



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

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 EM CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL EM INDIVÍDUOS JOVENS E IDOSOS**

DANIELLA DE LUCENA MORAIS

CAMPINA GRANDE/PB

2019

DANIELLA DE LUCENA MORAIS

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 EM CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL EM INDIVÍDUOS JOVENS E IDOSOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

CAMPINA GRANDE/PB

2019

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.

M827a Morais, Daniella de Lucena.
Análise da imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em carcinomas de células escamosas de língua oral em indivíduos jovens e idosos [manuscrito] / Daniella de Lucena Morais. - 2019.
100 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."
1. Carcinoma de células escamosas. 2. Língua. 3. Quimiocinas. I. Título

21. ed. CDD 616.994 31

DANIELLA DE LUCENA MORAIS

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12 E CXCR4 EM CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL EM INDIVÍDUOS JOVENS E IDOSOS**

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.

Apresentado em : 30/07/2019

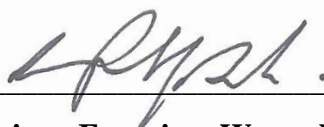
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro/ UFCG
Membro Titular (1º Examinador)



Prof. Dra. Pollianna Muniz Alves/ UEPB
Membro Titular (2º Examinador)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka/ UEPB
Membro Titular (Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus**;
Ao meu **filho** a razão do meu viver;
Ao meu **marido**;
Aos meu **pais**,
E ao meu orientador **Cassiano Nonaka**.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu filho amado, **Fifilho** (como mamãe te chama), com inúmeras ocupações de mamãe você foi o que sofreu mais com minha ausência, quero te pedir desculpas por não acompanhar seu crescimento como mamãe queria, desculpas por chegar cansada e sem fôlego para brincar, por fazer você sentir ciúmes do computador, por descontar meu stress em você só porque derrubou o copo de suco na mesa. Sei que hoje você não vai entender direito algumas escolhas que fazemos na vida adulta, mas talvez quando você tiver oportunidade de ler essa mensagem possa entender que todas essas renúncias e sacrifícios foram por você e pela nossa família. Não se sinta jamais menos amado e cuidado, pois onde eu estava meu coração e meu pensamento estavam com você. Mamãe te ama demais e ama chegar em casa e ver seu sorriso no rosto, dizendo: MAMÃE VOCÊ CHEGOOOUUU?!?!, isso que me fortalece e me fez hoje comemorar com você mais essa vitória.

Ao meu marido e companheiro **JAKSON**, a vida nos proporcionou responsabilidades que sonhávamos em tê-las, porém sentíamos inseguros. De repente erámos, pais, profissionais, dono de casa e marido e mulher. Não foi fácil assumir e organizar todos esses afazeres em um equilíbrio e até hoje tem sido um desafio, no entanto, você tem se mostrado muitas vezes mais maduro que eu. Obrigado por me apoiar em minhas decisões e objetivos, mas quero te agradecer ainda mais por me ajudar a não esquecer que os valores sentimentais, a família, o nosso filho, a nossa vida conjugal é a maior riqueza que podemos construir. Você é um ser humano que sempre vê o lado bom das coisas, faz os defeitos serem pequenos em inúmeros qualidades e se preocupa diariamente em nos fazer feliz, por isso me apaixonei por você há 12 anos. Mais uma vitória nossa, fruto do nosso esforço, amadurecimento e amor! TE AMO!

Aos meus **PAIS**, sem eles eu não seria nada nem ninguém. Engraçado porque eles sempre me disseram que os valores de pai e mãe só se sabe quando se tem um filho, e hoje posso sentir na pele, não que não os valorizasse, mas talvez não desse a importância merecida. Pai e mãe deixam seus sonhos, seus afazeres, suas obrigações com si próprio e faz pelo filho. Para filho pode parecer algo natural, para os pais são grandes renúncias e sacrifícios que são movidos pelo amor. E como não ser GRATA? Painho e Mainha até hoje vocês têm sido meu alicerce, minha paz e meu refúgio. Obrigado por acreditar em mim quando todos diziam ao contrário, por me proporcionar uma educação de qualidade e por investir nos meus sonhos.

Obrigado pelo colo, aconchego, excesso de amor com meu filho e por suprir minhas ausências na vida dele. Obrigado por me fazer essa mãe, esposa, e profissional que hoje eu sou. Painho, Mainha... foram vocês que me apoiaram e me deram força para hoje eu estar aqui! AMO VOCÊS, vencemos!

Ao meu orientador querido! Professor **Cassiano Nonaka**, serei eternamente grata ao senhor por tudo que vivi e cresci durante esses dois anos, mesmo com tantas peculiaridades (trabalho, filho, morar fora) jamais deixou de acreditar em mim e me instigar, foi sempre muito compreensivo, paciente, preocupado e atencioso. Saiba que quando me vejo como profissional, imediatamente penso no senhor, pois és um profissional completo em todo sentidos, sim em todos sentidos, não só no ensinamento, didática e conhecimento, mas também, na postura, dedicação e responsabilidade com o seu trabalho. Confesso que ser orientanda de Nonaka, C.F.W, não é para qualquer um, exige muita responsabilidade e dedicação, no entanto, se ganha crescimento, conhecimento e uma enorme satisfação. Enfim, muito obrigado pela confiança em mim depositada em uma relação de cumplicidade e respeito, que me fizeram hoje chegar até aqui! MINHA GRATIDÃO SEMPRE!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, por ser o meu refúgio, minha fortaleza e minha fonte inesgotável de esperança.

“Jesus manso e humilde de coração, fazei nosso coração semelhante ao vosso”

Aos meu **irmãos, Daniel e Wilmar Filho**, pelo apoio e incentivo.

A minha **Avó (Vovó Céu)**, por todas as orações e inúmeras velas acendidas. Te amo vovó.

A minha Tia querida **Beta**, obrigado por tanto amor, tanto carinho e por ser a fonte de união da família Lucena. Te amo demais!!

Aos meu **Primos (Andréa, Andrezza e André)**, pela torcida durante todo esse tempo.

Aos meu **Sogros (Seu Assis e Dona Koka)**, pelo apoio e compreensão.

Ao meu **GRUPO DE AMIGOS DE PESQUISA (Luana, Manu, Fabianna, Amanda e Allany)**, por toda ajuda, apoio e confiança. Agradeço a DEUS pela a amizade construída durante esse tempo, tornamos tudo mais leve com a nossa união. Vocês moram em meu coração.

A minha amiga **Luana Samara Balduino de Sena**, você foi minha mão amiga para a realização dessa pesquisa, sua contribuição foi imensamente responsável pelo sucesso final. Além disso, tive a oportunidade de lhe conhecer melhor e fortalecer nossos laços de amizade que se Deus quiser levaremos para sempre.

Aos meus amigos do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB (**Luanzito, Ingrid, Wliana, Walter, Manu, Luana, Amanda, Allany e Fabianna**), obrigado pelo apoio e inúmeros momentos de descontração.

À técnica de laboratório *Denize Núbia Souza*, por tornar nossos dias mais leves e alegres. Pelos comentários irreverentes e a sinceridade. Te admiro muito, Denize!

À técnica de laboratório *Ana Luzia Araújo Batista (Aninha)*, por ser a mãezona do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, se preocupando e cuidando de todo mundo. Gosto demais de você, Aninha!

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta dissertação, *Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro, Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves, Profa. Dra. Hellen Bandeira de Pontes Santos e Prof. Dr. Manuel Antônio Gordón-Nuñez*, pelo aceite em participar desta banca, pelo empenho e dedicação na leitura deste trabalho e desde já, pelas contribuições que serão apresentadas!

A *Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves*, pelas demonstrações de carinho, amizade e cuidado. Te admiro muito, professora!

Ao meu orientador (*Prof. MSc. Dmitry José de Santana Sarmiento*) e coorientador (*Prof. MSc. Sérgio Henrique Gonçalves de Carvalho*) da graduação pelo incentivo, confiança e amizade. Sou fruto do profissionalismo de vocês. Gratidão sempre!

Ao *Prof. Dr. Tiago João da Silva Filho*, sempre tão solícito, prestativo e carinhoso. Te adoro Ti!

Ao meu amigo *Eraldo Viana*, pela amizade, carinho e cuidado. Você foi um dos meus presentes do mestrado. Te amo amigo!

A todos os meus colegas da turma de *mestrado 2017*, pelo coleguismo, união e conhecimento compartilhado.

A amiga *Dioliane*, sempre foi meu refúgio na *Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB*. Obrigado pela amizade construída. Saudades!

A todos os professores do *Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB*, em especial *Profa. Dra. Daniela Pita de Melo, Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa*,

Profa. Dra. Ana Flávia Granville-Garcia, Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka e Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves, que sempre demonstraram tanto carinho por mim.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e torceram por mim: Danylle, Danyelle, Lívia, Felipe, Davi, Maria Aline, Fabrícia, Lulinha, Cinthya, Elaine e Romana.

As minhas amigas ***Manu, Fabi e Ingrid***, não sei como agradecer tanto amor durante esses dois anos, vocês foram anjos que tornaram meus dias mais felizes. Obrigada por toda amizade compartilhada durante todo esse tempo. Amo vocês.

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

Ao ***Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano***, pela concessão de casos que permitiram o desenvolvimento desta pesquisa.

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

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”

Ayrton Senna

RESUMO

RESUMO

O carcinoma de células escamosas de língua oral (CCELO) é uma neoplasia maligna epitelial que se caracteriza pelo potencial de invasão e desenvolvimento de metástases linfonodais. Embora usualmente diagnosticado em indivíduos acima dos 60 anos, nas últimas duas décadas, tem-se observado um aumento importante na incidência do CCELO em pacientes abaixo dos 45 anos. Evidências científicas sugerem a existência de diferenças no perfil das alterações genéticas do CCELO entre indivíduos jovens e idosos, além de eventuais diferenças no comportamento biológico desta neoplasia relacionadas à idade. Estudos têm demonstrado que a quimiocina CXCL12, também denominada fator 1 α derivado de células estromais (SDF-1 α), e o receptor de quimiocina CXCR4 podem estar envolvidos na patogênese e progressão do CCELO. No entanto, até o presente momento, pouco se sabe sobre eventuais diferenças na expressão dessas proteínas no CCELO relacionadas à idade dos pacientes. Dessa forma, este estudo se propôs a avaliar a imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em CCELO em indivíduos jovens e idosos. A amostra foi constituída por 42 casos de CCELO (21 deles diagnosticados em indivíduos jovens [\leq 45 anos] e 21 em idosos [\geq 60 anos]). Dados clínicos (sexo, idade, localização anatômica da lesão e estágio clínico) foram coletados a partir de prontuários médicos. No estudo morfológico, o grau histopatológico de malignidade dos CCELO foi avaliado no *front* de invasão tumoral. Para o estudo imunoistoquímico, sob aumento de 400 \times , foram estabelecidos os percentuais de células epiteliais com positividade nuclear (CXCR4) e citoplasmática (CXCR4 e CXCL12) em 10 campos microscópicos do *front* de invasão tumoral. Foi observada positividade para CXCL12 em 10 (47,6%) casos de CCELO no grupo de indivíduos jovens e em 12 (57,1%) casos no grupo de indivíduos idosos. A análise isolada dos casos positivos para CXCL12 revelou percentual mediano de 35,7% no grupo de jovens e de 2,4% no grupo de idosos, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos etários ($p = 0,222$). Foi constatada positividade citoplasmática para CXCR4 em 16 (76,2%) casos de CCELO no grupo de indivíduos idosos (mediana: 23,9%) e em 11 (52,4%) casos no grupo de indivíduos jovens (mediana: 1,1%) ($p = 0,052$). Por sua vez, a análise da imunoexpressão nuclear de CXCR4 revelou positividade em 17 (80,9%) casos de CCELO no grupo de indivíduos idosos (mediana: 10,6%) e em 8 (38,1%) casos no grupo de indivíduos jovens (mediana: 0,0%), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,001$). Considerando os parâmetros clinicopatológicos, foram constatadas diferenças estatisticamente significativas apenas na imunoexpressão de CXCL12 nos CCELO de indivíduos idosos. No referido grupo, lesões com padrão de invasão em pequenos grupos de células neoplásicas revelaram maior imunoexpressão citoplasmática de CXCL12 ($p = 0,027$). Foi identificada correlação positiva, estatisticamente significativa, apenas para as expressões citoplasmáticas e nucleares de CXCR4 nos CCELO, tanto para o grupo dos indivíduos idosos ($r = 0,507$; $p = 0,019$) quanto para o dos jovens ($r = 0,495$; $p = 0,023$). Os resultados do presente estudo sugerem um potencial envolvimento de CXCR4 e CXCL12 na patogênese de alguns casos de CCELO e, adicionalmente, suportam a existência de diferenças nas bases moleculares dessa neoplasia maligna relacionadas à idade dos pacientes. A progressão tumoral nos CCELO, no entanto, pode não estar relacionada à expressão dessas proteínas.

Palavras-chaves: Carcinoma de células escamosas; Língua; Quimiocinas; Imunoistoquímica; Grupos etários.

ABSTRACT

ABSTRACT

Oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC) is an epithelial malignant neoplasm characterized by the potential for invasion and development of lymph node metastases. Although usually diagnosed in individuals over 60 years of age in the last two decades, a significant increase in the incidence of OTSCC has been observed in patients under 45 old of age. Scientific evidence suggests the existence of differences in the profile of the genetic alterations of OTSCC among young and elderly individuals, in addition to possible differences in the biological behavior of this neoplasm related to age. Studies have shown that the chemokine CXCL12, also called stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α), and the chemokine receptor CXCR4 may be involved in the pathogenesis and progression of OTSCC. However, to date, little is known about possible differences in the expression of these proteins in the OTSCC related to the age of the patients. Thus, this study aimed to evaluate the immunoexpression of CXCL12 and CXCR4 in OTSCC in young and elderly individuals. The sample consisted of 42 cases of OTSCC (21 of them diagnosed in young individuals [≤ 45 years] and 21 in the elderly [≥ 60 years old]). Clinical data (sex, age, anatomical location of the lesion and clinical stage) were collected from medical records. In the morphological study, the histopathological grade of malignancy of the OTSCC was evaluated on the *front* of tumor invasion. For the immunohistochemical study, the percentages of epithelial cells with nuclear (CXCR4) and cytoplasmic (CXCR4 and CXCL12) positivity were established in 10 microscopic magnification of the tumor invasion front. CXCL12 positivity was observed in 10 (47.6%) cases of OTSCC in the group of young individuals and in 12 (57.1%) cases in the elderly group. The isolated analysis of the positive cases for CXCL12 revealed a median percentage of 35.7% in the young group and 2.4% in the elderly group, with no statistically significant difference between the age groups ($p = 0.222$). Cytoplasmic positivity for CXCR4 was found in 16 (76.2%) cases of OTSCC in the group of elderly individuals (median: 23.9%) and in 11 (52.4%) cases in the group of young individuals (median: 1, 1%) ($p = 0.052$). In turn, the analysis of CXCR4 nuclear immunoexpression revealed positivity in 17 (80.9%) cases of OTSCC in the elderly group (median: 10.6%) and in 8 (38.1%) cases in the (median: 0.0%), with a statistically significant difference between groups ($p = 0.001$). Considering the clinicopathological parameters, statistically significant differences were observed only in the immunoexpression of CXCL12 in the OTSCC of elderly individuals. In this group, lesions with invasion pattern in small groups of neoplastic cells revealed greater cytoplasmic immunoexpression of CXCL12 ($p = 0.027$). A positive statistically significant correlation was found only for the cytoplasmic and nuclear expression of CXCR4 in the OTSCC, both for the elderly group ($r = 0.507$, $p = 0.019$) and for the young group ($r = 0.495$, $p = 0.023$). The results of the present study suggest a potential involvement of CXCR4 and CXCL12 in the pathogenesis of some cases of OTSCC and, in addition, support the existence of differences in the molecular bases of this malignant neoplasia related to the patients' age. Tumor progression in OTSCC, however, may not be related to the expression of these proteins.

Keywords: Squamous cell carcinoma; Tongue; Chemokines; Immunohistochemistry; Age groups.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- B88: Linhagem celular de carcinoma de células escamosas de língua oral.
- CAL27: Linhagem celular de carcinoma de células escamosas de língua oral.
- CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- CCE: Carcinoma de células escamosas.
- CCEO: Carcinoma de células escamosas oral.
- CCELO: Carcinoma de células escamosas de língua oral.
- CC: Do inglês *family chemokine CC*, traduzido como família de quimiocinas CC.
- CD34: Do inglês *cluster of differentiation 34*, traduzido como grupamento de diferenciação 34.
- CAFs: Fibroblastos associados ao câncer.
- CXC: Do inglês *family chemokine CXC*, traduzido como família de quimiocinas CXC.
- CX₃C: Do inglês *family chemokine CX₃C*, traduzido como família de quimiocinas com três resíduos de aminoácidos intervenientes CX₃C.
- CXCL12: Do inglês *stromal cell derived factor-1 (SDF-1)*, traduzido como fator 1 derivado de células estromais.
- CXCR4: Do inglês *CXC chemokine receptor-4*, traduzido como receptor 4 de quimiocina CXC.
- CXCR1: Do inglês *CXC chemokine receptor-1*, traduzido como receptor 1 de quimiocina CXC.
- CXCR16: Do inglês *CXC chemokine receptor-16*, traduzido como receptor 16 de quimiocina CXC.
- CCR1: Do inglês *CC chemokine receptor-1*, traduzido como receptor 1 de quimiocina CC.
- CCR10: Do inglês *CC chemokine receptor-10*, traduzido como receptor 10 de quimiocina CC.
- CX₃CR1: Do inglês *CX₃C receptor-1*, traduzido como receptor 1 de quimiocina CX₃C.
- CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- DNA: Do inglês *deoxyribonucleic acid*, traduzido como ácido desoxirribonucleico.
- ELISA: Do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*, traduzido como ensaio de

	imunoabsorção enzimática.
EMT:	Transição epitélio-mesequimal.
ERK:	Do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i> , traduzido como proteína quinase regulada por sinal extracelular.
HIV:	Do inglês <i>human immunodeficiency virus</i> , traduzido como vírus da imunodeficiência humana.
HNt:	Linhagem celular de carcinoma de células escamosas de língua oral.
HPV:	Do inglês <i>human papilloma virus</i> , traduzido como papiloma vírus humano.
HSC3:	Linhagem celular de carcinoma de células escamosas de língua oral.
HUVECs:	Células endoteliais de veia umbilical humana.
IL-1:	Do inglês <i>interleukin 1</i> , traduzido como interleucina 1.
IL-6	Do inglês <i>interleukin 6</i> , traduzido como interleucina 6.
kDa:	Quilodáton.
Ki-67:	Proteína de proliferação celular.
MMP:	Do inglês <i>matrix metalloproteinase</i> , traduzido como metaloproteinase de matriz.
OMS:	Organização Mundial da Saúde.
PCR:	Do inglês <i>polymerase chain reaction</i> , traduzido como reação em cadeia da polimerase.
PD-L1:	Do inglês <i>programmed death-ligand 1</i> , traduzido como ligante de morte programada 1.
PKB:	Proteína quinase B.
pTNM:	Estágio patológico TNM.
RNA _m :	Ácido ribonucleico mensageiro.
RNA _{sh} :	Vetor para silenciamento de genes.
RNA _i :	Vetor para silenciamento de genes.
RT-PCR:	Do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i> , traduzido como reação de transcrição reversa em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.
SPSS:	Do inglês <i>statistical package for social sciences</i> , traduzido como programa estatístico para ciências sociais.
SCC4:	Linhagem celular de carcinoma de células escamosas de língua oral.
SCC9:	Linhagem celular de carcinoma de células escamosas de língua oral.

- TNF: Do inglês *tumor necrosis factor*, traduzido como fator de necrose tumoral.
- TNM: Tumor-Nodo-Metástase.
- TRIS: Tris-hidroximetil-aminometano.
- UPA: Do inglês *urokinase plasminogen activator*, traduzido como ativador de plasminogênio do tipo uroquinase.
- UEPB: Universidade Estadual da Paraíba.
- USA: Do inglês *United States of America*, traduzido como Estados Unidos da América.
- µm: Micrômetro.
- XCR1: Do inglês *XC chemokine receptor-1*, traduzido como receptor 1 de quimiocina XC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Interação de quimiocina com seu receptor. Os receptores são compostos por domínios transmembranares extracelulares, constituídos pela região N-terminal, responsáveis pela interação com as quimiocinas, e por domínios intracelulares, constituídos pela região C-terminal, responsáveis pela transdução de sinal..... 34
- Figura 2.** Interação de CXCL12 com os receptores CXCR4 e CXCR7. Quando CXCL12 se liga com CXCR4 pode ativar as vias MAPK e PI3K/Akt, induzindo a sobrevivência, proliferação e quimiotaxia celular, ou a via GRK/ β -arrestina, com a internalização e translocação de CXCR4. A ligação de CXCL12 com CXCR7 ativa GRK/ β -arrestina, determinando a eliminação de CXCL12..... 36
- Figura 3.** Possível participação de CXCL12 e CXCR4 no desenvolvimento de metástases em neoplasias malignas. Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) secretam altos níveis de CXCL12. Células neoplásicas do tumor primário com alta expressão de CXCR4 se disseminam através da corrente sanguínea, interagindo com a quimiocina CXCL12 presente em regiões com alto índice de expressão dessa proteína, formando o tumor secundário..... 37
- Quadro 1.** Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.....
- Quadro 2.** Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo..... 46
- Quadro 3.** Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCEO, preconizado por Sobin e Wittekind (2002)..... 46
- Quadro 4.** Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCEO, preconizado por Sobin e Wittekind (2002)..... 47
- Quadro 5.** Sistema de gradação histopatológica de malignidade no *front* de invasão, proposto por Bryne *et al.* (1992)..... 48
- Quadro 6.** Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo..... 49
- Figura 1.** Positividade citoplasmática para CXCL12 em CCELO de indivíduo jovem (A) e idoso (B) (Reveal, 400x e 200x). Imunoexpressão citoplasmática de CXCR4 em CCELO de indivíduo jovem (C) e idoso

(D) (Reveal, 400x). Imunoexpressão nuclear de CXCR4 em CCELO de indivíduo jovem (E) e idoso (F) (Reveal, 400x)..... 70

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários.....	65
Tabela 2.	Distribuição absoluta e relativa dos casos de CCELO de acordo com o grupo etário e os parâmetros clinicopatológicos.....	65
Tabela 3.	Tamanho da amostra, mediana e variação dos percentuais de imunexpressão de CXCL12 nos CCELO de indivíduos jovens e idosos e suas diferenças em relação aos parâmetros clinicopatológicos.....	66
Tabela 4.	Tamanho da amostra, mediana e variação dos percentuais de imunexpressão de CXCL12 nos CCELO de indivíduos jovens e idosos e suas diferenças em relação ao grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório.....	67
Tabela 5.	Tamanho da amostra, mediana e variação dos percentuais de imunexpressão de CXCR4 nos CCELO de indivíduos jovens e idosos e suas diferenças em relação aos parâmetros clinicopatológicos.....	68
Tabela suplementar 1.	Tamanho da amostra, mediana e variação dos percentuais de imunexpressão de CXCR4 nos CCELO de indivíduos jovens e idosos e suas diferenças em relação ao grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório.....	69

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	30
2	OBJETIVOS.....	41
2.1	Objetivo geral.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
3	METODOLOGIA.....	43
3.1	Aspectos éticos.....	43
3.2	Caracterização do estudo.....	43
3.3	População.....	43
3.4	Amostra.....	43
3.4.1	Critérios de inclusão.....	43
3.4.2	Critérios de exclusão.....	44
3.5	Variáveis.....	44
3.6	Estudo clínico.....	45
3.7	Estudo morfológico.....	47
3.8	Estudo imunoistoquímico.....	48
3.8.1	Método imunoistoquímico.....	48
3.8.2	Análise imunoistoquímica.....	50
3.9	Análise estatística.....	50
4	ARTIGO.....	52
4.1	Apresentação.....	52
4.2	Artigo a ser submetido.....	53
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXOS.....	81
	APÊNDICES.....	102

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna epitelial que corresponde a mais de 90% das neoplasias malignas orais (LEITE *et al.*, 2018). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), há uma estimativa anual de 529.000 novos casos de câncer de boca, e mais de 300.000 mortes (WHO, 2017). O CCE oral (CCEO) é o sétimo tipo mais comum de câncer em brasileiros. Estima-se, para cada ano do biênio 2018-2019, 11.200 casos novos em homens e 3.500 em mulheres (LEITE *et al.*, 2018; INCA, 2018).

A etiologia do CCEO é multifatorial. O tabaco e o álcool são os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento dessa neoplasia, especialmente quando atuam sinergicamente (WARNAKULASURIYA, 2009; MONTERO; PATEL, 2015; LEITE *et al.*, 2018). Outros fatores associados ao desenvolvimento do CCEO incluem exposição excessiva à radiação ultravioleta, particularmente para lesões em lábio, além de mastigação de bétel, deficiências nutricionais, imunossupressão e susceptibilidade genética (BODNER *et al.*, 2014; DE MORAIS *et al.*, 2017). A infecção pelo papilomavírus humano (HPV), embora seja motivo de debate contínuo, também tem sido associada ao desenvolvimento do CCEO (SCULLY; BAGAN, 2009; LEITE *et al.*, 2018).

Dentre os diversos sítios anatômicos em cavidade oral, a língua é acometida com maior frequência pelo CCE (BODNER *et al.*, 2014). O CCE de língua oral (CCELO) se caracteriza pelo potencial de invasão às estruturas adjacentes e pelo desenvolvimento de metástases linfonodais regionais, os quais contribuem para as morbidades e mortalidades significativas associadas à doença (FREITAS *et al.*, 2010; MUCKE *et al.*, 2016).

Tipicamente, o CCEO é diagnosticado em homens acima dos 60 anos, com longo histórico de consumo de tabaco e álcool (LISTL *et al.*, 2013; MAJCHRZAK *et al.*, 2014; FARQUHAR *et al.*, 2018). Nas últimas duas décadas, no entanto, estudos observaram um aumento importante na incidência do CCEO em pacientes jovens (18 – 45 anos), especialmente em mulheres (PATEL *et al.*, 2011; SABA *et al.*, 2011; NG *et al.* 2017; FARQUHAR *et al.*, 2018), com frequências variando de 3,3% a 13% (SOUDRY *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2016). Tais variações na frequência do CCEO nessa população específica podem estar relacionadas à ausência de padronização, nos estudos, da idade para definir os grupos de indivíduos jovens e não jovens (FONSECA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016; HUSSEIN *et al.*, 2017).

Clinicamente, os CCEO podem ser apresentar como úlcera de margens irregulares, elevadas e firmes à palpação, como nódulo exofítico, com superfície verrucosa e limites imprecisos ou, ainda, como placa branca ou avermelhada (MCDOWELL, 2006; SCULLY; FELIXS, 2006; BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). Tais aspectos clínicos não tendem a exibir variações relacionadas às idades dos pacientes (KAPILA *et al.*, 2017). Entre outros sinais e sintomas que podem estar presentes, destacam-se: dor, sangramento, halitose, linfonodos regionais palpáveis e fixos, alteração na fonação e dificuldade de deglutição, dependendo da localização anatômica (IZARZUGAZA; ESPARZA; AGUIRRE, 2001).

Histopatologicamente, os CCEO se caracterizam por lençóis, cordões, ninhos ou pequenos grupos de células epiteliais neoplásicas que invadem o tecido conjuntivo subjacente. As células neoplásicas podem apresentar diversas alterações morfológicas, incluindo nucléolos proeminentes, hipercromatismo nuclear, multinucleação e disceratose, com eventual formação de pérolas córneas, além de figuras atípicas de mitose. É possível observar graus variados de pleomorfismo celular e nuclear, com alteração da relação núcleo/citoplasma. O estroma é constituído por tecido conjuntivo fibroso, permeado por infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade variável (LOURENÇO *et al.*, 2007; NEVILLE *et al.*, 2016).

O tratamento de escolha para o CCEO é a ressecção cirúrgica, que pode ser realizada de forma isolada ou associada à radioterapia ou à quimioterapia (BEENA *et al.*, 2011; MONTERO; PATEL, 2015). Estudos recentes também têm sugerido uma potencial aplicação da imunoterapia no tratamento dessas neoplasias malignas, por meio da inibição de moléculas como a proteína ligante-1 de morte programada (PD-L1) (HANNA *et al.*, 2018).

Algumas pesquisas têm relatado uma maior agressividade da lesão em indivíduos jovens, com maiores índices de recorrência locorregional e comprometimento linfonodal após o tratamento (UDEABOR *et al.*, 2012; FARQUHAR *et al.*, 2018), ao passo que outras investigações não observaram diferenças significativas relacionadas à idade no comportamento biológico dessa neoplasia (BODNER *et al.*, 2014; MAJCHRZAK *et al.*, 2014; KAPILA; NATARAJAN; BOAZ, 2017; FARQUHAR *et al.*, 2018).

Os CCELO que se desenvolvem em pacientes jovens são considerados, por alguns autores, como uma lesão distinta do diagnosticado em idosos (FARQUHAR *et al.*, 2018; BENEVENUTO *et al.*, 2012). Neste sentido, análises moleculares têm revelado uma maior quantidade de anormalidades no ácido desoxirribonucleico (DNA) nos CCELO em indivíduos jovens quando comparados aos CCELO em pacientes idosos (SANTOS-SILVA *et al.*, 2011).

Diversos fatores podem influenciar na agressividade dos tumores, incluindo localização anatômica, tamanho da lesão primária, nível de envolvimento dos tecidos

circunvizinhos, presença de metástase no momento do diagnóstico e grau histopatológico de malignidade (SILVEIRA *et al.*, 2007). Portanto, a padronização de dados que possibilitem a classificação dos tumores, como o sistema de estadiamento clínico TNM, pode auxiliar na predição da evolução clínica da lesão, nortear a conduta terapêutica e estimar a sobrevida do paciente (MARZOUK; SCHOFIELD, 2011).

O TNM se baseia na extensão anatômica da doença, no intuito de fornecer informações sobre o prognóstico e auxiliar no planejamento do tratamento (SOBIN; WITTEKIND, 2002; SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND *et al.*, 2010). Por meio da avaliação do tamanho do tumor (T), das metástases em linfonodos regionais (N) e das metástases à distância (M), esse sistema permite a classificação da doença em estágios que variam de I a IV (ALLISON; LOCKER; FEINE, 1998; SOBIN; WITTEKIND, 2002; SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2010).

Em pacientes jovens, estudos têm reportado uma maior frequência de CCEO em estágios avançados (III e IV), com percentuais que variam de 50% a 84,4% (RIBEIRO *et al.*, 2009; KAMINAGAKURA *et al.*, 2011; HILLY *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2017). Essa elevada proporção em jovens pode estar relacionada a um diagnóstico tardio ou a um comportamento mais agressivo do CCEO relacionado à idade (SOUDRY *et al.*, 2010).

Contudo, a existência de casos diagnosticados em estágios iniciais, tratados corretamente, e que, apesar disso, culminam com o óbito dos pacientes, não condizendo com a indicação clínica TNM, tem suscitado a instituição de outros fatores prognósticos para suplementar este sistema clínico (LOURENÇO *et al.*, 2007). Os sistemas de gradação histopatológica de malignidade (SGHM) para os CCEO surgiram com o intuito de fornecer conhecimentos adicionais que pudessem explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes (LOURENÇO *et al.*, 2007). Segundo Kurokawa *et al.* (2005), as características histopatológicas da neoplasia são importantes porque podem refletir a relação imunológica entre o tumor e o hospedeiro.

No SGHM proposto por Bryne *et al.* (1992) consideraram a área do *front* de invasão do CCEO para avaliar quatro parâmetros: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. Para estes autores, as características morfológicas no *front* invasão do CCEO podem refletir melhor o prognóstico destas neoplasias, já que vários eventos moleculares importantes ocorrem nessa região.

Vários estudos têm investigado fatores capazes de influenciar o prognóstico e a sobrevida de pacientes com CCEO. Embora variáveis clínicas (sítio anatômico, tamanho do tumor primário e metástase) e morfológicas sejam utilizadas como indicadores do

comportamento biológico e prognóstico de CCEO, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de identificar indicadores moleculares e/ou imunoistoquímicos do comportamento biológico dessas neoplasias (KNOPF *et al.*, 2015).

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas, com peso molecular de 8 a 12kD (KUFAREVA; SALANGA; HANDEL, 2015), responsáveis pela migração direcionada de leucócitos, podendo coordenar o movimento celular durante a inflamação, assim como o transporte homeostático das células hematopoiéticas, linfócitos e células dendríticas. São induzidas por citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (BALKWILL *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2016).

Essas citocinas quimiotáticas são capazes de interagir com receptores transmembrana acoplados à proteína G. Tais receptores são compostos por domínios transmembranares, sendo a porção extracelular constituída pela região N-terminal e por alças extracelulares que atuam na ligação às quimiocinas. A porção intracelular, por sua vez, é formada pela região C-terminal e por alças intracelulares que participam na transdução de sinais. Uma vez que as quimiocinas se ligam aos receptores transmembrana acoplados à proteína G, ocorre uma sinalização em cascata que culmina com o estímulo à migração celular (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; NAGASAWA, 2014) (FIGURA 1).

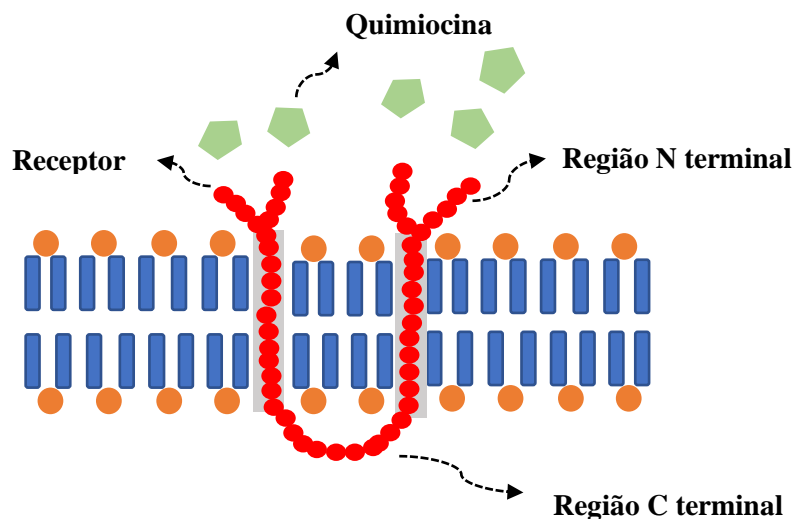


Figura 1. Interação de quimiocina com seu receptor. Os receptores são compostos por domínios transmembranares extracelulares, constituídos pela região N-terminal, responsáveis pela interação com as quimiocinas, e por domínios intracelulares, constituídos pela região C-terminal, responsáveis pela transdução de sinal.

De acordo com o arranjo dos resíduos de cisteína, as quimiocinas podem ser classificadas em quatro subfamílias: CXC, CC, C e CX₃C, sendo que C representa cisteína e X ou X₃ representam um ou três aminoácidos entre as cisteínas, respectivamente. Até o momento, foram identificados aproximadamente 50 diferentes quimiocinas, designadas CC, CXC, CX₃C, C e 28 receptores diferentes de quimiocinas, designados de CXCR1 a CXCR16, CCR1 a CCR10, XCR1 e CX₃CR1 (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; MILLER; MAYO, 2017).

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

Dentre as quimiocinas, uma das mais estudadas é o fator 1 α derivado de células estromais (SDF-1 α), também designado de CXCL12. Esta quimiocina foi originalmente descrita como um produto secretado por linhagens de células estromais da medula óssea (NAGASAWA, 2014). Estudos posteriores revelaram que CXCL12 pode ser secretada por vários tecidos e órgãos humanos, como pulmão, fígado, cérebro, rim, coração, músculo esquelético e pele (PAWIG *et al.*, 2015). É uma proteína de aproximadamente 8 kDa, formada por cerca de 68 aminoácidos, que tem como função a quimiotaxia de linfócitos T e monócitos, regulação do ciclo celular e apoptose (WANG *et al.*, 2006; PAWING *et al.*, 2015).

A migração direcionada de células que expressam o receptor de quimiocina apropriado ocorre ao longo de um gradiente de concentração de quimiocinas. Isso permite que as células se movam para os locais onde a concentração desses ligantes seja mais elevada (BALKWILL *et al.*, 2004).

A proteína CXCR4 é um receptor transmembranar acoplado à proteína G, formado por cerca de 3502 aminoácidos (WANG *et al.*, 2006). Sua expressão é observada na maioria das células hematopoiéticas, incluindo neutrófilos, monócitos, linfócitos T, linfócitos B e suas precursoras, células progenitoras CD34⁺ do sangue e medula óssea, células dendríticas, células de Langerhans e macrófagos (MURPHY *et al.*, 2000; MURDOCH; FINN 2000; GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011). Também se expressa em níveis elevados em células endoteliais vasculares e neurônios dos sistemas nervosos central e periférico (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011). Embora a

CXCL12 possa se ligar a outros receptores, o CXCR4 constitui o receptor principal para essa quimiocina (BALKWILL, 2004; TEICHER; FRICKER, 2010) (FIGURA 2).

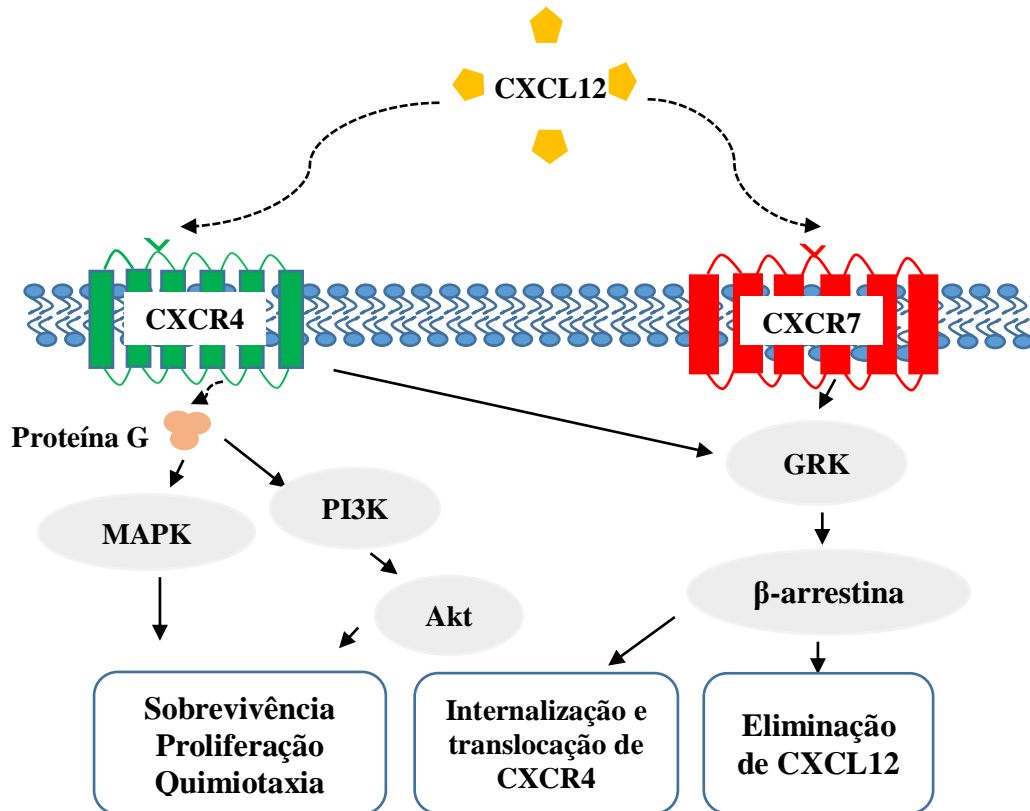


Figura 2. Interação de CXCL12 com os receptores CXCR4 e CXCR7. Quando CXCL12 se liga com CXCR4 pode ativar as vias MAPK e PI3K/Akt, induzindo a sobrevivência, proliferação e quimiotaxia celular, ou a via GRK/β-arrestina, com a internalização e translocação de CXCR4. A ligação de CXCL12 com CXCR7 ativa GRK/β-arrestina, determinando a eliminação de CXCL12.

No contexto das neoplasias malignas, pesquisas têm revelado que os receptores de quimiocinas podem desempenhar importantes papéis no desenvolvimento de metástases, facilitando a disseminação tumoral em cada um dos eventos do processo, incluindo aderência das células tumorais ao endotélio, colonização metastática, angiogênese, proliferação e proteção contra resposta do hospedeiro através da ativação de vias de sobrevivência celular (KAKINUMA; HWANG, 2006; SINGH; SADANANDAM; SINGH, 2007; MENG; XUE; CHEN, 2018).

Diversos estudos têm enaltecido a participação das proteínas CXCL12 e CXCR4 na patogênese de neoplasias malignas, incluindo câncer de mama, próstata, tumores cerebrais e

leucemias (LI *et al.*, 2016; MENG; XUE; CHEN, 2018). Nesse sentido, pesquisas sugerem que a interação entre essa quimiocina e seu receptor pode aumentar a sobrevivência de células-tronco malignas, bem como sua proliferação, invasão e metástase, levando à disseminação tumoral (LAPTEVA *et al.*, 2005; BALKWILL, 2004; KAKINUMA; HWANG, 2006; SALVATORE *et al.*, 2010) (FIGURA 3).

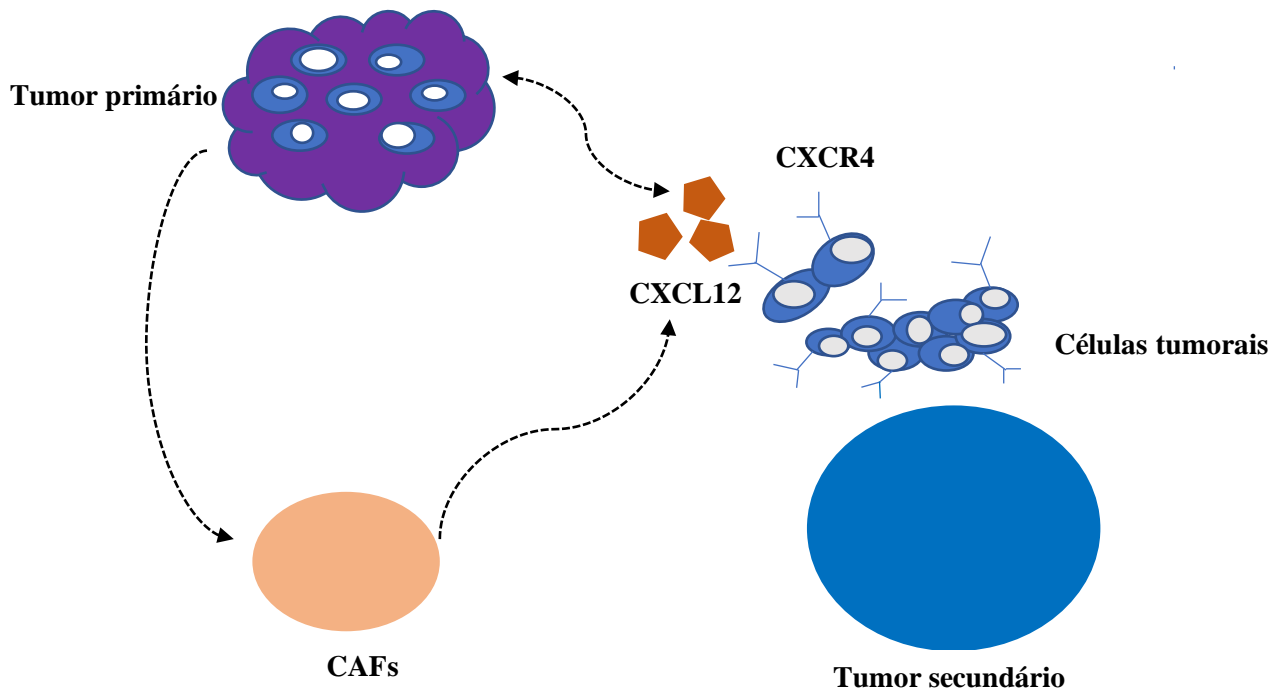


Figura 3. Possível participação de CXCL12 e CXCR4 no desenvolvimento de metástases em neoplasias malignas. Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) secretam altos níveis de CXCL12. Células neoplásicas do tumor primário com alta expressão de CXCR4 se disseminam através da corrente sanguínea, interagindo com a quimiocina CXCL12 presente em regiões com alto índice de expressão dessa proteína, formando o tumor secundário.

No contexto do CCEO, há evidências de que as proteínas CXCL12 e CXCR4 podem estar envolvidas na patogênese e progressão tumorais, com eventuais impactos no prognóstico (UCHIDA *et al.*, 2003; DUAN *et al.*, 2016). Em uma das pesquisas pioneiras neste sentido, Uchida *et al.* (2003) avaliaram a expressão de 13 tipos de receptores de quimiocinas em linhagens celulares metastáticas e não metastáticas de CCEO e constataram que apenas CXCR4 se encontrava superexpressa nas linhagens metastáticas (HNt e B88). Os autores observaram expressão de CXCL12 em linfonodos regionais com metástase e o condicionamento com meio obtido de células estromais desses linfonodos estimulou a

migração das células B88. Além disso, a exposição das células B88 à CXCL12 determinou a rápida ativação da quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) e da proteína quinase B (PKB), com consequente estímulo à migração celular. De acordo com Uchida *et al.* (2003), a sinalização CXCL12/CXCR4 pode estar envolvida no desenvolvimento de metástases linfonodais regionais no CCEO por meio da ativação das vias ERK 1/2 e PKB.

Com o objetivo de esclarecer os mecanismos pelos quais a sinalização CXCL12/CXCR4 é capaz de estimular a invasividade do CCEO, Almofiti *et al.* (2004) analisaram, por reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) em linhagens celulares. Os autores observaram que o tratamento de células B88 com CXCL12 determinava um aumento na invasão de matrigel, de forma dose-dependente, mas não alterava os níveis de expressão do uPA e das MMPs-1, -2, -3, -7 e -9. Para Almofiti *et al.* (2004), os resultados sugerem que, no CCEO, o eixo CXCL12/CXCR4 pode contribuir para a invasão local por meio do direcionamento da migração celular e não pelo aumento da expressão de enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular.

Além de contribuir para o desenvolvimento de metástases em CCEO, evidências sugerem uma importante participação de CXCL12 no processo de invasão de tecidos ósseos por essas neoplasias. Em estudo com RT-PCR, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e citometria de fluxo em linhagens celulares de CCEO (HSC3, SCC4 e SCC9), Tang *et al.* (2008) observaram que CXCL12 derivada de osteoblastos estimulou a expressão de CXCR4, bem como a síntese e secreção de interleucina-6 (IL-6) nas linhagens celulares de CCEO. Além disso, o condicionamento de monócitos com meio obtido de células SCC4 estimulou a formação de osteoclastos. Este processo, por outro lado, foi parcialmente revertido pela incorporação de anticorpos anti-IL-6 no meio. De acordo com Tang *et al.* (2008), os resultados enaltecem a importância do eixo CXCL12/CXCR4 no processo de invasão do CCEO em tecidos ósseos e a participação de outros tipos celulares do microambiente tumoral na síntese desta quimiocina.

Estudos mais recentes também têm destacado a participação de outras células presentes no microambiente dos CCELO na síntese e secreção de CXCL12, com destaque para os CAFs (ZHOU *et al.*, 2015). Por meio de estudos *in vitro*, Zhou *et al.* (2015) constataram que CXCL12, sintetizada e secretada por CAFs, era capaz de estimular a transição epitélio-mesequimal (EMT) e a invasividade em linhagens celulares (SCC9 e CAL27) de CCELO. Além disso, os autores observaram que CXCL12 derivada de CAFs

estimulou a migração de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), bem como a formação de estruturas tubulares por estes tipos celulares. De acordo com Zhou *et al.* (2015), a CXCL12 secretada por CAFs pode contribuir para a invasão e a metástase nos CCELO através do estímulo à EMT e à angiogênese.

Além das evidências apresentadas por estudos *in vitro*, diversas pesquisas têm demonstrado uma importante relação da expressão das proteínas CXCL12 e CXCR4 com parâmetros clinicopatológicos e com o prognóstico em CCEO (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009; MENG *et al.*, 2010; ALBERT *et al.*, 2012).

No estudo de Oliveira-Neto *et al.* (2008), realizou-se análises quantitativas de RNAm através do RT-PCR e a análise da imunexpressão de CXCR4, CXCL12 e Ki-67 em CCEO primário e CCEO com e sem metástases para linfonodos cervicais. No presente estudo, RNAm de CXCR4 e CXCL12 foi aumentada no CCEO primário em comparação com os tecidos controles. Em relação a imunexpressão de CXCL12 observou-se uma expressão significativa em células do microambiente tumoral em CCEO com metástases linfonodais, com uma associação positiva entre o percentual destas células estromais e o índice proliferação neoplásica, observou-se também, uma associação positiva entre a expressão de CXCR4 e o marcador de proliferação celular Ki-67 em células neoplásicas, propondo que a expressão de CXCR4 em células do microambiente tumoral podem contribuir para a proliferação dessas células. No estudo de Lee *et al.* (2009), analisou-se a expressão de CXCR4, MMP-9, MMP-2 e Ki-67. Verificou-se que a expressão de CXCR4 associa-se significativamente a metástases em linfonodos com a expressão de MMP-9 e Ki-67, e analisou também que a recorrência e o tamanho do tumor em relação a expressão de CXCR4, eram fatores prognósticos independentes para a sobrevida. Em Meng *et al.* (2010), sugere-se que superexpressão do CXCR4 pode ser uma preditor de metástase linfonodal. Além do que, observou-se que a maior expressão do CXCR4 estava associada tamanho do tumor, estágio clínico e grau histológico do tumor.

Em estudo imunistoquímico com 47 casos CCELO, Albert *et al.* (2012) avaliaram a expressão de CXCL12, CXCR4, E-caderina, vimentina e anidrase carbônica-9. Os autores observaram expressões significativamente maiores de CXCR4 em CCELO com maiores tamanhos, em estágios clínicos avançados e exibindo invasão neural. Em relação a CXCL12, foi constatada tendência à associação, sem significância estatística, da alta expressão desta proteína com o estágio patológico (pTNM) avançado da lesão. Os autores observaram, ainda, menor sobrevida geral nos casos com alta expressão de CXCR4, especialmente no subgrupo

exibindo positividade concomitante para vimentina, caracterizando EMT. Para Albert *et al.* (2012), CXCR4 constituiria um importante marcador de agressividade nos CCELO.

No estudo de Uchida *et al.* (2011), realizou-se uma pesquisa com camundongos inoculados com CCEO, introduzindo um vetor de RNash contra o receptor CXCR4 e análise através de RT-PCR. Verificou-se que RNash inibiu significativamente as metástases linfonodais das linhagens de células B88. Por sua vez, no estudo Zhang *et al.* (2015), utilizou-se um vetor de expressão gênica de fusão CXCL12-KDEL (CXCL12-KDEL-pIRES2-EGFP) para bloquear o eixo biológico CXCL12-CXCR4 através do sequestro de CXCR4 intracelular, de modo a inibir a metástase do CCEO. Observou-se que o bloqueio do eixo CXCL12-CXCR4 impediu a quimiotaxia celular e, dessa forma, inibiu a metástase em CCEO. No estudo de Duan *et al.* (2016), analisou-se o papel do CXCR4 na EMT através da expressão *in vitro* de N-caderina, E-caderina, MMP-9 e MMP-2 em células de CCELO e o silenciamento do CXCR4 *in vivo* utilizando RNAi. Observou-se que a superexpressão do CXCR4 está significativamente associada com estimulação da EMT, ou seja, o silenciamento do CXCR4 suprimiu a EMT no CCELO, afetando assim a metástase tumoral. Os autores também observaram que nas células com RNAi do CXCR4, a expressão de N-caderina, MMP-2 e MMP-9 foi aumentada, enquanto a E-caderina manteve-se em níveis normais.

Apesar desses importantes achados, até o presente momento, pouco se sabe sobre eventuais diferenças na imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em CCEO relacionadas à idade dos pacientes. Nesse contexto, destaca-se a pesquisa realizada por Knopf *et al.* (2015). Em estudo com 276 casos de CCELO (66 diagnosticados em pacientes com até 45 anos de idade e 210 em indivíduos acima dos 45 anos), esses autores constataram uma forte imunopositividade para CXCR4 nas células neoplásicas, com padrão de reatividade similar entre os grupos etários.

Com base no exposto, este estudo se propôs a avaliar a imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em CCELO em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos). Espera-se, com esta pesquisa, contribuir para uma melhor compreensão das diferenças relacionadas à idade no comportamento biológico dessas lesões, fornecendo subsídios para uma possível aplicação dessas proteínas como indicadores prognósticos ou alvos potenciais para estratégias terapêuticas para os CCELO.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de imunohistoquímica, a expressão da quimiocina CXCL12 e do seu receptor CXCR4 em CCELO em indivíduos jovens e idosos.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o perfil clínico (sexo e estágio clínico [TNM]) e o grau histopatológico de malignidade nos casos de CCELO em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos);
- Estabelecer os percentuais de células epiteliais imunopositivas para CXCL12 e CXCR4 em CCELO em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos);
- Relacionar as imunoexpressões de CXCL12 e CXCR4 nos CCELO em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) com parâmetros clinicopatológicos (sexo, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade);
- Relacionar as imunoexpressões de CXCL12 e CXCR4 nos CCELO em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) com o grau de ceratinização, o grau de pleomorfismo nuclear, o padrão de invasão e a intensidade do infiltrado inflamatório;
- Correlacionar as imunoexpressões de CXCL12 e CXCR4 nos CCELO em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos).

METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil), de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, e submetida à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Conforme parecer nº 3.185.969 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

3.2 Caracterização do estudo

A pesquisa desenvolvida consistiu em um estudo do tipo transversal, observacional, analítico, caracterizado pela análise, registro e quantificação das imunoexpressões das proteínas CXCL12 e CXCR4 em CCELO em indivíduos jovens e idosos.

3.3 População

A população do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCELO diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/João Pessoa – PB, no período de 2002 a 2016.

3.4 Amostra

A amostra do estudo foi do tipo não probabilística, por conveniência, constituída por 42 casos de CCELO. Deste total, vinte e um casos foram diagnosticados em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e 21 em idosos (≥ 60 anos), todos emblocados em parafina, obtidos do serviço anteriormente citado.

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas casos de CCELO provenientes da ressecção cirúrgica, o quais possibilitassem a avaliação do *front* de invasão tumoral. Além disso, só

foram incluídos no estudo os casos cujos prontuários contivessem informações relativas ao sexo e idade dos pacientes, bem como à localização anatômica da lesão e ao estágio clínico.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as lesões de pacientes submetidos previamente à radioterapia ou quimioterapia. Adicionalmente, foram excluídos da pesquisa os casos que não apresentaram quantidades suficientes de material biológico para realização dos estudos morfológico e imunoistoquímico.

3.5 Variáveis

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

Quadro 1. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Idade	Idade do paciente (em anos)	Jovem (≤ 45 anos) Idoso (≥ 60 anos)
Estágio clínico	Classificação baseada nas características do tumor primário (T), do envolvimento linfonodal regional (N) e da presença ou ausência de metástases à distância (M).	Estágio I Estágio II Estágio III Estágio IV
Grau histopatológico de malignidade	Classificação histopatológica do tumor considerando o grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório	Baixo grau de malignidade Alto grau de malignidade
Grau de Ceratinização	Grau de ceratinização das células tumorais	Alto Moderado Baixo Ausente
Pleomorfismo Nuclear	Grau de pleomorfismo nuclear das células Tumorais	Pouco Moderado Intenso Extremo
Padrão de invasão	Padrão de invasão das células tumorais	Bordas bem delimitadas Cordões, bandas e/ ou trabéculas infiltrativas Pequenos grupos / cordões

		de células infiltrativas (n>15) Infiltração em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15)
Infiltrado Inflamatório	Intensidade do infiltrado inflamatório	Intenso Moderado Escasso Ausente

Quadro 2. Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Imunoexpressão de CXCR4	Percentual de células neoplásicas positivas	- Citoplasmática/ membranar. - Nuclear.
Imunoexpressão da CXCL12	Percentual de células neoplásicas positivas	- Citoplasmática.

3.6 Estudo clínico

Dados clínicos (sexo, idade, localização anatômica da lesão e estágio clínico) foram coletados a partir dos prontuários dos pacientes. Para o estágio clínico, foram utilizados os parâmetros elencados na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (SOBIN; WITTEKIND, 2002), os quais são apresentados nos Quadros 3 e 4. Os dados coletados foram transcritos para uma ficha específica (APÊNDICE A).

Quadro 3. Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCEO, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

TAMANHO/ EXTENSÃO DO TUMOR PRIMÁRIO (T)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4a	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/ extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face

T4b	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna
ENVOLVIMENTO DE LINFONODO REGIONAL (N)	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
N2	N2a – Metástase em um único linfonodo homolateral com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão N2b – Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão N2c – Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
ENVOLVIMENTO POR METÁSTASES DISTANTES (M)	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Quadro 4. Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCEO, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

ESTÁGIO	CLASSIFICAÇÃO TNM
Estágio 0	Tis N0 M0
Estágio I	T1 N0 M0
Estágio II	T2 N0 M0
Estágio III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Estágio IVA	T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0
Estágio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estágio IVC	Qualquer T Qualquer N M1

3.7 Estudo morfológico

A partir do material embocado em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 5µm, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina com hematoxilina e eosina. Em sequência, os cortes histológicos foram analisados em microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) por dois examinadores previamente treinados.

A análise do grau histopatológico de malignidade dos CCELO foi realizada no *front* de invasão tumoral, de acordo com o sistema proposto por Bryne *et al.* (1992) (QUADRO 5). Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso. As lesões com escore final menor ou igual a oito foram classificadas como de baixo grau de malignidade. Por sua vez, os tumores com escore final igual ou superior a nove foram classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA *et al.*, 2007). Os dados obtidos foram transcritos para uma ficha específica (APÊNDICE B).

Quadro 5. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no *front* de invasão, proposto por Bryne *et al.* (1992).

Aspectos Morfológicos	Escore de malignidade			
	1	2	3	4
Grau de ceratinização	Alto (> 50% das células)	Moderado (20-50% das células)	Baixo (>5<20% das células)	Ausente (0-5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco (>75% de células maduras)	Moderado (50 a 75% de células maduras)	Intenso (>25< 50% de células maduras)	Extremo (0 a 25% de células maduras)
Padrão de Invasão	Bordas Infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)	Infiltração difusa e pronunciada, em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15)
Infiltrado Inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

3.8 Estudo imunoistoquímico

3.8.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*RevealTM*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), utilizando os anticorpos primários policlonais anti-CXCL12 e anti-CXCR4 (QUADRO 6).

Quadro 6. Especificidade, referência, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação dos anticorpos primários que foram utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
CXCL12	P-159X	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Citrato, pH 6.0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30min	<i>Overnight</i>
CXCR4	12 G5	Santa Cruz Biotechnology	1:750	Sem recuperação antigênica	60 min

Cortes histológicos de tonsila foram empregados como controle positivo. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Odontologia da UEPB, descrito a seguir:

⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);

⇒ Reidratação em cadeia descendente de etanóis:

- Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 80°GL (5 minutos);

⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)

- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 6);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*Antibody diluent*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (QUADRO 6);
- ⇒ Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário conjugado com polímero de dextrano (*Complement*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (2 trocas);
- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP conjugate*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*DAB substrate system*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA) (7 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em 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 polímero de acrilatos (*Entellan[®] new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

3.8.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) por uma examinadora previamente treinada. Para as análises imunoistoquímicas, foi realizado o mascaramento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. As imunorexpressões de CXCL12 e CXCR4 foram avaliadas em células neoplásicas ao longo do *front* de invasão tumoral. Em relação ao CXCR4, as expressões citoplasmática e nuclear foram analisadas de forma separada. Por sua vez, a imunorexpressão de CXCL12 foi analisada no citoplasma das células neoplásicas.

Para a análise da imunorexpressão de CXCL12 e CXCR4, foi adaptada a metodologia utilizada no estudo de Meng *et al.* (2010). Sob aumento de 100×, foi identificada a área com maior imunorreatividade aos anticorpos anti-CXCL12 e anti-CXCR4. Posteriormente, 10 campos microscópicos foram fotomicrografados (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), sob aumento de 400×, e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa ImageJ® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem das células imunomarcadas e das células negativas. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se, por fim, o percentual de células positivas em relação ao total de células contadas. Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE C).

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 21.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com o estudo imunoistoquímico foram submetidos à análise de distribuição, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual demonstrou ausência de distribuição normal. Dessa forma, as comparações das medianas dos percentuais de células imunopositivas para CXCL12 e CXCR4 de acordo com os grupos (jovens x idosos) e os demais parâmetros clinicopatológicos foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Possíveis correlações entre as imunorexpressões das proteínas foram avaliadas por meio do teste de correlação de

Spearman. Para todos os testes estatísticos, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

ARTIGO

4 ARTIGO

4.1 Apresentação

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo será apresentado nesta dissertação: **“Imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em carcinomas de células escamosas de língua oral em indivíduos jovens e idosos”**.

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

4.2 Artigo a ser submetido

Imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4 em carcinomas de células escamosas de língua oral em indivíduos jovens e idosos

Título breve: **Expressão de CXCL12 e CXCR4 em carcinomas de língua oral**

Daniella de Lucena Morais¹, Luana Samara Balduino de Sena¹, Aline Carvalho Batista², Elismauro Francisco de Mendonça², Pollianna Muniz Alves¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹

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

²*Departamento de Estomatologia (Patologia Oral), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.*

Autor correspondente:

Cassiano Francisco Weege Nonaka

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Baraúnas, 351 – Bairro Universitário – Campina Grande – PB – Brasil

CEP 58429-500 Phone/ Fax: +55 83 3315-3471

e-mail: cfwnonaka@gmail.com

Abstract

BACKGROUND: Oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC) is characterized by its potential to invade adjacent structures and develop regional lymph nodes metastasis. Age-related differences in the biological behavior of OTSCC are still debatable. This study compared the immunoexpressions of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in OTSCC between young and elderly individuals.

METHODS: Forty-two cases of OTSCC, 21 diagnosed in young individuals (≤ 45 yo) and 21 diagnosed in elderly individuals (≥ 60 yo) were selected. The percentages of nuclear (CXCR4) and cytoplasmic (CXCL12 and CXCR4) staining in epithelial cells were assessed. Immunohistochemical findings were correlated with clinicopathological parameters (gender, clinical stage and histopathological grade of malignancy).

RESULTS: Expression of CXCL12 was observed in 10 (47.6%) cases of OTSCC in young individuals and in 12 (57.1%) cases in elderly individuals. When compared to elderly individuals, young patients exhibited higher expression of CXCL12 ($P = 0.222$). Nuclear and cytoplasmic expressions of CXCR4 were more frequently observed in elderly individuals. When compared to young individuals, elderly patients exhibited higher expression of CXCR4 in nucleus ($P = 0.001$) and a tendency towards a higher cytoplasmic expression ($P = 0.052$). Regarding clinicopathological parameters, significant differences were found for expression of CXCL12 according to the pattern of invasion of OTSCC in elderly patients ($P = 0.027$). There was a positive correlation between cytoplasmic and nuclear expressions of CXCR4 in young individuals ($r = 0.495$; $P = 0.023$) and elderly individuals ($r = 0.507$; $P = 0.019$).

CONCLUSIONS: The results suggest a potential role of CXCR4 and CXCL12 in the pathogenesis of some cases of OTSCC and additionally support possible age-related differences in the molecular basis of this malignant neoplasm. However, these proteins may not be involved in the progression of OTSCC.

Keywords: Squamous cells carcinoma; Tongue; Chemokines; Immunohistochemistry; Age groups.

Introdução

O carcinoma de células escamosas de língua oral (CCELO) é uma neoplasia maligna epitelial que se caracteriza pelo potencial de invasão às estruturas adjacentes e desenvolvimento de metástases linfonodais, resultando em morbidades e taxas de mortalidade significativas associadas à doença.^{1,2} Embora o CCELO seja tipicamente diagnosticado em homens acima dos 60 anos, com longo histórico de consumo de tabaco e álcool,^{3,4} nas últimas duas décadas, estudos observaram um aumento importante na incidência desta lesão em pacientes abaixo de 45 anos de idade.^{4,5}

Alguns estudos têm destacado um curso clínico mais agressivo do carcinoma de células escamosas oral (CCEO) em indivíduos mais jovens,³⁻⁵ ao passo que outras investigações não observaram diferenças significativas relacionadas à idade no comportamento biológico dessa neoplasia.^{4,6,7} Apesar desses achados divergentes, evidências sugerem a existência de diferenças no perfil das alterações genéticas do CCEO entre indivíduos jovens e idosos.^{8,9}

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas pró-inflamatórias, originalmente identificadas como mediadores do tráfego de leucócitos, capazes de interagir com receptores transmembrana acoplados à proteína G.¹⁰ Dentre as quimiocinas, destaca-se o fator 1 α derivado de células estromais (SDF-1 α), também denominado de CXCL12.¹¹ Embora CXCL12 possa interagir com diversos receptores de quimiocinas, a proteína transmembrana acoplada à proteína G, denominada CXCR4, constitui o principal receptor para essa quimiocina.^{12,13}

Diversos estudos têm enaltecido a participação das proteínas CXCL12 e CXCR4 na patogênese de neoplasias malignas, incluindo câncer de mama, próstata, tumores cerebrais e leucemias.^{14,15} No contexto do CCEO, há evidências de que as proteínas CXCL12 e CXCR4 podem estar envolvidas na patogênese e progressão tumorais, com eventuais impactos no prognóstico.^{16,17}

Apesar desses importantes achados, até o presente momento, pouco se sabe sobre eventuais diferenças na expressão de CXCL12 e CXCR4 em CCEO relacionadas à idade dos pacientes. Com base no exposto, este estudo se propôs a avaliar a imunexpressão de CXCL12 e CXCR4 em CCELO em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos). Pretendeu-se, com esta pesquisa, contribuir para uma melhor compreensão das diferenças relacionadas à idade no comportamento biológico dessas lesões.

Material e métodos

Espécimes

Vinte e um casos de CCELO em jovens (≤ 45 anos) e 21 casos de CCELO em idosos (≥ 60 anos), obtidos no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, Brasil, foram selecionados para este estudo. Para todos os casos de CCELO, foram coletadas informações relativas ao sexo, idade dos pacientes e localização anatômica das lesões. Com base na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos¹⁸, também foram coletadas informações sobre o estadiamento clínico das lesões. Foram excluídos do estudo os casos de CCELO provenientes de pacientes submetidos previamente à radioterapia ou quimioterapia. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UEPB (Protocolo: 3.185.969).

Análise morfológica

Cortes histológicos com 5 μ m de espessura foram obtidos de material biológico incluído em parafina e, subsequentemente, corados em hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois avaliadores previamente treinados analisaram o grau histopatológico de malignidade dos CCELO no *front* de invasão tumoral, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al.¹⁹ Nesse sistema, são atribuídos escores (1 – 4) aos seguintes parâmetros: grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório. Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso.¹⁹ Lesões com escore final ≤ 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade e aquelas com escore final ≥ 9 foram classificadas como de alto grau de malignidade.²⁰

Imunoistoquímica

Cortes histológicos com 3 μ m de espessura foram obtidos e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo a base de organosilano. Os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica (Tabela 1). Em sequência, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Após incubação com os anticorpos primários policlonais anti-CXCL12 e anti-CXCR4 (Tabela 1), os cortes teciduais foram lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros (RevealTM, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA). A atividade da peroxidase foi visualizada através da imersão dos cortes em diaminobenzidina (DAB Substrate system, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA).

Finalmente, os cortes teciduais foram contracolorados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com lamínula. Cortes histológicos de tonsila foram empregados como controle positivo. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito anteriormente.

Análise imunoistoquímica

Os cortes teciduais foram analisados sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por uma examinadora previamente treinada, sem conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. As imunoexpressões de CXCL12 e CXCR4 foram avaliadas em células epiteliais ao longo do *front* de invasão tumoral. Em relação ao CXCR4, as expressões citoplasmática e nuclear foram analisadas de forma separada. Por sua vez, a imunoexpressão de CXCL12 foi analisada apenas no citoplasma das células neoplásicas.

Para a análise da imunoexpressão de CXCL12 e CXCR4, foi adaptada a metodologia utilizada no estudo de Meng *et al.*²¹ Sob aumento de 100×, foram identificados 10 campos de maior imunorreatividade aos anticorpos anti-CXCL12 e anti-CXCR4. Cada campo foi fotomicrografado (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), sob aumento de 400×, e as imagens obtidas foram transferidas para o programa ImageJ® (Imaging Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Células imunomarcadas e células negativas foram contadas em cada um dos campos fotomicrografados e, por fim, foi estabelecido o percentual de células positivas em relação ao total de células contadas.

Análise estatística

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com o estudo imunoistoquímico foram analisados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual demonstrou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para CXCL12 e CXCR4, de acordo com os grupos etários e parâmetros clinicopatológicos. Possíveis correlações entre as imunoexpressões das proteínas foram avaliadas 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 clínicas e morfológicas

Os resultados das análises clínicas e morfológicas estão sumarizados na Tabela 2. Foi observada uma maior frequência de casos de CCELO em indivíduos do sexo masculino, tanto para o grupo de jovens ($n = 15$; 71,4%) como para o de idosos ($n = 11$; 52,4%). A análise do estadiamento clínico revelou maior frequência de casos no estágio IV, no grupo de jovens ($n = 9$; 42,9%) e nos estágios I ($n = 9$; 42,9%) e II ($n = 9$; 42,9%), no grupo de idosos. Em relação ao grau histopatológico de malignidade, houve predomínio de lesões de alto grau em indivíduos jovens ($n = 16$; 76,2%) e idosos ($n = 16$; 76,2%).

Análises imunoistoquímicas

Imunoexpressão de CXCL12

Foi observada positividade citoplasmática para CXCL12 em 22 dos 42 casos de CCELO avaliados no presente estudo, dez (47,6%) deles diagnosticados em indivíduos jovens e 12 (57,1%) em indivíduos idosos (Figura 1A,B). A análise isolada dos casos positivos para CXCL12 revelou percentual mediano de 35,7% (variação: 0,1% – 71,4%) no grupo de jovens e de 2,4% (variação: 0,1% – 43,5%) no grupo de idosos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos percentuais de expressão citoplasmática de CXCL12 nos CCELO em relação aos grupos etários ($P = 0,222$). De forma similar, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão de CXCL12 em relação aos parâmetros clinicopatológicos dos CCELO, tanto no grupo de indivíduos jovens quanto no de indivíduos idosos ($P > 0,05$) (Tabela 3).

A análise dos parâmetros isolados da gradação histopatológica de malignidade revelou diferença estatisticamente significativa apenas para o padrão de invasão nos CCELO de indivíduos idosos (Tabela 4). No referido grupo, lesões arranjadas em pequenos grupos de células neoplásicas revelaram maior imunoexpressão citoplasmática de CXCL12 ($P = 0,027$).

Imunoexpressão de CXCR4

Foi constatada positividade citoplasmática para CXCR4 em 16 (76,2%) casos de CCELO no grupo de indivíduos idosos (mediana: 23,9%; variação: 0,0% – 99,8%) e em 11 (52,4%) casos no grupo de indivíduos jovens (mediana: 1,1%; variação: 0,0% – 99,0%) (Figura 1C,D). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa nos percentuais de expressão citoplasmática de CXCR4 nos CCELO em relação aos grupos etários ($P = 0,052$). A análise da imunoexpressão nuclear de

CXCR4 revelou positividade em 17 (80,9%) casos de CCELO no grupo de indivíduos idosos (mediana: 10,6%; variação: 0,0% – 74,7%) e em 8 (38,1%) casos no grupo de indivíduos jovens (mediana: 0,0%; variação: 0,0% – 29,7%) (Figura 1E,F). O teste não paramétrico de Mann-Whitney demonstrou percentuais significativamente superiores de positividade nuclear para CXCR4 nos CCELO de indivíduos idosos quando comparados aos de indivíduos jovens ($P = 0,001$).

Em relação aos parâmetros clinicopatológicos dos CCELO, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nas imunoexpressões citoplasmáticas e nucleares de CXCR4, tanto no grupo de indivíduos jovens quanto no de idosos ($P > 0,05$) (Tabela 5). De forma similar, nos dois grupos etários avaliados no presente estudo, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão de CXCR4 em relação aos parâmetros isolados da gradação histopatológica de malignidade ($P > 0,05$) (Tabela suplementar 1).

Correlação entre as imunoexpressões de CXCL12 e CXCR4

O teste de correlação de Spearman revelou significância estatística apenas para as expressões citoplasmáticas e nucleares de CXCR4 nos CCELO, tanto para o grupo dos indivíduos idosos ($r = 0,507$; $P = 0,019$) quanto para o dos jovens ($r = 0,495$; $P = 0,023$).

Discussão

A existência de diferenças no perfil das alterações genéticas e no comportamento biológico do CCEO entre indivíduos jovens e idosos tem se apresentado como objeto de intensa discussão na literatura, com achados ainda conflitantes.²²⁻²⁵ Neste contexto, os resultados do presente estudo sugerem um potencial envolvimento das proteínas CXCR4 e CXCL12 na patogênese de alguns casos de CCELO e, além disso, suportam a existência de eventuais diferenças nas bases moleculares dessa neoplasia maligna relacionadas à idade dos pacientes.

Evidências têm sugerido que a interação entre a quimiocina CXCL12 e o receptor CXCR4 pode aumentar a sobrevivência de células-tronco malignas, bem como sua proliferação, invasão e metástase, levando à disseminação tumoral.¹² No contexto do CCEO, há evidências de que as proteínas CXCL12 e CXCR4 podem estar envolvidas na patogênese e progressão tumorais, com eventuais impactos no prognóstico.^{16,17}

Na presente pesquisa, foram identificados maiores percentuais de expressão citoplasmática para CXCL12 no grupo de indivíduos jovens (35,7%) quando comparado aos

idosos (2,4%), sem diferença estatisticamente significativa ($P = 0,222$). Com relação à expressão de CXCR4, os CCELO de indivíduos idosos apresentaram maiores percentuais de positividade nuclear ($P = 0,001$) e citoplasmática ($P = 0,052$) quando comparados aos CCELO de indivíduos jovens. Em conjunto, tais resultados sugerem um importante papel do CXCR4 e CXCL12 na patogênese dos CCELO, com diferentes mecanismos de ativação desse complexo ligante-receptor quando comparados os grupos etários.

Em relação a imunexpressão de CXCL12 e os parâmetros clinicopatológicos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos CCELO, em ambos os grupos etários. No entanto, os parâmetros isolados da gradação histopatológica de malignidade revelaram imunexpressão citoplasmática de CXCL12 com diferença estatisticamente significativa ($P = 0,027$) apenas para o padrão de invasão em pequenos grupos de células neoplásicas em indivíduos idosos.

Diversos estudos têm destacado o envolvimento de várias vias de ativação do complexo CXCR4/CXCL12.^{13,26} Dessa forma, especialmente para a expressão nuclear de CXCR4 no grupo dos idosos, pode-se sugerir que a interação entre CXCR4 e CXCL12 pode desencadear a ativação de vias de transdução de sinais mediadas por receptores quinase acoplados a proteína G (GRK) e sinalização de β -arrestina, permitindo a internalização e translocação de CXCR4 para o interior do núcleo das células neoplásicas.²⁶ Além disso, para o grupo dos jovens, pode-se sugerir uma provável mutação germinativa no domínio C-terminal de CXCR4, bloqueando a internalização deste receptor para o núcleo.^{26,27}

O CXCR4 é uma proteína transmembranar que medeia transduções de sinais, cuja expressão já foi observada na membrana celular e citoplasma de células tumorais.^{28,29} No entanto alguns estudos relatam expressão nuclear deste receptor em células neoplásicas.^{21,30} cujas funções permanecem pouco compreendidas. No estudo realizado por Meng *et al.*²¹, foi observada expressão citoplasmática e nuclear de CXCR4 em células neoplásicas de CCEO. Os autores constataram diferenças significativas na imunexpressão desse receptor em relação à metástase linfonodal, ao tamanho do tumor e ao grau histopatológico de malignidade, sugerindo um papel importante dessa proteína no comportamento biológico dessas lesões.

No entanto no presente estudo os parâmetros clinicopatológicos dos CCELO, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nas imunexpressões citoplasmáticas e nucleares de CXCR4, nos grupos etários. Como também, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na imunexpressão de CXCR4 em relação aos parâmetros isolados da gradação histopatológica de malignidade nos grupos em questão.

No teste de correlação foi identificada significância estatística para as expressões citoplasmáticas e nucleares de CXCR4 nos CCELO, tanto para o grupo dos indivíduos idosos ($r = 0,507$; $P = 0,019$) quanto para o dos jovens ($r = 0,495$; $P = 0,023$). Tais resultados identificam a participação dessa proteína no desenvolvimento dos CCELO em ambos os grupos etários, especialmente nos idosos, sugerindo que sua expressão nuclear possa estar envolvida em outros mecanismos de transdução de sinais.

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem um potencial envolvimento de CXCR4 e CXCL12 na patogênese de alguns casos de CCELO e, adicionalmente, suportam a existência de diferenças nas bases moleculares dessa neoplasia maligna relacionadas à idade dos pacientes. A progressão tumoral nos CCELO, no entanto, pode não estar relacionada à expressão dessas proteínas.

Referências

1. Freitas Rde A, Silveira EJ, Silveira JP, Silva FM, Amorim RF. Correlation of β -catenin expression and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *Acta Cir Bras.* 2010;25:513-517.
2. Mücke T, Kanatas A, Ritschl LM. et al. Tumor thickness and risk of lymph node metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol.* 2016;53: 80-84.
3. Bachar G, Hod R, Goldstein DP. et al. Outcome of oral tongue squamous cell carcinoma in patients with and without known risk factors. *Oral Oncol.* 2011;47: 45-50.
4. Farquhar DR, Tanner AM, Masood MM. et al. Oral tongue carcinoma among young patients: An analysis of risk factors and survival. *Oral Oncol.* 2018;84:7-11.
5. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S. et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol.* 2011;29: 1488-1494.
6. Kapila SN, Natarajan S, Boaz K. A comparison of clinicopathological differences in oral squamous cell carcinoma in patients below and above 40 years of age. *J Clin Diagn Res.* 2017;11:ZC46-ZC50.
7. Adduri R Sr, Kotapalli V, Gupta NA. et al. P53 nuclear stabilization is associated with FHIT loss and younger age of onset in squamous cell carcinoma of oral tongue. *BMC Clin Pathol.* 2014;14:37.

8. Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM. et al. High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. *Histopathology*. 2011;58:1127-1135.
9. Dos Santos Costa SF, Brennan PA, Gomez RS. et al. Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: Is it any different from older patients?. *J Oral Pathol Med*. 2018;47:541-546.
10. Kufareva I, Salanga CL, Handel TM. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol Cell Biol*. 2015;93: 372-383.
11. Nagasawa T. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92:433-439.
12. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:540-550.
13. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;6:2927-2931.
14. Li SH, Dong WC, Fan L, Wang GS. Suppression of chronic lymphocytic leucemia progression by CXCR4 inhibitor WZ811. *Am J Transl Res*. 2016;8:3812-3821.
15. Meng W, Xue S, Chen Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. *Gene*. 2018;641:105-110.
16. Uchida D, Begum NM, Almofti A. et al. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res*. 2003;290:289-302.
17. Duan Y, Zhang S, Wang L. et al. Targeted silencing of CXCR4 inhibits epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2016;12:2055-2061.
18. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002; 264.
19. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*. 1992;166:375-381.
20. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol*. 2007;15:376-383.

21. 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 Med.* 2010;39:63-68.
22. Bodner L, Manor E, Friger MD, van der Waal I. Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger--review and analysis of 186 reported cases. *Oral Oncol.* 2014;50:84-89.
23. Cariati P, Cabello-Serrano A, Perez-de Perceval-Tara M, Monsalve-Iglesias F, Martínez-Lara I. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: A retrospective study in Granada University Hospital. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017; 22:e679-e685.
24. Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A. et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol.* 2014;48:1-10.
25. Santos HB, dos Santos TK, Paz AR. et al. Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21:e151-156.
26. Scala S. Molecular pathways: targeting the CXCR4-CXCL12 axis - untapped potential in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2015;21:4278-4285.
27. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN. et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet.* 2003;34:70-74.
28. González-Arriagada WA, Lozano-Burgos C, Zúñiga-Moreta R, González-Díaz P, Coletta RD. Clinicopathological significance of chemokine receptor (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 and CXCR4) expression in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2018;47:755-763.
29. Domingueti CB, Janini JB, Paranaíba LM, Lozano-Burgos C, Olivero P, González-Arriagada WA. Prognostic value of immunoexpression of CCR4, CCR5, CCR7 and CXCR4 in squamous cell carcinoma of tongue and floor of the mouth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24:e354-e363.
30. Spano JP, Andre F, Morat L. et al. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol.* 2004;15:613-617.

Tabela 1 Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
CXCL12	P-159X	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Citrato, pH 6.0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30min	<i>Overnight</i>
CXCR4	12 G5	Santa Cruz Biotechnology	1:750	Sem recuperação antigênica	60 minutos

Tabela 2 Distribuição absoluta e relativa dos casos de CCELO de acordo com o grupo etário e os parâmetros clinicopatológicos.

Parâmetros clinicopatológicos	Indivíduos jovens	Indivíduos idosos
	n (%)	n (%)
<i>Sexo</i>		
Masculino	15 (71,4)	11 (52,4)
Feminino	6 (28,6)	10 (47,6)
<i>Estágio clínico</i>		
Estágio I	2 (9,5)	9 (42,9)
Estágio II	7 (33,3)	9 (42,9)
Estágio III	3 (14,3)	2 (9,5)
Estágio IV	9 (42,9)	1 (4,8)
<i>Grau histopatológico de malignidade</i>		
Baixo grau	5 (23,8)	5 (23,8)
Alto grau	16 (76,2)	16 (76,2)

Tabela 3 Tamanho da amostra, mediana e variação dos percentuais de imunexpressão de CXCL12 nos CCELO de indivíduos jovens e idosos e suas diferenças em relação aos parâmetros clinicopatológicos.

Variáveis/ parâmetros	Grupos	N	Mediana	Variação	P
<i>Indivíduos jovens</i>					
Sexo	Masculino	8	25,8	0,1 – 71,4	0,433
	Feminino	2	47,2	27,8 – 66,6	
Estágio clínico	Estágio I/II	2	25,8	8,2 – 43,5	0,794
	Estágio III/IV	8	35,7	0,1 – 71,4	
Grau histopatológico	Baixo grau	2	13,9	0,2 – 27,8	0,296
	Alto grau	8	43,6	0,1 – 71,4	
<i>Indivíduos idosos</i>					
Sexo	Masculino	7	0,7	0,1 – 41,0	0,167
	Feminino	5	17,3	0,5 – 43,5	
Estágio clínico	Estágio I	3	3,6	0,5 – 41,0	0,644
	Estágio II – IV	9	1,1	0,1 – 43,5	
Grau histopatológico	Baixo grau	5	0,7	0,2 – 40,9	0,570
	Alto grau	7	17,3	0,1 – 43,5	

Tabela 4 Tamanho da amostra, mediana e variação dos percentuais de imunexpressão de CXCL12 nos CCELO de indivíduos jovens e idosos e suas diferenças em relação ao grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório.

Variáveis/ parâmetros	Grupos	n	Mediana	Varição	P
<i>Indivíduos jovens</i>					
Grau de ceratinização	Alto/ moderado	6	17,8	0,2 – 43,6	0,201
	Baixo/ ausente	4	65,5	0,1 – 71,4	
Padrão de invasão	Bordas bem delimitadas/ cordões	2	35,8	0,2 – 71,4	0,794
	Pequenos grupos	8	35,7	0,1 – 66,6	
Pleomorfismo nuclear	Pouco/ moderado	6	43,6	8,2 – 66,6	0,201
	Intenso/ extremo	4	0,2	0,1 – 71,4	
Infiltrado inflamatório	Intenso	4	14,0	0,2 – 71,4	0,670
	Moderado – Ausente	6	43,6	0,1 – 66,6	
<i>Indivíduos idosos</i>					
Grau de ceratinização	Alto/ moderado	8	0,6	0,1 – 41,0	0,126
	Baixo/ ausente	4	17,6	1,1 – 43,5	
Padrão de invasão	Bordas bem delimitadas/ cordões	4	0,4	0,1 – 1,1	0,027
	Pequenos grupos	8	17,6	0,3 – 43,5	
Pleomorfismo nuclear	Pouco/ moderado	4	9,5	0,7 – 41,0	0,396
	Intenso/ extremo	8	2,1	0,1 – 43,5	
Infiltrado inflamatório	Intenso	7	0,7	0,2 – 41,0	0,570
	Moderado – Ausente	5	17,3	0,1 – 43,5	

Tabela 5 Tamanho da amostra, mediana e variação dos percentuais de imunexpressão de CXCR4 nos CCELO de indivíduos jovens e idosos e suas diferenças em relação aos parâmetros clinicopatológicos.

Variáveis/ parâmetros	Grupos	n	Citoplasma			Núcleo		
			Mediana	Varição	P	Mediana	Varição	P
<i>Indivíduos jovens</i>								
Sexo	Masculino	15	2,6	0,0 – 90,2	0,410	0,0	0,0 – 29,7	0,593
	Feminino	6	0,0	0,0 – 99,0		0,0	0,0 – 3,7	
Estágio clínico	Estágio I/II	9	6,1	0,0 – 90,2	0,707	0,0	0,0 – 29,7	0,290
	Estágio III/IV	12	0,5	0,0 – 99,0		0,0	0,0 – 12,4	
Grau histopatológico	Baixo grau	5	0,0	0,0 – 90,2	0,965	0,0	0,0 – 2,6	0,777
	Alto grau	16	1,8	0,0 – 99,0		0,0	0,0 – 29,7	
<i>Indivíduos idosos</i>								
Sexo	Masculino	11	23,9	0,0 – 99,8	0,547	7,5	0,0 – 74,7	0,944
	Feminino	10	23,8	0,0 – 78,5		11,4	0,0 – 69,0	
Estágio clínico	Estágio I	9	23,9	0,0 – 99,8	1,000	10,9	0,0 – 69,0	0,412
	Estágio II – IV	12	18,8	0,0 – 97,0		6,3	0,0 – 74,7	
Grau histopatológico	Baixo grau	5	23,9	0,0 – 69,0	0,771	20,4	0,0 – 60,4	0,709
	Alto grau	16	23,8	0,0 – 99,8		7,5	0,0 – 74,7	

Tabela suplementar 1 Tamanho da amostra, mediana e variação dos percentuais de imunexpressão de CXCR4 nos CCELO de indivíduos jovens e idosos e suas diferenças em relação ao grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório.

Variáveis/ parâmetros	Grupos	N	Citoplasma			Núcleo		
			Mediana	Variação	P	Mediana	Variação	P
<i>Indivíduos jovens</i>								
Grau de ceratinização	Alto/ moderado	11	9,3	0,0 – 90,2	0,233	0,0	0,0 – 29,7	0,936
	Baixo/ ausente	10	0,0	0,0 – 99,0		0,0	0,0 – 12,4	
Padrão de invasão	Bordas bem delimitadas/ cordões	7	1,1	0,0 – 37,6	0,969	0,1	0,0 – 29,7	0,172
	Pequenos grupos	14	1,3	0,0 – 99,0		0,0	0,0 – 5,6	
Pleomorfismo nuclear	Pouco/ moderado	11	0,0	0,0 – 99,0	0,655	0,0	0,0 – 5,6	0,687
	Intenso/ extremo	10	3,6	0,0 – 37,6		0,0	0,0 – 29,7	
Infiltrado inflamatório	Intenso	9	0,0	0,0 – 90,2	0,910	0,0	0,0 – 2,6	0,122
	Moderado – Ausente	12	1,8	0,0 – 99,0		0,4	0,0 – 29,7	
<i>Indivíduos idosos</i>								
Grau de ceratinização	Alto/ moderado	14	35,2	0,0 – 99,8	0,348	9,9	0,0 – 74,7	0,681
	Baixo/ ausente	7	8,1	0,0 – 78,5		10,6	0,0 – 69,0	
Padrão de invasão	Bordas bem delimitadas/ cordões	4	4,1	0,0 – 9,0	0,115	10,2	0,0 – 66,3	0,753
	Pequenos grupos	17	46,5	0,0 – 99,8		10,6	0,0 – 74,7	
Pleomorfismo nuclear	Pouco/ moderado	6	16,0	0,0 – 69,0	0,389	3,8	0,0 – 69,0	0,435
	Intenso/ extremo	15	28,7	0,0 – 99,8		10,9	0,0 – 74,7	
Infiltrado inflamatório	Intenso	15	46,5	0,0 – 99,8	0,308	12,3	0,0 – 74,7	0,118
	Moderado – Ausente	6	8,6	0,0 – 78,5		0,9	0,0 – 66,3	

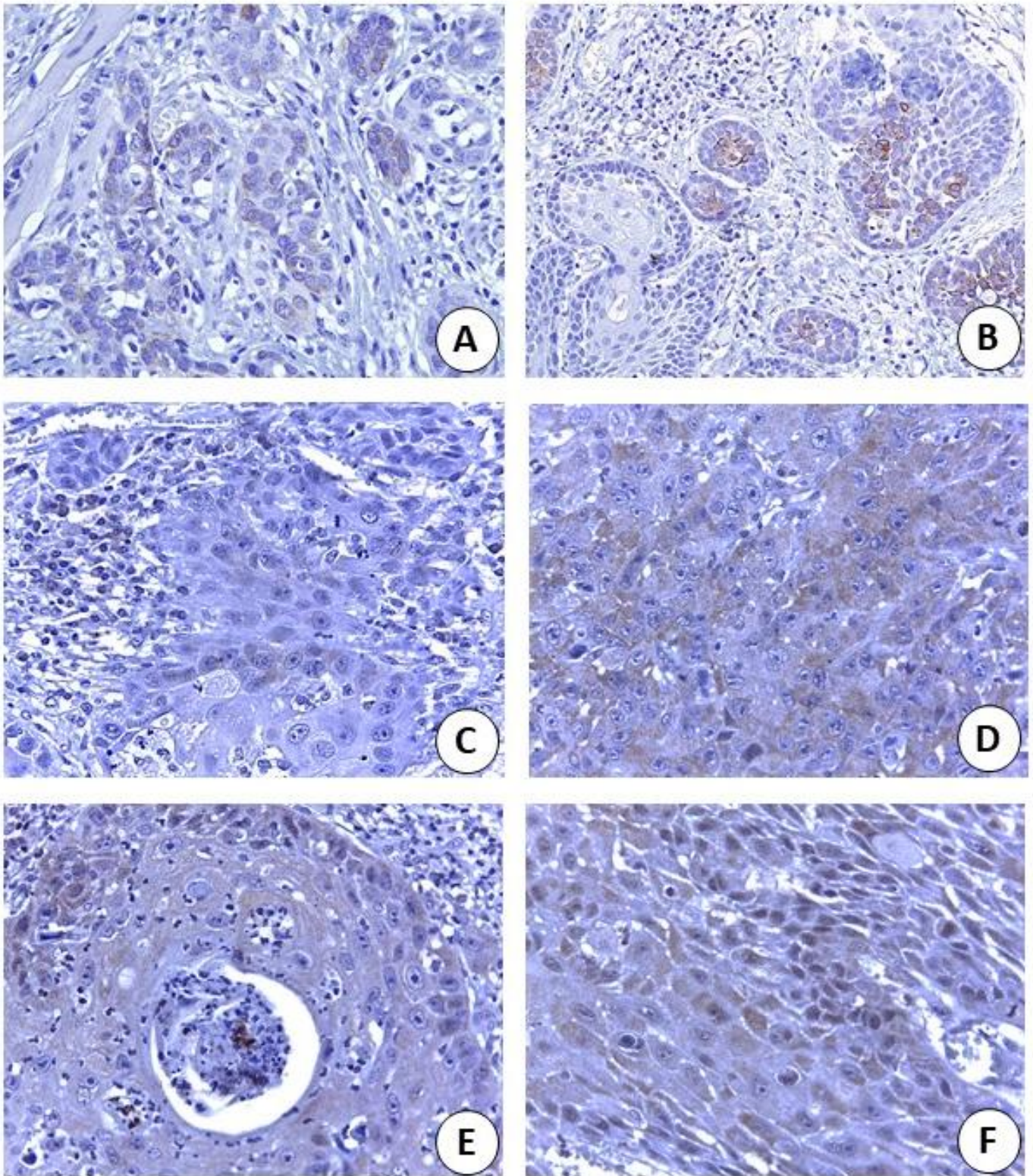


Figura 1 Positividade citoplasmática para CXCL12 em CCELO de indivíduo jovem (A) e idoso (B) (Reveal, 400x e 200x). Imunoexpressão citoplasmática de CXCR4 em CCELO de indivíduo jovem (C) e idoso (D) (Reveal, 400x). Imunoexpressão nuclear de CXCR4 em CCELO de indivíduo jovem (E) e idoso (F) (Reveal, 400x).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CCELO tem se apresentado como objeto de intensa investigação científica, especialmente nos últimos anos, com aumento importante da incidência em pacientes jovens. Diversas pesquisas têm sido voltadas à compreensão dos mecanismos envolvidos no comportamento biológico e bases moleculares capazes de influenciar o prognóstico desses pacientes.

Estudos têm sugerido o envolvimento da interação entre a quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 na patogênese das neoplasias malignas, bem como seu papel na disseminação tumoral nestas neoplasias. No contexto do CCELO, pesquisas têm relatado que as proteínas CXCL12 e CXCR4 podem estar envolvidas na patogênese e progressão tumorais, podendo estar relacionada com eventuais impactos no prognóstico.

Neste sentido, os resultados do presente estudo são importantes por apresentarem um potencial envolvimento da quimiocina CXCL12 e do receptor CXCR4 na patogênese de alguns casos de CCELO. A expressão nuclear de CXCR4 provavelmente desempenha um importante papel nos grupos de jovens e idosos. Adicionalmente, os achados desta pesquisa suportam a existência de diferenças nas bases moleculares dessa neoplasia maligna relacionadas à idade dos pacientes. No entanto, a progressão tumoral nos CCELO pode não estar relacionada à expressão dessas proteínas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADDURI, R. S. R. *et al.* P53 nuclear stabilization is associated with FHIT loss and younger age of onset in squamous cell carcinoma of oral tongue. **BMC Clin. Pathol.**, v.14, n. 37, p. 1-8, 2014.
- ALBERT, S. *et al.* Prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in patients with squamous cell carcinoma of the mobile tongue. **Oral Oncol.**, v. 48, n. 12, p. 1263-1271, 2012.
- ALLISON, P.; LOCKER, D.; FEINE, J.S. The role diagnostic delays in the prognosis of oral cancer: a review of the literature. **Oral Oncol.**, v. 34, n. 3, p. 161-170, 1998.
- ALMOFTI, A. *et al.* The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Oncol.**, v. 25, n. 1, p. 65-71, 2004.
- ARDUINO, P.G. *et al.* Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 8, p. 1570- 1579, 2008.
- BACHAR, G. *et al.* Outcome of oral tongue squamous cell carcinoma in patients with and without known risk factors. **Oral Oncol.**, v. 47, n. 1, p. 45-50, 2011.
- BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncol.**, v. 46, n. 6, p. 414-417, 2010.
- BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 7, p. 540-550, 2004.
- BEENA, V.T. *et al.* Oral cancer in young non-habitual females: a report of four cases and review of the literature. **Aust. Dent. J.**, v. 56, n. 3, 322-327, 2011.
- BENEVENUTO, T. G. *et al.* Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. **Appl. Immunohistochem Mol. Morphol.**, v. 20, n. 3, p. 291-297, 2012.
- BODNER, L. *et al.* Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger – review and analysis of 186 reported cases. **Oral Oncol.**, v. 50, n. 2, p. 84-89, 2014.
- BRYNE, M. *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J. Pathol.**, v.166, n. 4, p. 375- 381, 1992.
- BRYNE, M. The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? **Anticancer Res.**, v. 18, n. 6B, p. 4757-4764, 1998.
- CARIATI, P. *et al.* Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a retrospective study in Granada University Hospital. **Med. Oral Patol. Med. Cir. Bucal.**, v. 22, n.6, p. e679-e685, 2017.

- CHENG, Z.H. *et al.* Chemokines and their receptors in lung cancer progression and metastasis. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.**, v.17, n. 5, p. 342-351, 2016.
- DE MORAIS, E.F. *et al.* Prognostic factors of oral squamous cell carcinoma in young patients: A systematic review. **J. Oral Maxillofac.**, v. 75, n. 7, p. 1555-1566, 2017.
- DEVRIES, M.E. *et al.* Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. **J. Immunol.**, v. 176, n.1, p. 401-415, 2006.
- DOMINGUETI, C.B. *et al.* Prognostic value of immunoexpression of CCR4, CCR5, CCR7 and CXCR4 in squamous cell carcinoma of tongue and floor of the mouth. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** v. 24, n. 3, p.e354-e363, 2019.
- DOS SANTOS COSTA, S.F. *et al.* Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: Is it any different from older patients?. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 47, n. 6, p. 541-546, 2018.
- DUAN, Y. *et al.* Targeted silencing of CXCR4 inhibits epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. **Oncol Lett.**, v. 12, n. 3, p. 2055-2061, 2016.
- FARQUHAR, D.R. *et al.* Oral tongue carcinoma among young patients: An analysis of risk factors and survival. **Oral Oncol.**, v. 84, n. 1, p. 7-11, 2018.
- FONSECA, F. P. *et al.* Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients - a multicenter collaborative study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 118, n. 4, p. 483-9, 2014.
- FREITAS, R.A. *et al.* Correlation of β -catenin expression and metastasis in tongue squamous cell carcinoma: the clinicopathological and prognostic significance. **Acta Cir. Bras.**, v. 25, n. 6, p. 513, 2010.
- GONZÁLEZ-ARRIAGADA, W.A. *et al.* Clinicopathological significance of chemokine receptor (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 and CXCR4) expression in head and neck squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 47, n. 8, p. 755-776, 2018.
- GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J.M. As quimiocinas e os seus receptores – Características e funções fisiológicas. **Acta Med. Port.**, v. 24, n. 1, p. 967-976, 2011.
- HANNA, G.J. *et al.* Tumor PD-L1 expression is associated with improved survival and lower recurrence risk in young women with oral cavity squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 47, n. 5, p. 568-577, 2018.
- HEMBRUFF, S.L.; CHENG, N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. **Cancer Ther.**, v.7, n. a, p. 254-267, 2009.
- HERNANDEZ, P.A. *et al.* Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. **Nat. Genet.** v. 34, n. 1, p. 70-74, 2003.

- HILLY, O. *et al.* Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years. **Oral Oncol.**, v. 49, n. 10, p. 987-990, 2013.
- HIROTA, S.K. *et al.* Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 13, n. 4, p. E227-231, 2008.
- HUSSEIN A.A. *et al.* Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: a systematic review. **Eur J Cancer**. v. 82, n. 1, p. 115-127, 2017.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. **Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil**, 2015. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 03 mar. 2017.
- IZARZUGAZA, M.I.; ESPARZA, H.; AGUIRRE, J.M. Epidemiological aspects of oral and pharyngeal cancers in the Basque Country. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 30, n. 9, p. 521-526, 2001.
- KAKINUMA, T.; HWANG, S.T. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 79, n. 4, p. 639-651, 2006.
- KAMINAGAKURA, E. *et al.* CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Head Neck**, v. 33, n. 10, p. 1413-1419, 2011.
- KAPILA, S.N.; NATARAJAN, S.; BOAZ, K.A. Comparison of clinicopathological differences in oral squamous cell carcinoma in patients below and above 40 years of age. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 11, n. 9, p. ZC46-ZC50, 2017.
- KATAYAMA, A. *et al.* Expression of CXCR4 and its down-regulation by IFN-gamma in head and neck squamous cell carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 8, p. 2937-2946, 2005.
- KUFAVERA, I.; SALANGA, C.L.; HANDEL, T. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 93, n. 4, p. 372-383, 2015.
- KUROKAWA, H. *et al.* The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, n. 10, p. 602-607, 2005.
- KNOPF, A. *et al.* Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. **Oncotarget**, v. 6, n. 5, p. 3443-3451, 2015.
- LAPTEVA N., *et al.* CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. **Cancer Gene Ther.**, v.12, n. 1, p.84- 89, 2005.
- LEE, J.I. *et al.* Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 107, n. 5, p. 678-684, 2009.

- LEITE, A.A. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study on 194 cases in northeastern Brazil. A cross-sectional retrospective study. **Sao Paulo Med. J.**, v. 136, n. 2, p. 165-169, 2018.
- LI, S.H. *et al.* Suppression of chronic lymphocytic leukemia progression by CXCR4 inhibitor WZ811. **Am. J. Transl. Res.**, v.15, n. 8, v. 9, p. 3812-3821, 2016.
- LISTL, S. *et al.* Survival of patients with oral cavity cancer in Germany. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53415, 2013.
- LOURENÇO, S.Q.C. *et al.* Histological classifications of oral squamous cell carcinoma: a review of the proposed systems. **Rev. Bras. Cancer**, v. 53, n. 3, p. 325-333, 2007.
- MAJCHRZAK, E. *et al.* Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. **Radiol Oncol.**, v. 48, n. 1, p. 1–10, 2014.
- MARZOUK, O.; SCHOFIELD, J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 2, p. 2767-2810, 2011.
- MENG, W; XUE, S. CHEN, Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. **Gene**, v.641, n. 1, p.105-110, 2018.
- MENG, X. *et al.* Expression of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma: correlations with clinicopathology and pivotal role of proliferation. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 39, n. 1, p. 63-68, 2010.
- MILLER, M.C.; MAYO, K.H. Chemokines from a Structural Perspective. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 10, p. pii: E2088, 2017.
- MONTERO, P.H.; PATEL, S.G. Cancer of the oral cavity. **Surg. Oncol. Clin. N. Am.**, v. 24, n. 3, p. 491-508, 2015.
- MUCKE, T. *et al.* Tumor thickness and risk of lymph node metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. **Oral Oncol.**, v. 53, n. 1, p. 80-84, 2016.
- MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3032-3043, 2000.
- MURPHY, P. *et al.* International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 1, p. 145-176, 2000.
- MCDOWELL, J.D. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, v. 39, n. 2, p. 277-294, 2006.
- NAGASAWA, T. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 92, n. 5, p. 433-439, 2014.
- NEVILLE, B.W. *et al.* **Patologia Oral e Maxilofacial**. Rio Janeiro: Elsevier, 2016. p. 730.

- NG, J.H. *et al.* Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. **Head Neck**, v. 39, n. 2, p. 297–304, 2017.
- OLIVEIRA-NETO, H.H. *et al.* Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastases and development of oral squamous cell carcinomas. **Tumour Biol.**, v. 29, n. 4, p. 262-271, 2008.
- PATEL, S.C. *et al.* Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young White women, age 18 to 44 years. **J. Clin. Oncol.**, v.29, n. 11, p. 1488–1494, 2011.
- PAWING, L. *et al.* Diversity and inter-connections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: molecular perspectives. **Front. Immunol.**, v. 6, n. 429, p. 1-23, 2015.
- RIBEIRO, A.C. *et al.* Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 47, n. 2, p. 95-98, 2009.
- ROSTENE, W.; BUCKINGHAM, J.C. Chemokines as modulators of neuroendocrine functions. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 38, n. 3, p. 351-353, 2007.
- SABA, N.F. *et al.* Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the oral tongue, base of tongue, and tonsils: A surveillance, epidemiology and end results program-based analysis. **Oncology**, v. 81, n.1, p. 12–20, 2011.
- SALVATORE P. *et al.* CXCR4-CXCL12-dependent inflammatory network and endothelial progenitors. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, n. 27, p. 3019- 3029, 2010.
- SANTOS, H.B. *et al.* Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 21, n. 2, p. e151-156, 2016.
- SANTOS-SILVA, A. R. *et al.* High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. **Histopathology**, v. 58, n. 7, p. 1127-1135, 2011.
- SILVEIRA, E.J. *et al.* Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int. J. Surg. Pathol.**, v. 15, n. 4, p. 376-383, 2007.
- SINGH, S.; SADANANDAM, A.; SINGH, R.K. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 26, n. 3-4, p. 453-467, 2007.
- SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant of tumors. International Union Against Cancer.** 6th ed., New York: Wiley-Liss, 2002. 239p.
- SOBIN, L.H.; GOSPODAROWICZ, M.K.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant of tumors. International Union Against Cancer.** 7th ed. 2009. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. 301p.

SOUDRY, E. *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. **Clin. Otolaryngol.**, v. 35, n. 4, p. 307-312, 2010.

SUN, Q.; FANG, Q.; GUO, S. A comparison of oral squamous cell carcinoma between young and old patients in a single medical center in China. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, v. 8, n. 8, p. 12418-23, 2015;

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.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 4-5, p. 301-308, 2009.

SCULLY, C.; FELIX, D.H. Oral medicine--update for the dental practitioner oral cancer. **Br. Dent. J.**, v. 200, n. 1, p. 13-17, 2006.

SPANO, J.P. *et al.* Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. **Annals of Oncology.**, v.15, n. 4, p. 613-617, 2004.

TANG, C.H. *et al.* Bone-derived SDF-1 stimulates IL-6 release via CXCR4, ERK and NF-kappaB pathways and promotes osteoclastogenesis in human oral cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 8, p. 1483-1492, 2008.

TEICHER, B.A.; FRICKER, S.P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.16, n.11, p.2927-2931, 2010.

UCHIDA, D. *et al.* Blockade of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma inhibits lymph node metastases. **Eur. J. Cancer**, v. 47, n. 3, p. 452-459, 2011.

UCHIDA, D. *et al.* Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. **Exp. Cell. Res.**, v. 290, n. 2, p. 289-302, 2003.

UDEABOR, S.E. *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. **Head Neck Oncol.**, v. 4, n. 28. p. 2-7, 2012.

WANG J. *et al.* The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, v.25, n.4, p.573-587, 2006.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, 2009.

WHO/IARC Classification of Tumours, Lyon, France: International Association for Research on Cancer, 2016 Available at: <http://publications.iarc.fr/>. Acesso em Abril 2017.

ZHANG, Y.Y. *et al.* Clinicopathological characteristics and outcomes of squamous cell carcinoma of the tongue in different age groups. **Head Neck**, v. 39, n. 11, p. 2276-2282, 2017.

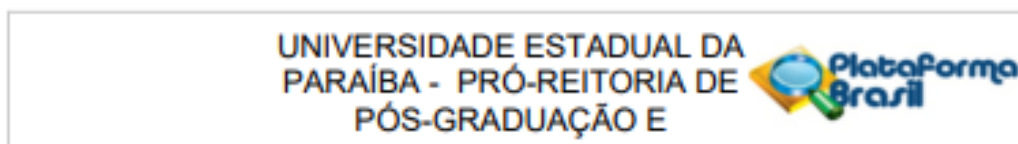
ZHANG, W. *et al.* Construction of a CXCL12-KDEL fusion gene to inhibit head and neck squamous cell carcinoma metastasis by intracellular sequestration of CXCR4. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, n. 195828, p. 1-9, 2015.

ZHOU, B. *et al.* Tumor necrosis factor α induces myofibroblast differentiation in human tongue cancer and promotes invasiveness and angiogenesis via secretion of stromal cell-derived factor-1. **Oral Oncol.**, v. 51, n. 12, p. 1095-1102, 2015.

ANEXOS

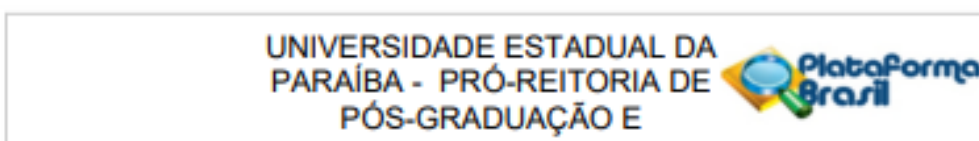
ANEXOS

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.185.909

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Recomendamos enviar a este CEP os resultados finais dessa pesquisa

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é viável, está embasado cientificamente e conforme preconiza a Resolução 466/12 do CONEP / 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_1291521.pdf	21/02/2019 13:30:57		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_Adequacoes.pdf	21/02/2019 13:30:34	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Adequacoes.pdf	21/02/2019 13:30:20	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	18/02/2019 23:09:25	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Laureano_2.pdf	13/02/2019 00:24:57	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Laureano_1.pdf	13/02/2019 00:24:37	Cassiano Francisco Weege Nonaka	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

ANEXO B – Normas para submissão de trabalhos ao periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine*.

Author Guidelines

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

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

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

1. GENERAL

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

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Journal of Oral Pathology & Medicine. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Publishing Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Note to NIH Grantees

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

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

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

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association

Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

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

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

- If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians.
- If the person is dead, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the photo against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased.
- If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

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

2.4 Conflict of Interest

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

2.5 Appeal of Decision

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

2.6 Permissions

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

2.7 Copyright Assignment

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

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

2.8 OnlineOpen

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your

paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

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

3.1. Getting Started

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

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.

- You are required to upload your files.
- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

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

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

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

3.6. E-mail Confirmation of Submission

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

be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.7. Manuscript Status

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

3.8. Submission of Revised Manuscripts

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

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

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

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

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

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

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

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

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

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

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

5.2. Format

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

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

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

5.3. Structure

All papers submitted to Journal of Oral Pathology & Medicine should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest state-

ment where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

Title Page: Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Discussion: Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Dis-

discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

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

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

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

5.4. References

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

- If there are more than 6 author names in a reference then first three author names are retained with ‘et al.’ and et al. is in roman.
- Article title in roman and sentence case.

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

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

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

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

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

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

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

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

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

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

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

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

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

6. AFTER ACCEPTANCE

6.1 Proofs

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

6.2 Supporting Information

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

6.3 Early View

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

6.4 Offprints

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

6.5 Author Services

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

APÊNDICES
