



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

EALBER CARVALHO MACEDO LUNA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CD133 EM DISPLASIAS EPITELIAIS
ORAIS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES ORAIS**

Fortaleza
2015

EALBER CARVALHO MACEDO LUNA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CD133 EM DISPLASIAS EPITELIAIS
ORAIS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES ORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica
Odontológica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karuza Maria Alves Pereira

**Fortaleza
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- L983e Luna, Ealber Carvalho Macedo.
Expressão imuno-histoquímica de cd133 em displasias epiteliais orais e carcinomas epidermoides orais./ Ealber Carvalho Macedo Luna. – 2015.
59 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará; Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; Departamento de Odontologia; Programa de Pós-Graduação em Odontologia; Mestrado em Odontologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Clínica Odontológica.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Karuza Maria Alves Pereira.
1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Lesões Pré-Cancerosas. 3. Neoplasias Bucais. I. Título.

CDD 616.99431

EALBER CARVALHO MACEDO LUNA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CD133 EM DISPLASIAS EPITELIAIS
ORAIS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES ORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovada em: 05/03/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Karuza Maria Alves Pereira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC *campus* Sobral

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Renata Cordeiro Teixeira Medeiros
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Aos meus pais, Ealber e Livramento, as
pessoas mais importantes da minha vida.
Eles nunca mediram esforços para que eu
chegasse até aqui. A vocês, o meu muito
obrigado por tudo. Amor incondicional

AGRADECIMENTOS

À minha avó Iduína e minha Tia Maria Das Dores, pelo apoio incondicional que sempre me deram. Podem contar sempre comigo.

À minha namorada Camila, pela paciência, pelo amor e carinho com que sempre me tratou. Você é uma mulher muito especial. Te amo!

Ao meu primo João Luís, pelos anos que moramos juntos na casa da vovó, pelos conselhos e incentivo. Espero atingir o grau de conhecimento científico que você atingiu.

Aos meus familiares, pelo apoio e dedicação.

À minha orientadora, Professora Karuza, pessoa a quem devo grande parte da minha formação profissional. Obrigado pelas oportunidades, pelo incentivo e pelas lições que a senhora me deu. Sempre será um prazer trabalhar com a senhora.

Aos professores Fábio Wildson e Alexandre Nogueira. Tive a honra de ser alunos desses dois grandes mestres. Obrigado pelos conselhos, trabalhos e ensinamentos transmitidos. Quero tê-los sempre no meu convívio. Dois grandes amigos.

À professora Ana Paula, por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Patologia Bucal. Muito obrigado pelo carinho e pela forma respeitosa com que a senhora sempre me tratou.

Aos professores Fabrício Bitu e Mário Mota, dois grandes exemplos de profissionais e mestres. É muito bom trabalhar com vocês diariamente.

Ao colega de pós-graduação e amigo Filipe, pela ajuda e pelos conselhos. Você foi muito importante no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por tudo.

Ao amigo Paulinho, pela valorosa ajuda nos dados estatísticos do trabalho. Você, além de ser um excelente profissional, é um grande amigo e incentivador.

Aos técnicos de anatomia patológica Alceu Machado e Júnior. Vocês foram de fundamental importância no desenvolvimento deste trabalho. Serei eternamente grato.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Bucodental: Artur, Carol, Paulinho, Camila, Thales, Clarissa, Malena, Filipe, Thâmara, Mariana Araújo,

Ernando, Erasmo, Breno, Laryssa, Luan, Mariana Canuto. Obrigado pela amizade e troca de experiências.

Aos meus amigos de graduação: Brunno, Stephanie, Vanessa, Luzia, Rodrigo e Leonardo. A vocês o meu muito obrigado por sempre acreditarem em mim. Espero que a nossa amizade dure a vida toda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFC, Clínicas de Métodos de Diagnóstico I e II e ao Laboratório de Patologia Bucodental, onde realizei minha pesquisa e cresci bastante, pessoal e profissionalmente.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro e por acreditar em nossa pesquisa.

*“Entender a vontade de **Deus** nem sempre é fácil, mas crer que Ele está no comando e tem um plano para a nossa vida faz a caminhada valer a pena.”*

“Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. É agradecer a Deus a cada minuto pelo milagre da vida.” (Fernando Pessoa)

RESUMO

Introdução: Células-tronco cancerígenas constituem uma subpopulação de células neoplásicas que apresentam propriedades fenotípicas de diferenciação, renovação celular e proliferação semelhantes às células-tronco normais, sendo responsáveis pela manutenção tumoral. **Objetivo:** investigar a imunexpressão de CD133, marcador de células-tronco cancerígenas, em displasias epiteliais orais e em carcinomas epidermóides orais. **Material e Método:** a amostra se constituiu de 15 casos de CEO e 15 casos de DEO, sendo realizada a imuno-histoquímica pela técnica da estreptoavidina-biotina, utilizando o anticorpo anti-CD133 (GTX60471, GeneTex®, San Antonio, TX, USA), com diluição de 1:650 e recuperação antigênica com citrato PH 6. A análise quantitativa foi realizada por meio da contagem percentual de células com imunomarcagem positiva em cinco campos, no aumento de 400X, utilizando o programa *Image J*. Os resultados foram obtidos e comparados entre grupos por meio dos testes *t* de Student e ANOVA multifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni, tomando como base os níveis de significância de 5%. **Resultados:** a avaliação imuno-histoquímica evidenciou marcação positiva em todos os casos da amostra (100% dos casos). No grupo de DEO, observou-se que $77,6 \pm 16,0$ das células epiteliais exibiam imunexpressão positiva para CD133 e, no grupo de CEO, verificou-se que $82,6 \pm 7,2$ das células epiteliais exibiam imunexpressão positiva para CD133; contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p=0,283$). Ademais, observou-se que, com relação a sexo, localização anatômica e grau de displasia, a marcação positiva ocorreu da seguinte forma: sexo masculino (DEO: $76,4 \pm 10,9$ e CEO: $82,9 \pm 6,3$) ($p=0,526$) e feminino (DEO: $78,0 \pm 17,9$ e CEO: $82,1 \pm 8,9$) ($p=0,588$); língua (DEO: $69,6 \pm 23,2$ e CEO: $83,5 \pm 9,3$) ($p=0,217$), mucosa jugal (DEO: $84,8 \pm 14,7$ e CEO: $79,0 \pm 5,7$) ($p=0,618$) e palato (DEO: $74,5 \pm 6,7$ e CEO: $86,8 \pm 10,3$); DEO leve ($78,0 \pm 18,4$), DEO moderada ($72,7 \pm 11,4$) e DEO severa ($80,1 \pm 1,8$) ($p=0,899$). Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. **Conclusão:** sugere-se que a presença dessa subpopulação celular pode não ser imprescindível para a determinação do fenótipo maligno.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas. Lesões Pré-Cancerosas. Neoplasias Bucais.

ABSTRACT

Introduction: Cancer stem cells are a subpopulation of neoplastic cells, which have properties phenotypic differentiation, cell renewal and proliferation similar to normal stem cells are responsible for tumor support. **Objective:** To investigate the immunoreactivity of CD133, a marker of cancer stem cells in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Methods:** 15 cases were selected as CEO and 15 cases of DEO, being held by immunohistochemistry by the streptavidin-biotin technique, using anti-CD133 antibody (GTX60471, GeneTex®, San Antonio, TX, USA) with dilution of 1: 650 and antigen retrieval with citrate pH 6. the quantitative analysis was performed using the percentage of cells with positive immunostaining count in 5 fields at 400X magnification using the Image program J. the results were obtained and compared between groups through the Student t test and ANOVA followed by Bonferroni multifactorial post-test, based on the levels of significance of 5%. **Results:** Immunohistochemical evaluation showed positive staining in all cases the sample (100% of cases). In DEO group, it was observed that 77.6 ± 16.0 epithelial cells exhibited positive immunostaining for CD133 and CEO group was found that 82.6 ± 7.2 epithelial cells exhibited positive immunostaining for CD133; however, there was no statistically significant difference between groups ($p = 0.283$). Moreover, it was observed that, with respect to gender, anatomical location and degree of dysplasia, the positive staining was as follows: male (DEO: 76.4 ± 10.9 and CEO: 82.9 ± 6.3) ($p = 0.526$) and female (DEO: 78.0 ± 17.9 and CEO: 82.1 ± 8.9) ($p = 0.588$); tongue (DEO: 69.6 ± 23.2 and CEO: 83.5 ± 9.3) ($p = 0.217$), buccal mucosa (DEO: 84.8 ± 14.7 and CEO: 79.0 ± 5.7) ($p = 0.618$) and palate (DEO: 74.5 ± 6.7 and CEO : 86.8 ± 10.3); mild DEO (78.0 ± 18.4), moderate DEO (72.7 ± 11.4) and DEO severe (80.1 ± 1.8) ($p = 0.899$). However, there was no statistically significant difference between groups. **Conclusion:** it is suggested that the presence of this cell subpopulation may not be essential for determining the malignant phenotype.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Precancerous conditions. Mouth Neoplasms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Percentual de Células Epiteliais Imunomarcadas por CD133.....	32
FIGURA 2- Percentual de Células Epiteliais Imunomarcadas por CD133 por sexo.....	33
FIGURA 3- Percentual de Células Epiteliais Imunomarcadas por CD133 por Grau de Displasia.....	34
FIGURA 4- Percentual de Células Epiteliais Imunomarcadas por CD133 por Localização Anatômica.....	35
FIGURA 5- Detecção da expressão de CD133 em espécime de Carcinoma Epidermoide Oral.....	36
FIGURA 6- Detecção da expressão de CD133 em espécime de Displasia Epitelial Oral.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

CEO	Carcinoma epidermoide oral
LPM	Lesão potencialmente maligna
DEO	Displasia epitelial oral
CSC	Célula-tronco cancerígena
CD133	Prominina – 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Células-tronco cancerígenas (CSCs).....	15
2 PROPOSIÇÃO	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 CAPÍTULOS	18
3.1 CAPÍTULO 1: Expressão imuno-histoquímica de CD133 em Displasias Epiteliais Orais e Carcinomas Epidermóides Orais.....	19
4 CONCLUSÃO GERAL	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS.....	42

1 INTRODUÇÃO GERAL

O câncer tem sido alvo de estudos e investigações científicas dentro da Patologia oral por ser importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, apesar da distribuição geográfica ser variável nos continentes. É considerado a segunda maior causa de morte no mundo, atrás de mortalidades relacionadas a doenças coronarianas; por isso, os fatores relacionados ao câncer apresentam grande relevância em pesquisas científicas (SCULLY, 2005; RHODUS et al., 2014). Os cânceres orais continuam sendo uma doença letal em mais de 50% dos casos diagnosticados anualmente e, em grande parte, isso se deve ao fato da maioria dos casos serem diagnosticados em estágios avançados da doença (WARNAKULASURIYA, 2009).

O Carcinoma Epidermoide Oral (CEO) apresenta-se como a forma mais prevalente do câncer de boca, representando aproximadamente 90% das neoplasias malignas em cavidade oral e orofaringe (SCULLY, 2005; SYRJÄNEN, 2005; RHODUS et al., 2014). Apesar dos grandes avanços e descobertas, o prognóstico desse tipo de câncer ainda é pobre, com taxa de sobrevivência estimada em 56% em cinco anos (KADEMANI et al., 2005), fato que tem encorajado pesquisas adicionais sobre fatores que possam modificar a evolução do câncer de boca (MASSANO et al., 2006).

O CEO acomete principalmente o sexo masculino em uma proporção de 2:1, sendo que essa proporção está declinando (COSTA et al., 2005; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; AYALA et al., 2010). A maioria dos casos ocorre na faixa etária acima dos 40 anos, sendo as regiões de língua e lábio inferior os principais sítios de localização (COSTA et al., 2005; NEVILLE et al., 2009; AYALA et al., 2010). Os sintomas podem variar, dependendo do sítio primário de acometimento e podem incluir dor na orofaringe inespecífica, disfagia e odinofagia (HADDAD et al., 2008).

Múltiplos fatores de risco estão envolvidos para o desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral. Não há um agente ou fator causador isolado, claramente definido ou aceito, mas tanto fatores extrínsecos quanto intrínsecos podem estar associados. Fatores intrínsecos como alterações genéticas, deficiências nutricionais e imunossupressão; e fatores extrínsecos como raios solares, fumo, álcool e alguns vírus, dentre estes o Papilomavirus Humano(HPV),

têm sido apontados como possíveis agentes etiológicos, (UOBE et al., 2001; IAMAROON et al., 2004; SCULLY, 2005; BODNER et al, 2013).

Os três maiores estímulos carcinogênicos, dentre esses os agentes químicos (fumo e álcool), físicos (radiação) e infecciosos (vírus oncogênicos) podem alterar a estrutura dos genes por produzirem 13 mutações de ponto, deleção ou inserção, promovendo, por conseguinte, múltiplas alterações no genoma. O acúmulo dessas alterações genéticas, incluindo ativação ou supressão de oncogenes e genes supressores tumorais, leva ao desequilíbrio no ciclo celular gerando danos ao DNA celular e a perda do controle do ciclo de divisão da célula, favorecendo uma instabilidade genética (NAGPAL; DAS, 2003).

O prognóstico do câncer de boca no Brasil é considerado ruim. Embora a cavidade oral seja facilmente acessível à exploração, o que torna mais fácil a detecção de lesões incipientes, o diagnóstico do câncer oral, em estágio assintomático, é incomum (INCA, 2014).

As lesões potencialmente malignas (LPM) são lesões que podem preceder ao desenvolvimento do câncer. A OMS (Organização Mundial de Saúde) recomenda que o termo lesão potencialmente maligna seja preferível para denominar as lesões pré-cancerígenas ou pré-malignas, pois não obrigatoriamente essas lesões se transformam em câncer (BARNES et al., 2005). As lesões potencialmente malignas são definidas como lesões que têm maior probabilidade de evoluir para o câncer. O tecido epitelial acometido pode apresentar alterações morfológicas, caracterizando a displasia, o qual demonstra maior potencial de sofrer alteração maligna para carcinoma epidermoide, quando comparado com o tecido epitelial normal (WARNAKULASURIYA et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009).

Leucoplasia, eritroplasia, eritroleucoplasia e queilite actínica são as principais lesões potencialmente malignas envolvidas no surgimento de lesões malignas intraorais (BARNES et al., 2005; WARNAKULASURIYA et al., 2007). Quando o desfecho de um grande número de lesões potencialmente malignas é revisto, a frequência de transformação em lesão maligna é maior do que o risco associado a uma mucosa normal ou não alterada, ressaltando a importância do diagnóstico precoce dessas lesões para o correto tratamento e acompanhamento dessas patologias (WARNAKULASURIYA et al., 2008).

LPMs podem apresentar alterações morfológicas e citológicas que caracterizam um quadro histopatológico de displasia epitelial oral (DEO), que

demonstra um maior potencial de transformação maligna para CEO quando comparada ao tecido epitelial normal (WARNAKULASURIYA et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009). Individualmente, essas células podem exibir atipias, tais como: pleomorfismo celular, aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromatismo nuclear, dentre outras (SCULLY, 2005). Assim, o diagnóstico histopatológico de DEO é considerado um importante indicativo de transformação para CEO (BARNES et al., 2005; BRENNAN et al., 2007; WARNAKULASURIYA et al., 2007).

Estudos recentes evidenciam novos achados sobre câncer de cabeça e pescoço, conduzindo a uma melhor compreensão das características biológicas desses tumores, bem como fornecendo mais opções de tratamento como novos agentes terapêuticos dirigidos contra múltiplos alvos moleculares (HADDAD et al., 2008).

Atualmente é reconhecido que vários tumores sólidos, incluindo o CEO, são bastante heterogêneos, principalmente devido as mutações que ocorrem, tanto por conta da instabilidade genética como dos fatores ambientais associados. Algumas subpopulações de células podem exercer papel importante no processo de carcinogênese, como as células-tronco cancerígenas (MARGARITESCU et al., 2011).

1.1 Células-Tronco Cancerígenas na Carcinogênese

Células-tronco cancerígenas (CSCs) compreendem uma pequena população de células neoplásicas que apresentam propriedades pluripotentes das células-tronco. CSCs podem ser dependentes do Fator Indutor de Hipóxia (HIF) para a sobrevivência, renovação celular e crescimento tumoral (HEDDLESTON et al., 2010; ZHANG et al., 2012). Essas células-tronco de auto-renovação estão diretamente associadas à manutenção tumoral, dando origem à proliferação e diferenciação celular, tendo sido descritas como as células diferenciadas que são responsáveis por grande parte da heterogeneidade celular vista nos cânceres (BURKERT et al., 2006; ZHANG et al., 2012; KAUR et al., 2014).

Hipóxia é um evento comum em muitos cânceres. Isso contribui para a progressão tumoral local e a distância. Evidências experimentais recentes têm expandido o papel da hipóxia no câncer, demonstrando diferentes respostas à hipóxia entre subpopulação heterogênea de células dentro do tumor. Dentre essas, as CSCs possuem muitas similaridades fenotípicas com as células-tronco normais,

tais como habilidade de aumentar a regulação de quinases de reparo do DNA para evadir do dano genômico causado pela radiação (BAO et al., 2006) e resistência aos tratamentos convencionais. Embora um tanto controversa, a hipóxia tem sido relacionada cada vez mais ao fenótipo das CSCs. O papel dos HIFs nessas células tem se tornado um foco importante para entendimento do crescimento e sobrevivência tumoral (HILL et al., 2009; ROUTRAY et al., 2014).

A identificação das CSCs isoladas pode ser através de alguns marcadores de superfície, como: CD133, CD44 e CD24. CD44 caracteriza-se como uma glicoproteína de superfície celular envolvida nas interações celulares, migração e adesão celular. Além disso, é um receptor para o ácido hialurônico, ativando uma variedade de receptores tirosina-quinases em vários tipos de cânceres; essa glicoproteína também desempenha um papel importante na invasão e metástase de uma variedade de células tumorais (MARGARITESCU et al., 2011; SATPUTE et al., 2013).

CD24 representa uma molécula de adesão expressa por linfócitos B e neutrófilos. Alguns autores têm sugerido que a expressão citoplasmática desse marcador está associada a diferentes tipos de cânceres, como o adenocarcinoma de cólon, estômago, bexiga e ovário; não há evidências de correlação entre a expressão de CD24 e câncer nas regiões de cabeça e pescoço (LIM et al., 2005; SATPUTE et al., 2013).

CD133, também denominado prominina – 1, é uma glicoproteína localizada na superfície das CSCs, é considerado o mais importante marcador dessas células em casos de câncer de próstata, cérebro, pulmão, fígado, rins, ovário e pele. Também é utilizado como marcador de prognóstico em casos de câncer de mama, reto, estômago e pâncreas (OKAMOTO et al., 2013). Novas evidências mostram que CD133 constitui-se em um marcador para CSCs que pode estar presente em vários tumores, como no estudo de Mizrak e colaboradores (2008), em tumores de próstata, podendo ser expresso isoladamente ou em combinação com CD44+ e $\alpha\beta 1$ em células tumorais, independente do grau de diferenciação e metástases. (MIZRAK et al., 2008).

Alguns trabalhos, como o de Sun et al., 2012 evidenciaram que um aumento na expressão de CD133 pode estar correlacionado a metástase e a graus de diferenciação em carcinoma de células claras renais

2 PROPOSIÇÃO

a. Objetivo Geral

Investigar a expressão das células-tronco cancerígenas por meio da imunomarcção com CD133, em displasias epiteliais orais e carcinomas epidermóides orais.

b. Objetivos Específicos

- Analisar a presença de células-tronco cancerígenas, por meio de imunomarcção com CD133, nos casos de carcinomas epidermóides orais;
 - Analisar a presença de células-tronco cancerígenas, por meio de imunomarcção com CD133, nos casos de displasias epiteliais orais;
 - Comparar a imunoexpressão das células-tronco cancerígenas entre os casos de displasias epiteliais orais e carcinomas epidermóides orais;
- Correlacionar a imunoexpressão de CD133 com sexo e localização anatômica;
- Correlacionar a imunoexpressão de CD133 com classificação histopatológica (leve, moderada e severa) das displasias epiteliais.

3 CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato (Anexo A).

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, sob o número do parecer 137.019, sendo aprovado em 01/12/12, sob o CAAE: 06720312.3.0000.5054 (Anexo B).

Foram utilizados fichas de requisição de biópsias, laudos histopatológicos e espécimes teciduais emblocados em parafina, armazenados nos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da UFC, através da assinatura do Termo de Fiel Depositário (Anexo C)

Assim sendo, esta dissertação é composta por um capítulo contendo um artigo científico que será submetido para a publicação no periódico “**Archives of Oral Biology**”, conforme descrito abaixo: (Anexo D)

Immunohistochemistry expression of CD133 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma

Luna ECM, Pereira KMA

3.1 CAPÍTULO 1: Expressão imuno-histoquímica de CD133 em displasias epiteliais orais e carcinomas epidermoides orais. Este artigo seguiu as normas de publicação do Periódico Archives of Oral Biology (ISSN: 0003-9969).

Autores:

Ealber Carvalho Macedo Luna

Grau acadêmico: Bacharel em Odontologia

Posição: Estudante de Mestrado em Odontologia

Afiliação institucional: Departamento de Clínica Odontológica, Setor de Diagnóstico Oral, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

Karuza Maria Alves Pereira

Grau acadêmico: Bacharel em Odontologia, Mestre em Patologia Oral, Bacharel em Patologia Oral.

Posição: Professora Adjunta III da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral.

Afiliação institucional: Departamento de Clínica Odontológica, Setor de Patologia Oral, Universidade Federal do Ceará, *campus* Sobral, Sobral, Brasil.

Autor de Correspondência: Ealber Carvalho Macedo Luna

Endereço: Rua Oscar Bezerra, Damas – Fortaleza, Ceará, Brasil, CEP: 60420-480.

Telefone Residencial: 55-85-34670845

Email: ealbercarvalho@yahoo.com.br

RESUMO

OBJETIVO: investigar a imunexpressão de CD133, marcador de células-tronco cancerígenas, em displasias epiteliais e em carcinomas epidermóides orais. **MATERIAL E MÉTODO:** a amostra foi constituída de 15 casos de CEO e 15 casos de DEO, sendo realizada a imuno-histoquímica com o anticorpo anti-CD133 (GTX60471, GeneTex®, diluição 1:650 e recuperação antigênica com citrato PH 6). A análise quantitativa foi realizada por meio da contagem percentual de células imunomarcadas em cinco campos, no aumento de 400X, utilizando o programa *Image J*. Os resultados obtidos foram comparados por meio dos testes *t* de Student e ANOVA multifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni, tomando como base os níveis de significância de 5%. **RESULTADO:** evidenciou marcação positiva em todos os casos da amostra (100% dos casos). No grupo de DEO, observou-se que $77,6 \pm 16,0$ das células epiteliais exibiam imunexpressão para CD133, enquanto no grupo de CEO verificou imunomarcagem de $82,6 \pm 7,2$ das células epiteliais; contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p=0,283$). Ademais, observou-se que, com relação a sexo, localização anatômica e grau de displasia, a imunexpressão: sexo masculino (DEO: $76,4 \pm 10,9$ e CEO: $82,9 \pm 6,3$) ($p=0,526$) e feminino (DEO: $78,0 \pm 17,9$ e CEO: $82,1 \pm 8,9$) ($p=0,588$); língua (DEO: $69,6 \pm 23,2$ e CEO: $83,5 \pm 9,3$) ($p=0,217$), mucosa jugal (DEO: $84,8 \pm 14,7$ e CEO: $79,0 \pm 5,7$) ($p=0,618$) e palato (DEO: $74,5 \pm 6,7$ e CEO: $86,8 \pm 10,3$); DEO leve ($78,0 \pm 18,4$), DEO moderada ($72,7 \pm 11,4$) e DEO severa ($80,1 \pm 1,8$) ($p=0,899$). Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. **CONCLUSÃO:** sugere-se que a presença dessa subpopulação celular pode não ser imprescindível para a determinação do fenótipo maligno.

Palavras-chave: Lesões Pré-Cancerosas. Carcinoma de Células Escamosas. Neoplasias Bucais.

INTRODUÇÃO

Os cânceres orais representam um importante problema de saúde. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer do Brasil, em previsão para o ano de 2014, estima-se para o câncer de boca um número de 15.290 novos casos por 100 mil habitantes no Brasil, sendo 11.280 homens e 4.010 mulheres. . Essa incidência do câncer bucal representa 2,6% de todos os cânceres registrados no Brasil, sendo uma das mais altas do mundo e de importante expressividade na América Latina¹

Dentre as neoplasias malignas da cavidade oral, o Carcinoma Epidermoide Oral (CEO) é a forma mais comum, perfazendo mais de 90% dos casos dessas malignidades²⁻³. Alguns CEOs têm sido documentados em associação ou precedidos por uma lesão potencialmente maligna, como a Displasia Epitelial Oral (DEO). O prognóstico desse carcinoma ainda é pobre, principalmente se descoberto em estágios mais avançados⁴. Leucoplasia, eritroplasia, eritroleucoplasia e a queilite actínica são as principais desordens envolvidas no surgimento de lesões malignas intraorais. A DEO é uma lesão potencialmente maligna, cuja combinação de alterações citológicas e anormalidades arquiteturais teciduais compreendem os critérios histopatológicos para o seu diagnóstico. Essa lesão demonstra maior potencial de sofrer transformação maligna para o carcinoma epidermoide, quando comparada com o tecido epitelial normal⁵⁻⁶

A carcinogênese oral é um processo complexo e vários genes podem estar alterados. As alterações genéticas produzem proteínas alteradas que podem exercer efeito importante nas neoplasias malignas; destacam-se, mais recentemente, as proteínas do metabolismo celular e microambiente tumoral⁷. Evidências experimentais recentes têm elucidado o papel da hipóxia na carcinogênese e na progressão tumoral, sendo observadas, em vários tumores, diferentes respostas à baixa concentração de oxigênio entre uma subpopulação heterogênea de células dentro do tumor, identificadas de Células-Tronco Cancerígenas (CSCs). Tais células apresentam propriedades fenotípicas de diferenciação, renovação celular e proliferação semelhantes às células-tronco normais, sendo responsáveis pela manutenção tumoral⁸⁻⁹. Observam-se, em estudos recentes com cânceres gástricos e renais, que a hipóxia tem se tornado cada vez mais relacionada ao fenótipo das CSCs¹⁰⁻¹¹, sendo essa subpopulação de células também identificada em culturas de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço^{9,12}. As CSCs são

identificadas por alguns marcadores de superfície, dentre eles o CD133, também denominado de Prominina-1, que consiste em uma glicoproteína transmembrana que pode ser utilizada como um marcador de células-tronco cancerígenas de vários tecidos e neoplasias, estando correlacionado com a diferenciação de células cancerígenas^{8,12-15}.

Considerando o papel das Células-Tronco Cancerígenas (CSCs) na manutenção tumoral e a escassez de estudos utilizando esses marcadores para os eventos biológicos em displasias epiteliais e carcinoma epidermoide oral, o propósito deste estudo é analisar a imunexpressão de CD133 em casos de DEO e CEO, procurando contribuir no estudo de carcinogênese oral, além de buscar possíveis marcadores de prognóstico para essa neoplasia, que influenciará na sobrevida dos pacientes acometidos pelo câncer de boca.

MATERIAL E MÉTODO

IMPLICAÇÕES ÉTICAS

A Presente pesquisa obteve o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, sob o número do parecer 137.019, sendo aprovado em 01/11/12 sob o CAAE: 06720312.3.0000.5054.

DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente trabalho consistiu em um estudo retrospectivo, analítico e transversal, por meio do diagnóstico e análise imuno-histoquímica de lesões malignas e potencialmente malignas. A população do estudo envolveu todos os espécimes cirúrgicos oriundos de lesões malignas (carcinomas epidermóides orais) e potencialmente malignas (que apresentavam graus histopatológicos de displasias epiteliais) de pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia/Métodos de Diagnóstico da Universidade Federal do Ceará - *Campus* Sobral, no período de outubro de 2013 a outubro de 2014.

Foram incluídos casos biopsiados com diagnóstico histopatológico de CEO e DEO, cujos espécimes possuíam quantidade suficiente de material disponível nos blocos de parafina para análises morfológica e imuno-histoquímica. Foram excluídos da amostra os casos que apresentaram quantidade insuficiente de material embocado em parafina para estudo morfológico e amostras com material insuficiente para realização da análise imuno-histoquímica. Os casos em que os pacientes não permitiram a realização da pesquisa, bem como pacientes sem autorização do responsável, também não foram incluídos na pesquisa.

Para o presente trabalho, foram selecionados casos obtidos de biópsias realizadas na Clínica de Métodos de Diagnóstico e Ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal do Ceará - *Campus Sobral/CE* e Clínica de Estomatologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus Fortaleza*, sendo 15 casos de Carcinoma Epidermoide Oral e 15 casos de Displasias Epiteliais Oraís, após confirmação histopatológica do diagnóstico dessas lesões.

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os espécimes referentes aos casos selecionados foram fixados em formol a 10% e posteriormente embocados em parafina, sendo submetidos a cortes de 5 µm (micrômetros) de espessura. Para imuno-histoquímica, os espécimes com cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3- aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co®, St Louis, MO, USA). Os cortes foram submetidos ao anticorpo anti-CD133, pela técnica imuno-histoquímica da estreptoavidina-biotina (*Labeled StreptAvidin Biotin – LSAB*). Esta técnica consistiu resumidamente nos seguintes passos: as secções passaram por dois banhos em xilol, durante dez minutos cada. Em seguida, foram imersas em três passagens de álcool absoluto, sendo posteriormente lavadas em água corrente e, logo após, uma passagem em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com citrato em pH 6,0, durante 30 minutos a 99°C. Após retornar à temperatura ambiente, as secções foram imersas em solução de bloqueio de peróxido de hidrogênio a 3%, durante 10 minutos. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-CD133- (GTX60471, GeneTex®, San Antonio, TX, USA), por 90 minutos, à Temperatura Ambiente (TA),

na diluição de 1:650 e, posteriormente, lavadas com solução de tampão fosfato-salino, PBS (*phosphate buffered saline*).

As amostras foram incubadas com o anticorpo secundário LSAB Kit (DAKO®, Carpinteria, CA, USA), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a incubação em solução cromógena preparada com DAB, durante 10 minutos, lavadas em água corrente e, em seguida, com água destilada. A contra coloração foi realizada com hematoxilina e, depois, foram desidratadas em álcool e diafanizadas em xilol.

Por fim, realizou-se a montagem em lâminas de vidro, as quais foram examinadas em microscópio óptico NIKON® Eclipse E200. Como controle positivo, utilizou-se CA de mama e, paralelamente às secções incubadas, foi realizado o controle negativo, excluindo-se a aplicação do anticorpo primário. O parâmetro de positividade da marcação imuno-histoquímica do antígeno em todos os espécimes incluídos na amostra consistiu nas células que exibiram coloração acastanhada nas regiões de membrana e citoplasma, independentemente da intensidade da imunomarcação. Foram selecionados cinco campos no aumento de 400x, visualizando-se através do microscópio óptico supracitado e fotografado em câmera digital SONY® Cyber-shot 7.2 mega pixels em máxima resolução.

ANÁLISE QUANTITATIVA

A análise quantitativa da expressão da glicoproteína CD133 foi realizada por meio da contagem do número, em valores absolutos, tanto das células imunomarcadas como das células totais por campo, por dois observadores, em momentos distintos, através do programa *Image J (Image and Processing Analysis in Java* – Rasband, W.S., ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2004).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados categóricos (sexo) foram analisados por meio do teste Exato de Fisher e os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, expressos em forma de média \pm erro-padrão da média (dados

paramétricos) e comparados entre grupos por meio dos testes *t* de Student e ANOVA multifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni.

Adotou-se índice de significância $p < 0.05$ para todas as avaliações, realizadas no *software* GraphPad Prism versão 5.0 para Windows®.

RESULTADOS

A amostra foi constituída de 30 casos, sendo 15 amostras de DEO e 15 de CEO. Foi realizada a caracterização clínica (perfil clínico) da amostra estudada. Dos 15 casos de CEO, evidenciou-se que o sexo masculino foi o mais acometido, perfazendo uma média de 60% dos casos. A faixa etária se estendeu entre 33 e 83 anos, como média de idade de 50,8 anos, sendo mais prevalentes as quarta e quinta décadas de vida com 66,6% dos casos. A região da língua foi o sítio anatômico mais prevalente, acometendo aproximadamente 40% dos casos. Já a análise epidemiológica realizada nos 15 casos de DEO selecionados para a pesquisa mostrou que o sexo feminino foi o mais prevalente, com uma porcentagem de 73,3% dos casos. A faixa etária de acometimento se estendeu entre 17 e 85 anos, sendo mais afetada a sétima década de vida, com 33,3% dos casos. A região de mucosa jugal foi o sítio de acometimento mais frequente, correspondendo a cerca de 33,3% dos casos analisados.

Com relação ao perfil de imunomarcção, observou-se expressão positiva de CD133 em todos os casos da amostra (100% dos casos). No grupo de CEO, observou-se que 82.6 ± 7.2 das células epiteliais exibiam imunoexpressão de CD133 e, no grupo de DEO, 77.6 ± 16.0 das células epiteliais exibiam imunomarcção positiva de CD133. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p=0.283$) (figura 1).

O percentual de imunomarcção para CD133 em relação ao sexo mostrou os seguintes resultados: sexo masculino (DEO 76.4 ± 10.9 e CEO 82.9 ± 6.3) e sexo feminino (DEO: 78.0 ± 17.9 e CEO 82.1 ± 8.9) (figura 2), dados estes que não demonstram diferença significativa na variável estudada. Com relação ao grau de displasia, pôde-se observar que 78.0 ± 18.4 das células epiteliais mostraram imunomarcção positiva em casos de displasia leve, enquanto 72.7 ± 11.4 e 80.1 ± 1.8

mostraram marcação positiva em casos de displasia moderada e severa, respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($p=0,899$) (figura 3).

No que diz respeito à localização anatômica, o percentual de imunomarcação para CD133 não mostrou nenhuma associação em relação aos diferentes sítios: língua (DEO: 69.6 ± 23.2 e CEO: 83.5 ± 9.3) ($p=0.217$), mucosa jugal (DEO: 84.8 ± 14.7 e CEO: 79.0 ± 5.7) ($p=0.618$) e palato (DEO: 74.5 ± 6.7 e CEO: 86.8 ± 10.3) ($p=0.193$) (figura 4).

DISCUSSÃO

O Carcinoma Epidermoide Oral (CEO) constitui-se como a forma mais prevalente do câncer na cavidade oral, representando aproximadamente 90% de todas as neoplasias malignas bucais¹⁶. As lesões potencialmente malignas são lesões que podem preceder ao desenvolvimento do câncer^{6,17}.

A presente pesquisa foi constituída por 30 casos, sendo 15 de CEO e 15 de DEO. No grupo do CEO, verificamos uma maior prevalência dos casos no sexo masculino, resultado semelhante ao estudo de Udeabor et al.,(2012) que apontou uma maior prevalência de casos de CEO em pacientes do sexo masculino (733) em relação ao sexo feminino (244). A faixa etária mais acometida com casos de CEO foi a dos pacientes entre a quarta e a quinta décadas de vida, divergindo dos trabalhos de Udeabor et al., (2012) e Rikardsen et al., (2014). Com relação à localização anatômica, este trabalho verificou que a língua foi o sítio mais prevalente, corroborando com os achados de Ravindran et al., (2011), nos quais 34,6% dos casos estavam presentes nessa região, e Bodner et al.(2013), que analisaram 186 CEO e encontraram a língua como a principal localização topográfica dessa lesão.

Com relação ao grupo de DEO, no que se refere ao sexo, esse estudo constatou que 73,3% dos casos eram de pacientes do sexo feminino, em concordância com os achados de Starzynska et al., (2013) e Foy et al., (2013). Com relação à faixa etária mais acometida, a presente pesquisa constatou que a sétima década de vida foi a mais afetada, condizente com os achados de Starzynska et al., (2013), que encontraram 63,2% dos pacientes inseridos entre a sexta e a sétima década de vida. No presente estudo, verificou-se que o sítio de localização mais frequente para DEO foi a região de mucosa jugal, corroborando com os trabalhos de

Mortazavi et al., 2013 e Starzynska et al., 2013, que verificaram que 52,2% dos casos pesquisados localizavam-se nessa região topográfica.

Evidências experimentais recentes têm expandido o papel do microambiente tumoral no câncer, demonstrando diferentes respostas à baixa concentração de oxigênio entre uma subpopulação heterogênea de células dentro do tumor, identificadas de Células-Tronco Cancerígenas (CSCs). Essas Células-tronco Cancerígenas (CSCs) possuem muitas similaridades fenotípicas com as células-tronco pluripotentes, sendo responsáveis pela sustentação tumoral^{8,25-26}.

As CSCs podem ser detectadas por meio de diferentes marcadores; dentre eles, pode-se destacar o CD133, que se caracteriza como uma glicoproteína transmembrana com peso molecular de aproximadamente 120Kda, inicialmente considerada como um marcador de células-tronco hematopoiéticas²⁰. Atualmente, CD133 pode ser considerado como um marcador de vários tumores sólidos, como câncer de mama, câncer gástrico, câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer de próstata e câncer de pâncreas²⁷⁻²⁸.

Li et al. (2014) avaliaram a imunexpressão de ABCG2, CD133 e podoplanina em casos de carcinoma adenoide cístico (n=25) e observaram marcação positiva em 100% dos casos para CD133, achado semelhante ao do presente estudo, contudo, divergindo dos estudos de Mizugaki et al. (2013), que encontraram marcação positiva em 77% da amostra de casos de carcinoma de células escamosas de pulmão, e os de Yu et al. (2014), nos quais a imunexpressão de CD133 em casos de carcinoma de células escamosas de laringe foi de 49,6% da amostra.

Kim et al. (2011) pesquisaram a imunomarcação de CD133 em 140 casos de carcinoma de células claras renais; dentre estes, 100 (71,4%) eram de pacientes do sexo masculino e 40 (28,6%) do sexo feminino. Os referidos autores observaram diferença significativa de marcação com relação à variável sexo, sendo que a porcentagem de marcação no sexo masculino foi de 16,4% e do sexo feminino foi de 0,5% (p=0.001). Esta pesquisa corrobora com os achados de Hashimoto et al. (2013) que, avaliando a expressão de CD133 em câncer gástrico, também encontraram diferença significativa com relação à variável sexo (p=0.004). Entretanto, esses estudos diferem de Ravindran et al.,(2011), que não encontraram diferença na imunomarcação do CD133 entre os sexos em casos de CEO (p=0.12) e de Yu et al. (2014), que avaliaram a expressão dessa proteína em casos de carcinoma de células escamosas de laringe (p>0.05). Congruente com esses

autores, a presente pesquisa não verificou diferença significativa com relação ao sexo ($p=0.588$), suscitando que o sexo do paciente possivelmente não influencia na presença das CSCs.

Yu et al. (2014) realizaram um estudo imuno-histoquímico com CD133 e KAI1/CD82 (marcador de metástase e de vários tipos de cânceres) e observaram diferença significativa entre a marcação no tecido normal de laringe (4,8% dos casos) e no carcinoma de células escamosas de laringe (49,4%). Os autores sugerem que essas proteínas podem exercer um importante papel na evolução dos carcinomas de células escamosas de laringe, sendo o CD133 um possível marcador de prognóstico em casos para essas neoplasias malignas.

No presente trabalho, não foi observada diferença significativa na imunoexpressão de CD133 entre DEO e CEO, diferença que também não foi observada em relação aos diferentes graus de displasia. Esses achados divergem dos observados por Ravindran et al. (2011). Esses autores analisaram a expressão de CD133 e Musashina-1 em tecido oral normal, displasias epiteliais e carcinomas orais, encontrando um aumento gradual da expressão dessas proteínas do tecido oral normal para displasias e carcinomas epidermóides orais; no caso de CD133, as porcentagens de marcação foram as seguintes: tecido oral normal (2,3%), displasia leve-moderada (18,5%), displasia severa (29,7%) e carcinoma (38,5%). Ainda nesse estudo, não foi observada diferença significativa entre os diferentes graus de displasia. Ademais, ressalta-se que mais estudos são necessários acerca do papel dessa glicoproteína como marcador de prognóstico em casos de lesões malignas e potencialmente malignas orais.

Com relação à imunomarcacão nas diferentes regiões anatômicas da cavidade oral, este estudo não mostrou diferença de expressão de CD133 e seus respectivos sítios topográficos; também não foi detectado, na literatura, esse tipo de diferença significativa, como no estudo de Ravindran et al. (2011), sugerindo que a expressão dessa proteína independe da localização da lesão na cavidade oral.

Não obstante a escassez de referências na literatura pertinente, até os dias atuais, poucos são os trabalhos envolvendo esse marcador na carcinogênese oral. Por isso, torna-se difícil comparar os dados do presente trabalho com os da literatura nessas lesões, especificamente.

4 CONCLUSÃO

Como conclusão do nosso estudo, pode-se inferir que a presença da glicoproteína CD133 pode não ser imprescindível para a determinação do fenótipo maligno.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e aos Senhores Adalberto Lima Júnior e Alceu Machado de Sousa, pelo suporte técnico nas fases laboratoriais da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil: **Ministério da Saúde**. *Instituto Nacional do Câncer (INCA)* 2014. Acessado em 19/10/2014.
2. Scully C: **Oral cancer: evidence for sexual transmission**. *Br Dental Journal* 2005, **199** (4): 203-207.
3. Rodrigues PC, Miguel MCC, Bagordakis E, Fonseca FP, De Aquino SN, Santos-Silva AR, Lopes MA, Graner E, Salo T, Kowalski LP, Coletta RD: **Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases**. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014, **43**: 795-801.
4. Warnakulasuriya S, Reibel S, Bouquot J, Dabelsteen E: **Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement**. *J Oral Pathol Med* 2008, **37**: 127-133.
5. Silveira EJD, Lopes MFF, Silva LMM, Ribeiro BF, Lima KC, Queiroz LMG: **Lesões orais com potencial de malignização: análise clínica e morfológica de 205 casos**. *J Bras Patol Med Lab* 2009, **45**(3) 233-238.
6. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der Wall, I: **Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa**. *J Oral Pathol Med* 2007, **36**: 575-580.
7. Demasi APD, Costa AF, Altemani A, Furuse C, Araújo NS, Araújo NC: **Glucose transporter protein 1 expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary gland: correlation with grade of malignancy**. *Int J Exp Pathol* 2010, **91**(2): 107-113.
8. Bao S, McLendon B: **Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response**. *Nature* 2006, **477**(7): 756-760

9. Hill RP, Marie-Egyptienne DT, Hedley DW: **Cancer stem cells, hypoxia and metastasis**. *Semin Radiat Oncol* 2009, **19**: 106-111
10. Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K: **The expression of hypoxia-inducible factor 1 a is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma**. *Clin Cancer Res* 2005, **11**(3): 1129-1135.
11. Matsumoto K, Arao T, Tanaka K: **mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells**. *Cancer Res* 2009, **69**(18): 7160-7164.
12. Okamoto A: **Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck**. *Oral Oncol* 2009, **45**(7): 633-639.
13. Mizrak D, Brittan M, Alison MR: **CD133: molecule of the moment**. *J Pathol* 2008, **214**(1): 3-9.
14. Pirozzi G, Irollo, E: **CD133: to be or not to be, is this the real question?**. *Am J Transl Res* 2013, **6**: 563-581.
15. Stephanie MA: **Biology and clinical implications of CD133 liver cancer stem cells**. *Experimental Cell Research* 2013, **319**: 126-132.
16. Rhodus NL, Kerr AR, Patel K: **Oral cancer, Leucoplakia, Premalignancy and Squamous Cell carcinoma**. *Dent Clin N Am* 2014, **58**: 315-340.
17. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D: **Pathology & Genetics: Head and Neck Tumors**. *Iarc Press*, 2005.
18. Udeabor SE, Rama M, Wegener G, Gellrich NC, Eckardt AM: **Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis**. *Head and Neck Oncology* 2012, **4**:28.
19. Rikardsen OG, Bjerkli IH, Uhlin-Hansen L, Hadler-Olsen E, Steigen SE: **Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma in northern Norway: a retrospective study**. *BMC Oral Health* 2014, **14**: 103.
20. Ravindran G, Devarai H: **Aberrant expression of CD133 and musashi-1 in preneoplastic and neoplastic human oral squamous epithelium and their correlation with clinicopathological factors**. *Head and Neck* 2011.
21. Bodner L, Manor E, Friger MD, Van der Waal I: **Oral squamous carcinoma in patients twenty years of age or younger – review and analysis of 186 reported cases**. *Oral Oncol* 2014, **50**: 84-89.
22. Starzynska A, Pawlowska A, Renkielska D, Michailowski I, Sobiannek M, Blazewicz I: **Oral premalignant lesions> epidemiological and clinical analysis in the northern polish population**. *Postep Derm Alergol* 2014, **6**: 341-350.
23. Foy JP, Bertolus C, Willian Jr WN, Saintigny P: **Oral premalignancy: the roles of early detection and chemoorevention**. *Otolaryngol Clin North Am* 2013, **46**(4): 579-597.
24. Mortazavi H, Baharvand M, Mehdipour M: **Oral potentially malignant disorders: an overview of more than 20 entities**. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* 2014, **8**(1): 6-14.
25. Zhang Z, Sant´ana-Filho M, Nor JE: **The biology of head and neck cancer stem cells**. *Oral Oncol* 2012, **48**: 1-9.
26. Patel SS, Shah KA, Shah MJ, Kothari KC, Rawal RM: **Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas**. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014, **15**(20): 8549-8556.
27. Okamoto H, Fujishima F, Nakamura Y, Zuguchi M, Ozawa Y, Takahashi Y, Miyata G, Kamei T, Nakano T, Taniyama Y, Teshima J, Watanabe M, Sato A, Ohuchi N, Sasano H: **Significance of CD133 expression in esophageal squamous cell carcinoma**. *World Journal of Surgical Oncology* 2013, **11**: 51.

28. Yu L, Zhou L, Wu S, Gong X, Feng Z, Ma L, Zhu BO, Yao N, Wang D, Dong H: **Clinicopathological significance of cancer stem cells marked by CD133 and KAI1/CD82 expression in laryngeal squamous cell carcinoma.** *World Journal of Surgical Oncology* 2014, **12**: 118
29. Li W, Tamamura R, Wang B, Liu Q, Liu H, Liu T, Katase N, Xiao N, Nagatsuka H: **Expressions of ABCG2, CD133 and podoplanin in salivary adenoid cystic carcinoma.** *BioMed Research International* 2014.
30. Mizugaki H, Sakakibara-Konishi J, Kikuchi J, Moriya J, Natamaka KC, Kikuchi E, Kinoshita I, Oizume S, Dosaka-Akita H, Matsuno Y, Nishimura M: **CD133 expression: a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers.** *Int J Clin Oncol* 2014, **19**: 254-259.
31. Kim K, Ihm H, Ro JY, Cho YM: **High-level expression. Of stem cell marker CD133 in clear cell renal cell carcinoma with favorable prognosis.** *Oncology Letters* 2011, **2**: 1095-1100.
32. Hashimoto K, Aoyagi K, Isobe T, Kouhiji K, Shirouzu K: **Expression of CD133 in the cytoplasm is associated with cancer progression and poor prognosis in gastric cancer.** *Gastric Cancer* 2014, **17**: 97-106.

FIGURAS

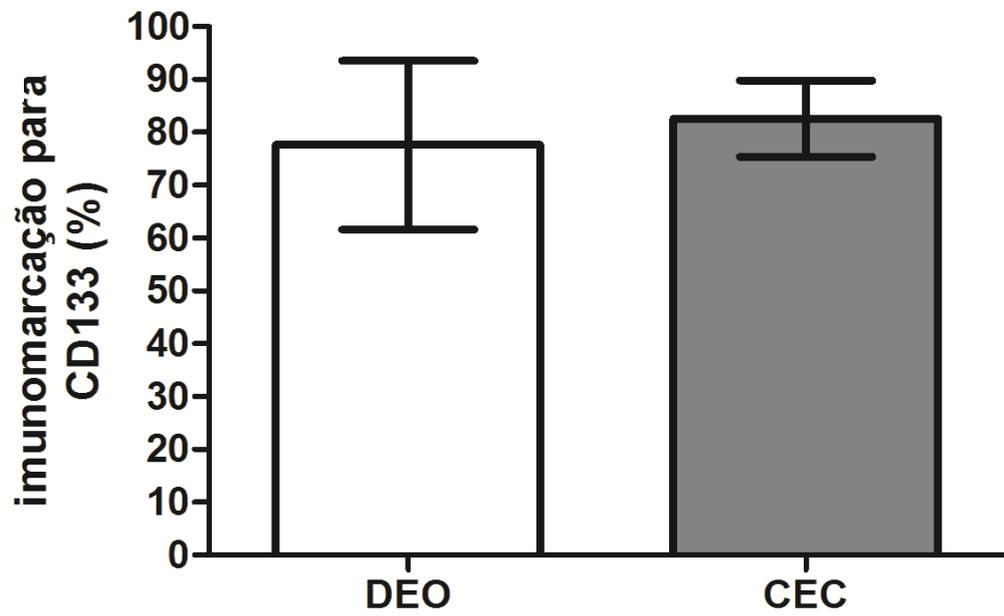


Figura 1: Percentual de Células Epiteliais Imunomarcadas por CD133: imunomarcção positiva em 77.6±16.0 das DEOs e em 82.6±7.2 dos CEOs (p=0.283)

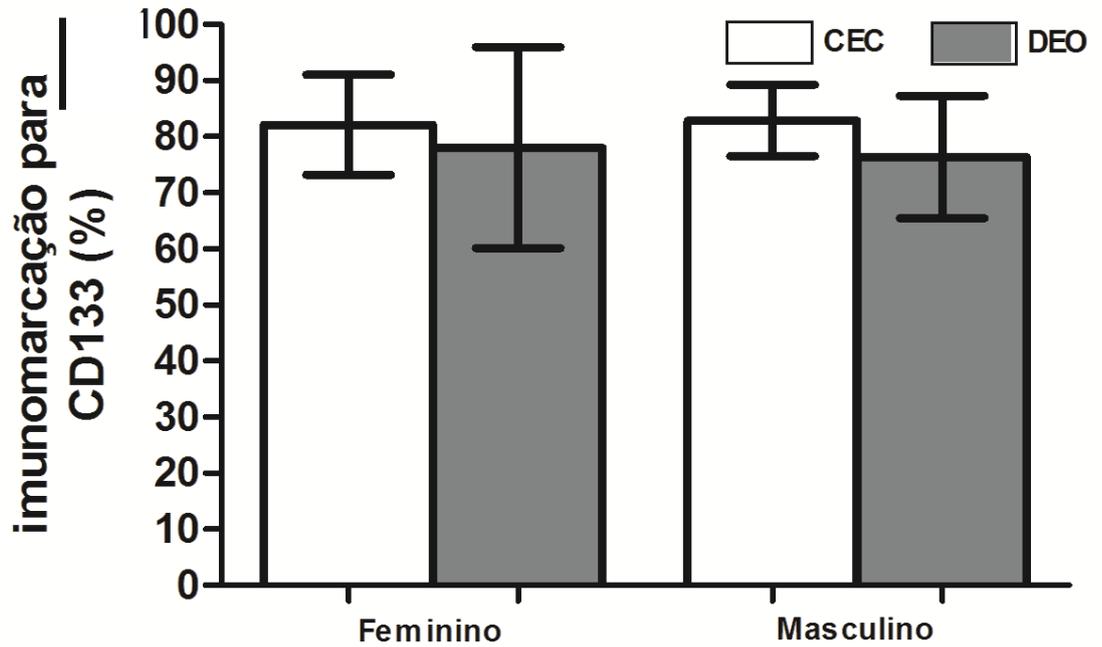


Figura 2: Percentual de Células Epiteliais Imunomarcadas por CD133 por Sexo: Imunomarcção em sexo feminino (DEO: 78.0 ± 17.9 e CEO: 82.1 ± 8.9) ($p=0.588$) e em sexo masculino (DEO: 76.4 ± 10.9 e CEO: 82.9 ± 6.3) ($p=0.526$).

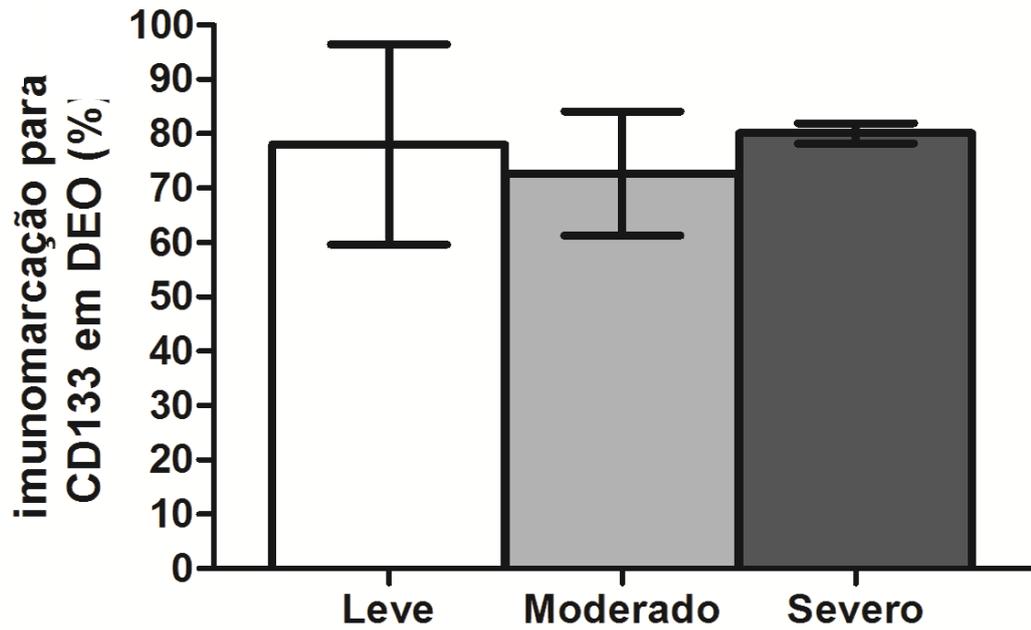


Figura 3: Percentual de Células Epiteliais Imunomarcadas por CD133 por Grau de Displasia: Imunomarcção positiva em 78.0±18.4 dos casos de DEO leve, 72.7±11.4 dos casos de DEO moderada e em 80.1±1.8 dos casos de DEO severa (p=0.899).

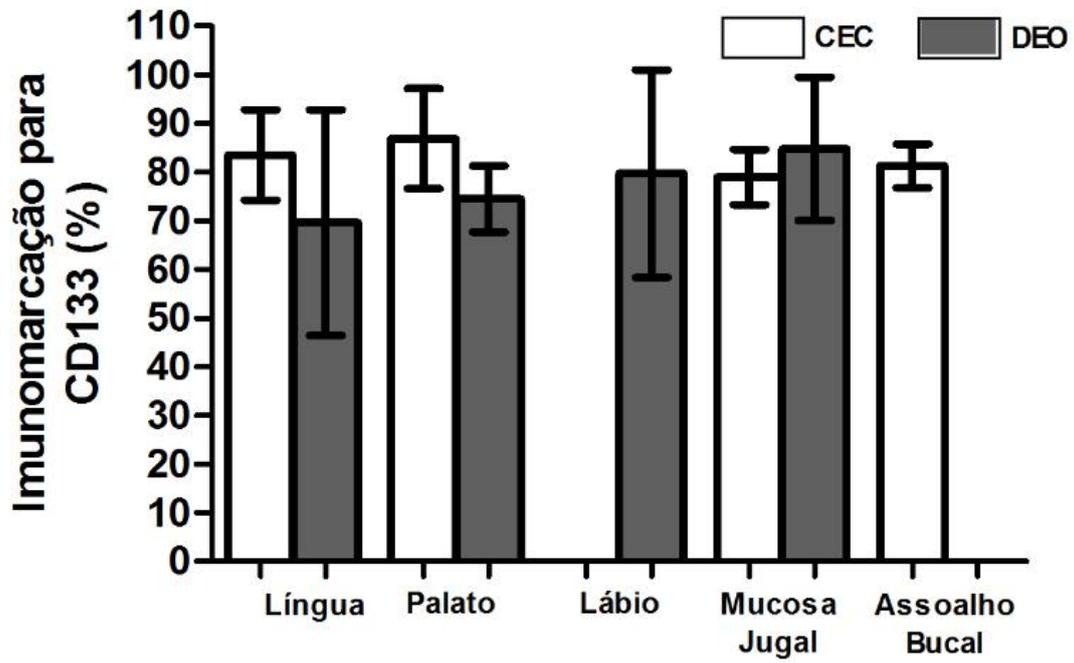


Figura 4: Percentual de Células Epiteliais Imunomarcadas por CD133 por localização topográfica. Língua (DEO: 69.6 ± 23.2 e CEO: 83.5 ± 9.3) ($p=0.217$), Palato (DEO: 74.5 ± 6.7 e CEO: 86.8 ± 10.3) ($p=0.193$) e Mucosa Jugal (DEO: 84.8 ± 14.7 e CEO: 79.0 ± 5.7) ($p=0.618$).

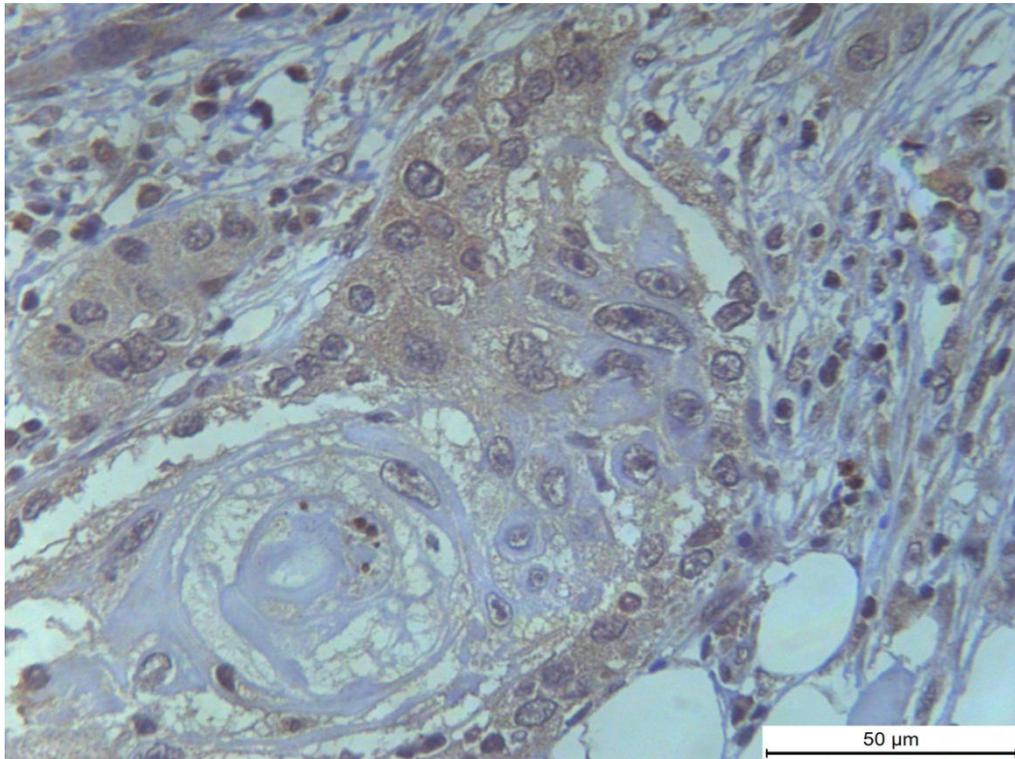


Figura 5: Fotomicrografia de Carcinoma Epidermóide Oral evidenciando expressão membranar e citoplasmática de CD133

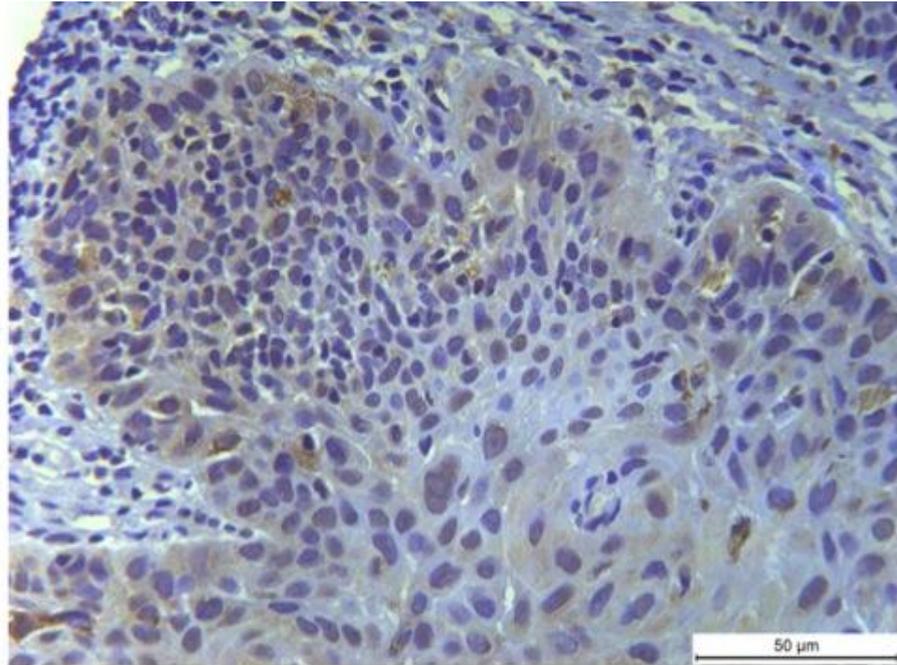


Figura 6: Fotomicrografia de Displasia Epitelial Oral evidenciando marcação membranar e citoplasmática de CD133.

4 CONCLUSÃO GERAL

Da avaliação dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Todos os casos analisados de CEO e DEO tiveram marcação (100% da amostra);
- Não houve diferença significativa na imunoexpressão de CD133 entre DEO e CEO;
- O percentual de imunomarcação entre sexo, localização topográfica e grau de displasia não mostrou nenhuma associação.

REFERÊNCIAS

- AYALA, F. R. et al. GLUT-1 and GLUT-3 as potencial prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2374-87, Apr 2010.
- BAO, S; WU, Q; McLendon, B. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage responde. **Nature**, v. 447, n. 7, p. 756-60, 2006.
- BARNES, L. et al. **Pathology & Genetics: Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press, 2005.
- BODNER, L et al. Oral squamous carcinoma in patients twenty years of age or younger – review and analysis of 186 reported cases. **Oral oncol**, v.50, p. 84-89, 2014
- BRASIL: Ministério da Saúde. **Instituto Nacional do Câncer (INCA)** 2014. Acessado em 19/10/2014.
- BRENNAN, M. et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 103, p.S19.e12, 2007.
- BURKET, J; WRIGHT, N. A.; ALISON, M. R. Stem cell and cancer: an intimate relationship. **J Pathol**, v. 209, n. 3, p.287-297, 2006.
- COSTA, A. L. L.; ARAÚJO JÚNIOR, R. F; RAMOS, C. C. F. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermoide oral. **Rev Bras Otorrinol**. V. 71, n.2, p.181-187, mar/abr, 2005.
- FOY, JP et al. Oral premalignancy: the roles of early detection and chemoorevention. **Otolaryngol Clin North Am**, v.46, n.4, p. 579-597, 2013
- HADDAD, R. I.; SHIN, D. M. Recent advances in head and neck cancer. **N Engl Med**, v. 359, n. 11, p.1143-54, Sep, 2008.
- HASHIMOTO, K et al. Expression of CD133 in the cytoplasm is associated with cancer progression and poor prognosis in gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 17, p. 97-106, 2014
- HEDDLESTON, J. M.; LI, Z.; LATHIA, J. D.; BAO, S. Hypoxia inducible factor in cancer stem cells. **Br J Cancer**, v. 102, p. 789-95, 2010.
- HILL, R. P.; MARIE-EGYPTIENNE, D. T.; HEDLEY, D. W. Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. **Semin Radiat Oncol**, v. 19, p.106-111, 2009.
- IAMAROON, A. et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. **Int J Oral Maxillofac**, v. 33, p.84-88, 2004.
- KADEMI, D. et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: The influence of histologic grade. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 63, p.1599-1605, 2005.
- KAUR, S.; SINGH, G.; KAUR, K. Cancer stem cells: An insight and future perspective. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, V. 10, N.4, P.846-52, 2014.

- KIM, K et al. High-level expression. Of stem cell marker CD133 in clear cell renal cell carcinoma with favorable prognosis. **Oncology Letters**, v. 2, p. 1095-1100, 2011
- LI, W et al. Expressions of ABCG2, CD133 and podoplanin in salivar adenoid cystic carcinoma. **BioMed Research International** 2014
- LIM, S. et al. The role od CD24 in various human epithelial neoplasias. **Pathol Res Pract**, v. 201, p.479-86, 2005.
- MARGARITESCU, C.L. et al. The utility of CD44, CD117 AND CD133 in identification of cancer stem cells (CSC) in oral squamous cell carcinomas. **Rom J Morphol Embryol**, v. 52, n. 3, p. 985-993, 2011.
- MASSANO, J. et al. Oral squamous cell carcinoma : Review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, p.67-76, 2006.
- MIZRAK, D.; BRITTAN, M.; ALISON, M. R. CD133: molecule of the moment. **J Pathol**, v. 214, n. 1, p.3-9, Jan 2008.
- MIZUGAKI, H et al. CD133 expression: a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. **Int J Clin Oncol**, v. 19, p. 254-259, 2014.
- MORTAZAVI, H et al. Oral potentially malignant disords: an overview of more than 20 entities. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospect**, v. 8, n. 1, p. 6-14, 2014
- NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- NAGPAL, J. K.; DAS, B. R. Oral cancer: Reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. **Oral Oncol**, v. 39, p.213-221, 2003.
- OKAMOTO, H. et al. Significance of CD133 expression in esophageal squamous cell carcinoma. **World Journal of Surgical Oncology** V. 11, N. 51, 2013.
- PATEL, S.S et al. Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 20, p. 8549-8556.
- RAVINDRAN, G. et al. Aberrant expression of CD133 and musashi-1 in preneoplastic and neoplastic human oral squamous epithelium and their correlation with clinicopathological factors. . **Head and Neck** 2011.
- .REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia oral: correlações clinicopatológicas**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- RHODUS, N. L.; KERR, A. R; PATEL, K. Oral Cancer, Leukoplakia, Premalignancy, and Squamous Cell Carcinoma. **Dent Clin N Am**, v. 58, p.315-340, 2014.
- RIKARDESEN O.G et al. Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma in northern Norway: a retrospective study. **BMC Oral Health**, v.14, p.103, 2014.

SATPUTE, S. P.; HAZAREY, V.; AHMED, R.; YADAV, L. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Review. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 10, p.5579-5587, 2013.

SCULLY, C. Oral cancer; evidence for sexual transmission. **Br Dent Journal**, v.199, n.4, p.203-207, Aug. 2005.

SILVEIRA, E. J. D. et al. Lesões orais com potencial de malignização: análise clínica e morfológica de 205 casos. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 3, p. 233-238, 2009.

STARZYNSKA, A et al. Oral premalignant lesions> epidemiological and clinical analysis in the northern polish population. **Postep Derm Alergol**, v.6, p. 341-350, 2014.

SOUSA, F. A. C. G. et al. Alterações gênicas e câncer bucal – uma breve revisão. **RBPO**, v. 3, n. 1, p.20-25, JAN/MAR, 2004.

SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virol**, v. 32S, p.S59-S66, 2005.

SUN, C. et al. CD133 expression in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with nuclear hypoxia-inducing factor 1 alpha (HIF-1 alpha). **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 15, p. 476-484, 2012.

UDEABRO, 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 and Neck Oncology**, v.4, p.28, 2012

UOBE, K. et al. Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by *in situ* PCR. **Oral Oncology**, v.37, p.146-152, 2001.

VENTURI, B. R. M.; CABRAL, M. G.; LOURENÇO, S. Q. C. Carcinoma de células escamosas oral - contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. **Rev.Bras. Otorrinol**, v.70, n.3, p.385-392, mai/jun. 2004.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Pathol Med**, v.36, p.575-80, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Pathol Med**, v.37, p.127-33, 2008.

YU, L. et al. Clinicopathological significance of cancer stem cells marked by CD133 and KAI1/CD82 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 12, p. 118, 2014

ZHANG, Z.; SANT'ANA-FILHO, M.; NOR, J. E. The biology of head and neck cancer stem cells. **Oral Oncology**, v.48, p1-9, 2012.

ANEXO A – SEGMENTO DO REGIMENTO INTERNO

Art. 46 – As dissertações e as teses apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará poderão ser produzidas em formato alternativo ou tradicional. O formato alternativo estabelece: a critério do orientador e com a aprovação da Coordenação do Programa, que os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, publicados ou submetidos para

11

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

publicação em revistas científicas, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§1º - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

§2º - A dissertação e a tese em formatos tradicionais ou formatos alternativos deverão seguir as normas preconizadas pelo Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca Universitária disponível no site <http://www.biblioteca.ufc.br>. As partes específicas do formato alternativo deverão ser feitas em concordância com o Manual de Normalização para Defesa de dissertação de Mestrado e tese de Doutorado no formato Alternativo do PPGO, disponível no site <http://www.pogo.ufc.br>.

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FATORES ASSOCIADOS A HIPÓXIA EM DISPLASIAS EPITELIAIS E CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Pesquisador: KARLUZA MARIA ALVES PEREIRA

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 06720312.3.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 137.019

Data da Relatoria: 04/10/2012

Apresentação do Projeto:

FATORES ASSOCIADOS A HIPÓXIA EM DISPLASIAS EPITELIAIS E CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Objetivo da Pesquisa:

O propósito desta pesquisa é analisar a participação das proteínas relacionadas à hipóxia, especificamente o Fator Induzido por Hipóxia-1alfa (HIF-1alfa) e Anidrase Carbônica IX (CA IX), nos casos de carcinomas epidermóides, bem como nas displasias epiteliais orais. Além disso, investigar o envolvimento das células tronco cancerígenas, através da imunomarcção com CD133, também associadas a hipóxia, buscando correlacionar a

presença dessas células com os fatores relacionados à hipóxia, bem com estabelecer correlação com os dados clínicos e histopatológicos das lesões em estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não apresenta risco uma vez que haverá apenas análise em material de biópsia já realizada ou a ser realizada independente da pesquisa.

Quanto aos benefícios visa contribuir para o melhor entendimento da carcinogênese, buscando marcadores de prognóstico para a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, o carcinoma epidermóide, proporcionando melhor sobrevida para os pacientes acometidos com tal lesão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante, a fundamentação bibliográfica é extensa e a metodologia é adequada.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270
UF: CE Município: PORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3323-2903 E-mail: compe@ufc.br

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O orçamento foi apresentado (O referido projeto de pesquisa foi submetido a chamada do Edital do Programa de Bolsas de Produtividade em Pesquisa e Estímulo à Interiorização - BPI Nº 05/2012, promovido pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), sendo aprovado, conforme o número do processo: BPI 4 0067-00081010012, qualificando o projeto de pesquisa a receber ajuda orçamentária.

TCLE apresentado e adequado.

Demais documentos apresentados e satisfazem às exigências.

Recomendações:

Rever os objetivos. Existem vários objetivos gerais e inclui benefícios no objetivo geral.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com recomendações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

FORTALEZA, 01 de Novembro de 2012

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
Bairro: Pólo II Tênis CEP: 60.430-270
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3225-8344 Fax: (85)3225-2900 E-mail: conep@ufc.br

ANEXO C – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

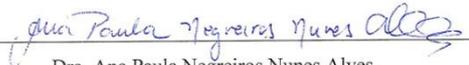


UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

Declaro, para os fins que se fizerem necessários, autorizar a utilização das fichas de requisição de biópsia, laudos histopatológicos e espécimes teciduais emblocados em parafina, armazenados nos arquivos do laboratório do Serviço de Patologia Bucal do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia referentes aos casos de Displasia Epitelial Oral e Carcinoma Epidermóide Oral diagnosticados neste serviço, a fim de possibilitar a realização da pesquisa intitulada “**Expressão imuno-histoquímica de CD133 em displasias epiteliais orais e carcinomas epidermóides orais**”, sob a coordenação e orientação da Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira. Este estudo representa um trabalho de pesquisa de onde resultarão trabalhos para publicação em periódicos especializados. Para efetivação deste estudo, os pesquisadores envolvidos terão acesso às fichas de requisição de biópsia e laudos histopatológicos, para a análise dos dados clínicos e histopatológicos. Além disso, os pesquisadores terão acesso aos espécimes teciduais emblocados em parafina das lesões acima relacionadas, a fim de obter cortes histológicos para o estudo imuno-histoquímico. Declaro, outrossim, que em nenhum momento serão divulgados dados que possibilitem a identificação de algum paciente, como nome ou número do registro, bem como, os pesquisadores responsáveis se comprometem com a devolução dos referidos laudos histopatológicos, das fichas de requisição e dos espécimes teciduais emblocados em parafina para o Serviço supracitado.

Fortaleza, 30 de Outubro de 2014.



Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Responsável pelo Laboratório de Patológica Bucal da UFC

ANEXO D – NORMAS DE PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

Submission

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

Use of word processing software

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

Article structure

Manuscript

Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract,

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

Introduction

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

Materials

and

Methods

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

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

Results

or

Findings

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

Discussion

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

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section,

which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

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

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

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in

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

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

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

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Acknowledgements

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

Bacterial

nomenclature

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

Artwork

Image

manipulation

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

information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic

artwork

General

points

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

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

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

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

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

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

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

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

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

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these

- typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
 - Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration

services

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

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

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

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

1. Walsh NP, Montague JC, Callow N and Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration

status during progressive acute dehydration in humans. Arch Oral Biol 2004;49(2):149-154.

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

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

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

Submission

checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address
- All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

