Shen B, Zheng M, Lu J, et al. CXCL12-CXCR4 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Asian Pac J Cancer* 2013; **14**:5403-5408.
25. De-Colle C, Menegakis A, Mönnich D, et al. SDF-1/CXCR4 expression is an independent negative prognostic biomarker in patients with head and neck cancer after primary radiochemotherapy. *Radiother Oncology* 2018; **126**: 125-131.
26. Doring Y, Pawig L, Weber C, et al. H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease, *Frontiers in physiology* 2014;**5**: 212.
27. Sanchez-Martin L, Sanchez- Mateos P, Cabanas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends in Molecular Medicine* 2013; **19**:12–22.
28. Burns JM, Summers BC, Wang Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 2006; **203**:2201-2213.
29. Sun X, Cheng G, Hao M, et al. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer Metastasis Ver* 2010; **29**:709-72.
30. SCALA, S. Molecular pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 axis-untapped potential in the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research* 2015; **21**:4278–4285.
31. Jeong WJ, Choi IK, Park MW. CXCR4 antagonist inhibits perineural invasion of adenoid cystic carcinoma. *J Clin Pathol* 2014; **67**:992–998.



**Tabela 01.** Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação utilizados no estudo.

<b>Especificidade</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Recuperação</b>
CXCL-12	P- 159X	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Steamer Citr
CXCR-4	12 G5	Santa Cruz Biotechnology	1:750	Sem r ar

**Tabela 02.** Dados descritivos do índice de positividade (IP) da CXCL12 e do CXCR4 em região geral de imunexpressão dos marcadores em relação ao padrão histopatológico dos CACs.

ÍNDICE DE POSITIVIDADE	SÓLIDO		PADRÃO HISTOPATOLÓGICO	
	Mín – Máx	Mediana $\pm$ DP	Mín – Máx	Mediana $\pm$ DP
<b>CXCL12 / INTRATUMORAL</b>	7,35 - 22,4	22,19 $\pm$ 8,646	0,00 – 100	34,91 $\pm$ 33,67
<b>CXCL12 / PERITUMORAL</b>	0,00 - 36,4	26,12 $\pm$ 18,773	0,00 – 100	18,27 $\pm$ 42,52
<b>CXCL12 / GERAL</b>	3,5 – 30	23,90 $\pm$ 13,882	0,00 – 100	27,54 $\pm$ 36,99
<b>CXCR4 / INTRATUMORAL</b>	15,6 - 85,9	58,11 $\pm$ 35,373	7,41 - 96,2	65,79 $\pm$ 35,93
<b>CXCR4 / PERITUMORAL</b>	9,7 - 84,1	71,34 $\pm$ 39,807	9,00 – 100	81,45 $\pm$ 35,14
<b>CXCR 4 / GERAL</b>	12,8 – 85	63,31 $\pm$ 37,075	20 - 94,8	63,06 $\pm$ 31,57

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

**Tabela 03.** Correlação do IP de imunexpressão da CXCL12, do CXCR4 grau histopatológico das amostras avaliadas. Campina Grande / PB, 2018.

CORRELAÇÕES	GRAU HISTOPATOLÓGICO DE MALIGNIDADE		
	<i>R</i>	Baixo Grau	<i>P</i>
CXCL12 intratumoral x CXCL12 peritumoral	0,886		<b>0,019</b>
CXCL12 intratumoral x CXCL12 geral	0,886		<b>0,019</b>
CXCL12 peritumoral x CXCL12 geral	1		<b>&lt;0,001</b>
CXCR4 intraumoral x CXCR4 peritumoral	0,812		0,05
CXCR4 intratumoral x CXCR4 geral	0,986		<b>&lt;0,001</b>
CXCR4 peritumoral x CXCR4 geral	0,829		0,042

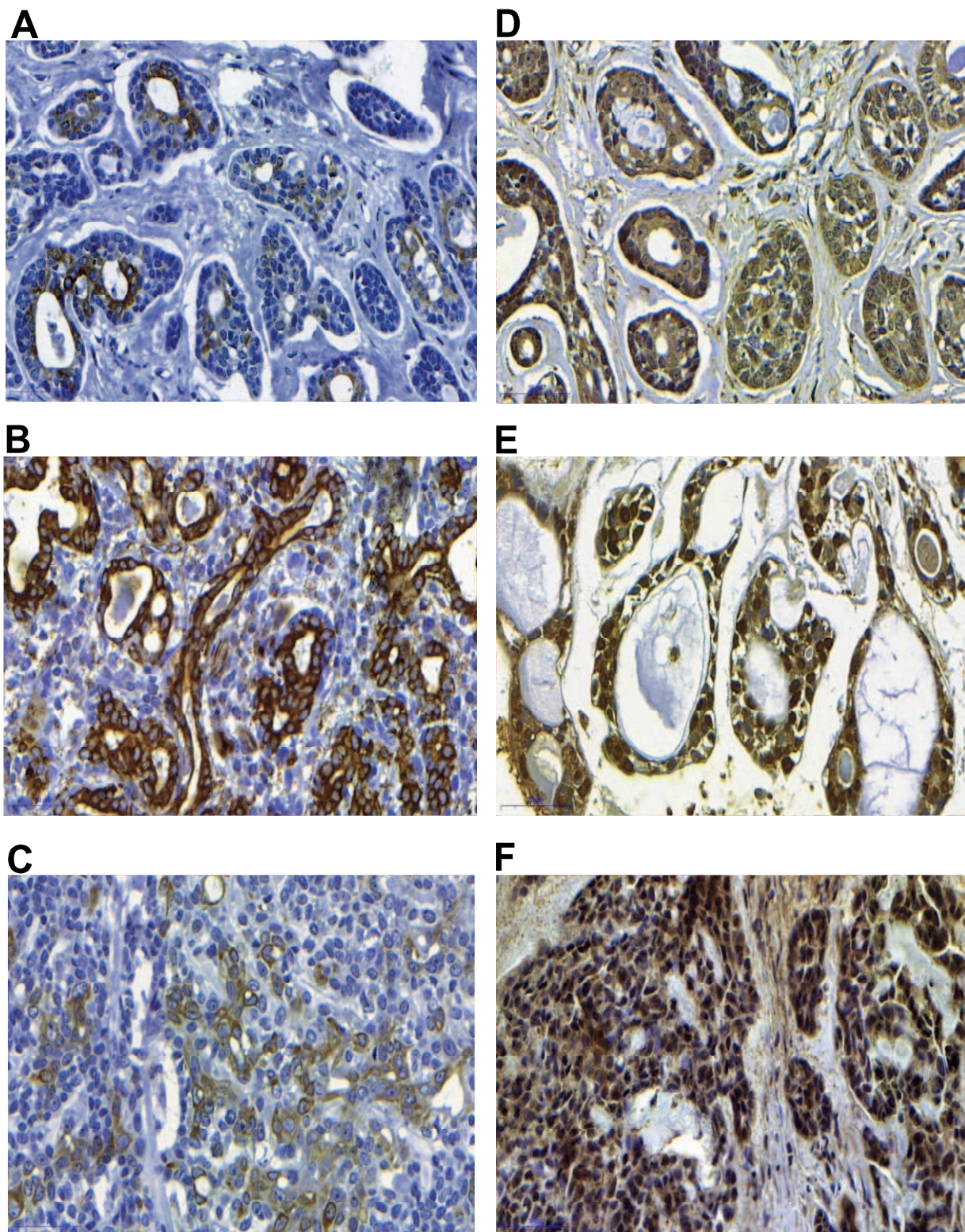
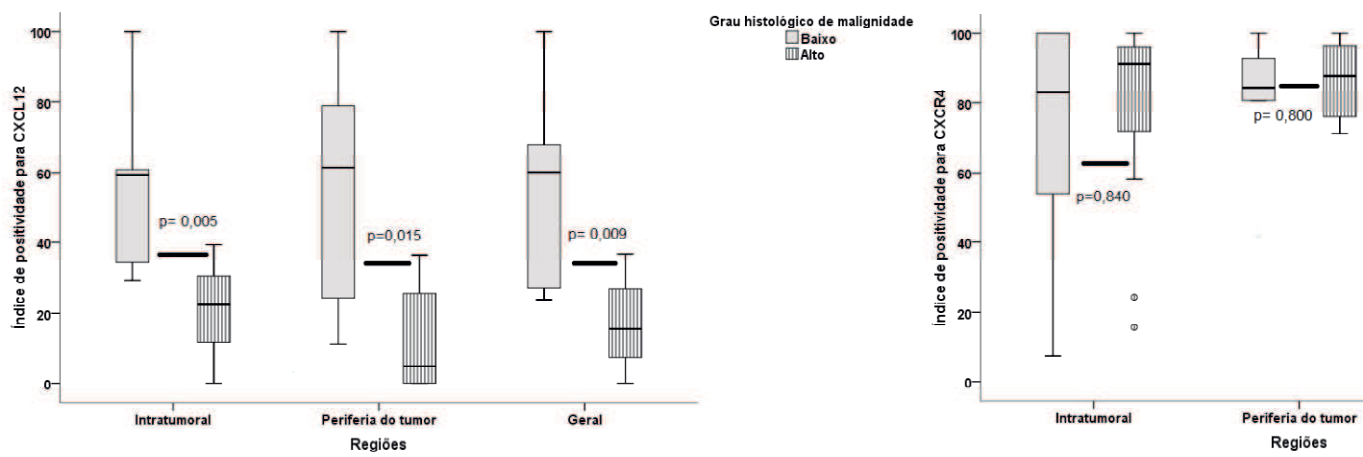


Figura 1. Fotomicrografias representativas da expressão imunohistoquímica dos marcadores utilizados. A) Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em CAC tubular. B) Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em CAC cribriforme. C) Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em CAC sólido. D) Imunoexpressão epitelial de CXCR4 em CAC tubular. E) Imunoexpressão celular epitelial de CXCR4 em CAC cribriforme. F) Imunoexpressão celular epitelial de CXCR4 em CAC sólido.



**Figura 2. A)** Boxplots relativos aos IP da quimiocina CXCL12 nas regiões intratumoral, peritumoral e geral de imunopositividade em relação ao grau de malignidade tumoral. **B)** Boxplots relativos IP do receptor CXCR4 nas regiões intratumoral e peritumoral de imunopositividade em relação ao grau de malignidade tumoral. Campina Grande / PB, 2023.





## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A amostra avaliada mostrou IP maior para o receptor CXCR4 do que para a quimiocina CXCL12 independente das regiões tumorais. Dentre os subtipos histopatológicos percebeu-se maior imunopositividade da CXCL12 em região intratumoral, principalmente no padrão cribiforme e maior imunopositividade na região peritumoral do padrão sólido, para o receptor a imunopositividade foi intensa e difusamente expresso em todas as regiões tumorais, principalmente no padrão tubular.

Considerando o grau histológico de malignidade, houve descritivamente maior imunopositividade do complexo CXCL12/CXCR4 em casos de baixo grau de malignidade, porém não houve correlação significativa entre as expressões de CXCL12 e CXCR4 nas regiões avaliadas com o grau histológico de malignidade, sugerindo que possivelmente as proteínas avaliadas não estariam em interação significativa na amostra avaliada.

Houve correlação significativa da expressão da CXCL12 intratumoral e imunopositividade geral dessa quimiocina em CAC de alto grau de malignidade. Para o CXCR4, houve correlação significativa dos IP intratumoral e peritumoral com o IP geral desse receptor em CAC de baixo grau de malignidade, sugerindo ações importantes dessas proteínas em eventos-chaves da patogênese dessa neoplasia glandular salivar.

Novos estudos, com amostra maior e/ou outras técnicas de avaliação, são necessários para o melhor entendimento da patogênese do CAC glandular salivar e preconização de novas modalidades terapêuticas.





## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. **Imunologia celular e molecular**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- ADAMS, A.; WARNER, K.; NOR, J.E. Salivary gland cancer stem cells. **Oral Oncology**, v. 49, n. 9, p. 845-853, 2013.
- ADELSTEIN, D.J. et al. Biology and Management of Salivary Gland Cancers. **Semin Radiat Oncology**, v.22, n.3, p.245-253, 2012.
- ALBERT, S. et al. Focus on the role of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v.35, n.12, p.1819-28, 2013.
- ALI, S. et al. Distant Metastases in Patients with Carcinoma of the Major Salivary Glands. **Ann Surg Oncol**, v.22, n.12, p.4014-4019, 2015.
- AL-KHATEEB, T.H.; ABABNEH, K.T. Salivary tumors in north Jordanians: a descriptive study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, n.5, p. 53-59, 2007.
- ALTMAN, K.W. et al. Pathologic quiz case 1. Adenoid cystic carcinoma of the parotid gland. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 123, n. 12, p. 1352-1355, 1997.
- ALVES, A. T. N. N. et al. Carcinoma adenoide cístico: revisão da literatura e relato de caso clínico. **J Bras Patol Med Lab**, v.40, n.6, p.421-424, 2004.
- ANSARI, M.H. Salivary gland tumors in an Iranian population: a retrospective study of 130 cases. **J Oral Maxillofac Surgery**, v.65, n.11, p.2187-2194, 2007.
- BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nature Rev Cancer**, v.4, n.7, p. 540-550, 2004.
- BALKWILL, F.R. The chemokine system and cancer. **J Pathology**. V. 226, n.2, p.148–157. 2012.
- BARRETT, A.W.; E SPEIGHT, P.M. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a valid prognostic indicator. **Oral oncology**, v.45, n.11, p.936-940, 2009.
- BELL, D et al. Expression and significance of notch signaling pathway salivary adenoid cystic carcinoma. **Ann Diagn Pathology**, v.18, n.1, p.10-13, 2014
- BIANCHI, B., et al. Adenoid cystic carcinoma of intraoral minor salivary glands. **Oral Oncology**, v.44, n.11, p.1026-31, 2008.
- BJORNDAL, K. et al. Salivary gland carcinoma in Denmark 1990–2005: a national study of incidence, site and histology. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). **Oral Oncology**, v.47, n.7, p.677-682, 2011.
- BUCHNER, A; MERRELL, P.W.; CARPENTER, W.M. Relative frequency of intra-oral minor salivary gland tumors: a study of 380 cases from northern California and comparison to reports from other parts of the world. **J Oral Pathology Medicine**, v.36, n.4, p. 207-314, 2007.
- BURNS, J.M., et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. **J Exp Medicine**, v. 203, n.9, p.2201-2213, 2006.
- CLATOT, F., et al. Intratumoural level of SDF-1 correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.47, n.11, p.1062–1068, 2011.

CLATOT, F. et al.

The gene expression profile of inflammatory, hypoxic and metabolic genes predicts the metastatic spread of human head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.50, n.3, p.200-207, 2014.

CHUMMUN, S. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Br J Plast Surg**, v.54, n.6, p.476-480, 2001.

COHEN, A. N. et al. Adenoid cystic carcinoma of the submandibular gland: a 35-year review. **Otolaryngol head neck surg**, v.131, n.6, p.994-1000, 2004.

COSTA, H.O.O.; VIANNA, M.R. **Tumores das glândulas salivares**. In: Campos AHC, Costa HOO. Tratado de Otorrinolaringologia. 1ª ed. Rocca, pp. 155-76, 2002.

DA SILVA, J.M., et al. Significance of chemokine and chemokine receptors in head and neck squamous cell carcinoma: A critical review. **Oral oncology**, v. 56, p.8-16, 2016.

DEANGELIS, A.F. et al. Outcomes of patients with adenoid cystic carcinoma of the minor salivary glands. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.40, n.7, p.710-714, 2011.

DE-COLLE, et al. SDF-1/CXCR4 expression is an independent negative prognostic biomarker in patients with head and neck cancer after primary radiochemotherapy. **Radiother Oncology**, v.126, n.1, p.125-131, 2018.

DEVRIES, M.E., et al. Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. **Journal of immunology**, v.176, n.1, p. 401-415, 2006.

DILLON, P.M., et al. Adenoid cystic carcinoma: A review of recent advances, molecular targets, and clinical trials. **Head Neck**, v.38, n.4, p.620-627, 2016.

DOMANSKA U.M. et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. **European Journal of Cancer**, v.49, p.219-230, 2013.

DONZELLA, G.A, et al. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. **Nature medicine**, v.4, n.1, p.72-77, 1998.

DORING, Y., et al. H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease, **Frontiers in physiology**, v.5, n.11, p.212, 2014.

ELLIS, M. et al. Tumors of the salivary glands in childhood and adolescence. **J Oral Maxillofac Surg**, v.64, n.7, p.1049-1058, 2006.

ELLIS, G.L.; AUCLAIR, P.L.; GNEPP, D.R. **Surgical Pathology of the salivary glands. Major Problems in Pathology Series**. Volume 25. Philadelphia: WB Saunders Company; 1991.

ELLIS G.L; AUCLAIR, P.L. **Tumors of the salivary glands**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.

EI-NAGGAR AK, et al. WHO Classification of Head and Neck Tumours . 4 Ed. IARC: Lyon 2017.

FAVA, A. S. Diagnóstico, estadiamento e tratamento cirúrgico dos tumores malignos das glândulas salivares. **Tratado de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia**. São Paulo: Atheneu, p.791-812, 2001.

FRIERSON Jr, H.F. et al. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. **Am J Pathol**, v.161, n.4, p.1315-1323, 2002.

- GAO, M. et al. Clinicopathological study of distant metastases of salivar adenoid cystic carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** , v.42, p. 923–928,2013.
- GUZZO, M., et al. Major and minor salivary gland tumors. **Crit Rev in Oncol Hematol**, v.74, n.2, p.134-148, 2010.
- HE, S., et al.  
Clinicopathologic and prognostic factors in adenoid cystic carcinoma of head and neck minorsalivary glands: A clinical analysis of 130 cases. **Am J Otolaryngol**, v.38, n.2, p.157-162, 2017.
- HEMBRUFF, S.L.; CHENG, N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. **Cancer therapy**, v. 14, n.7a, p. 254-267, 2009.
- ITO, F. A. et al. Salivary gland tumors in a brazilian population: a retrospective study of 496 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.34, n.5, p.533-36, 2005.
- JEONG, W.J., CHOI, I.K., PARK, M.W. CXCR4 antagonist inhibits perineural invasion of adenoid cystic carcinoma. **J Clin Pathol**, v.67, p.992–998, 2014.
- JIAO, L.I., et al. Carcinoma-Associated Fibroblasts Lead the Invasion of Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma Cells by Creating an Invasive Track. **PLoS One**, v.11, n.8, 2016.
- JONES, A.V. et al. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. **Oral Oncol**, v.44, n.2, p. 407-417, 2008.
- KAKINUMA T, HWANG ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. **J. Leukoc. Biol.**, 79:639-651, 2006.
- KHAN, A.J., et al. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. **Int J Cancer**, v. 96, n.4, p:149-58, 2001.
- KIM S.Y., et al. Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murinepulmonary metastases. **Clin Exp Metastasis**, v.25, n.3, p.201-211, 2008.
- KO, Y. H. et al. Prognostic factors affecting the clinical outcome of adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Jpn J Clin Oncol**, v.37, n.11, p.805-11, 2007.
- KOKEMUELLER, H. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--a 20 years experience. **Int J Oral Maxillof Surg**, v.33, n.1, p.25-31, 2004.
- KUFAVERA, I.; SALANGA, C.L.; HANDEL, T. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. **Immunol and Cell Biol**, v. 93, n. 4, p. 372-383, 2015.
- LAPTEVA N., et al. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. **Cancer Gene Ther.**, v.12, p.84- 89, 2005.
- LIMA, S. et al. Perfil epidemiológico das neoplasias de glândulas salivares: análise de 245 casos. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.71, n.3, p.335-340, 2005.
- LIU, J. et al. Association of chemokine and chemokine receptor expression with the invasion and metastasis of lung carcinoma.**Oncol Lett**, v.10, n.3, p. 1315-1322, 2015.
- LOPES M.A, et al. A clinicopathologic study of 196 intraoral salivary gland tumors. **J Oral Pathol Med**, v.28, n.264-267, 1999.

MASANJA, M.I.; KALYANYAMA, B.M.; SIMON, E.N. Salivary gland tumours in Tanzania. **Easr Afr Med**, n.80, v.8, p.429-434, 2003.

MEYERS, M. et al. Head and neck adenoid cystic carcinoma: A prospective multicenter REFCOR study of 95 cases. **Our Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis**, v.133, n.1, p.13-17, 2016.

NASSER, M.W. et al. Crosstalk between Chemokine Receptor CXCR4 and Cannabinoid Receptor CB2 in Modulating Breast Cancer Growth and Invasion. **PLoS One**, v. 6, n.9, p. e23901. 2011.

NEMETZ, M. A. et al. Estudo clínico e epidemiológico dos tumores da glândula parótida num serviço de referência em cirurgia de cabeça e pescoço e otorrinolaringologia. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço**, v.35, n.2, p.66-9, 2006.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 972p.

OLIVEIRA, F.A. et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a brazilian population. **Head Neck Pathol**, v. 3, n.4, p. 271-275, 2009. .

PHATTARATARATIP, E.; DHANUTHAI, K. Expression of C-X-C motif chemokine receptors 4 and 7 in salivary gland neoplasms. **Arch Oral Biol.**, v.83, p.136-144, 2017.

PERZIN, K.H, GULLANE P., CLAIRMONT, A.C. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands. **Cancer.**, v.42, n.1, p.265-282. 1978.

PORVASNIK S, et al. Effects of CXCR4 antagonist CTCE-9908 on prostate tumor growth. **Prostate**, v. 69, p. 1460-1469, 2009.

ROSTENE, W.; BUCKINGHAM, J.C. Chemokines as modulators of neuroendocrine functions. **J Mol Endocrinol**, v. 38, n. 3, p. 351-353, 2007.

SALVATORE P., et al. CXCR4-CXCL12-Dependent Inflammatory Network and Endothelial Progenitors. **Curr Med Chem**. 2010 Jul 14.

SAIKUMAR, P. et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease., **Am J of Med**, v.107, p.489-506, 1999.

SANCHEZ-MARTIN, L.; SANCHEZ-MATEOS, P.; CABANAS, C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v.19, n.1, p.12–22. 2013.

SCALA, S. Molecular pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 axis-untapped potential in the tumor microenvironment. **Clinical Cancer Research**, v.21, n.19, p.4278–4285, 2015.

SEETHALA, R. R. An update on grading of salivary gland carcinomas. **Head Neck Pathol**, v.3, n.1, p.69–77, 2009.

SEETHALA, R. R. et al. Progressive genetic alterations of adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.135, n.1, p.123–130, 2011.

SINGH S.; SADANANDAM, A.; SINGH, R.K. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. **Cancer Metastasis. Rev.**, v.26, n.3, p.453-467, 2007.

SPEIGHT ,P.M.; BARRETT, A.W. Salivary gland tumours. **Oral Dis**, n.8, v.5, p.229-240, 2002.

SPIRO, R.H; HUVOS, A.G.; STRONG, E.W. Adenoid cystic carcinoma of salivary origin. A clinicopathologic study of 242 cases. **Am J Surg**, v.128, n.4, p.512-520, 1974.

SUN, X. et al. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. **Cancer Metastasis Ver**, v.29, n.4, p.709–722, 2010.

SZANTO P.A, etal. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Cancer**, v.54, n.6, p.1062-1069, 1984.

- TEICHER, B.A.; FRICKER, S.P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clin Cancer Res**, v.16, n.11, p.2927-2931, 2010.
- TERHAARD, C.H. et al. Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group. **Head Neck**. v.26, n.8, p.681-692, 2004.
- TEYMOORTASH, A. et al. Evidence of lymphangiogenesis in Warthin's tumor of the parotid gland. **Oral Oncol.**, v.43, n.6, p.614-618, 2007.
- TINOCO, P. et al. Carcinoma Mucoepidermoide de Glândulas Salivares Menores. **Arq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol.**, São Paulo - Brasil, v.15, n.1, p. 99-101, 2011.
- UCHIDA, D., et al. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. **Experimental Cell Research**, v.290, p. 289–302, 2003.
- UCHIDA, D. et al. Expression and function of CXCR4 in human salivary gland cancers. *Clin Exp Metastasis*, V.30, N.2, P. 133-142, 2013.
- WEERT V et al. Histopathological grading of adenoid cystic carcinoma of the head and neck: analysis of currently used grading systems and proposal for a simplified grading scheme. **Oral Oncology**, v.51, n.1, p.71-76. 2015.
- WAHLBERG, P. et al. Carcinoma of the parotid and submandibular glands--a study of survival in 2465 patients. **Oral Oncol**, v.38, n.7, p.706-713. 2002.
- WALD O, SHAPIRA OM, IZHAR U. CXCR4/CXCL12 axis in non small cell lung cancer (NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential. **Theranostics**, v.3, n.1, p.26-33, 2013.
- WANG J. et al. The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.25, n.4, p.573-587, 2006.
- WATABE, Y.; MORI, T, S.; YOSHIMOTO, S. Número de cópias aumento de ACTN4 é um indicador de prognóstico no carcinoma da glândula salivar. **Cancer Medicine.**, v.3, n.3, p.613-622., 2014.
- ZHONG, W., et al. CXCL12-CXCR4 axis plays pivotal roles in the organ-specific metastasis of pancreatic adenocarcinoma: A clinical study. **Exp Ther Med**, v.4, n.3, p.363-369, 2012.
- ZHOU, Y., et al. CXCR4 Is a Major Chemokine Receptor on Glioma Cells and Mediates Their Survival. **J Biol Chem**, v.277, n.51 , p.49481-49487, 2002.
- ZLOTNIK, A. Chemokines in neoplastic progression. **Semin Cancer Biol**, v.14, n.3, p:181–185, 2004.
- ZUSHI Y, et al. Relations among expression of CXCR4, histological patterns, and metastatic potential in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **International journal of oncology**, v.33, p. 1133-1139, 2008.






**ANEXO A**

Parecer do comitê de ética

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

 Plataforma  
Brasil

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12, CXCR4, MMP9, BCL-2, KI-67, MUC1 E VEGF. SUA RELEVÂNCIA NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

**Pesquisador:** MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ

**Área Temática:**

**Versão:** 1


**CAAE:** 53329316.4.0000.5187

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.435.401



## ANEXO B

Normas para submissão de trabalhos no periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine*.

### Author Guidelines

**Content of Author Guidelines:** 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

**Useful Websites:** Submission Site, Articles published in Journal of Oral Pathology & Medicine, Author Services, Wiley Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures.

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

### 1. GENERAL

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information



concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Journal of Oral Pathology & Medicine. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Publishing Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

### **Note to NIH Grantees**

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

## **2. ETHICAL GUIDELINES**

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

### **2.1. Authorship and Acknowledgements**

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written

permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

## **2.2. Ethical Approvals**

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 [www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

Images of, or Information about, Identifiable Individuals: It is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files, interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have the rights we require please provide a signed consent form in all instances. Consent Form Template.

- If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians.
- If the person is dead, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the photo against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased.

- If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published.

### **2.3 Clinical Trials**

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consortstatement.org](http://www.consortstatement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

### **2.4 Conflict of Interest**

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading 'Conflict of Interest Statement'.

### **2.5 Appeal of Decision**

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

### **2.6 Permissions**

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

### **2.7 Copyright Assignment**



complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## **2.8 OnlineOpen**

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

## **3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE**

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further instructions, please contact Editorial Assistant Gill Smith at [JOPM.office@editorialoffice.co.uk](mailto:JOPM.office@editorialoffice.co.uk)

### **3.1. Getting Started**

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>.
- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as new user.
  - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
  - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre'.

### **3.2. Submitting Your Manuscript**

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
  - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
  - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
  - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

### **3.3. Manuscript Files Accepted**

Manuscripts should be uploaded as Word (.) or Rich Text Format (.rft) files (not writeprotected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for

printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

### **3.4. Blinded Review**

All manuscripts submitted to Journal of Oral Pathology & Medicine will be reviewed by two experts in the field. Journal of Oral Pathology & Medicine uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

### **3.5. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process**

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

### **3.6. E-mail Confirmation of Submission**

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

### **3.7. Manuscript Status**

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by email once a decision has been made.

### **3.8. Submission of Revised Manuscripts**

To submit a revised manuscripts please locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

#### **4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED**

**Original Research Articles:** of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

3.000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 30 references

**Review Papers:** Journal of Oral Pathology & Medicine commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> and are subject to peer-review.

3.000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 50 references

**Case Reports:** Please note that Journal of Oral Pathology & Medicine no longer accepts submissions of case reports.

**Brief Reports:** Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. 1.000 words maximum.

**Letters to the Editor:** Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in Journal of Oral Pathology & Medicine or they may raise new issues, but should have important implications.

750 words maximum. One figure or table, 5 references.

#### **5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE**

##### **5.1. Page Charge**



Articles exceeding 6 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters.

## 5.2. Format

**Language:** The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

**Abbreviations, Symbols and Nomenclature:** Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors. 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

**Font:** When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

## 5.3. Structure

All papers submitted to Journal of Oral Pathology & Medicine should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

**Title Page:** Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces,

2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

**Abstract:** is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

**Main Text of Original Articles:** should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

**Introduction:** should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

**Materials and Methods:** must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

**(i) Clinical trials:** Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

**(ii) Experimental subjects:** Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002

[www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

**(iii) Suppliers:** Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

**Results:** Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.

**Discussion:** Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

**Main Text of Review Articles** comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. See also above under Ethical Guidelines.

**Conflict of Interest Statement:** All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

#### **5.4. References**

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Reference numbers are cited in superscript. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based AMA style. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style, used in AMA 10th edition and follow below points:

- If there are more than 6 author names in a reference then first three author names are retained with 'et al.' and et al. is in roman.
- Article title in roman and sentence case.
- Journal title in italics and abbreviated with period at the end of the title only and not for all abbreviated terms.
- Semicolon used between year of publication and volume number.

- Colon used between volume number and page range.
- Full page range is used.
- End period at the end of a reference
- Place of publication is given first and then publisher name is given.
- Colon used between publisher location and publisher name.
- Year of publication is given after publisher name with semicolon separator.
- Chapter title given in roman and sentence case
- Book title given in italics and title case
- Query is raised for page range if it is not given
- Accessed date is must for websites

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: [www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp)

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow

Journal article: 1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book: 2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style - AMA Manual of Style

## **5.5. Tables, Figures and Figure Legends**

**Tables:** should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page. Tables with greater than 6 columns will be counted as multiple tables.

**Figures:** All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half tones should exhibit high contrast. Multi-paneled figures will be counted as multiple figures. Figures can contain multiple images as long as these are grouped together on one page per figure with one legend for each figure.

Due to space constraints within the Journal, no more than 6 figures and/or tables will be allowed

All figures and artwork must be provided in electronic format. Figure legends should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

Submit your figures as EPS, TIFF or PDF files. Use 300 dpi resolution for photographic images and 600 dpi resolution for line art. Full details of the submission of artwork are available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

## **6. AFTER ACCEPTANCE**

### **6.1 Proofs**

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file.

### **6.2 Supporting Information**

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process.

Although a proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

### **6.3 Early View**

Journal of Oral Pathology & Medicine is covered by Wiley Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

### **6.4 Offprints**

The corresponding author will receive a free PDF offprint that can be downloaded via Author Services. Please sign up for the service if you would like to access your free article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more information.

### **6.5 Author Services**

Online production tracking through Wiley Blackwell's Author Services Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.









