



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

WLIANA PONTES DE LIMA

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 EM CERATOCISTOS
ODONTOGÊNICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À
SÍNDROME DE GORLIN-GOLTZ**

**CAMPINA GRANDE/ PB
2020**

WLIANA PONTES DE LIMA

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 EM CERATOCISTOS
ODONTOGÊNICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À
SÍNDROME DE GORLIN-GOLTZ**

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

2020

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

L732i Lima, Wliana Pontes de.
Imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em ceratocistos odontogênicos isolados e associados à síndrome de Gorlin-Goltz [manuscrito] / Wliana Pontes de Lima. - 2020.
101 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.
"Orientação : Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez, Departamento de Odontologia - CCBS."
1. Cistos odontogênicos. 2. CXCL12. 3. CXCR4. 4. Síndrome do Nevo Basocelular. I. Título
21. ed. CDD 617.6

WLIANA PONTES DE LIMA

**IMUNOEXPRESSIONÃO DE CXCL12 E CXCR4 EM CERATOCISTOS
ODONTOGÊNICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À
SÍNDROME DE GORLIN-GOLTZ**

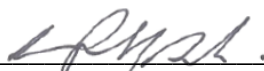
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em 09/07/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Emanuel Sávio de Souza Andrade
Universidade de Pernambuco (UPE)
Membro titular (1º Examinador)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)
Membro titular (2º Examinador)



Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez/ UEPB
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)
Membro titular (Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao pai celestial, ao meu Deus,

Por me acalmar, fortalecer e guiar nos momentos de desesperança.

Aos meus amados pais, Teresa Elma Pontes de Lima e José Erivaldo de Lima (*in memoriam*),

Pelas palavras de incentivo e todo amparo necessário ao longo dessa caminhada, e ao meu pai, que mesmo em outra dimensão sei que olhou por mim e desejou o meu sucesso.

As minhas queridas irmãs, Erielma, Maria José e Heriana,

Por cumprirem os seus papéis de irmãs e cúmplices em todo momento, me incentivando, apoiando e fortalecendo, cada qual a sua maneira.

“Entregue seu caminho ao Senhor, confie nele e ele agirá.”

(Salmos 37:5)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, professor **Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez**, por me auxiliar em todo momento, fazendo muito além do seu papel de orientador. Muito obrigada, pela paciência ao me orientar, corrigir, guiar meus passos no caminho certo e por me acalmar muitas vezes em que a ansiedade tomou conta de mim, quando as situações não se desenhavam como planejava. Em nenhum momento fui repreendida ou pressionada, fez sempre o oposto, depositou em mim positividade e soluções para as intempéries que surgiram. Enfatizo aqui minha admiração, não apenas pelo professor/pesquisador, mas, singularmente pelo ser humano excepcional, dotado de qualidades. Sempre fui tratada com afago, amavelmente chamada de “filhota” e o respeito se fez presente ao longo desses dois anos de orientação. Em todo o tempo me tranquilizou e passou sua energia positiva a mim, me transmitindo paz e serenidade. És um ser iluminado, conduzido por Deus. Minha convivência mais aproximada com o Senhor, só reforçou que a “humildade” é uma das qualidades humanas mais notáveis. Expresso minha gratidão a Deus, por ter lhe colocado no meu caminho como orientador, melhor pessoa ele não poderia ter destinado para essa finalidade. Obrigada por ter deixado em mim um pedaço do seu “eu”, da sua sabedoria! Tens a minha infinita gratidão por todos os ensinamentos repassados! Deus o guie sempre e o proteja! És magnânimo!

Ao professor **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, que admiro e respeito pela sua extrema dedicação à profissão que escolheu seguir. Meus sinceros agradecimentos, pela atenção, disponibilidade e todo auxílio necessário na ausência do meu orientador. Sua contribuição foi indispensável para que o meu objetivo fosse alcançado e para o desenvolvimento desse trabalho. És um exemplo de profissional, dedicado, competente e organizado. Desejo-lhe um caminho repleto de saúde e sabedoria. Deixo explicitada minha gratidão, admiração e respeito!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Expresso primordialmente minha gratidão a *Deus*, sem ti Senhor nada sou! Grata pela força, coragem, discernimento e sabedoria concedida para que pudesse cumprir essa missão. Nem uma folha cai ao chão sem o seu consentimento! Obrigada pela permissão de concretizar esse sonho, por fazer de minha vontade a sua! “O Senhor é minha força e o meu escudo; nele o meu coração confia e dele recebo ajuda...” Salmos (28:7).

Aos meus amados pais, *Teresa Elma Pontes de Lima e José Erivaldo de Lima* (*in memoriam*), por exercerem com exímio as suas missões concedidas por Deus em minha vida. São tantos os adjetivos e é tamanho o agradecimento, que nenhuma palavra sozinha seria capaz de definir minha gratidão. “Sou uma gota d’água, sou um grão de areia...” (Legião Urbana). Sem a presença de vocês em minha vida, sou apenas um grão de areia. E mesmo em outra dimensão, em todo momento senti a sua proteção e energia me fortalecendo meu pai. Sei que mesmo distante fisicamente, ficou imensamente feliz com a minha conquista.

As minhas irmãs, **Erielma Pontes de Lima, Maria José Pontes de Lima e Heriana Pontes de Lima**, pelo zelo, cuidado e cumplicidade de irmãs.

Aos meus queridos amigos, **Allany de Oliveira Andrade, Ana Karina Almeida Rolim, Carlus Alberto Oliveira dos Santos, Diego Filipe Bezerra Silva, Lígia Natália Sobreira Duarte Bezerra, Tiago Ribeiro Leal e Walter Gleybson Antas de Moraes**, por tornarem essa trajetória mais leve e harmoniosa, cada um com sua particularidade, porém, todos muito especiais para mim. Meu reconhecimento especial a **Allany**, pela contribuição no desenvolvimento da minha pesquisa. Serei eternamente grata!

A todos os membros integrantes do corpo docente do PPGO/UEPB: Prof. **Dr. Alessandro Cavalcanti**, Profa. Dra. **Andreza Cristina Massoni**, Profa. **Dra. Ana Flávia Granville-Garcia**, Prof. **Dr. Cassiano Nonaka**, Profa. **Dra. Daliana Queiroga**, Profa. **Dra. Daniela Pita**, Profa. **Dra. Edja Maria Costa**, Profa. **Dra. Jozinete Vieira**, Prof. **Dr. Kenio Lima**, Prof. **Dr. Manuel Gordón**, Profa. **Dra. Maria Helena Catão**, Profa. **Dra. Patrícia Bento**, Profa. **Dra. Pollianna Muniz**, Profa. **Dra. Renata Rocha**, Prof. **Dr. Sérgio d’Ávila**, por contribuírem com a minha formação como mestre, pelas vivências, conhecimento e bons momentos compartilhados.

Aos membros integrantes da banca dessa dissertação, os professores titulares e suplentes: Prof. **Dr. Emanuel Sávio de Souza Andrade**; Prof. **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**; Prof. **Dr. Márcio Campos de Oliveira**; Profa. **Dra. Pollianna Muniz Alves**, que direcionaram seus olhares a esse trabalho, dedicaram seu tempo e antecipadamente agradeço pelas futuras contribuições que serão direcionadas ao aperfeiçoamento do mesmo.

As técnicas do laboratório **Ana Luzia Batista** e **Denize Núbia**, pelo auxílio, palavras de apoio e momentos de alegria vivenciados. Ana Luzia com sua espiritualidade e positividade, tornou minha passagem pelo laboratório mais suave. Já Denize Núbia, com seu jeito singular, trouxe mais diversão e boas risadas.

A minha querida TSB, **Simone Bernardino**, por me ouvir durante nossas jornadas de trabalho, quando me sentia sobrecarregada e sem forças para seguir.

Aos meus queridos amigos, **Kaíza Santos**, **Maria do Socorro Costa**, **Rejane Araújo**, **Robeci Alves Mâcedo** e **Ydallyna Macário**, pelo apoio, por acreditarem no meu potencial e me ouvirem sempre que necessário. Vocês são incríveis!

As companheiras de laboratório, **Luana Balduino**, **Emanuene Galdino** e **Fabiana Medeiros**, por me instruírem sobre as técnicas que deveria executar e tornarem o ambiente mais agradável e harmônico.

A equipe técnica administrativa do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB, em especial a **Ahyanna Nóbrega**, pelo exemplo de competência e disponibilidade. E também a **Dione**, pelas gentilezas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro necessário para que essa pesquisa fosse executada.

Gratidão a todos que me apoiaram e colaboraram com a conclusão desse ciclo!

“A gratidão é o único tesouro dos humildes.”

(William Shakespeare)

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

(Martin Luther King)

RESUMO

O ceratocisto odontogênico (CO) apresenta potencial infiltrativo, elevada recorrência e mutações no gene supressor de tumor *PTCH1*, além da capacidade de associação à síndrome de Gorlin-Goltz, sendo os COs síndrômicos potencialmente mais agressivos. Tais características tem influenciado a busca de informações sobre a etiopatogênese desta lesão, por meio de marcadores proteicos e moleculares que visem melhorar o entendimento do seu comportamento biológico, porém ainda há muito a ser esclarecido. A quimiocina CXCL12 (SDF-1) e seu receptor principal CXCR4 regulam eventos importantes na patogênese de diversas lesões, desde neoplasias a cistos inflamatórios. Objetivou-se analisar a imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em COs isolados e síndrômicos. A amostra foi constituída por 21 casos de COs isolados e 21 síndrômicos, submetida à análise morfológica e imunoistoquímica das proteínas em células de 10 campos do componente epitelial e 10 campos da cápsula fibrosa subjacente. Observou-se imunoexpressão de CXCL12 em células epiteliais de 20 COs isolados e 19 síndrômicos, com diferença estatisticamente significativa do IP entre as lesões ($p < 0,001$), com maior expressão em COs isolados. Foi verificada expressão de CXCL12 em fibroblastos e células endoteliais de todos os COs isolados e em 20 síndrômicos, com diferença estatisticamente significativa do IP entre os grupos ($p < 0,001$) e maior expressão em COs isolados. CXCR4 foi expresso em citoplasma e núcleo de células suprabasais epiteliais de todos os COs, com diferença estatisticamente significativa do IP nuclear entre COs isolados e síndrômicos ($p=0,007$). A expressão citoplasmática de CXCR4 foi observada em fibroblastos e principalmente em células endoteliais de 90,5% dos COs síndrômicos e em todos os COs isolados. Observou-se positividade nuclear de CXCR4 em fibroblastos e células endoteliais de 20 COs isolados e em todos os COs síndrômicos. De acordo com o teste estatístico de Spearman, houve correlação estatisticamente significativa apenas para os COs síndrômicos em epitélio, entre o IP da expressão citoplasmática e nuclear de CXCR4 ($r= 0,730$; $p < 0,001$). Na expressão de CXCL12 e CXCR4 em cápsula fibrosa, notou-se correlação estatisticamente significativa entre o IP nuclear e citoplasmático de CXCR4 nos COs isolados ($r = 0,698$; $p > 0,001$) e síndrômicos ($r = 0,826$; $p > 0,001$). Os resultados sugerem que no componente epitelial cístico, a quimiocina CXCL12 e seu receptor principal CXCR4 parecem exercer um papel pouco significativo em relação à patogênese e comportamento biológico dos COs. Na cápsula fibrosa, é provável que as proteínas avaliadas possam estar implicadas em algum mecanismo associado à patogenia e diferenças no comportamento biológico entre os diferentes tipos de COs, principalmente nos eventos angiogênicos lesionais.

Palavras-chave: Cistos Odontogênicos. CXCL12. CXCR4. Síndrome do Nevo Basocelular.

ABSTRACT

ABSTRACT

Odontogenic keratocyst (OKC) has infiltrative potential, high recurrence and mutations in the *PTCH1* tumor suppressor gene, besides the capacity of association to the Gorlin-Goltz syndrome, where the syndromic OKCs are potentially more aggressive. These characteristics have influenced the search for information on the etiopathogenesis of this injury, through protein and molecular markers that aim to improve the understanding of its biological behavior, but there is still much to be clarified. CXCL12 chemokine (SDF-1) and its CXCR4 primary receptor regulate important events in the pathogenesis of various injuries. This paper was intended to analyze the CXCL12 and CXCR4 immunoeexpression in isolated and syndromic OKCs. The sample was composed of 21 cases of isolated OKCs and 21 syndromic OKCs, submitted to morphological and immunohistochemical analysis of the proteins in cells of 10 fields of the epithelial component and 10 fields of the underlying fibrous capsule. We observed CXCL12 immunoeexpression in epithelial cells of 20 isolated OKCs and 19 syndromic OKCs, with a statistically significant difference in the positivity index (PI) among injuries ($p < 0.001$), with greater expression in isolated OKCs. We found CXCL12 expression in fibroblasts and endothelial cells of all isolated OKCs and in 20 syndromic OKCs, with a statistically significant difference in PI between groups ($p < 0.001$) and greater expression in isolated OKCs. CXCR4 was expressed in cytoplasm and nucleus of suprabasal epithelial cells of all OKCs, with a statistically significant difference in nuclear PI between isolated and syndromic OKCs ($p = 0.007$). We observed the CXCR4 cytoplasmic expression in fibroblasts and, mainly, in endothelial cells of 90.5% of the syndromic OKCs and in all isolated OKCs. We observed CXCR4 nuclear positivity in fibroblasts and endothelial cells of 20 isolated OKCs and in all syndromic OKCs. According to Spearman's statistical test, there was a statistically significant correlation only for the epithelial syndromic OKCs between the PI of the CXCR4 cytoplasmic and nuclear expressions ($r = 0.730$; $p < 0.001$). In the CXCL12 and CXCR4 expression in cystic capsule, we noted a statistically significant correlation between nuclear and cytoplasmic PI of CXCR4 in isolated ($r = 0.698$; $p > 0.001$) and syndromic ($r = 0.826$; $p > 0.001$) OKCs. The results suggest that, in the cystic epithelial component, CXCL12 chemokine and its CXCR4 main receptor seem to play a minor role in relation to the pathogenesis and the biological behavior of OKCs. In the fibrous capsule, it is likely that the evaluated proteins may be implicated in some mechanism associated with pathogenesis and differences in the biological behavior among different types of OKCs, especially in the angiogenic events responsible for injuries.

Keywords: Odontogenic Cysts. CXCL12. CXCR4. Basal Cell Nevus Syndrome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACKRs:** Do inglês, *Atypical chemokine receptors*, traduzido como receptores de quimiocinas atípicos.
- Akt:** Do inglês, *Protein kinase B*, traduzido como proteína quinase B.
- Arg:** Corresponde ao aminoácido asparagina.
- BCL-2:** Do inglês, *B-cell lymphoma 2*, refere-se à proteína BCL-2.
- BSA:** Do inglês, *Bovine serum albumin*, traduzido como albumina do soro bovino.
- CBC:** Carcinoma basocelular.
- CCL2/MCP1:** Quimiocina CCL ligante 2/Do inglês, *(MCP-1) Monocyte chemoattractant protein-1*, traduzido como proteína quimiotática de monócitos 1.
- CXCL11/ITAC:** Quimiocina CXC ligante 11/Do inglês, *(I-TAC) induced T-lymphocyte chemokine by IFN*, traduzido como quimiocina de linfócito T induzida por IFN.
- CXCL12/SDF1:** Quimiocina CXC ligante 12/Do inglês, *(SDF1) stromal cell derived factor-1*, traduzido como Fator derivado de células do estroma 1.
- CXCR4:** Do inglês, *CXC chemokine receptor-4*, traduzido como receptor de quimiocina CXCR4.
- CXCR7:** Do inglês, *CXC chemokine receptor-7*, traduzido como receptor de quimiocina CXCR7.
- DAB:** Diaminobenzidina.
- ELR:** Sequência de aminoácidos Glu-Leu-Arg localizada na posição N-terminal de algumas quimiocinas.
- ERK:** Do inglês, *Extracellular-signal-regulated kinase*, traduzido como

quinase regulada por sinal extracelular.

Glu:	Corresponde ao aminoácido glutamina.
GLUT-1:	Do inglês, <i>Glucose transporter 1</i> , traduzido como transportador de glicose 1.
GLUT-3:	Do inglês, <i>Glucose transporter 3</i> , traduzido como transportador de glicose 3.
hMLH1:	Do inglês, <i>Human MutL homologue 1</i> , refere-se a proteína hMLH1.
HIV:	Do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i> , traduzido como Vírus da Imunodeficiência Humana.
IκB:	Do inglês, <i>κB inhibitory protein</i> , traduzido como proteína inibitória κB.
IP:	Índice de positividade.
L:	Ligante.
Leu:	Corresponde ao aminoácido leucina.
MAPKs:	Do inglês, <i>Mitogen-activated protein kinases</i> , traduzido como proteínas quinases ativadas por mitogênio.
MDM2:	Do inglês, <i>Murine double minute 2</i> , traduzido como homólogo de duplo minuto 2.
mTORC2:	Do inglês, <i>Mechanistic target of rapamycin complex 2</i> , traduzido como alvo mecanístico do complexo 2 de rapamicina.
NF-κB:	Do inglês, <i>Nuclear factor κB</i> , traduzido como fator nuclear κB.
OMS:	Organização Mundial da Saúde.
OPG:	Do inglês, <i>Osteoprotegerin</i> , traduzido como osteoprotegerina.
PCR:	Reação em cadeia da polimerase.
Ph:	Potencial Hidrogeniônico.

PI3K:	Do inglês, <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> , traduzido como fosfatidilinositol 3-quinase.
PTCH1:	Gene supressor tumoral que codifica a proteína <i>patched</i> .
P53:	Refere-se ao gene supressor de tumor <i>P53</i> ou proteína de mesmo nome.
P63:	Refere-se ao gene <i>P63</i> ou a proteína de mesmo nome.
R:	Receptor.
RANKL:	Do inglês, <i>Receptor activator of nuclear factor kB ligand</i> , traduzido como ligante do receptor ativador do fator nuclear kB.
RT-PCR:	Do inglês, <i>Real time quantitative PCR</i> , traduzido como PCR quantitativo em tempo real.
SPSS:	Do inglês, <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> , traduzido como Programa Estatístico para Ciências Sociais.
TCD4+:	Linfócito T auxiliar que expressa glicoproteínas monoméricas de superfície do tipo CD4.
TCLE:	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
TGF-2:	Do inglês, <i>Transforming growth factor</i> , traduzido como fator transformante de crescimento beta.
TRIS-HCL:	Cloridrato de trisaminometano-ácido clorídrico.
UEPB:	Universidade Estadual da Paraíba.
UNIFOR:	Universidade de Fortaleza.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1. Apresentação das variáveis independentes analisadas no estudo.....	40
Quadro 2. Apresentação das variáveis dependentes analisadas no estudo.....	41
Quadro 3. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	43
Tabela 1. Dados descritivos do índice de positividade (IP) de CXCL12 e CXCR4 em epitélio e cápsula fibrosa de COs isolados e sindrômicos.....	63
Tabela 2. Correlação do índice de positividade (IP) de CXCL12 e CXCR4 em epitélio de COs isolados e sindrômicos.....	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Esquema das vias de sinalização intracelulares do complexo CXCL12/CXCR4. Fonte: Adaptado de Alves, 2014.....	34
Figura 1. (Artigo) A. Expressão epitelial de CXCL12 em CO isolado; B. Expressão epitelial de CXCL12 em CO síndrômico; C. Expressão epitelial (nuclear) de CXCR4 em CO isolado; D. Expressão epitelial (citoplasmática) de CXCR4 em CO síndrômico; E. Expressão de CXCR4 em células endoteliais e fibroblastos de CO isolado e F. Expressão de CXCR4 em células endoteliais de CO síndrômico (Reveal, 400x).....	65
Figura 2. (Artigo) BoxPlots relativos aos percentuais de células epiteliais e fibroblastos/células endoteliais imunopositivas aos anticorpos anti-CXCL12 (citoplasma de células epiteliais e fibroblastos/células endoteliais [A]) e anti-CXCR4 (citoplasma de células epiteliais e fibroblastos/células endoteliais [B] e núcleo [C]) em COs isolados e síndrômicos.....	66

SUMÁRIO

	Página
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... 26
2	OBJETIVOS..... 36
2.1	OBJETIVO GERAL..... 37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 37
3	METODOLOGIA..... 38
3.1	ASPECTOS ÉTICOS..... 39
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO DE ESTUDO..... 39
3.3	POPULAÇÃO..... 39
3.4	AMOSTRA..... 39
3.4.1	Critérios de inclusão..... 40
3.4.2	Critérios de exclusão..... 40
3.5	VARIÁVEIS..... 40
3.6	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO..... 41
3.6.1	Método imunoistoquímico..... 41
3.6.2	Análise imunoistoquímica..... 43
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 44
4	ARTIGO..... 45
4.1	APRESENTAÇÃO..... 46
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO..... 47
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 67
	REFERÊNCIAS..... 69
	ANEXOS
	APÊNDICES

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Caracterizado inicialmente como um cisto de desenvolvimento, o ceratocisto odontogênico (CO) passou por diversas reclassificações devido ao seu comportamento biológico diferenciado, no tocante ao maior potencial infiltrativo, alta taxa de recorrência e alterações no gene *PTCH1* (TANDON, CHAUHAN, SHARMA, JAIN, 2016; SCHUCH *et al*, 2020). Em 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS) denominou-o tumor odontogênico ceratocístico, em razão do comportamento biológico peculiar, anteriormente descrito (SPEIGHT, TAKATA, 2018). Posteriormente, foi reclassificado e enquadrado no grupo dos cistos de desenvolvimento, já que as evidências científicas foram insuficientes para considerá-lo uma neoplasia (EL-NAGGAR *et al*, 2017; BORGHESI *et al*, 2018).

Os COs representam cerca de 10% dos cistos maxilares (ANTONOGLOU, SÁNDOR, KOIDOU, PAPAGEORGIOU, 2014; KARHADE, AFSHAR, PADWA, 2019). Apresentam predileção pela área de ramo e ângulo mandibulares. Acometem indivíduos em uma faixa etária muito diversificada, especialmente os da terceira década e o sexo masculino é o mais acometido (JOHNSON, GANNON, SAVAGE, BATSTONE, 2014; BILODEAU, COLLINS, 2017; SCHUCH *et al*, 2020). Os COs associados à síndrome de Gorlin ocorrem com maior frequência em indivíduos mais jovens, geralmente entre a primeira e segunda décadas de vida (ANTONOGLOU, SÁNDOR, KOIDOU, PAPAGEORGIOU, 2014; KARHADE, AFSHAR, PADWA, 2019).

Quanto à histogênese, origina-se da lâmina dentária, são compostos por epitélio estratificado pavimentoso paraceratinizado com distribuição uniforme de 5 a 8 camadas celulares e camada superficial corrugada de paraceratina. A camada basal é constituída por células colunares ou cuboidais dispostas em paliçada, com núcleo hipercromático e áreas focais exibindo polaridade reversa. O lúmen cístico contém ceratina descamada e figuras mitóticas podem ser observadas. A interface epitélio-cápsula é geralmente plana, essa na maioria dos casos é delgada e frágil, podendo exibir cistos satélites e/ou brotamentos epiteliais, principalmente nos COs síndrômicos. Tais características da cápsula fibrosa são apontadas como prováveis causas da alta taxa de recidiva dessas lesões (ARAGAKI, 2010; BILODEAU, COLLINS, 2017; EL-NAGGAR *et al*, 2017; VIJAYARANGAN, BASKARA PANDIAN, 2019).

Apresentam-se no geral associados a estruturas dentárias, porém, cerca de 30% das lesões não possuem vinculação com dentes. Seu crescimento é característico, no sentido

anteroposterior, não ocasionando abaulamento ósseo em fases iniciais. Esse padrão de crescimento é decorrente da propagação lesional ocorrer no interior do espaço intramedular (HARMON, ARRIGAN, TONER, O'KEEFFE, 2015; SCARFE, TOGHYANI, AZEVEDO, 2018). Em termos de sintomatologia, na maioria dos casos são assintomáticos, sendo por isso geralmente diagnosticados em exames imaginológicos de rotina, com exceção de raras infecções secundárias e parestesia devido a danos nervosos (MACDONALD-JANKOWSKI, 2011; SCHUCH *et al*, 2020).

No tocante as características radiográficas, usualmente, apresentam-se como imagens radiolúcidas arredondadas, uniloculares, bem definidas, de margens escleróticas. Todavia, em proporções menores podem se apresentar como imagens multiloculares. Acerca de danos a estruturas adjacentes, não costumam gerar reabsorção radicular, porém, habitualmente provocam deslocamentos dentários (GUPTA, JAETLI, MOHANTY, SHARMA, 2012; KITISUBKANCHANA *et al*, 2020). O crescimento anteroposterior da lesão deve ser observado nos exames radiográficos, pois contribui como critério para o diagnóstico diferencial com outras lesões intraósseas, como o ameloblastoma (KITISUBKANCHANA *et al*, 2020). Usualmente, exibem-se como lesões únicas, não sendo comum multiplicidade e quando essa característica é encontrada, logo, suspeita-se de síndromes, em especial a do carcinoma nevo basocelular ou de Gorlin-Goltz (GURDÁN, GELENCSÉR, LENGYEL, SZALMA, 2020).

Ceratocistos são normalmente as primeiras manifestações clínicas da síndrome de Gorlin-Goltz e possuem algumas particularidades em relação a lesões isoladas (GURDÁN, GELENCSÉR, LENGYEL, SZALMA, 2020; SILVA *et al*, 2020). O CO sindrômico apresenta predileção pela maxila, enquanto o isolado acomete principalmente a mandíbula, seu comportamento clínico é potencialmente mais agressivo e o índice de recidiva consideravelmente superior em relação às lesões isoladas (ANTONOGLOU, SÁNDOR, KOIDOU, PAPAGEORGIOU, 2014).

No que se refere ao tratamento, é indicada a enucleação da lesão acompanhada de um vasto leque de outras técnicas, como marsupialização, ostectomia periférica e crioterapia, objetivando diminuir a recorrência da lesão e propiciar um prognóstico mais favorável (JOHNSON, BATSTONE, SAVAGE, 2013; RIBEIRO-JÚNIOR *et al*, 2017). Em casos mais raros, indica-se ressecção cirúrgica parcial ou completa, como tratamento secundário em lesões altamente recidivantes (JOHNSON, BATSTONE, SAVAGE, 2013). A abordagem terapêutica é individualizada, baseada nas características da lesão, sua localização e envolvimento de estruturas adjacentes, bem como nas particularidades do portador, sendo

controverso o estabelecimento de um padrão ouro (RIBEIRO-JÚNIOR *et al*, 2017; VIJAYARANGAN, BASKARA PANDIAN, 2019).

A respeito da recidiva, o período crítico para as lesões recidivarem é de 5 a 7 anos. Porém, Apajalahti *et al* (2011) relataram recorrência em aproximadamente 2 anos, tendo como justificativa o acompanhamento por exames de tomografia computadorizada, em que é possível verificar lesões incipientes. Devido ao potencial de recidiva, recomenda-se a preservação do paciente diagnosticado com COs isolados e sindrômicos, sendo necessária a realização de exames imaginológicos regulares por longos períodos em casos relacionados à síndrome e até 5 anos em casos isolados (MACDONALD-JANKOWSKI, 2011; SCARFE, TOGHYANI, AZEVEDO, 2018).

A síndrome de Gorlin-Goltz foi caracterizada primariamente por Jarish e White no ano de 1894, ao observarem a existência de múltiplos carcinomas basocelulares (CBCs) em um indivíduo. Em 1960, Gorlin e Goltz estabeleceram que a síndrome se trata de um distúrbio com herança autossômica dominante, exibindo padrão fenotípico similar entre os portadores. Tais autores instauraram a tríade clássica da síndrome, composta por múltiplos COs, CBCs abundantes e costelas bífidas (GORLIN, GOLTZ, 1960; GORLIN, 1987). Entretanto, Rayner e colaboradores introduziram mais critérios diagnósticos, acrescentando depressão palmo-plantar e calcificação da foice cerebral (RAYNER, TOWERS, WILSON, 1977). Quanto à prevalência, existem controvérsias entre alguns estudos. Há uma variação de 1/50.000 indivíduos até 1/250.000, com discrepância por localização geográfica (MACDONALD, 2015; JOHN, SCHWARTZ, 2016; GALDES, MINTOFF, CLARK, 2019).

Com relação à etiopatogenia, estudos genéticos indicam que se deve a mutações no gene onco-supressor *PTCH1*, localizado no braço longo do cromossomo 9. Esse gene é um dos integrantes da via de sinalização *Hedgehog*, logo, sua mutação provoca alterações nessa via, ocasionando mudanças na proliferação e sobrevivência celular, o que gera aparecimento de lesões (MACDONALD, 2015; MENDES-ABREU *et al*, 2017; GALDES, MINTOFF, CLARK, 2019). Tal via é constituída por 3 componentes principais, Desert Hedgehog (DHH), Indian hedgehog (*IHH*) e Sonic hedgehog (*SHH*), os quais são expressos em diferentes tecidos e desempenham atividades biológicas distintas. Após interação do ligante *SHH* com *PTCH1*, o *Smoothed* (*SMO*) deixa de ser reprimido, levando a ativação de membros da família das proteínas Gli. Por conseguinte, Gli1 e Gli2 são translocadas ao núcleo, onde controlam a transcrição de genes alvo (CADAVID *et al*, 2019).

Definiram-se alguns critérios primários e quantidade superior a 100 critérios secundários para auxiliar no estabelecimento do diagnóstico da síndrome de Gorlin (BREE *et*

al, 2014; INOUE, KUROSAKA, LEE, YAMASHIRO, 2020). Os aspectos clínicos mais expressivos da síndrome são considerados critérios maiores, sendo os principais, a presença de múltiplos COs, CBCs, depressões palmo-plantares, anormalidades em estruturas ósseas e a existência de um parente de primeiro grau acometido pela síndrome. Já entre os critérios menores podemos elencar o hipertelorismo, sindactilia, macrocefalia, deformações em vértebras, tumores cerebrais e manifestações orais, como as fissuras labiopalatais (KIMONIS, 1997; YAMAMOTO *et al*, 2011; MACDONALD, 2015; LAZARIDOU, KATOPODI, DIMITRAKOPOULOS, 2015).

Assim sendo, torna-se essencial para estabelecer o diagnóstico a existência mínima de um critério maior e comprovação molecular, dois critérios maiores ou um maior e dois menores (BREE *et al*, 2011). Vale ressaltar a relevância da realização do diagnóstico precocemente, tendo em vista que contribuirá para a redução da gravidade das complicações advindas das lesões cutâneas malignas e deformações maxilofaciais vinculadas ao desenvolvimento de múltiplos COs (TANDON, CHAUHAN, SHARMA, JAIN, 2016; GURDÁN, GELENCSÉR, LENGYEL, SZALMA, 2020).

Os recursos terapêuticos disponíveis são incapazes de sanar a problemática provocada pela síndrome de Gorlin, em razão da multiplicidade e variedade das lesões, o que muitas vezes impede a execução de uma terapia mais efetiva. São indicados procedimentos cirúrgicos e a radioterapia também é um tratamento de escolha, em especial para os CBCs. O surgimento da terapia molecular voltada à inibição da via *Hedgehog* tem sido sugerida como uma nova modalidade terapêutica, no entanto, mais avanços nessa área são necessários. Dessa forma, fica explicitado o grau de complexidade encontrado no tratamento da referida síndrome indicando que a ciência ainda tem muito a contribuir nesse sentido (BOOMS, HARTH, SADER, GHANAATI, 2015; MENDES-ABREU *et al*, 2017; INOUE, KUROSAKA, LEE, YAMASHIRO, 2020).

Após a execução de um tratamento bem planejado, faz-se necessário o acompanhamento do paciente por um longo prazo, tanto clínico quanto radiográfico, levando em consideração o índice elevado de recorrência dos COs e CBCs. A preservação e aconselhamento devem ser estendidos também aos familiares de primeiro grau, devido à possibilidade de desenvolvimento da doença por parte destes indivíduos (DE MOLON *et al*, 2015; FIGUEIRA *et al*, 2018; GURDÁN, GELENCSÉR, LENGYEL, SZALMA, 2020).

Os COs tem sido objeto de estudo na tentativa de obter informações que contribuam com o conhecimento do comportamento biológico diferenciado desta lesão, dentre as outras lesões císticas odontogênicas, e das particularidades clinicopatológicas usualmente diferentes

entre os COs isolados e sindrômicos. Nesse contexto, Nonaka *et al*, (2012) analisaram a expressão de RANKL, OPG, o índice angiogênico e existência de miofibroblastos em COs isolados e associados à síndrome de Gorlin, por meio da imunistoquímica. Os autores não observaram diferenças significativas na expressão de RANKL e OPG entre essas lesões. Na análise do índice angiogênico e número de miofibroblastos, também não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Chegaram à conclusão que os distintos comportamentos dessas lesões não estão vinculados com a expressão de RANKL, OPG, o índice angiogênico e presença de miofibroblastos.

No estudo de Monteiro *et al*, (2015), investigaram a expressão de hMLH1, p63 e MDM2 em COs isolados primários, recorrentes e com associação à síndrome do carcinoma nevo basocelular. Verificaram maior imunoexpressão de hMLH1 na camada basal de COs primários e de p63 e MDM2 na região superficial do epitélio. No entanto, não foram encontradas diferenças nos índices de marcação de hMLH1, p63 e MDM2 entre essas lesões. Os autores inferiram que não foi possível relacionar a marcação dessas proteínas com as diferenças biológicas dos COs isolados e sindrômicos, indicando possíveis efeitos isolados destas no crescimento desses cistos.

Já na pesquisa de Ibrahim *et al*, (2016), houve análise imunistoquímica de Bcl-2, Ciclina D1, PCNA e p53 nessas lesões. A partir dos resultados obtidos, em que houve maior expressão de PCNA e menor de p53, os autores denotaram que a expressão desses marcadores seria útil na avaliação da atividade proliferativa e na diferenciação do comportamento clínico de COs isolados e associados à síndrome de Gorlin-Goltz. Porém, sugeriram estudos com amostras maiores, pois, o número reduzido de casos (13) foi uma limitação desse estudo, dificultando a extrapolação dos resultados.

Em um estudo imunistoquímico, Leite *et al*, (2017) avaliaram a imunoexpressão dos transportadores de glicose-1 (GLUT-1) e 3 (GLUT-3), correlacionando a expressão dessas proteínas com o índice angiogênico, em COs isolados e sindrômicos. Após observação dos resultados foi verificada alta expressão de GLUT-1 em ambos os COs, já o GLUT-3 apresentou pouca marcação. Não houve correlação da expressão de GLUT-1 e GLUT-3 com o índice angiogênico. Desta forma, sugere-se que a expressão dessas proteínas não possui relação com o maior potencial de agressividade do CO sindrômico. A alta expressão de GLUT-1, por outro lado, poderia indicar um papel relevante dessa proteína na captação de glicose pelas células dessas lesões.

Clementino (2018) ao avaliar a imunoexpressão das galectinas -1, -3 e -7 em COs isolados e associados à síndrome de Gorlin-Goltz, verificaram que as diferenças no

comportamento biológico dessas lesões não estão relacionadas às imunoexpressões dessas galectinas. Inferiu que a galectina-7 pode desempenhar importantes funções na patogênese dos COs, por outro lado, as galectinas -1 e -3 apresentam papel menos relevante no desenvolvimento dessas lesões.

No estudo de Malaguez *et al* (2019), houve avaliação da imunoexpressão de podoplanina em COs associados ou não com a síndrome de Gorlin e em cistos odontogênicos ortoqueratinizados. A expressão imunohistoquímica da podoplanina foi significativamente maior nos COs, com imunorreatividade distinta entre os diferentes tipos dessa lesão. Tais autores concluíram que essa proteína parece desempenhar um papel importante na proliferação e migração celular dos COs.

Mesmo com esses antecedentes, os mecanismos responsáveis pelas diferenças entre os COs isolados e sindrômicos ainda não são completamente compreendidos, sendo escassa a literatura referente a participação de quimiocinas e/ou seus receptores na etiopatogenia dessas lesões.

As quimiocinas são definidas como proteínas quimioatrativas pro-inflamatórias, constituídas por cerca de 70 a 80 aminoácidos, que exercem diversas funções. A primeira descrita, e mais relevante, é a influência que apresentam na quimiotaxia e ativação de células inflamatórias. Entretanto, executam outras atividades biológicas relevantes como a formação neovascular, morte celular programada, nutrição celular, hematopoiese e proliferação celular (GUERREIRO, SANTOS-COSTA, AZEVEDO-PEREIRA, 2011; JANSSENS, STRUYF, PROOST, 2018; DARAKHSHAN *et al*, 2019; WANG *et al*, 2020). Até então são conhecidas cerca de 50 quimiocinas e 20 receptores distribuídos em subgrupos, conforme o número e posição da cisteína da extremidade N-terminal, em CXC (α), CC (β), CX3C e C, em que X ou X3 equivale ao número de aminoácidos e C corresponde a cisteína (DARAKHSHAN *et al*, 2019; MOUSAVI, 2020; TONY *et al*, 2020).

Para que possam ser ativadas e desempenhar suas respectivas funções fisiológicas e patológicas, as quimiocinas requerem a presença de receptores, os quais são acoplados a proteína G do domínio transmembrana, sendo essa a principal via de atuação dos mesmos. No entanto, também conseguem sinalizar através de outras vias (RAJAGOPAL, RAJAGOPAL, LEFKOWITZ, 2010; ZHOU *et al*, 2018). Quanto à constituição, os receptores possuem sete domínios transmembranares, uma região N-terminal e uma C-terminal. Após a interação quimiocina/receptor sucede uma sequência de eventos intracelulares e as funções específicas desses complexos são executadas (KRIKUN, 2018; JARACZ-ROS *et al*, 2020).

Conforme a funcionalidade, as quimiocinas são classificadas como homeostáticas ou inflamatórias. As primeiras atuam na manutenção do equilíbrio do organismo e capacidade imunológica, ou seja, controlando a quimiotaxia leucocitária em atividades fisiológicas e ausentes de inflamação. As últimas também estimulam a migração de células de defesa, não obstante, em situações de agressão tecidual e processos infecciosos, isto é, quando há inflamação. Todavia, algumas quimiocinas são analisadas como mistas, exercendo ambas as funções citadas anteriormente (PAWIG *et al*, 2015; JANSSENS, STRUYF, PROOST, 2018; DARAKHSHAN *et al*, 2019).

Devido ao aumento do número de quimiocinas descobertas, tornou-se necessário o estabelecimento de uma nomenclatura sistemática para designar essas proteínas. A denominação das quimiocinas é baseada no nome da subfamília a qual integra, CXC, CC, CX3C e C, seguida pela letra L que significa “ligante” e um número arábico que é representativo do seu gene. Já os receptores são classificados de acordo com a classe de proteínas com as quais interagem, seguidos pela letra R oriunda de “receptor” e um número arábico correspondente ao gene no qual são codificados (WANG *et al*, 2016; JARACZ-ROS *et al*, 2020).

Por sua vez, o grupo CXC assim denominado por apresentar dois resíduos de cisteína intercalados por um aminoácido, do qual a quimiocina CXCL12 é integrante, constitui-se por quimiocinas do tipo ELR+ e ELR-. Essa classificação é baseada na existência ou não de um tripeptídeo Glu-Leu-Arg. O grupo ELR+ frequentemente atua na neoformação vascular e estimula a quimiotaxia, por outro lado o grupo ELR- inibe esses processos. No entanto, a SDF-1 ou CXCL12 que pertence ao grupo ELR- e age com seu receptor principal CXCR4, promove a angiogênese, logo, uma exceção à regra geral do seu grupo (VANDERCAPPELLEN, VAN DAMME, STRUF, 2011; PAWIG *et al*, 2015; MOUSAVI, 2019; TONY *et al*, 2020).

A interação e sinalização do complexo CXCL12-CXCR4 resulta no desempenho de algumas funções fisiológicas relevantes, atuando na hematopoiese, quimiotaxia de células imunológicas, cardiogênese, neoformação vascular, neurogênese e no desenvolvimento de células germinativas (NAGASAWA, 2014; YU, HAN-BO, WEN-JUN, LI, 2018). Todavia, esse complexo atua também em processos patológicos, auxiliando na proliferação de células neoplásicas para locais de metástase e na migração das mesmas em diferentes tipos de cânceres (BAE *et al*, 2017; JENG *et al*, 2017).

Os efeitos biológicos da quimiocina CXCL12 são executados após sua interação com o CXCR4, iniciando diferentes vias de sinalização intracelulares. A comunicação

CXCR4/CXCL12 promove uma conformação tridimensional do CXCR4, ocasionando a dissociação da proteína G nas subunidades α e $\beta\gamma$. Logo após, diferentes subtipos da subunidade α transmitem sinais distintos, promovem a formação de AMPc pela ativação da enzima adenilato ciclase, consequentemente são ativadas as vias NF- κ B, PI3K-AKT, mTOR e p38 que regulam a sobrevivência, proliferação, quimiotaxia e a transcrição de genes alvos. Por sua vez, a subunidade $\beta\gamma$ ativa a fosfolipase C (PLC), gerando diacilglicerol e inositol trifosfato (IP3), que irá controlar a liberação de Ca^{2+} intracelular (Figura 1) (ALVES, 2014).

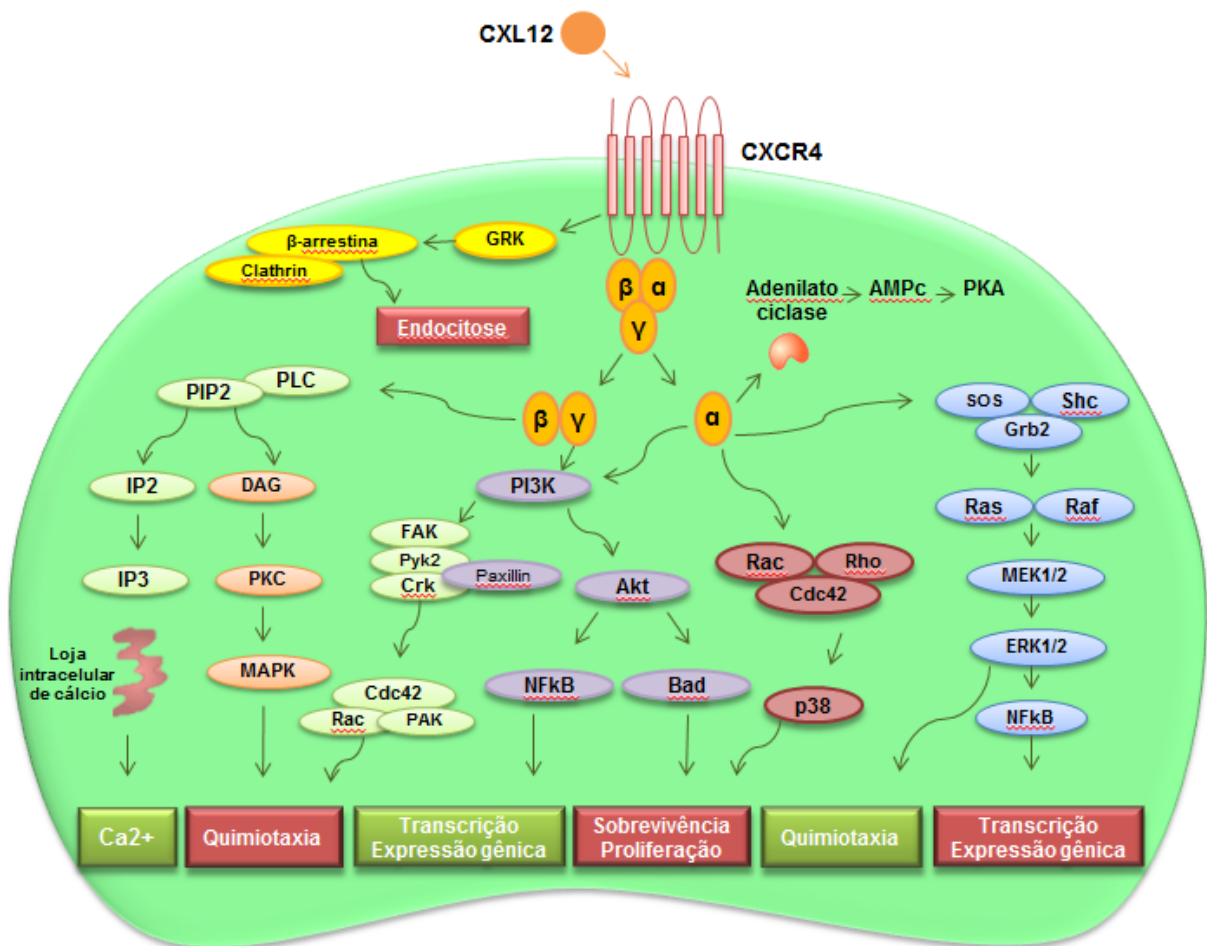


Figura 1.: Esquema das vias de sinalização intracelulares do complexo CXCL12/CXCR4.

Fonte: Adaptado de Alves, 2014.

A quimiocina CXCL12, composta em média por 68 aminoácidos, foi identificada inicialmente em células de murinos, e apresenta como funções primordiais a quimiotaxia de linfócitos e monócitos, regulação do ciclo celular e apoptose (KARIN, 2010; NAGASAWA, 2014; GASCON *et al*, 2020). É expressa constitutivamente em alguns tecidos e órgãos do

corpo como o pulmão, fígado, cérebro, rim, coração e medula óssea. No entanto, também é encontrada em tecidos lesionados por agentes externos, como os que sofrem ação da radioterapia e quimioterapia ou por danos provenientes de causas internas como no infarto do miocárdio, isquemia e quadros hemorrágicos (WANG *et al*, 2016; JENG *et al*, 2017; ZHANG *et al*, 2017).

O receptor CXCR4 é expresso em uma gama de células estaminais, desde granulócitos, agranulócitos até células de Langerhans. Apresenta também, significativa expressão em células endoteliais e células nervosas. Sua ligação ocorre exclusivamente com o ligante CXCL12 e dentre todos os receptores conhecidos foi o primeiro co-receptor a auxiliar a entrada do vírus HIV em células CD4+, fato esse que despertou o interesse em estudos mais aprofundados de suas funções, entre as quais podemos citar a quimiotaxia, formação de constituintes do plasma sanguíneo e atuação na embriogênese (SINGH *et al*, 2013; WANG *et al*, 2016; JENG *et al*, 2017; YAZDANI, MOUSAVI, MORADABADI, HASSANSHAHI, 2020).

As informações da literatura apontam poucas informações sobre a expressão e o papel da quimiocina CXCL12 e seu receptor principal CXCR4 em lesões císticas odontogênicas. No entanto, apesar da escassez de estudos sobre a expressão desse complexo em cistos odontogênicos de desenvolvimento, existem alguns trabalhos como o de Cavalla *et al* (2013) e Fukada *et al* (2009), que identificaram a expressão dessas proteínas em cistos inflamatórios. Os quais evidenciaram a atuação de CXCL12 e CXCR4 na quimiotaxia celular e destruição do tecido apical dessas lesões. Baseado nessas informações justifica-se pesquisar a imunoexpressão de tais proteínas nos COs, na busca de maiores informações que possam contribuir para o entendimento do comportamento biológico dessas lesões.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse estudo objetivou analisar a imunexpressão da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4, em COs isolados e associados à síndrome de Gorlin-Goltz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar possíveis diferenças na imunexpressão das proteínas CXCL12 e CXCR4 em células epiteliais e da cápsula fibrosa de COs isolados e síndrômicos;
- Pesquisar se existe correlação estatisticamente significativa entre a imunexpressão citoplasmática de CXCL12 e citoplasmática/nuclear de CXCR4 em células epiteliais e/ou da cápsula fibrosa de COs isolados e síndrômicos.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi registrado na Plataforma Brasil e, posteriormente, submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (CEP-UEPB), sendo desenvolvido posteriormente após aprovação deste Comitê mediante o parecer N°: 3.373.526 (ANEXO A), respeitando assim a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde.

3.2 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo laboratorial, de caráter descritivo e analítico, no qual foram investigadas as características histomorfológicas de uma série de COs isolados e associados à síndrome de Gorlin-Goltz, com análise qualitativa e quantitativa da expressão imunohistoquímica das proteínas CXCL12 e CXCR4 nessas lesões.

3.3 População

Dos casos registrados e diagnosticados nos Arquivos dos Laboratórios de Patologia Oral dos Departamentos de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)-PB e da Universidade de Fortaleza (UNIFOR)-CE, foram selecionados espécimes de COs isolados e associados à síndrome de Gorlin-Goltz.

3.4 Amostra

A amostra foi do tipo não probabilística, intencional, baseada na quantidade de material disponível nos blocos parafinados, constituindo-se de 21 amostras teciduais de COs isolados e 21 COs associados à síndrome de Gorlin-Goltz. Em todos os casos, o diagnóstico histopatológico dos COs foi realizado com base na quarta classificação dos cistos odontogênicos da OMS (EL-NAGGAR *et al*, 2017).

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos espécimes provenientes de enucleação cirúrgica, biópsias excisional e incisional de COs isolados e associados à síndrome de Gorlin-Goltz, cujos blocos em parafina estavam em bom estado, continham quantidade suficiente de material para análise e ainda apresentaram suas respectivas fichas clínicas devidamente preenchidas, contendo a confirmação do diagnóstico da síndrome de Gorlin-Goltz e os dados clínicos dos pacientes. O diagnóstico da síndrome de Gorlin-Goltz foi estabelecido com base na existência mínima de um critério maior e comprovação molecular, dois critérios maiores ou um maior e dois menores (BREE *et al*, 2011).

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os espécimes de COs isolados recorrentes.

3.5 Variáveis

Os Quadros 1 e 2, abaixo apresentados, exibem o elenco das variáveis independentes e dependentes que foram avaliadas no presente estudo.

Quadro 1. Conjunto de variáveis independentes do estudo.

Variável	Descrição	Categorias
Classificação da lesão	Classificação dos ceratocistos odontogênicos quanto à associação ou não com a síndrome de Gorlin-Goltz.	<ul style="list-style-type: none"> • Isolado • Sindrômico
Epitélio odontogênico em cápsula cística	Presença de proliferação de células epiteliais odontogênicas na cápsula cística.	<ul style="list-style-type: none"> • Cisto satélite (MYOUNG <i>et al</i>, 2001) • Brotamentos epiteliais em cápsula (LEONARDI <i>et al</i>, 2010)

Quadro 2. Conjunto de variáveis dependentes do estudo.

Variável	Descrição	Categorias
Localização da expressão	Local exato predominante da expressão imunohistoquímica das proteínas avaliadas.	<ul style="list-style-type: none"> • Células epiteliais • Células mesenquimais (fibroblastos e endoteliais) • Ambas
Topografia celular da expressão	Local exato predominante da expressão imunohistoquímica das proteínas avaliadas no componente epitelial e conjuntivo da amostra.	<ul style="list-style-type: none"> • Membranar (CXCL12/CXCR4) • Citoplasmática (CXCL12/CXCR4) • Nuclear (CXCR4)
Distribuição da expressão	Disposição predominante da expressão imunohistoquímica das proteínas avaliadas no componente epitelial da amostra avaliada.	<ul style="list-style-type: none"> • Focal • Difusa

3.6 Estudo imunohistoquímico

3.6.1 Método imunohistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe Plus™, Advanced Biosystems Inc.*, 44 Redwood, CA, USA), utilizando os anticorpos primários monoclonais anti-CXCL12 e anti-CXCR4.

Para verificação da efetividade da técnica foram utilizados, como controle positivo para CXCL12 e CXCR4, cortes de hiperplasia fibrosa inflamatória oral. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo imunohistoquímico.

A técnica seguiu o protocolo utilizado no Laboratório de Imunohistoquímica 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 3);
- ⇒ 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 (*EnVision Flex antibody diluent*, Dako North America Inc., Carpinteria, 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 (*Amplifier*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, 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*, Advanced Biosystems Inc., Redwood, 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 (*Liquid-DAB+ substrate system*, Dako North America Inc., Carpinteria, 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 *Permout*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

Quadro 3. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários que foram utilizados no estudo.

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

3.6.2 Análise imunoistoquímica

A análise da expressão imunoistoquímica de CXCL12 e CXCR4 foi realizada de forma quantitativa e qualitativa por uma examinadora previamente treinada, mediante utilização de microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), logo em seguida ao processamento e tratamento imunoistoquímico dos cortes histológicos. É válido enfatizar que foi efetuado o mascaramento das informações clinicopatológicas dos casos, visando impossibilitar o surgimento de vieses.

Sob aumento de 100x, foram selecionados dez campos histológicos no revestimento e dez campos na cápsula fibrosa imediatamente abaixo do revestimento epitelial nos COs isolados eindrômicos. Em seguida, para todos os casos, sob aumento de 400x, cada um destes campos foi fotomicrografado (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*). A imagem de cada campo foi capturada e salva em formato JPG. Utilizando o software *Image Processing and Analysis in Java (Image J, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA)*, em cada campo foi realizada contagem de células imunopositivas e negativas. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o número de células imunopositivas para as proteínas avaliadas e obtido o Índice de Positividade (IP), tanto no componente epitelial como na cápsula fibrosa, através da fórmula descrita abaixo. Os dados obtidos com essa avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE A).

$$IP = \frac{\text{Número de células positivas}}{\text{Total de células}} \times 100$$

Foi considerada a topografia celular da expressão de CXCL12, CXCR4, ou seja, a presença de marcação acastanhada/marrom membranar, citoplasmática e/ou nuclear em células epiteliais e da cápsula fibrosa.

A distribuição de marcação em células epiteliais e da cápsula fibrosa, definida como a disposição predominante da expressão imunoistoquímica das proteínas nos espécimes selecionados foi avaliada de acordo com os seguintes critérios: focal e difusa.

A localização, ou seja, o local exato predominante da expressão imunoistoquímica das proteínas avaliadas em células epiteliais e da cápsula fibrosa foi categorizada em: células epiteliais, células do tecido conjuntivo (fibroblastos e células endoteliais) ou ambas.

3.7 Análise estatística

Os resultados imunoistoquímicos foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics (versão 25.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA)*. Os dados obtidos com as análises imunoistoquímicas foram analisados por meio do teste de Shapiro-Wilk, 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 CXCL12 e CXCR4, de acordo com o tipo de lesão (COs isolados e COs sindrômicos). Correlações entre as imunoexpressões de CXCL12 e CXCR4 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 de CXCL12 e CXCR4 em ceratocistos odontogênicos isolados e associados à síndrome de Gorlin-Goltz**”.

O referido artigo será submetido ao periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine* (ISSN:1600-0714, Fator de impacto: 2,03, Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em ceratocistos odontogênicos isolados e associados à síndrome de Gorlin-GoltzTítulo breve: **CXCL12 e CXCR4 em ceratocistos odontogênicos**

Wliana Pontes de Lima¹, Roberta Barroso Cavalcante², Renato Luiz Maia Nogueira³, Pollianna Muniz Alves¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹, Manuel Antonio Gordón-Núñez¹

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

²*Universidade de Fortaleza, Departamento de Patologia Oral, Fortaleza, CE, Brasil.*

³*Universidade Federal do Ceará, Departamento de Cirurgia Oral, Fortaleza, CE, 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

e-mail: gordonnunez162531@gmail.com

Abstract

Background: the odontogenic keratocyst (OKC) has differentiated clinical behavior, genetical alterations and can be associated with Gorlin-Goltz syndrome. Isolated and syndromic OKCs have some differences. The CXCL12 cytokine and its main receptor, CXCR4, regulate important events in the pathogenesis of several lesions. This study aimed to analyze the CXCL12/CXCR4 immunoexpression in 21 isolated and 21 syndromic OKCs. **Methods:** the immunoexpression of the proteins was analyzed in epithelium and fibrous capsule of 10 fields with greater immunostaining. **Results:** the CXCL12 immunoexpression was observed in epithelial cells of 20 isolated OKCs and in 19 syndromic, with statistically significant difference between the lesions. CXCL12 immunoexpression was observed in endothelial cells and fibroblasts in all isolated OKCs and in 20 syndromic OKCs, with greater expression in the former. Cytoplasmic and nuclear CXCR4 expression was observed in epithelium of all OKCs, with a statistically significant difference in the nuclear PI. The cytoplasmic and nuclear expression of CXCR4 in the fibrous capsule was predominant in the endothelial cells of most syndromic and isolated OKCs. There was a statistically significant correlation for syndromic OKCs, between the nuclear and cytoplasmic PI of CXCR4 in epithelium and fibrous capsule. **Conclusion:** it was concluded that probably in the epithelial cells of OKCs, the CXCL12 and CXCR4 seem to play a minor role in relation to the pathogenesis and biological behavior of OKCs. In the fibrous capsule, it is likely that the proteins evaluated may be involved in the pathogenesis and in the different biological behavior of the OKCs.

Keywords: Odontogenic Cysts. CXCL12. CXCR4. Basal Cell Nevus Syndrome.

Introdução

Classificado como cisto de desenvolvimento por Philipsen, em 1956, o ceratocisto odontogênico (CO) apresenta comportamento clínico agressivo, alto índice de recidiva e possibilidade de associação com a síndrome de Gorlin-Goltz ou do carcinoma nevo basocelular¹. Em razão do comportamento clínico distinto e de mutações no gene supressor de tumor *patched* (*PTCH1*), passou por diversas reclassificações pela Organização Mundial da Saúde (OMS), voltando à denominação de CO em 2017, devido a escassas evidências científicas que apoiassem a origem neoplásica dessa lesão.¹⁻²⁻³ A síndrome de Gorlin-Goltz, a qual o CO pode está associado, é uma desordem de caráter autossômico dominante, identificada pela presença de múltiplos COs, carcinomas basocelulares (CBC) abundantes distribuídos pelo corpo, deformações ósseas, entre outras alterações.⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷

Diversas proteínas relacionadas a apoptose, ciclo celular, nutrição celular e também genes supressores tumorais, têm sido analisados no intuito de pesquisar informações que tentem explicar as diferenças de comportamento biológico entre os COs isolados e sindrômicos.⁸⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹ No entanto, ainda persistem lacunas a ser esclarecidas,⁹⁻¹⁰⁻¹¹ sendo necessário o desenvolvimento de mais estudos visando elucidar peculiaridades no tocante a cistos odontogênicos.

As quimiocinas constituem uma família de quimioatraentes pro-inflamatórios.^{12,13} Além disso, exercem outras funções biológicas que contribuem na patogenia de lesões, como neovascularização, sobrevivência, migração, apoptose e aumento da capacidade infiltrativa.¹⁴⁻¹⁵ São conhecidas cerca de 50 quimiocinas e 20 receptores.¹⁶⁻¹⁷ A quimiocina CXCL12 ou SDF-1 (Fator-1 derivado de células do estroma), como também é conhecida, pertence ao grupo ELR- (ausência do tripeptídeo Glu-Leu-Arg na porção N-terminal), atuando com seu receptor principal CXCR4. O complexo CXCL12/CXCR4 é estudado em diferentes tipos de neoplasias, cistos e outras alterações.¹⁸

Baseado no exposto anteriormente, considerando o crescente interesse no estudo da interação quimiocinas/receptores e sua contribuição em processos importantes na etiopatogenia de várias lesões, mostra-se relevante analisar a expressão das proteínas CXCL12 e CXCR4 em COs isolados e sindrômicos. Objetivando determinar se existem diferenças na imunexpressão dessas proteínas entre tais lesões. Visto que subsidiaria o esclarecimento de diferenças biológicas que influenciam o comportamento distinto dos COs, com conseqüente desenvolvimento de estratégias terapêuticas e melhor compreensão de marcadores de prognóstico.

Material e métodos

Espécimes

A amostra foi não probabilística, intencional, constituída por 21 amostras teciduais de COs isolados e 21 COs associados à síndrome de Gorlin-Goltz, registrados e diagnosticados nos Arquivos dos Laboratórios de Patologia Oral dos Departamentos de Odontologia da UEPB-PB e da UNIFOR-CE. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UEPB (Parecer: 3.373.526). Em todos os casos, o diagnóstico histopatológico dos COs foi realizado com base na quarta classificação dos cistos odontogênicos da OMS.³

Foram incluídos espécimes provenientes de enucleação cirúrgica, biópsias excisional e incisional de COs isolados e sindrômicos, inflamados ou não, cujos blocos em parafina estavam em bom estado, continham quantidade suficiente de material e com as fichas clínicas devidamente preenchidas, apresentando a confirmação do diagnóstico da síndrome de Gorlin e os dados clínicos dos pacientes. Foram excluídos os espécimes de COs isolados recorrentes. O diagnóstico da síndrome de Gorlin-Goltz foi estabelecido com base na existência mínima de um critério maior e comprovação molecular, dois critérios maiores ou um maior e dois menores.¹⁹

Imunoistoquímica

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Immunohistoprobe Plus™*, Advanced Biosystems Inc., 44 Hedwood, CA, USA), utilizando os anticorpos primários policlonais anti-CXCL12 (clone P-159X, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50, recuperação antigênica Steamer, 90°C, 30 min., citrato/pH 6.0 e incubação overnight) e anti-CXCR4 (clone 12G5, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:750, recuperação antigênica Steamer, 90°C, 30min., citrato/pH 6.0 e incubação 60min.). A atividade da peroxidase foi visualizada através da imersão dos cortes em diaminobenzidina (*Liquid DAB+ substrate system*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Finalmente, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com lamínula. O controle positivo para CXCL12 e CXCR4 foi realizado com cortes de

hiperplasia fibrosa inflamatória oral e o controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito anteriormente.

Análise imunoistoquímica

A análise da expressão imunoistoquímica de CXCL12 e CXCR4 foi realizada de forma quantitativa por uma examinadora previamente treinada, mediante utilização de microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), logo em seguida ao processamento e tratamento imunoistoquímico dos cortes histológicos. É válido enfatizar que foi efetuado o mascaramento das informações clínicas dos casos, visando impossibilitar o surgimento de vieses. Foi pesquisada a imunoexpressão citoplasmática e/ou nuclear das proteínas avaliadas em células do componente epitelial e da cápsula fibrosa (fibroblastos e células endoteliais).

Sob aumento de 100x, foram selecionados dez campos aleatórios no revestimento epitelial e dez campos na cápsula fibrosa imediatamente subjacente ao revestimento nos COs isolados e síndrômicos. Para todos os casos, sob aumento de 400x, cada um dos campos foi fotomicrografado (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*). A imagem de cada campo foi capturada e salva em formato JPG. Utilizando o software *Image Processing and Analysis in Java (Image J, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA)*, em cada campo foi realizada contagem de células imunopositivas e negativas, tanto no componente epitelial como na cápsula fibrosa. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o número de células imunopositivas para as proteínas avaliadas e obtido o Índice de Positividade (IP), dividindo o número de células positivas pelo total de células contadas e multiplicado por 100.

Análise estatística

Os resultados imunoistoquímicos foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics (versão 25.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA)*. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste de Shapiro-Wilk, 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 CXCL12 e CXCR4, de acordo com o tipo de lesão (COs isolados e COs síndrômicos). Correlações entre as imunoexpressões de CXCL12 e CXCR4 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

Análises imunoistoquímica

Imunoexpressão de CXCL12

Foi observada imunopositividade citoplasmática distribuída de forma predominantemente focal em células do componente epitelial, principalmente nas camadas suprabasais, em 20 casos dos COs isolados (95,2%; mediana: 10,48; variação: 0,00% – 76,33%) e em 19 de COs síndrômicos (90,5%; mediana: 0,84; variação: 0,00% – 7,71%) avaliados nesse estudo (Figura 1-A,B). Através dos resultados obtidos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, foi revelado percentual maior da imunoexpressão de CXCL12 em COs isolados em comparação com os COs síndrômicos ($p < 0,001$) (Figura 2-A).

Com relação à imunoexpressão da quimiocina CXCL12 em células da cápsula fibrosa, notou-se positividade em 21 casos nos COs isolados (100%; mediana: 17,29; variação: 1,28% – 41,54%) e em 20 casos de COs síndrômicos (95,2%; mediana: 3,79; variação: 0,00% – 22,85%). A análise, mediante o teste não paramétrico de Mann-Whitney, mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$), com maior imunoexpressão de CXCL12 em COs isolados (Tabela 1).

Imunoexpressão de CXCR4

A expressão imunoistoquímica do receptor CXCR4 foi detectada predominantemente difusa, em citoplasma de células epiteliais suprabasais de 100% dos COs isolados (mediana: 0,36; variação: 0,06% – 96,10%) e síndrômicos (mediana: 39,60; variação: 0,61% – 98,39%) analisados no presente estudo (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de CXCR4 em citoplasma de células epiteliais de COs isolados e síndrômicos ($p = 0,080$), no entanto, os casos isolados exibiram uma mediana menor do percentual de imunoexpressão desse receptor de quimiocina (Figura 2-B).

A imunopositividade nuclear do receptor CXCR4 foi observada com distribuição prevalentemente focal, nas camadas suprabasais do epitélio em todos os casos de COs isolados (100%; mediana: 48,75; variação: 9,99% – 79,68%) e síndrômicos (100%; mediana: 13,79; variação: 0,34% – 89,30%) (Figura 1-C,D). Notou-se diferença estatisticamente significativa entre as lesões ($p = 0,007$), sendo o maior percentual de imunomarcção em COs isolados (Tabela 1, Figura 2-C).

Quanto à expressão imunoistoquímica citoplasmática de CXCR4 em células da cápsula fibrosa, esta ocorreu de forma focal, especialmente em células endoteliais (Figura 1-E,F). Verificou-se positividade em 100% dos casos de COs isolados (mediana: 3,17; variação:

00,15% – 76,10%) e em 90,5% dos casos associados à síndrome de Gorlin-Goltz (mediana: 5,58; variação: 0,00% – 39,89%). Não houve diferença estatística significativa entre os casos isolados e sindrômicos ($p = 0,352$), com maior mediana do percentual de imunomarcção para os COs sindrômicos (Figura 2-B).

A respeito da imunexpressão nuclear do receptor CXCR4 em células da cápsula fibrosa, a positividade da expressão foi observada principalmente em células do endotélio, de forma predominantemente focal, em todos os casos sindrômicos (100%; mediana: 11,95; variação: 0,73% – 57,33%) e em 20 casos dos COs isolados (95,2%; mediana: 3,54; variação: 0,00% – 63,40) (Figura 1). Notou-se distribuição focal da marcação imunoistoquímica e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tipos de COs ($p = 0,054$), com maior mediana do percentual de imunomarcção em COs sindrômicos (Tabela 1, Figura 2-C).

Correlação entre as imunexpressões de CXCL12 e CXCR4

De acordo com o teste estatístico de Spearman, não houve correlação estatisticamente significativa do IP de expressão citoplasmática de CXCL12 com o IP de expressão citoplasmática ou nuclear de CXCR4 em células epiteliais de COs isolados. Para os COs sindrômicos, observou-se correlação positiva estatisticamente significativa do IP da expressão citoplasmática do CXCR4 com o IP de expressão nuclear desse receptor ($r = 0,730$; $p < 0,001$) em epitélio (Tabela 2). Na cápsula fibrosa verificou-se correlação estatisticamente significativa entre IP citoplasmático e nuclear de imunopositividade para CXCR4 ($r = 0,698$; $p < 0,001$) nos COs isolados e o mesmo foi observado nos COs sindrômicos, com valor de ($r = 0,826$; $p < 0,001$). Verificou-se cisto satélite e brotamento epitelial em cápsula fibrosa de apenas um caso de CO sindrômico.

Discussão

As particularidades do comportamento biológico dos COs isolados e sindrômicos, o maior potencial de agressividade destes últimos, seu alto índice de recidiva e maior capacidade de infiltração constituem assuntos intrigantes para a pesquisa científica.⁹⁻¹⁰ Nesse contexto, têm sido analisadas as expressões de algumas proteínas relacionadas a apoptose, ciclo celular, nutrição celular e também genes supressores tumorais, que sustentam diferenças biológicas entre essas lesões.⁸⁻¹⁰⁻¹¹⁻²⁰ No entanto, evidências científicas que justifiquem os

distintos comportamentos biológicos e etiopatogênicos entre os COs isolados e sindrômicos ainda são insuficientes.¹⁰⁻¹¹⁻²⁰

A atuação das quimiocinas e seus respectivos receptores tem se apresentado como alvo de intensa investigação científica nos últimos tempos, levando em consideração a ação dessas proteínas na patogênese de diversas lesões.¹⁵⁻²¹⁻²²⁻²³⁻²⁴ Nesse contexto, verifica-se a expressão da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em relação a maior agressividade em lesões neoplásicas,²⁵⁻²⁶ no entanto, observa-se escassez de informações sobre a ação dessas proteínas na etiopatogenia de COs.

Nesta pesquisa, o baixo percentual de imunexpressão de CXCL12 em células epiteliais na maioria da amostra avaliada, especialmente nos COs sindrômicos, pode sugerir que essa quimiocina possivelmente não exerça função preponderante na patogênese e comportamento biológico mais agressivo dos COs associados à síndrome. Tais achados destoam do que é relatado para lesões neoplásicas, as quais apresentam maior expressão dessa proteína quando a lesão é considerada mais agressiva.²⁵⁻²⁶

Os achados desta pesquisa antes citados, somados a baixa imunexpressão de CXCR4 observada na maioria da amostra avaliada e a ausência de correlação entre a imunexpressão de CXCL12 e a expressão citoplasmática/nuclear de CXCR4, levam a sugerir que possivelmente tal quimiocina não estivesse interagindo isoladamente com seu receptor principal, o CXCR4. No revestimento epitelial, as medianas de positividade citoplasmática de CXCR4, nos COs sindrômicos, e nuclear de CXCR4, nos COs isolados, apresentaram valores consideráveis. Desta forma, não se poderia descartar uma potencial participação na patogenia dos COs.

Existem receptores de quimiocinas atípicos (ACKRs), os quais não ativam cascatas clássicas de sinalização dependentes da proteína G mediante interação com o ligante. Em vez disso, a ligação desses receptores às quimiocinas pode induzir a rápida internalização e degradação destas, atuando, portanto como eliminadores de quimiocinas e exercendo um papel na remodelação, manutenção e resolução do gradiente de quimiocinas.²⁷⁻²⁸⁻²⁹⁻³⁰⁻³¹ Nesse contexto, relata-se que CXCL12 pode interagir com o seu receptor alternativo, o CXCR7, também conhecido como ACKR3, ou através de heterodímeros formados entre CXCR4/CXCR7.¹³⁻²¹⁻³²⁻³³⁻³⁴ O CXCR7 também interage com a quimiocina inflamatória altamente regulada CXCL11 (I-TAC). Por ser incapaz de aumentar as respostas da proteína G na maioria dos tipos celulares, a ligação da proteína ao CXCR7 induz a parada na resposta a sinalização e a rápida degradação da quimiocina CXCL12.²⁷⁻²⁸⁻²⁹⁻³⁰⁻³¹

Em relação à interação entre CXCL12 e CXCR7, sugere-se que de tal comunicação pode ocorrer a internalização dessa quimiocina no citoplasma celular e sua degradação. Após interação de CXCL12 com o receptor CXCR7, este é ativado por essa quimiocina para induzir sinalização intracelular e impulsionar a realocização de β -arrestinas, findando na internalização e degradação da quimiocina.³⁵⁻³⁶ A eliminação de CXCL12 parece ser impulsionada pela rápida taxa de degradação de uma fração relativamente pequena da quimiocina, ligada a altos níveis de expressão de CXCR7. Sendo assim, destaca-se a relevância biológica da afinidade de CXCL12 pelo CXCR7.³¹

Os menores IPs de CXCL12 foram observados nos COs síndrômicos. Essas lesões, no entanto, também exibiram os maiores IPs para CXCR4 em citoplasma. Baseado no antes exposto, o resultado do presente estudo sobre o menor IP de CXCL12 em epitélio poderia ser decorrente da interação dessa quimiocina com o receptor atípico CXCR7, na superfície celular. Provavelmente CXCL12 estivesse sendo rapidamente internalizada na célula e sofrendo degradação, porém como este receptor não foi avaliado neste estudo, o assunto é um tema interessante para posterior pesquisa.

O achado da maior imunexpressão de CXCL12 em células endoteliais, principalmente em COs síndrômicos, assemelha-se às informações encontradas na literatura para outras lesões.³²⁻³³⁻³⁷⁻³⁸ Tais resultados podem indicar que na cápsula fibrosa de COs síndrômicos, essa proteína talvez desempenhe alguma função relevante na sua patogênese. Ressalta-se a importância de células da cápsula fibrosa e as diversas interações entre as mesmas na patogenia de lesões císticas, principalmente nos COs. Pois, nessas lesões o componente epitelial parece ser biologicamente muito ativo, e hipoteticamente, precisaria do suporte contínuo do componente mesenquimal, neste caso, através do fornecimento de nutrientes e oxigênio dependentes da angiogênese.

É importante destacar os resultados antes citados, uma vez que relata-se a expressão da quimiocina CXCL12 no tocante à modulação de fenômenos vasculares, principalmente na angiogênese em lesões.³²⁻³³⁻³⁷⁻³⁸ Além de interagir com os receptores CXCR4 e CXCR7, CXCL12 exerce suas funções comunicando-se com glicosaminoglicanos, a exemplo da heparina, dessa interação resultam a quimiotaxia celular e eventos vasculares. A interação de CXCL12 com os receptores CXCR4 e/ou CXCR7 associados à membrana de células endoteliais é responsável pelo recrutamento, ativação e migração destas. O que resulta no acionamento de cascatas de sinalização, as quais incluem proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs), as vias PI3K/AKT e NF- κ B, inclusive com a mediação da proteína mTORC2, e conseqüentemente, desempenhando um papel importante na angiogênese em

lesões.¹²⁻³⁹⁻⁴⁰⁻⁴¹ Talvez a expressão das proteínas avaliadas em células endoteliais, seja importante para a manutenção da angiogênese e consequente suprimento de nutrientes e oxigênio, necessários para garantir a sobrevivência das células epiteliais do limitante cístico.

Foi realizada análise imunoistoquímica da quimiocina CXCL12 e seu receptor canônico CXCR4 em carcinomas orais, identificando padrões distintos de expressão dessas proteínas, com destaque para a superexpressão de CXCR4 em células epiteliais tumorais, especialmente em citoplasma e membrana celular.²⁵ Resultados semelhantes foram observados por Meng *et al* (2010)⁴², com maior imunoexpressão citoplasmática de CXCR4 em carcinomas de células escamosas (CCEs). Estas observações apresentam-se em consonância com informações do presente estudo, com COs síndrômicos exibindo maior expressão citoplasmática epitelial de CXCR4.

Mediante essas informações e levando em consideração que nos COs síndrômicos foi identificada forte correlação positiva estatisticamente significativa entre as expressões citoplasmática e nuclear de CXCR4 em epitélio, enquanto, nas lesões isoladas não houve nenhuma correlação significativa entre os IPs epiteliais, é reforçada a idéia de possíveis diferenças biológicas entre estas lesões císticas. O que poderia indicar alguma atuação desse receptor na patogenia e comportamento biológico de COs síndrômicos.

Verificou-se predominante imunoexpressão do receptor CXCR4 em citoplasma de células suprabasais epiteliais da amostra deste estudo. Informações da literatura relatam interação desse receptor com a quimiocina CXCL12 promovendo a sobrevivência celular, através da ativação das cascatas PI3 e MAP.⁴³ Além de informações demonstrando que as camadas epiteliais suprabasais dos COs podem atuar na manutenção da sobrevivência celular.⁴⁴ A partir do exposto sugere-se que os achados desse estudo possam indicar alguma ação dessas proteínas na manutenção da viabilidade celular, em camadas suprabasais dos COs e consequentemente, alguma função na manutenção da integridade do revestimento cístico e possíveis implicações na expansão da lesão.

Não são encontrados estudos na literatura sobre a imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em células epiteliais e da cápsula fibrosa em COs. Todavia, Xia *et al* (2012),⁴⁵ embora tenham analisado amostras de outros tipos teciduais para a imunorreatividade de CXCL12/CXCR4, verificaram expressão dessas proteínas em células endoteliais na lâmina própria e submucosa de tecidos orais displásicos e neoplásicos. Evidenciando que essas proteínas desempenham funções importantes na progressão neoplásica. Considerando a maior expressão citoplasmática e nuclear de CXCR4 em células endoteliais da cápsula fibrosa, na maioria dos casos de COs síndrômicos, reforçar-se a possível atuação do complexo

CXCL12/CXCR4 na neoformação vascular, importante para a patogenia de COs.¹³⁻³²⁻³³ Esses resultados, somados a verificação de correlação positiva estatisticamente significativa entre o IP citoplasmático e nuclear de CXCR4 em células da cápsula fibrosa, nos COs isolados ($r = 0,698$; $p > 0,001$) e síndrômicos ($r = 0,826$; $p > 0,001$), poderia indicar uma provável participação de CXCR4 na patogênese dos COs, porém, apesar da existência da correlação, em especial nos síndrômicos, a expressão de CXCL12/CXCR4 foi baixa.

Existem duas variantes do receptor CXCR4, CXCR4-A e CXCR4-B, sendo esta última mais expressa. Não há consenso sobre as diferentes atividades biológicas dessas variantes, com um estudo relatando atividade igual e outro evidenciando atividade reduzida para CXCR4-A.⁴⁶⁻⁴⁷ A imunopositividade nuclear do receptor CXCR4, foi verificada principalmente em células suprabasais epiteliais da amostra, porém com mediana relativamente variável do percentual de imunoexpressão, com destaque para o menor IP nuclear desse receptor em COs síndrômicos. Poderia sugerir-se, que tal proteína não guarde relação com as diferenças no comportamento biológico entre os diferentes COs. Nesse contexto, haveria possibilidade que CXCL12 interaja com diferentes variantes de CXCR4 nessas lesões ou que a quimiocina CXCL12 sofra modificação no seu domínio N-terminal através de processamento proteolítico. Tornando-se truncada e passando a atuar como antagonista do receptor CXCR4 nas lesões síndrômicas, o que provavelmente não ocorre nos COs isolados.⁴⁶⁻⁴⁷

Por outro lado, é importante lembrar que o CXCR4 pode formar heterodímeros com o CXCR7, havendo regulação da distribuição subcelular e transdução de sinal do CXCR4.³⁵⁻³⁶ Além disso, com o fato que CXCR7 degrada CXCL12 para evitar superestimulação e degradação do CXCR4,⁴⁸ há uma remota possibilidade que na amostra avaliada devido a alterações moleculares na lesão, o CXCR4 esteja sendo regulado negativamente ou degradado e portanto pouco expresso em núcleo dos COs síndrômicos e citoplasma de COs isolados.

Apesar da carência de estudos sobre a expressão de CXCL12/CXCR4 nos cistos odontogênicos de desenvolvimento, existem trabalhos relacionados com a expressão desse complexo em cistos inflamatórios, que embora possuam etiologia distinta, essas lesões guardam alguma similaridade. A exemplo dos estudos de Cavalla *et al* (2013)⁴⁹ e Fukada *et al* (2009),⁵⁰ os quais identificaram a expressão de CXCL12/CXCR4 em cistos inflamatórios, evidenciando a atuação dessas proteínas na quimiotaxia de células inflamatórias e destruição do tecido apical em cistos odontogênicos.

Alguns estudos vem mostrando imunoexpressão dessas proteínas em CCEs, a exemplo do trabalho de Knopf *et al* (2017),⁵¹ que notaram maior expressão dessas proteínas em áreas

de metastase, quando comparadas a amostras de tumor primário. O que reforça a relação entre a expressão de CXCL12/CXCR4 com a maior agressividade de lesões. Todavia, no presente estudo não foi possível determinar associação das proteínas avaliadas com o potencial mais agressivo dos COs síndrômicos, visto a diversidade da expressão imunoistoquímica do complexo CXCL12/CXCR4 encontrada nessas lesões. A baixa expressão na maioria dos casos refletiu um papel diferenciado dessas proteínas nos COs isolados e síndrômicos. No entanto, pelo seu ineditismo, destaca-se a importância deste trabalho como o primeiro em avaliar a imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em COs, este poderá servir de embasamento para estudos futuros e nortear caminhos que venham a esclarecer os diferentes comportamentos dos COs.

Em suma, os achados do presente estudo sugerem que nos COs isolados e associados à síndrome de Gorlin-Goltz, no componente epitelial, a quimiocina CXCL12 e seu receptor principal parecem não exercer alguma função ou talvez apenas um papel pouco significativo em relação à patogênese e comportamento biológico dessas lesões. Na cápsula fibrosa é provável que as proteínas avaliadas possam estar implicadas na patogenia e diferenças do comportamento biológico dos diferentes tipos de COs, principalmente nos eventos angiogênicos lesionais.

Estudos subsequentes são necessários para avaliar a interação de CXCL12 com o receptor alternativo CXCR7 e/ou dímeros CXCR4/CXCR7, para confirmar ou descartar a atuação do eixo CXCL12/CXCR4/CXCR7 nos COs.

Referências

1. Schuch LF, Arruda JAA, Mosconi C, et al. A Brazilian multicentre study of 2,497 isolated cases of odontogenic keratocysts. *Oral Dis.* 2020; 26(03):711-715.
2. Speight PM, Takata T. New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. *Virchows Arch.* 2018; 472(03):331-339.
3. El-naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO (World Health Organization). WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4^a ed. International Agency for Research on Cancer-IARC Press, 2017; França.
4. Figueira JA, Batista FRS, Rosso K, Veltrini VC, Pavan AJ. Delayed diagnosis of Gorlin–Goltz syndrome: The importance of the multidisciplinary approach. *J Craniof Surg.* 2018; 29(06):530-531.

5. Gurdán Z, Gelencsér G, Lengyel Z, Szalma J. The complex dental and oral surgical management with 8-year follow up of a Gorlin–Goltz syndrome patient. *Orv Hetil.* 2020; 161(02):67-74.
6. Inoue S, Kurosaka H, Lee D, Yamashiro T. Multidisciplinary approach for treating malocclusion of patient with basal cell nevus syndrome: a case report. *Cleft Palate Craniofac J.* 2020; 57(02):255-262.
7. Silva BSF, et al. SOX2 and BCL-2 expressions in odontogenic keratocyst and ameloblastoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2020; 25(02):283-290.
8. Nonaka CFW, Cavalcante RB, Nogueira RLM, Souza LB, Pinto LP. Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(03):230-237.
9. Leonardi R, Perrotta RE, Crimi S, et al. Differential expression of TLR3 and TLR4 in ceratocystic odontogenic tumor (KCOT): A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent, and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015; 43(06):733-737.
10. Leite RB, Cavalcante RB, Nogueira RLM, et al. Analysis of GLUT-1, GLUT-3, and angiogenic index in syndromic and non-syndromic keratocystic odontogenic tumors. *Braz Oral Res.* 2017; 31:31-39.
11. Clementino MA, et al. Análise imunoistoquímica das galectinas 1, 3 e 7 em ceratocistos odontogênicos isolados e associados à síndrome de Gorlin, Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2018, p.49.
12. Janssens R, Struyf S, Proost P. Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018; 44:51-68.
13. Jaracz-ros A, Bernadat G, Cutolo P, et al. Differential activity and selectivity of N-terminal modified CXCL12 chemokines at the CXCR4 and ACKR3 receptors. *J Leukoc Biol.* 2020; 01:01-13.
14. Darakhshan S, Fatehi A, Hassanshahi G, et al. Serum concentration of angiogenic (CXCL1, CXCL12) and angiostasis (CXCL9, CXCL10) CXC chemokines are differentially altered in normal and gestational diabetes mellitus associated pregnancies. *J Diabetes Metab Disord.* 2019; 18(02):371-378.
15. Yazdani Z, Mousavi Z, Moradabadi A, Hassanshahi G. Significance of CXCL12/CXCR4 ligand/receptor axis in various aspects of acute myeloid leukemia. *Cancer Manag Res.* 2020; 12:2155-2165.
16. Mousavi A. CXCL12/CXCR4 signal transduction in diseases and its molecular approaches in targeted-therapy. *Immunol Lett.* 2020; 217:91-115.

17. Zhou Y, Cao HB, Li WJ, Zhao L. The CXCL12 SDF-1/CXCR4 chemokine axis: oncogenic properties, molecular targeting, and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy. *Chin J Nat Med.* 2018; 16(11):801-810.
18. Tony NGO, Stephens BS, Gustavsson M, et al. Crosslinking-guided geometry of a complete CXC receptor-chemokine complex and the basis of chemokine subfamily selectivity. *PLOS Biol.* 2020; 18(04):01-29.
19. Bree FA, Shah MR, et al. Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). *Am J Med Genet A.* 2011; 155A(09):2091-2097.
20. Ibrahim N, Nazimi AJ, Ajura AJ, Nordin R, Latiff ZA, Ramli R. The clinical features and expression of bcl-2, cyclin D1, p53, and proliferating cell nuclear antigen in syndromic and nonsyndromic keratocystic odontogenic tumor. *J Craniofac Surg.* 2016; 27(05):1361-1366.
21. Murphy PM, Heusinkveld L. Multisystem multitasking by CXCL12 and its receptors CXCR4 and ACKR3. *Cytokine.* 2018; 109:02-10.
22. Lin Y, Li Z, Xu C, et al. Design, synthesis, and evaluation of novel CXCR4 antagonists based on an aminoquinoline template. *Bioorg Chem.* 2020; 99:01-37.
23. Wang S, Chen C, Li J, Xu X, Chen W, Li F. The CXCL12/CXCR4 axis confers temozolomide resistance to human glioblastoma cells via up-regulation of FOXM1. *J Neurol Sci.* 2020; 414:01-32.
24. Gascon S, Solano AG, Kheir WE, et al. Characterization and mathematical modeling of alginate/chitosan-based nanoparticles releasing the chemokine CXCL12 to attract glioblastoma cells. *Pharmaceutics.* 2020; 12(04):356-377.
25. Albert S, Riveiro ME, Hamili C, et al. Focus on the role of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2013; 35(12):1819-1828.
26. De-Colle C, Monnich D, Welz S, et al. SDF-1/CXCR4 expression in head and neck cancer and outcome after postoperative radiochemotherapy. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2017; 05:28-36.
27. Burns JM, 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(09):2201-2213.
28. Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol. Pharmacol.* 2009; 75(05):1240-1247.
29. Naumann U, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *Plos One.* 2010; 05(02):9175-9204.
30. Bachelierie F, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX: update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol.* 2014; 66(01):01-79.

31. Benredjem B, Girard M, Rhainds D, St-Onge G, Heveker N. Mutational analysis of atypical chemokine receptor 3 (ACKR3/CXCR7) interaction with its chemokine ligands CXCL11 and CXCL12. *J Biol Chem*. 2017; 292(01):31-42.
32. Krikun G. The CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis in female reproductive tract disease: review. *Am J Reprod Immunol*. 2018; 80(05):01-08.
33. Gao JH, Yu XH, Tang CK. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) in atherosclerosis: an underlying therapeutic target. *Clin Chim Acta*. 2019; 495:538-544.
34. Lounsbury N. Advances in CXCR7 Modulators. *Pharmaceuticals*. 2020; 13(02):13-33.
35. Décaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits β -arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem*. 2011; 286(37):32188-32197.
36. Nibbs RJB, Graham GJ. Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(11):815-829.
37. Zhang L, Zhou Y, Sun X, Zhou J, Yang P. CXCL12 overexpression promotes the angiogenesis potential of periodontal ligament stem cells. *Sci Rep*. 2017; 07(01):10286-10294.
38. Yu Z, Han-Bo C, Wen-Jun L, Li Z. The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 chemokine axis: oncogenic properties, molecular targeting, and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy. *Chin J Nat Med*. 2018; 16(11):801-810.
39. Keeley EC, et al. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv. Cancer Res*. 2010; 106:91-111.
40. Ziegler ME, Hatch MMS, Wu N, Muawad SA, Hughes CCW. mTORC2 mediates CXCL12-induced angiogenesis. *Angiogenesis*. 2016; 19(3):359-371.
41. Zhao K, et al. LYG-202 inhibits activation of endothelial cells and angiogenesis through CXCL12/CXCR7 pathway in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2018; 39(4):588-600.
42. Meng X, Wuyi L, Yuhong X, Xinming C. Expression of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma: correlations with clinicopathology and pivotal role of proliferation. *J Oral Pathol Medic*. 2010; 39:63-68.
43. Scala S. Molecular pathways: targeting the CXCR4-CXCL12 axis untapped potential in the tumor microenvironment. *Clinic Cancer Res*. 2015; 21(19):4278-4285.
44. Galvão HC, Gordón-Núñez MA, Amorim RFB, Freitas RA, Souza LB. Immunohistochemical expression of protein 53, murine double minute 2, B-cell lymphoma 2, and proliferating cell nuclear antigen in odontogenic cysts and ceratocystic odontogenic tumor. *Indian J Dent Res*. 2013; 24(03):369-374.
45. Xia J, et al. Expressions of CXCL12/CXCR4 in oral premalignant and malignant lesions. *Mediators Inflamm*. 2012; 2012:01-05.

46. Gupta SK, Pillarisetti, K. Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. *J Immunol.* 1999; 163(05):2368-2372.
47. Duquenne C, Psomas C, Gimenez S, et al. The two human CXCR4 isoforms display different HIV receptor activities: consequences for the emergence of X4 strains. *J Immunol.* 2014; 193(08):4188-4194.
48. Sánchez-Martín L, Sánchez-Mateos P, Cabañas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med.* 2013; 19(01):12-22.
49. Cavalla F, Reyes M, Vernal R, et al. High levels of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 in apical lesions of endodontic origin associated with mast cell infiltration. *J Endod.* 2013; 39(10):1234-1239.
50. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(01):25-31.
51. Kpnof A, et al. Primary tumor-associated expression of CXCR4 predicts formation of local and systemic recurrency in head and neck squamous cell carcinoma. 2017; *Oncotarget.* 8(68):112739-112747.

Tabelas:**Tabela 1.** Dados descritivos do índice de positividade (IP) de CXCL12 e CXCR4 em células epiteliais e da cápsula fibrosa de COs isolados e sindrômicos. Campina Grande – PB, 2020.

CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS	CXCL12		CXCR4				
	Citoplasma		Citoplasma		Núcleo		
	Mediana (Q ₂₅ - Q ₇₅)	<i>p</i>	Mediana (Q ₂₅ - Q ₇₅)	<i>p</i>	Mediana (Q ₂₅ - Q ₇₅)	<i>p</i>	Total n (%)
ISOLADOS (células epiteliais)	10,48 (1,71-34,56)		00,36 (00,14 - 75,62)		48,75 (30,55-8,75)		21(100%)
SINDRÔMICOS (células epiteliais)	00,84 (00,84-2,20)	<0,001	39,60 (14,07-67,35)	0,080	13,79 (2,68-51,10)	0,007	21(100%)
ISOLADOS (células da cápsula fibrosa)	17,29 (6,59-25,24)		03,17 (00,65-7,10)		03,54 (2,95-14,74)		21(100%)
SINDRÔMICOS (células da cápsula fibrosa)	03,79 (1,44-9,24)	<0,001	5,58 (00,69-13,56)	0,352	11,95 (6,76-17,45)	0,054	21(100%)

COs: ceratocistos odontogênicos.

Tabela 02. Correlação do índice de positividade (IP) de CXCL12 e CXCR4 em epitélio de COs isolados e sindrômicos. Campina Grande - PB,2020.

CORRELAÇÕES	CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS											
	ISOLADOS						SINDRÔMICOS					
	CXCL12/ EPITÉLIO		CXCR4 CITOPLASMA		CXCR4 / NÚCLEO		CXCL12/ EPITÉLIO		CXCR4 CITOPLASMA		CXCR4 / NÚCLEO	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CXCL12 / CITOPLASMA	1,000	-----	- 0,314	0,166	- 0,068	0,769	1,000	-----	- 0,175	0,449	- 0,110	0,636
CXCR4 / CITOPLASMA	- 0,314	0,166	1,000	-----	0,159	0,491	- 0,175	0,449	1,000	-----	0,730	<0,001
CXCR4 / NÚCLEO	- 0,068	0,769	0,159	0,491	1,000	-----	- 0,110	0,636	0,730	<0,001	1,000	-----

COs: ceratocistos odontogênicos.

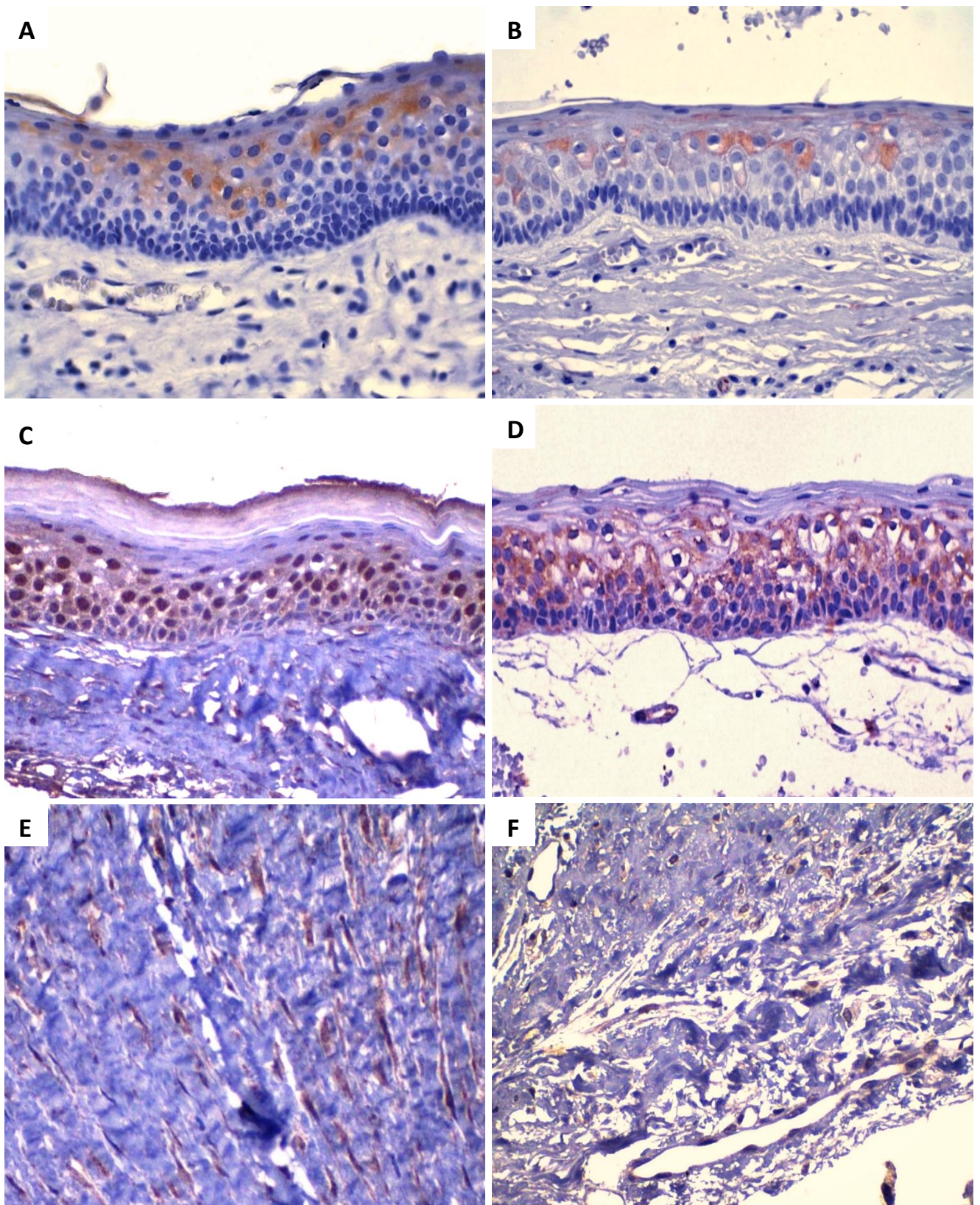


Figura 1. **A.** Expressão epitelial de CXCL12 em CO isolado; **B.** Expressão epitelial de CXCL12 em CO sindrômico; **C.** Expressão epitelial (nuclear) de CXCR4 em CO isolado; **D.** Expressão epitelial (citoplasmática) de CXCR4 em CO sindrômico; **E.** Expressão de CXCR4 em células endoteliais e fibroblastos de CO isolado e **F.** Expressão de CXCR4 em células endoteliais de CO sindrômico (Reveal, 400 x).

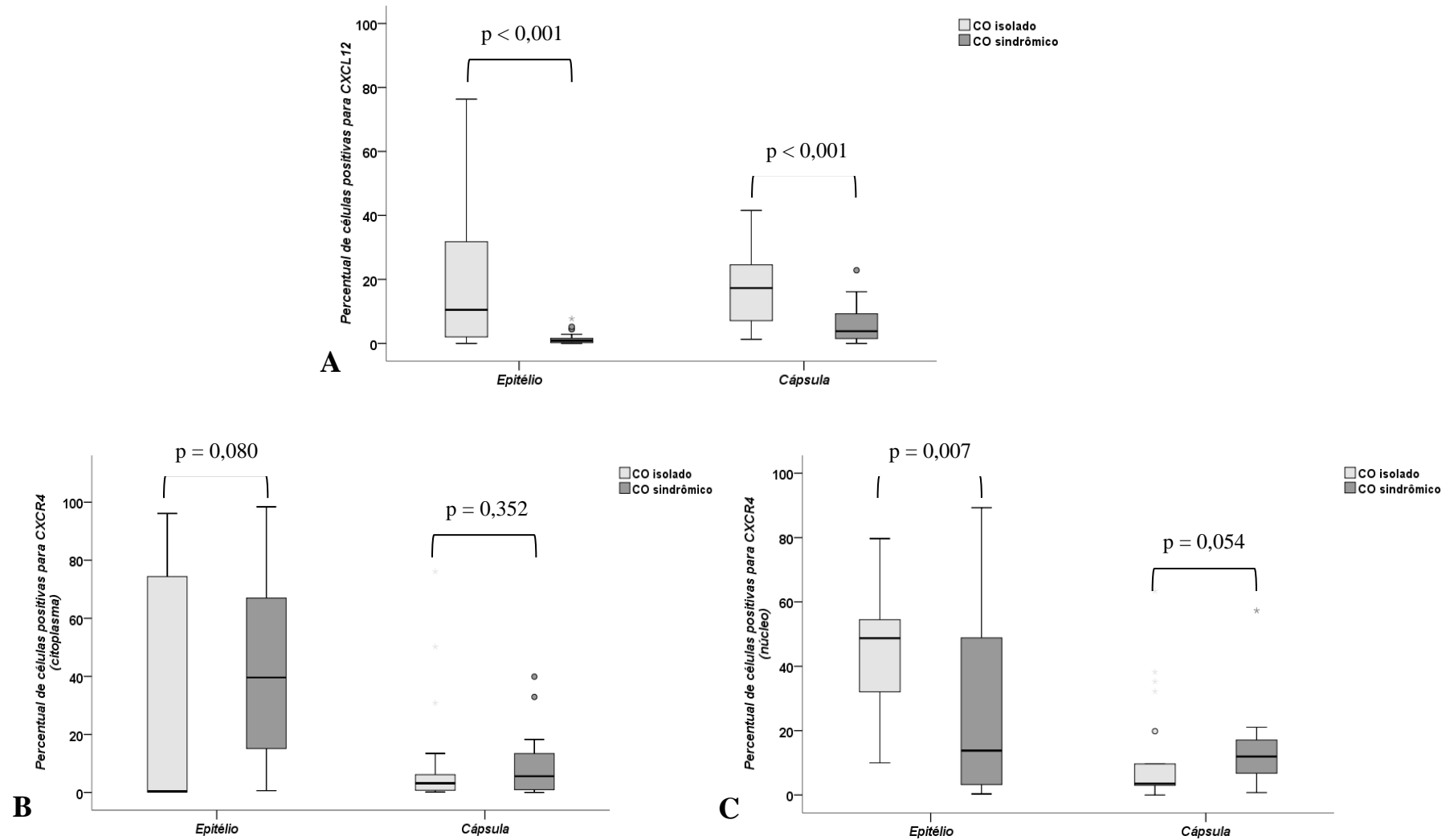


Figura 02. BoxPlots relativos aos percentuais de células epiteliais e fibroblastos/células endoteliais imunopositivas aos anticorpos anti-CXCL12 (citoplasma de células epiteliais e fibroblastos/células endoteliais [A]) e anti-CXCR4 (citoplasma de células epiteliais e fibroblastos/células endoteliais [B] e núcleo [C]) em COs isolados e sindrômicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversas investigações científicas tem objetivado esclarecer os diferentes mecanismos patológicos relacionados ao desenvolvimento dos COs, que justifiquem o comportamento biológico diferenciado entre as lesões isoladas e as associadas à síndrome de Gorlin-Goltz. O presente estudo demonstrou que a expressão imunoistoquímica da quimiocina CXCL12 em COs isolados e sindrômicos foi pouco significativa, com distribuição focal, principalmente em células das camadas suprabasais do limitante epitelial. Quanto à expressão imunoistoquímica do receptor CXCR4, esta foi detectada predominantemente focal em citoplasma e núcleo de células epiteliais suprabasais em todos os COs isolados e sindrômicos.

Mediante os resultados obtidos, nas células do limitante epitelial, a quimiocina CXCL12 e o receptor CXCR4 talvez exerçam um papel pouco significativo em relação à patogênese e comportamento biológico de COs. Na cápsula fibrosa, é provável que as proteínas avaliadas possam estar implicadas em algum mecanismo associado à patogenia e diferenças no comportamento biológico dos diferentes tipos de COs, potencialmente nos eventos angiogênicos.

Baseado nesses resultados e nas informações da literatura que apontam que COs isolados e sindrômicos apresentam comportamento biológico diferente e embora em neoplasias a expressão de CXCL12 tenha sido associada a lesões mais agressivas, os resultados sugerem que provavelmente nos COs, principalmente nos sindrômicos, essa quimiocina não tenha participação preponderante na patogenia e comportamento dessas lesões.

REFERÊNCIAS

- 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.1819-1828, 2013.
- ALVES, M. K. S. **Identificação de alterações moleculares associadas à expressão de CD133, CXCR4, CD44 E OLIG2 e ao padrão de metilação em promotor de CDKN2A em tumores astrocíticos.** Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde). Universidade Federal do Ceará-UFC. Fortaleza/CE, p.42, 2014.
- ANTONOGLOU, G. N.; SÁNDOR, G. K.; KOIDOU, V. P.; PAPAGEORGIOU, S. N. Non-syndromic and syndromic keratocystic odontogenic tumors: systematic review and meta-analysis of recurrences. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.42, n.07, p.364-371, 2014.
- APAJALAHTI, S.; HAGSTRÖM, J.; LINDQVIST, C.; SUOMALAINEN, A. Computerized tomography findings and recurrence of keratocystic odontogenic tumor of the mandible and maxillofacial region in a series of 46 patients. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.111, n.03, p.29-37, 2011.
- ARAGAKI, T. *et al.* Comprehensive keratin profiling reveals different histopathogenesis of keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cyst. **Human Pathology**, v.41, n.12, p.1718-1725, 2010.
- BAE, Y. K. *et al.* The significance of SDF-1 α -CXCR4 axis in in vivo angiogenic ability of human periodontal ligament stem cells. **Molecules and Cells**, v.40, n.06, p.386-392, 2017.
- BACHELERIE, F. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX: update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacological Reviews**, v.66, n.01, p.01-79, 2014.
- BENREDJEM, B. *et al.* Mutational analysis of atypical chemokine receptor 3 (ACKR3/CXCR7) interaction with its chemokine ligands CXCL11 and CXCL12. **Journal of Biological Chemistry**, v.292, n.01, p.31-42, 2017.
- BILODEAU, E. A.; COLLINS, B. M. Odontogenic cysts and neoplasms. **Surgical Pathology Clinics**, v.10, n.01, p.177-222, 2017.
- BOOMS, P.; HARTH, M.; SADER, R.; GHANAATI, S. Vismodegib hedgehog-signaling inhibition and treatment of basal cell carcinomas as well as keratocystic odontogenic tumors in Gorlin syndrome. **Annals of Maxillofacial Surgery**, v.5, n.14, p.05-14, 2015.
- BORGHESI, A. *et al.* Odontogenic keratocyst: imaging features of a benign lesion with an aggressive behaviour. **Insights into Imaging**, v.9, n.05, p.883-897, 2018.
- BREE, F. A. *et al.* Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). **American Journal of Medical Genetics**, v.155A, n.09, p.2091-2097, 2011.

BURNS, J.M. *et al.* A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. **Journal of Experimental Medicine**, v.203, n.9, p.2201-2213, 2006.

CADAVID, A. M. H. *et al.* Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway proteins (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, and Gli3) in sporadic and syndromic odontogenic keratocysts. **Clinical Oral Investigations**, v.23, n.01, p.153-159, 2019.

CAVALLA, F. *et al.* High levels of CXC ligand 12/stromal cell-derived factor 1 in apical lesions of endodontic origin associated with mast cell infiltration. **Journal of Endodontics**, v.39, n.10, p.1234-1239, 2013.

CLEMENTINO, M. A. **Análise imunoistoquímica das galectinas 1, 3 e 7 em ceratocistos odontogênicos isolados e associados à síndrome de Gorlin.** Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, p.49. 2018.

DARAKHSHAN, S. *et al.* Serum concentration of angiogenic (CXCL1, CXCL12) and angiostasis (CXCL9, CXCL10) CXC chemokines are differentially altered in normal and gestational diabetes mellitus associated pregnancies. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v.18, n.02, p.371-378, 2019.

DÉCAILLOT, F.M. *et al.* CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits β -arrestin to enhance cell migration. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.37, p.32188-32197, 2011.

DE-COLLE, C. *et al.* SDF-1/CXCR4 expression in head and neck cancer and outcome after postoperative radiochemotherapy. **Clinical and Translational Radiation Oncology**, v.05, p.28-36, 2017.

DE MOLON, R. *et al.* Five years follow-up of a keratocyst odontogenic tumor treated by marsupialization and enucleation: a case report and literature review. **Contemporary Clinical Dentistry**, v.6, n.106, p.20-28, 2015.

DUQUENNE, C. *et al.* The two human CXCR4 isoforms display different HIV receptor activities: consequences for the emergence of X4 strains. **Journal of Immunology**, v.193, n.08, p.4188-4194, 2014.

EL-NAGGAR, A. K. *et al.* WHO (World Health Organization). WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4^a ed. **International Agency for Research on Cancer-IARC Press**, França, 2017.

FIGUEIRA, J. A. *et al.* Delayed diagnosis of Gorlin–Goltz syndrome: The importance of the multidisciplinary approach. **Journal of Craniofacial Surgery**, v.29, n.06, p.530-531, 2018.

FUKADA, S. Y. *et al.* Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**, v.24, n.01, p.25-31, 2009.

GALDES, C.; MINTOFF, D.; CLARK, E. Gorlin-Goltz syndrome: a rare syndrome presenting as an even rarer de novo case with numerous features and complications. **Skinmed Journal**, v.17, n.05, p.324-327, 2019.

GALVÃO, H. C. *et al.* Immunohistochemical expression of protein 53, murine double minute 2, B-cell lymphoma 2, and proliferating cell nuclear antigen in odontogenic cysts and ceratocystic odontogenic tumor. **Indian Journal of Dental Research**, v.24, n.03, p.369-374, 2013.

GAO, J. H.; YU, X. H.; TANG, C. K. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) in atherosclerosis: an underlying therapeutic target. **Clinica Chimica Acta**, v.495, p.538-544, 2019.

GASCON, S. *et al.* Characterization and mathematical modeling of alginate/chitosan-based nanoparticles releasing the chemokine CXCL12 to attract glioblastoma cells. **Pharmaceutics**, v.12, n.04, p.01-21, 2020.

GORLIN, R. J. Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. **Medicine**, v.66, n.2, p.98-113, 1987.

GORLIN, R. J.; GOLTZ, R. W. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib a syndrome. **New England Journal of Medicine**, v.262, n.05, p.908-912, 1960.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions. **Acta Médica Portuguesa**, v.24, n.04, p.967-976, 2011.

GURDÁN, Z.; GELENCSEÉR, G.; LENGYEL, Z.; SZALMA, J. The complex dental and oral surgical management with 8-year follow up of a Gorlin–Goltz syndrome patient. **Orvosi Hetilap**, v.161, n.02, p.67-74, 2020.

GUPTA, S. K.; PILLARISETTI, K. Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. **Journal of Immunology**, v.163, n.05, p.2368-2372, 1999.

GUPTA, S. R.; JAETLI, V.; MOHANTY, S.; SHARMA, R. Nevoid basal cell carcinoma syndrome in Indian patients: a clinical and radiological study of 6 cases and review of literature. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.113, n.01, p.99-110, 2012.

HARMON, M.; ARRIGAN, M.; TONER, M.; O'KEEFFE, S. A. A radiological approach to benign and malignant lesions of the mandible. **Clinical Radiology**, v.70, n.04, p.335-350, 2015.

IBRAHIM, N. *et al.* The clinical features and expression of bcl-2, cyclin D1, p53, and proliferating cell nuclear antigen in syndromic and nonsyndromic keratocystic odontogenic tumor. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v.27, n.05, p.1361-1366, 2016.

INOUE, S.; KUROSAKA, H.; LEE, D.; YAMASHIRO, T. Multidisciplinary approach for treating malocclusion of patient with basal cell nevus syndrome: a case report. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v.57, n.02, p.255-262, 2020.

JANSSENS, R.; STRUYF, S.; PROOST, P. Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.44, p.51-68, 2018.

JARACZ-ROS, A. *et al.* Differential activity and selectivity of N-terminal modified CXCL12 chemokines at the CXCR4 and ACKR3 receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v.01, p.01-13, 2020.

JENG, K. S. *et al.* Role of C-X-C chemokine ligand 12/C-X-C chemokine receptor 4 in the progression of hepatocellular carcinoma (Review). **Oncology Letters**, v.14, n.01, p.1905-1910, 2017.

JOHN, A. M.; SCHWARTZ, R. A. Basal cell naevus syndrome: an update on genetics and treatment. **British Journal of Dermatology**, v.174, n.01, p.68-76, 2016.

JOHNSON, N. R.; BATSTONE, M. D.; SAVAGE, N. W. Management and recurrence of keratocystic odontogenic tumor: a systematic review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.116, n.04, p.271-276, 2013.

JOHNSON, N. R.; GANNON, O. M.; SAVAGE, N. W.; BATSTONE, M. D. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v.5, n.01, p.09-14, 2014.

KALATSKAYA, I. *et al.* AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. **Molecular Pharmacology**, v.75, n.05, p.1240-1247, 2009.

KARHADE, D.S.; AFSHAR, S.; PADWA, B. L. What is the prevalence of undiagnosed nevoid basal cell carcinoma syndrome in children with an odontogenic keratocyst? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.77, n.07, p.1389-1391, 2019.

KARIN, N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease. **Journal of Leukocyte Biology**, v.88, n.03, p.463-73, 2010.

KEELEY, E. C. *et al.* CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. **Advances in Cancer Research**, v.106, p. 91-111, 2010.

KIMONIS, V. E. *et al.* Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v.69, n.03, p.299-308, 1997.

KPNOF, A. *et al.* Primary tumor-associated expression of CXCR4 predicts formation of local and systemic recurrency in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v.8, n.68, p.112739-112747, 2017.

KITISUBKANCHANA, J. *et al.* Odontogenic keratocyst and ameloblastoma: radiographic evaluation. **Oral Radiology**, v.01, n.01, p.01-11, 2020.

KRIKUN, G. The CXL12/CXCR4/CXCR7 axis in female reproductive tract disease: review. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.80, n.05, p.01-08, 2018.

- LAZARIDOU, M. N.; KATOPODI, T.; DIMITRAKOPOULOS, I. Gorlin-Goltz syndrome: a 25-year follow-up of a familial case. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v.19, n.01, p.79-84, 2015.
- LEITE, R. B. *et al.* Analysis of GLUT-1, GLUT-3, and angiogenic index in syndromic and non-syndromic keratocystic odontogenic tumors. **Brazilian Oral Research**, v.31, p.31-39, 2017.
- LEONARDI, R. *et al.* Differential expression of TLR3 and TLR4 in ceratocystic odontogenic tumor (KCOT): A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent, and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.43, n.06, p.733-737, 2015.
- LIN, Y. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of novel CXCR4 antagonists based on an aminoquinoline template. **Bioorganic Chemistry**, v.99, p.01-37, 2020.
- LOUNSBURY, N. Advances in CXCR7 Modulators. **Pharmaceutics**, v.13, n.02, p.13-33, 2020.
- MACDONALD, D. S. A systematic review of the literature of nevoid basal cell carcinoma syndrome affecting east Asians and north Europeans. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.120, n.03, p.396-407, 2015.
- MACDONALD-JANKOWSKI, D. S. Keratocystic odontogenic tumour: systematic review. **Dentomaxillofacial Radiology**, v.40, n.01, p.01-23, 2011.
- MALAGUEZ, G. G. *et al.* Podoplanin expression in odontogenic keratocysts associated or not associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v.00, n.00, p.1-5, 2019.
- MENDES- ABREU, J. *et al.* Síndrome de Gorlin-Goltz: Diagnóstico e hipóteses de tratamento. **Acta Médica Portuguesa**, v.30, n.5, p.418-421, 2017.
- MENG, X.; WUYI, L.; YUHONG, X.; XINMING, C. Expression of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma: correlations with clinicopathology and pivotal role of proliferation. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.39, p.63-68, 2010.
- MONTEIRO, B. V. B. *et al.* Participation of hMLH1, p63, and MDM2 proteins in the pathogenesis of syndromic and nonsyndromic keratocystic odontogenic tumors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.120, n.01, p.52-56, 2015.
- MOUSAVI, A. CXCL12/CXCR4 signal transduction in diseases and its molecular approaches in targeted-therapy. **Immunology Letters**, v.217, p.91-115, 2020.
- MURPHY, P. M.; HEUSINKVELD, L. Multisystem multitasking by CXCL12 and its receptors CXCR4 and ACKR3. **Cytokine**, v.109, p.02-10, 2018.
- NAGASAWA, T. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. **Journal Molecular Medicine**, v.92, n.05, p.433-439, 2014.

NAUMANN, U. *et al.* CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. **Plos One**, v.05, n.02, p.9175-9204, 2010.

NIBBS, R. J. B.; GRAHAM, G. J. Immune regulation by atypical chemokine receptors. **Nature Reviews Immunology**, v.13, n.11, p.815-829, 2013.

NONAKA, C. F. W. *et al.* Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. **Archives of Oral Biology**, v.57, n.03, p.230-237, 2012.

PAWIG, L. *et al.* Diversity and inter-connections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: molecular perspectives. **Frontiers in Immunology**, v.06, n.429, p.01-23, 2015.

RAJAGOPAL, S.; RAJAGOPAL, K.; LEFKOWITZ, R. J. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, n.05, p.373-86, 2010.

RAYNER, C. R.; TOWERS, J. F.; WILSON, J. S. What is Gorlin's syndrome? The diagnosis and management of the basal cell naevus syndrome, based on a study of thirty-seven patients. **British Journal of Plastic Surgery**, v.30, n.1, p.62-67, 1977.

RIBEIRO-JÚNIOR, O. *et al.* Reclassification and treatment of odontogenic keratocysts: a cohort study. **Brazilian Oral Research**, v.31, p.98-108, 2017.

SÁNCHEZ-MARTÍN, L.; SÁNCHEZ-MATEOS, P.; CABAÑAS, C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v.19, n.01, 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.

SCARFE, W. C.; TOGHYANI, S.; AZEVEDO, B. Imaging of benign odontogenic lesions. **Radiologic Clinics of North America**, v.56, n.01, p.45-62, 2018.

SCHUCH, L. F. *et al.* A Brazilian multicentre study of 2,497 isolated cases of odontogenic keratocysts. **Oral Diseases**, v.26, n.03, p.711-715, 2020.

SILVA, B. S. F. *et al.* SOX2 and BCL-2 expressions in odontogenic keratocyst and ameloblastoma. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v.25, n.02, p.283-290, 2020.

SINGH, A. K. *et al.* Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.24, n.01, p.41-49, 2013.

SPEIGHT, P. M.; TAKATA, T. New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. **Virchows Archiv**, v.472, n.03, p.331-339, 2018.

TANDON, S.; CHAUHAN, Y.; SHARMA, M.; JAIN, M. Gorlin-Goltz syndrome: A rare case report of a 11-year-old child. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.9, n.3, p.264-268, 2016.

TONY, N. G. O. *et al.* Crosslinking-guided geometry of a complete CXC receptor-chemokine complex and the basis of chemokine subfamily selectivity. **PLOS Biology**, v.18, n.04, p.01-29, 2020.

VANDERCAPPELLEN, J.; VAN DAMME, J.; STRUYF, S. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.22, n.01, p.01-18, 2011.

VIJAYARANGAN, S.; BASKARA PANDIAN, V. Management of the odontogenic keratocyst - six cases with conservative management supported by chemical and electrochemical cauterization. **Cureus Journal of Medical Science**, v.11, n.11, p.01-12, 2019.

WANG, Z. *et al.* Oncogenic roles and drug target of CXCR4/CXCL12 axis in lung cancer and cancer stem cell. **Tumor Biology**, v.37, n.07, p.8515-8528, 2016.

WANG, S. *et al.* The CXCL12/CXCR4 axis confers temozolomide resistance to human glioblastoma cells via up-regulation of FOXM1. **Journal of the Neurological Sciences**, v.414, p.01-32, 2020.

XIA, J. *et al.* Expressions of CXCL12/CXCR4 in oral premalignant and malignant lesions. **Mediators Inflamm**, v.2012, p.01-05, 2012.

YAMAMOTO, T. *et al.* Nevroid basal cell carcinoma syndrome: clinical features and implications of development of basal cell carcinoma in skin and keratocystic odontogenic tumor in jaw and their gene expressions. **Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.23, n.01, p.105-112, 2011.

YAZDANI, Z.; MOUSAVI, Z.; MORADABADI, A.; HASSANSHAHI, G. Significance of CXCL12/CXCR4 ligand/receptor axis in various aspects of acute myeloid leukemia. **Cancer Management and Research**, v.12, p.2155-2165, 2020.

YU, Z.; HAN-BO, C.; WEN-JUN, L.; LI, Z. The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 chemokine axis: oncogenic properties, molecular targeting, and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.16, n.11, p.801-810, 2018.

ZHANG, L. *et al.* CXCL12 overexpression promotes the angiogenesis potential of periodontal ligament stem cells. **Scientific Reports**, v.07, n.01, p.10286-10294, 2017.

ZHAO, K. *et al.* LYG-202 inhibits activation of endothelial cells and angiogenesis through CXCL12/CXCR7 pathway in breast cancer. **Carcinogenesis**, v.39, n.4, p.588-600, 2018.

ZHOU, Y.; CAO, HB.; LI, WJ.; ZHAO, L. The CXCL12 SDF-1/CXCR4 chemokine axis: oncogenic properties, molecular targeting, and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.16, n.11, p.801-810, 2018.

ZHOU, W. *et al.* Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy. **Current Medicinal Chemistry**, v.26, n.17, p.3026-3041, 2019.

ZIEGLER, M.E. *et al.* mTORC2 mediates CXCL12-induced angiogenesis. **Angiogenesis**, v.19, n.3, p.359-371, 2016.

ANEXOS

ANEXO A- Parecer do comitê de ética em pesquisa da UEPB.

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



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da pesquisa: IMUNOEXPRESSIONÃO DE CXCL12 E CXCR4 EM CERATOCISTOS ODONTOGÊNICOS ISOLADOS E ASSOCIADOS À SÍNDROME DE GORLIN-GOLTZ

Pesquisador: MANUEL ANTONIO GORDÓN-NÚÑEZ

Área temática:

Versão: 1

CAAE: 14786819.5.0000.5187

Instituição proponente: Universidade Estadual da Paraíba-UEPB

Patrocinador principal: Universidade Estadual da Paraíba-UEPB

DADOS DO PARECER:

Número do Parecer: 3.373.526

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

Esse estudo objetiva analisar a imunoe expressão da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4, em COs isolados e associados à síndrome de Gorlin Goltz, visando determinar se existem diferenças da imunoe expressão dessas proteínas entre tais lesões e obter informações que contribuam com o conhecimento do papel do complexo CXCL12/CXCR4 em mecanismos patológicos relacionados ao desenvolvimento dessas lesões e o seu comportamento biológico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em se tratando de uma pesquisa que realizará a coleta de dados em fichas clínicas e utilizará lâminas histológicas e espécimes biológicos mantidos em arquivo, os riscos potenciais implicados na participação nesta pesquisa são mínimos. Neste contexto, deve-se considerar a possibilidade de exposição dos dados pessoais dos pacientes. Este risco, no entanto, será minimizado pelo uso de codificações que garantirão a privacidade e confidencialidade dos dados, assegurando que não sejam utilizadas quaisquer indicações que possam identificar os participantes da pesquisa.

Quanto aos benefícios, frente aos resultados deste estudo, serão analisados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta as etapas exigidas pela Plataforma Brasil, está seguindo a Resolução 466/12 do MS, apresenta num texto de fácil entendimento e uma sequência lógica de metodologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em consonância com o desenvolvimento da pesquisa e o solicitado pelo CEP.

Recomendações:

Solicitamos que concluída a pesquisa, os resultados sejam enviados em forma de relatório a este CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é viável, está embasado cientificamente e conforme preconiza a Resolução 466/12 do MS. Portanto, emitimos parecer favorável.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações básicas do projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1337460.pdf	30/05/2019 19:52:49	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Outros	JUSTIFICATIVA_POPULACAO_AMOSTRA_ESTUDO.docx	30/05/2019 19:50:48	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_CONCORDANCIA.docx	30/05/2019 19:48:46	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Outros	TERMO_DE_AUTORIZACAO_INSTITUCIONAL.docx	30/05/2019 19:43:48	Wliana Pontes de Lima	Aceito

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	30/05/2019 19:40:43	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.docx	07/05/2019 19:29:37	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Outros	Autorizacao_institucional_UNIFOR.docx	07/05/2019 19:11:02	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Outros	Termo_compromisso_coleta_dados_arquivo _UNIFOR.docx	07/05/2019 19:01:58	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Outros	Termo_autorizacao_UEPB.docx	07/05/2019 18:50:46	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Outros	Termo_compromisso_coleta_dados_arquivo _UEPB.docx	07/05/2019 18:49:26	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Outros	Termo_compromisso_pesquisador_responsa vel.docx	07/05/2019 18:41:24	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	07/05/2019 18:39:57	Wliana Pontes de Lima	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	07/05/2019 18:39:12	Wliana Pontes de Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_TCLE.docx	07/05/2019 18:16:13	Wliana Pontes de Lima	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINA GRANDE, 06 de Junho de 2019

Assinado por:
Dóris Nóbrega de Andrade Laurentino
(Coordenador(a))

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

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. Submission, 2. Aims and Scope, 3. Manuscript, Categories and Requirements, 4. Preparing the Submission, 5. Editorial Policies and Ethical Considerations, 6. Author Licensing, 7. Publication Process After Acceptance, 8. Post Publication, 9. Editorial Office Contact Details.

1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Data protection

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

Preprint policy

Please find the Wiley preprint policy here.

This journal accepts articles previously published on preprint servers.

Journal of Oral Pathology & Medicine will consider for review articles previously available as preprints. Authors may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

For help with submissions, please contact: JOPM.office@wiley.com

2. AIMS AND SCOPE

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. The journal does not usually consider papers on periodontal or related diseases. 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.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

i. Original Research Articles

Journal of Oral Pathology & Medicine welcomes 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.

Word limit: 3,000 words maximum, excluding abstract and references.

Abstract: 250 words maximum; must be structured, under the sub-headings: Background, Methods, Results, Conclusion. Should not contain abbreviations.

References: Maximum of 30 references.

Figures/Tables: Total of no more than 6 figures and/or tables.

Main Text Structure: 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. Please see the Editorial Policies and Ethical Considerations section for requirements related to Clinical Trials, Experimental Subjects and Suppliers.
- **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.

ii. Review Articles

Journal of Oral Pathology & Medicine commissions review articles and also welcomes uninvited reviews. Reviews are subject to peer-review.

Word limit: 3,000 words maximum, excluding abstract and references.

Abstract: 250 words maximum. Should not contain abbreviations. Please choose headings appropriate for the article.

References: Maximum of 50 references.

Figures/Tables: Total of no more than 6 figures and/or tables.

Main Text must 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.

iii. Systematic Reviews

A systematic review is a comprehensive high-level summary of primary research on a specific research question that attempts to identify, select, synthesise and appraise all (high-quality) evidence relevant to that question. A meta-analysis uses statistical methods to quantitatively evaluate pooled data from single studies. Many pathological reviews are likely not to have sufficient data on clinical outcomes to warrant a meta-analysis.

While the content of a systematic review will be partly determined by the topic and evidence, as a minimum the review should:

- Clearly state the purpose of the review
- Determine inclusion and exclusion criteria to generate a PRISMA flowchart that includes identification of studies, screening, eligibility and inclusion data (See Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J et al, The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ* 2009; 339: b2700)
- Determine the primary end point of the review ie. acceptance or rejection of the null hypothesis
- Clearly describe the search methodology [databases (preferably more than one), search terms]
- Describe the process of data extraction
- Undertake statistical assimilation if appropriate
- Evaluate the quality and/or risk of bias of the studies included preferably using a standard assessment tool (See Guyatt, GH, Oxman AD, Vist GE et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2008; 336: 924-926)
- Provide recommendations for future researches

Word limit: 3,000 words maximum, excluding abstract and references.

Abstract: 250 words maximum. Should not contain abbreviations. Please choose headings appropriate for the article.

References: Maximum of 50 references.

Figures/Tables: Total of no more than 6 figures and/or tables.

Main Text must 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.

Systematic reviews must be registered in the PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews) database and the registration number provided in the text.

iv. Brief Reports

Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports.

Word limit: 1,000 words maximum, excluding abstract and references.

Abstract: 250 words maximum. Should not contain abbreviations. Please choose headings appropriate for the article.

References: Maximum of 10 references.

Figures/Tables: Total of no more than 3 figures and tables.

v. 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.

Word limit: 750 words maximum, excluding abstract and references.

References: Maximum of 5 references.

Figures/Tables: Total of no more than one figure and table.

Case Reports: Please note that *Journal of Oral Pathology & Medicine* no longer accepts submissions of case reports. The journal also does not accept case reports with an extensive literature review.

4. PREPARING THE SUBMISSION

Cover Letters

Cover letters are not mandatory; however, they may be supplied at the author's discretion.

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- i. A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's best practice SEO tips);
- ii. A short running title of less than 40 characters;
- iii. The full names of the authors;
- iv. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- v. Acknowledgments;
- vi. Abstract and keywords;
- vii. Main text;
- viii. References;
- ix. Tables (each table complete with title and footnotes);
- x. Figure legends;
- xi. Appendices (if relevant).

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on eligibility for author listing.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in

the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

Abstracts and keywords are required for some manuscript types. For details on manuscript types that require abstracts, please refer to the 'Manuscript Types and Criteria' section.

Keywords

Please provide 2-5 keywords. Authors are encouraged to choose keywords from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at www.nlm.nih.gov/mesh.

References

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. For more information about AMA reference style please consult the AMA Manual of Style.

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.

Internet document

3. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2003*. <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2003PWSecured.pdf> Access March 3, 2003.

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted.

Color Figures. Figures submitted in color may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

Reproduction of Copyright Material

If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, credit must be shown in the contribution. It is the author's responsibility to also obtain written permission for reproduction from the copyright owners. For more information visit Wiley's Copyright Terms & Conditions FAQ at http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-terms--conditions_301.html

Data Citation

Please review Wiley's data citation policy [here](#).

Additional Files

Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only. Use only standard abbreviations. 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.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website for more information about SI units.
- Use no roman numerals in the text.
- In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used.

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available here. In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on Writing for Search Engine Optimization.

Article Preparation Support: Wiley Editing Services offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for Preparing Your Article for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Guidelines for Cover Submissions: If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please follow these general guidelines.

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Manuscripts are single-blind or transparent peer reviewed, depending on the choice of the authors. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is available [here](#).

Transparent Peer Review

This journal is participating in the Peer Review Transparency project. By submitting to this journal, authors agree that the reviewer reports, their responses, and the editor's decision letter will be linked from the published article to where they appear on Publons in the case that the article is accepted. Authors have the opportunity to opt out during submission, and reviewers may remain anonymous unless they would like to sign their report.

Appeal of Decision

All papers are handled by the editor and an associate editor and after peer review and any reject decision is final. The editors will not enter in to correspondence with authors about rejected papers.

Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: Declaration of Helsinki; US Federal Policy for the Protection of Human Subjects; or European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice. It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Patient anonymity should be preserved. When detailed descriptions, photographs, or videos of faces or identifiable body parts are used that may allow identification, authors should obtain the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a standard patient consent form available for use. Where photographs are used they need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized; black eye bars should not be used as they do not sufficiently protect an individual's identity).

Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the ARRIVE guidelines for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.
- UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).
- European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU.

Suppliers

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

Clinical Trial Registration

The journal requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are encouraged to adhere to recognised research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

- Randomised trials: CONSORT
Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.
- Observational studies: STROBE
- Systematic reviews: PRISMA or PROSPERO
Systematic reviews must be registered in the PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews) database and the registration number provided in the text.
- Case reports : CARE
- Qualitative research : SRQR
- Diagnostic / prognostic studies : STARD
- Quality improvement studies : SQUIRE
- Economic evaluations : CHEERS
- Animal pre-clinical studies : ARRIVE
- Study protocols : SPIRIT
- Clinical practice guidelines : AGREE

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from:

- Future of Research Communications and e-Scholarship (FORCE11)
- National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines
- The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues
- Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities (MIBBI) website
- FAIRsharing website

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms together with the manuscript on submission. The disclosure statement should be included under Acknowledgements. Please find the form below:

Conflict of Interest Disclosure Form

The form above does not display correctly in the browsers. If you see an error message starting with "Please wait...", we recommend that you download the file to your computer. Saving a local copy on your computer should allow the form to work properly.

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; and
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options. Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. ‘X and Y should be considered joint first author’ or ‘X and Y should be considered joint senior author.’

Data Sharing and Data Accessibility

Please review Wiley's policy [here](#). This journal encourages and peer review data sharing.

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

All accepted manuscripts may elect to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. Sample statements are available [here](#). If published, statements will be placed in the heading of your manuscript.

Publication Ethics

This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley's [Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors](#) [here](#). Wiley's [Publication Ethics Guidelines](#) can be found [here](#).

ORCID

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. Find more information [here](#).

6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available here. To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please click here. (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click here.)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click here for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: If you choose to publish using OnlineOpen you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available here.

Funder Open Access: Please click here for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with Wiley Author Services. The author will be asked to sign a publication license at this point.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance and appear in PDF format only. They are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked and are indexed by PubMed. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so

it is accurate for indexing. Subsequently, the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

Proofs

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with full instructions on how to provide proof corrections.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

Publication Charges

Page Charges. Articles exceeding 8 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters. In case an article exceeds 8 pages including references the author will be invoiced after publication.

Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. Early View (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

8. POST PUBLICATION

Access and sharing

When the article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).

- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Promoting the Article

To find out how to best promote an article, [click here](#).

Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist partnerships with Kudos and Altmetric.

9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

For queries about submissions, please contact JOPM.office@wiley.com

Author Guidelines Updated 22 November 2019.

