



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

THALYTA AMANDA PINHEIRO FERREIRA

AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSIONÃO DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA
1 α (HIF-1 α) EM CISTOS
RADICULARES E DENTÍGEROS

FORTALEZA

2017

THALYTA AMANDA PINHEIRO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1α
(HIF- 1α) EM CISTOS RADICULARES E DENTÍGEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de concentração: Clínica Odontológica.

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

FORTALEZA-CE

2017

THALYTA AMANDA PINHEIRO FERREIRA

AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE HIF-1 α EM CISTOS RADICULARES E
DENTÍGEROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

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

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Roberta Barroso Cavalcante
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

A Deus.
Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por ter me dado o dom da vida, a oportunidade de poder concluir mais essa etapa, proporcionando-me forças para superar os desafios encontrados durante a caminhada até aqui.

Aos meus pais, Rosa e Eudes, meus maiores exemplos de dedicação e perseverança, que sempre estiveram ao meu lado apoiando minhas decisões, sem o esforço deles e a confiança depositada em mim, as dificuldades não seriam superadas.

A minha avó, Maria Auxiliadora, meu grande exemplo de fé e dedicação à família, que me mostra a cada dia garra para vencer as provações encontradas ao longo da vida, a quem sempre posso recorrer para obter palavras de incentivo e conforto.

Ao meu namorado, Raphael Castelo Branco, com quem partilho todos os momentos da minha vida, que pacientemente escuta minhas dificuldades, comemora minhas conquistas, dedica palavras de incentivo e conselhos, muitas vezes fazendo com que eu recupere a autoconfiança.

Aos meus familiares pelo incentivo, confiança e credibilidade depositadas no meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Karuza Maria Aleves Pereira, minha orientadora, pelos ensinamentos, pela paciência e pela oportunidade de convívio que enriqueceram minha formação pessoal e profissional.

À Prof^a. Dr^a. Walda Viana Brígido de Moura, minha eterna orientadora, que sempre está disposta a prestar apoio com sua serenidade e distribuir amor a todos ao seu redor.

Aos amigos que fiz durante o período do mestrado, os quais tornaram possível a realização e conclusão desta pesquisa, em especial Thâmara Marinho, Filipe Nobre, Paulo Goberlânio, Alceu Machado, Mariana Canuto, Sthefane Feitosa e Ealber Luna.

Aos amigos do colégio, especialmente Luiza Arcanjo, Jean Carlos e Lincoln Correia, que mesmo diante do pouco contato por conta das nossas novas rotinas, sempre acreditam no meu potencial e me dão forças para seguir em busca de novos sonhos.

Aos amigos da Turma Odontologia UFC 2013.2 pelo convívio e apoio durante essa jornada, principalmente aos mais próximos Danielle Possidônio, Lia Castro, Daniel Amora, Joel Barreto, Hermano Paiva, Ana Carla, Hilana Oliveira, Luan Cartaxo e ao meu grande irmão Eduardo Emim, que mesmo distante encontra um tempo para me ouvir e apoiar.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À instituição Universidade Federal do Ceará, em nome do reitor Henry de Holanda Campos.

À diretoria da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE), representada pela Prof^a. Dr^a. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues.

Ao Curso de Odontologia, na representação do Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa, coordenador.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (PPGO/UFC) Prof. Dr. Vicente De Paulo Aragão Sabóia e Prof. Dr. Fábio Wildson Gurgel Costa .

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os professores, coordenadores e servidores técnico-administrativos que compõem o Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Aos professores que gentilmente aceitaram constituir a banca examinadora e acrescentaram conhecimento ao estudo.

“Quem não se
movimenta, não sente as correntes
que o prendem” (Rosa
Luxemburgo)

RESUMO GERAL

Os cistos odontogênicos são classificados conforme sua origem em: cistos de desenvolvimento, dos quais faz parte o cisto dentígero (CD), ou em cistos inflamatórios, que têm o cisto radicular (CR) como principal representante. Em microambientes lesionais com baixas concentrações de oxigênio, o Fator Induzido por Hipóxia 1α (HIF-1) influencia mecanismos responsáveis pela sobrevivência celular. Assim, o objetivo desta pesquisa foi analisar a imunoposição do HIF- 1α em cistos radiculares e dentígeros. A amostra foi constituída por 40 casos de cistos odontogênicos, sendo 20 de CD e 20 de CR. A verificação da expressão de HIF- 1α foi realizada através da técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpo primário anti-HIF- 1α (Clone EP1215Y, Abcam®, 1:500, overnight, citrato pH 6, Pascal). A análise quantitativa foi realizada por meio da contagem do número de células epiteliais com imunomarcção no citoplasma ou núcleo, em cinco campos fotografados no aumento de 400x. Realizou-se, também, uma análise qualitativa observando a intensidade de imunomarcção citoplasmática. Os dados clínicos coletados, tais como sexo, idade e sítio de localização, foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e comparados por meio do teste qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher e por meio de Regressão Logística Binomial. O número de células epiteliais positivas foi expresso em forma de média e desvio-padrão e analisado por meio do teste de T de Student, utilizando-se o programa Statistical Package for the Social Sciences. Para todos os testes realizados, foi estabelecido o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise imunohistoquímica evidenciou marção positiva em toda a amostra. Para o total de células com imunomarcção citoplasmática entre os casos de CR ($67,7 \pm 12,6$) e CD ($64,5 \pm 16,1$), não houve diferença significativa entre as lesões ($p = 0,480$), bem como o mesmo resultado foi encontrado para imunomarcção nuclear ($p = 0,354$). Quando se observou a intensidade de imunomarcção citoplasmática forte e as características clínicas, o grupo de CD apresentou para faixa etária de até 30 anos menor número de células imunomarcadas por HIF- 1α ($11,7 \pm 13,6$) quando comparada à faixa etária de indivíduos maiores de 30 anos ($34,5 \pm 20,0$), demonstrando diferença estatística ($p = 0,010$). Já quando observada a imunomarcção citoplasmática forte entre os grupos de CR e CD na região anterior dos maxilares, verificou-se que o grupo de CR apresentou maior quantidade de células imunomarcadas ($28,5 \pm 8,5$) que o grupo de CD ($14,0 \pm 11,4$), com diferença estatística ($p = 0,014$). Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que HIF- 1α está presente nos constituintes epiteliais de CR e CD. No entanto, novos estudos são necessários para melhor elucidar o papel desenvolvido pelo HIF- 1α nos cistos odontogênicos.

Palavras-chave: Cistos odontogênicos. Cisto radicular. Cisto dentífero. Fator 1 induzível por hipóxia.

.

ABSTRACT

Odontogenic cysts are classified according to their origin in: developmental cysts, which include the dentigerous cyst (DC), or in inflammatory cysts, which have the root cyst (RC) as the main representative. In lesional microenvironments with low oxygen concentrations, the Hypoxia Induced Factor 1 α (HIF-1) influences mechanisms responsible for cell survival. Thus, the aim of this research was to analyze the immunoexpression of HIF-1 α in root and dentigerous cysts. The sample consisted of 40 cases of odontogenic cysts, 20 of DC and 20 of RC. Verification of HIF-1 α expression was performed by the immunohistochemistry technique using anti-HIF-1 α primary antibody (Clone EP1215Y, Abcam®, 1: 500, overnight, citrate pH 6, Pascal). Quantitative analysis was performed by counting the number of epithelial cells with immunostaining in the cytoplasm or nucleus in five fields photographed at a magnification of 400x. A qualitative analysis was also performed, observing the intensity of cytoplasmic immunostaining. The collected clinical data, such as sex, age and location site, were expressed in absolute and percentage frequency form and compared by Pearson's Chi-square test or Fisher's Exact and by Binomial Logistic Regression. The number of positive epithelial cells was expressed as mean and standard deviation and analyzed using the Student's T-test using the Statistical Package for the Social Sciences program. For all the tests performed, a significance level of 5% ($p < 0.05$) was established. Immunohistochemical analysis evidenced positive marking throughout the sample. For the total number of cells with cytoplasmic immunostaining, between RC (67.7 ± 12.6) and DC (64.5 ± 16.1), there was no significant difference between the lesions ($p = 0.480$) and the same result was found for nuclear immunostaining ($p = 0.354$). When the intensity of strong cytoplasmic immunostaining was observed and the clinical characteristics, the DC group presented a lower number of cells immunized by HIF-1 α (11.7 ± 13.6) for the age group up to 30 years when compared to the age group of individuals older than 30 years (34.5 ± 20.0), showing statistical difference ($p = 0.010$). When the strong cytoplasmic immunostaining was observed between the RC and DC groups in the anterior region of the jaws, it was verified that the RC group presented a greater quantity of immunolabelled cells (28.5 ± 8.5) than the DC group (14.0 ± 11.4), with statistical difference ($p = 0.014$). Considering the results obtained in this research, it can be concluded that HIF-1 α is present in the epithelial constituents of RC and DC. However, further studies are needed to better elucidate the role of HIF-1 α in odontogenic cysts.

Keywords: Odontogenic cysts. Radicular cyst. Dentigerous cyst. Hypoxia-Inducible Factor 1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Domínios funcionais da molécula de HIF-1 α24
- Figura 2-** Mecanismo de ação do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) em ambientes normóxico e hipóxico.....25
- Figura 3-** Genes regulados por HIF-1 α e seus efeitos sobre a progressão do câncer.....26
- Figura 4-** Fotomicrografia exibindo imunoexpressão citoplasmática forte de HIF-1 α ao longo do revestimento epitelial de CD (LSAB, 400x).....45
- Figura 5-** Fotomicrografia exibindo imunoexpressão citoplasmática e nuclear de HIF-1 α no revestimento epitelial de CR. Observa-se na região de camada basal ausência de imunomarcacão em relação às demais camadas epiteliais (LSAB, 400x).....45
- Figura 6-** Percentual total de células epiteliais imunomarcadas, bem como a intensidade desta imunomarcacão por HIF1 α na região citoplasmática de cistos radiculares e dentígeros..46
- Figura 7-** Percentual total de células epiteliais imunomarcadas por HIF1 α na região nuclear de cistos radiculares e dentígeros.....46

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1- Perfil epidemiológico da amostra pesquisada..... | 47. |
| Tabela 2- Percentual de células epiteliais totais imunomarcadas por HIF1 α em Cistos Radiculares e Dentígeros..... | 48 |
| Tabela 3- Percentual de células epiteliais com imunomarcção nuclear por HIF1 α em Cistos Radiculares e Dentígeros..... | 49 |
| Tabela 4- Percentual de células epiteliais com imunomarcção citoplasmática para HIF1 α em Cistos Radiculares e Dentígeros, segundo a intensidade..... | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|---|
| ARNT | Do inglês <i>Arylhydrocarbon-receptor nuclease translocador</i> |
| ADM | Do inglês <i>Adrenomedullin</i> |
| bHLH | Do inglês <i>Basic helix-loop-helix</i> |
| CD | Cisto Dentígero |
| CR | Cisto Radicular |
| C-TAD | Domínio de Transativação COOH-terminal |
| CA IX | Do inglês <i>Carbonic anhydrase IX</i> |
| C-MYC | Do inglês <i>Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i> |
| DAB | Do inglês <i>Diaminobenzidine</i> |
| DNA | Do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| E3UB | Do inglês E3 ubiquitina ligase |
| EGF | Do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| EPO | Do inglês <i>Erythropoietin</i> |
| FGF | Do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i> |
| GLUT 1 | Do inglês <i>Glucose transporter type 1</i> |
| GLUT3 | Do inglês <i>Glucose transporter type 3</i> |
| HE | Hematoxilina & Eosina |
| HIF | Do inglês <i>Hypoxia Inducible Factor</i> |
| HRE | Do inglês <i>Hypoxia responsive element</i> . |
| HK | Do inglês <i>Hexokinase</i> |
| IL1 | Do inglês <i>Interleukin 1</i> |
| IL-6 | Do inglês <i>Interleukin 6</i> |
| ID2 | Do inglês <i>DNA-bindingprotein inhibitor</i> |
| IGF2 | Do inglês <i>Insulin-likegrowthfactor2</i> |
| IGF-BP2 | Do inglês <i>IGF-factor-bindingprotein2</i> |
| IGF-BP3 | Do inglês <i>IGF-factor-binding protein3</i> |
| kDa | Kilodalton |
| KGF | Do inglês <i>Keratinocyte Growth Factor</i> |
| LEP | Do inglês <i>Leptin</i> |
| LSAB | Do inglês <i>Labelled Streptavidin Biotin</i> |
| LDHA | Do inglês <i>Lactate dehydrogenase</i> |

| | |
|----------------|---|
| LRP1 | Do inglês <i>LDL-receptor-relatedprotein1</i> |
| MCP-1 | Do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> |
| MMPs | Do inglês <i>Matrix Metallopeptidase</i> |
| NF κ B | Do inglês <i>Nuclear Factor- Kappa B</i> |
| N TAD | Domínio de Transativação NH2 |
| NO | Do inglês <i>Nitric Oxide</i> |
| NOS | Do inglês <i>Nitric Oxide Synthase</i> |
| OPG | Do inglês <i>Osteoprotegerin</i> |
| PAS | Do inglês <i>PER-ARNT-SIM</i> |
| PI3K | Do inglês <i>Fosfatidilinositol 3-quinase</i> |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PHD | Domínio prolil hidroxilase |
| PKM | Do inglês <i>Pyruvate kinase M ;</i> |
| PRO 402 | Do inglês <i>Proline 402</i> |
| pVHL | Do inglês <i>von Hippel-Lindau tumor suppressor protein</i> |
| RANKL | Do inglês <i>Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B ligand</i> |
| RANK | Do inglês <i>Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B</i> |
| RANTES | Do inglês <i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i> |
| ROS | Do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| TAD | Domínios de Transativação |
| TGF- α | Do inglês <i>Transforming Growth Factor- α</i> |
| TGF- β 3 | Do inglês <i>Transforming Growth Factor-β3</i> |
| TNF α | Do inglês <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> |
| UFC | Universidade Federal do Ceará |
| VEGF | Do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 17 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 29 |
| 2.1 Objetivo Geral | 29 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 29 |
| 3 CAPÍTULOS | 29 |
| 3.1 Capítulo 1: Avaliação da Imunoexpressão de HIF-1α em Cistos Radiculares e Dentígeros | 31 |
| 4 CONCLUSÃO GERAL | 51 |
| REFERÊNCIAS | 52 |
| ANEXOS | 60 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

Cistos são cavidades patológicas com material fluido ou semi-fluido em seu interior, sendo revestidos por epitélio e suportados por tecido conjuntivo fibroso (REGEZI et al., 2012). Os cistos dos maxilares podem ser classificados, conforme sua origem, em odontogênicos e não odontogênicos (KRAMER e al., 1992; NEVILLE et al., 2009).

Quando a formação cística dá-se a partir de inclusões epiteliais nas linhas de fusão dos processos embrionários que dão origem ao processo maxilomandibular são denominados não odontogênicos. Já quando resultam da proliferação de remanescentes epiteliais de estruturas relacionadas com a odontogênese, como a lâmina dentária, órgão do esmalte ou a bainha epitelial de Hertwig, são classificados como cistos odontogênicos (AVELAR et al., 2009; SOUZA et al., 2010).

A presença dos restos epiteliais seria insuficiente para explicar os mecanismos de formação cística, pois se torna necessária a participação de um estímulo capaz de incitar e determinar a proliferação desses remanescentes. A natureza desse estímulo define a classificação dos cistos odontogênicos, que podem ser classificados em cistos de desenvolvimento e inflamatórios (AVELAR et al., 2009; SHEAR et al., 2011). Os cistos odontogênicos inflamatórios são aqueles em que a inflamação participa como desencadeador do desenvolvimento cístico (REGEZI et al. 2012). O cisto radicular faz parte desse grupo, correspondendo ao cisto odontogênico mais comum nos maxilares (MOSQUEDA et al., 2002; AVELAR et al., 2009).

Contudo, nos cistos odontogênicos de desenvolvimento, os mecanismos responsáveis pela formação, bem como crescimento dessas lesões císticas ainda não se encontram completamente elucidados. Os cistos dentígeros são os principais representantes desse grupo de lesões e representam o segundo tipo mais comum de cistos odontogênicos dos maxilares. (DALEY et al., 1994; SHEAR et al., 2011; LIN et al., 2012).

Cistos Dentígeros

O cisto dentígero origina-se pela expansão do folículo que envolve a coroa de um dente incluso devido ao acúmulo de fluido cístico, e, geralmente, está ligado à coroa dentária na junção amelocementária. Os CD acometem comumente indivíduos nas segunda e terceira décadas de vida, com predileção pelo sexo masculino, sendo a razão masculino:feminino de 1,6:1. Geralmente, é assintomático, e o diagnóstico é realizado através de exames radiográficos de rotina, sendo o retardo na erupção dentária o indicador mais frequente da possível presença desse cisto (SRIDEVI et al., 2015). Em casos que atingem grandes dimensões, pode ser observada expansão da cortical óssea e pode apresentar sintomatologia dolorosa (SHEAR et

al.,2011; JOHNSON et al., 2014).

Regezi et al. (2012) relatam que o desenvolvimento do cisto dentígero dar-se a partir da proliferação do epitélio reduzido do órgão do esmalte ou através dos remanescentes deste. A expansão dessa entidade cística está relacionada à proliferação epitelial, à liberação de fatores de reabsorção óssea e ao aumento da osmolaridade do fluido cístico.

Os cistos desenvolvem-se segundo um mecanismo degenerativo, ainda não totalmente esclarecido, que induz a ativação de resíduos epiteliais presentes nos ossos maxilares. Quanto aos mecanismos de crescimento, existem duas hipóteses consideradas: a teoria hidrostática e a teoria das prostaglandinas. De acordo com a teoria hidrostática, um estímulo irritativo ou degenerativo intraósseo provoca a proliferação dos restos epiteliais, que passam a formar um espaço cujo interior contém resíduos que contribuem para o aumento da pressão osmótica. A consequente entrada de fluidos da adjacência provoca o aumento da pressão hidrostática sobre as paredes, agindo como um estímulo para a ativação de osteoclastos presentes no exterior da parede cística, causando expansão da lesão. De acordo com a teoria das prostaglandinas, a parede cística é capaz de liberá-las; estas, por sua vez, ativam os osteoclastos, que induzem a reabsorção do osso adjacente. Alguns autores citam uma origem inflamatória para o cisto dentígero, que seria relacionada a processos infecciosos que se desenvolvem no dente decíduo antecessor (MORAES et al.,2011; REGEZI et al. 2012; MORAES et al.,2014).

O CD geralmente está associado a um dente incluso, principalmente terceiros molares e caninos superiores, dentes que apresentam maior frequência de impacção e, também, podem estar associados a odontomas (LIN et al., 2012; MELO et al., 2015). Parece existir uma relação direta entre o atraso na erupção e a probabilidade de degeneração cística do folículo dentário do dente correspondente (SRIDEVI et al., 2015).

A relação coroa-cisto pode apresentar três variantes radiográficas: central, lateral e circunferencial. A central é a mais comum, na qual o cisto circunda a coroa do dente que está projetada para o interior do cisto. A lateral está geralmente associada a um terceiro molar inferior com impacção mesio-angular e parcialmente erupcionado, o cisto cresce lateralmente ao longo da superfície radicular e circunda parcialmente a coroa. Na variante circunferencial, o cisto circunda a coroa e se estende por alguma distância ao longo da raiz, de tal forma que esta parece estar dentro do cisto (LIN et al., 2013; JOHNSON et al., 2014).

Radiograficamente, o CD é caracterizado por uma lesão radiolúcida unilocular com margem bem definida associada à coroa de um dente incluso. A imagem radiográfica é insuficiente para os diagnósticos definitivos desse cisto, já que imagens radiográficas semelhantes podem ser encontradas em outras lesões odontogênicas, como tumor odontogênico

ceratocístico, ameloblastoma unicístico ou tumor odontogênico adenomatoide (ZHANG, et al., 2010; LIN et al., 2013). Torna-se difícil distinguir entre um pequeno cisto dentífero e um grande folículo dentário. Um método confiável para essa distinção é a identificação de uma cavidade cística no momento da cirurgia, além da avaliação microscópica (GODOY, 2005).

Histopatologicamente, o CD apresenta como principal característica a presença de um revestimento epitelial consistindo em 2-4 camadas de células cuboidais ou colunares, não ceratinizadas. A cápsula de tecido conjuntivo fibroso arranja-se frouxamente e contém considerável substância fundamental amorfa composta por glicosaminoglicanos, e a interface entre epitélio e tecido conjuntivo é plana (NEVILLE et al. 2009; SHEAR, 2011). O exame histopatológico é de suma importância pra o diagnóstico final da lesão (LIN, et al., 2013).

Quando apresenta inflamação, o CD exibe cápsula fibrosa bem colagenizada, com um infiltrado inflamatório variável, geralmente crônico. O componente epitelial pode apresentar áreas de hiperplasia com desenvolvimento de projeções epiteliais. Algumas vezes, podem ser observados trechos com superfície ceratinizada. Descontinuidades no revestimento epitelial podem ser vistas na presença de um infiltrado inflamatório intenso na cápsula adjacente (GODOY et al., 2005; NEVILLE et al., 2009).

O tratamento do cisto dentífero é variável, conforme seu tamanho e localização. As principais opções incluem enucleação e marsupialização, e descompressão com ou sem tracionamento dentário (DEBONI et al., 2012; ARJONA-AMO et al., 2015). O prognóstico para os cistos dentíferos, em sua maioria, é bom, e raramente há registro de recidivas após a remoção completa dessa lesão (REGEZI et al., 2012).

Há relatos na literatura da possibilidade de transformação neoplásica para um ameloblastoma e até mesmo carcinoma de células escamosas e carcinoma mucoepidermoide. A incidência de carcinomas oriundos de cistos dentíferos é bastante rara, cerca de um a dois para 1000 casos, sendo descrito como um possível responsável pela transformação maligna do epitélio do cisto dentífero o processo inflamatório crônico (YASUOKA et al., 2000; CAVALCANTI et al., 2005; CHAISUPARAT et al., 2006; COLBERT et al, 2012; ZAPAŁA-POŚPIECH et al., 2013).

Cistos Radiculares

Os cistos radiculares são lesões que se originam a partir da proliferação dos restos epiteliais de Malassez, decorrente do estímulo inflamatório ocasionado pela infecção dos canais radiculares proveniente, principalmente, da doença cárie ou por ocorrência de traumatismo que gerou alterações pulpares. (CEDIN et al., 2005; SANTOS et al., 2006; BERNARDI et al.,

2015).

Estudos epidemiológicos das lesões orais mostram que o cisto radicular representa a entidade patológica encontrada com maior frequência, perfazendo cerca de 37,9% a 84,5% dentre os cistos e tumores odontogênicos (JOHNSON et al., 2014). Apresenta predominância pelo sexo masculino (PROCKT et al., 2008; AVELAR et al., 2009), com maior prevalência na terceira década de vida (SOUZA et al., 2010; BORGES et al., 2012;), sendo a maxila seu sítio de localização mais frequente (SHARIFAN; KHALILI., 2011; SELVAMANI et al., 2012)

Os CR são, em geral, assintomáticos, sendo descobertos através dos exames radiográficos de rotina. Quando atingem grandes dimensões, sinais clínicos como sensibilidade, mobilidade e deslocamento dos dentes adjacentes, abaulamento na região afetada, assimetria facial, dor à palpação e à mastigação são relatados. Essas lesões podem envolver um ou mais dentes necróticos, que não respondem aos testes pulpares térmicos e elétricos (HENRY NETO et al., 2007; CARRILLO et al., 2008).

A imagem radiográfica dessa lesão cística pode ser representada por uma área radiolúcida, com densidade homogênea, de forma ovalada ou arredondada, delimitada por halo radiopaco contínuo, geralmente associada ao ápice radicular de um dente desvitalizado, apresentando rompimento da lâmina dura ao nível do ápice. Normalmente, o tamanho dos cistos radiculares é superior a 20 mm de diâmetro ou apresentam uma área de 200mm², podendo envolver os ápices dos dentes adjacentes ou outras estruturas anatômicas, como o canal mandibular, o seio maxilar, o assoalho da cavidade nasal e a abóbada palatina. (YOSHIURA et al., 2003).

Os cistos radiculares podem surgir a partir de um granuloma periapical com epitélio pré-existente, o qual se constitui num foco de tecido de granulação cronicamente inflamado no ápice dentário. Contudo, a formação dos granulomas dentários ocorre em consequência da penetração de toxinas bacterianas no periápice dental, e, dessa forma, estas proporcionam aumento da quantidade de fibroblastos, fibrilas colágenas, células endoteliais e capilares (MOURÃO et al., 2013). Ambos classificam-se como lesões periapicais crônicas, cuja formação envolve ativação da resposta imunológica e reabsorção do osso alveolar adjacente ao ápice dentário envolvido (FUKADA et al., 2009).

Durante o período de deposição de dentina na região radicular, os restos epiteliais de Malassez, resultantes da apoptose incompleta sofrida pela bainha epitelial de Hertwig durante o processo de rizogênese, permanecem no ligamento periodontal. A presença e a ação de citocinas inflamatórias parecem estimular a divisão dessas células epiteliais, bem como a reabsorção do osso adjacente (RUIZ et al., 2003). Em decorrência de um estímulo crônico de

baixa intensidade, desencadeado pelos produtos bacterianos, é condicionado ao organismo inibir o crescimento da agressão e, dessa forma, mantê-la restrita à região periapical (MOURÃO et al., 2013). A regulação da reabsorção óssea pela ação dos osteoclastos foi estudada através da imunexpressão de OPG (osteoprotegerina), receptor ativador do ligante fator nuclear- κ B (RANKL) / RANK em CR; esta demonstrou maior atividade de OPG em relação à RANKL, resultado que corrobora com o comportamento dessa lesão de não causar invasão e destruição ao osso subjacente (MORAES et al., 2011).

De acordo com Lin, Huang e Rosenberg (2007), existem três teorias que explicam a formação dos cistos radiculares: a primeira é a teoria da deficiência nutricional, em que, por meio de um estímulo inflamatório, ocorre uma proliferação epitelial na região e as células mais centrais sofrem necrose, formando a cavidade cística; a segunda teoria defende que a proliferação celular é consequência da formação de um abscesso, formando cordões que passam a revesti-lo; e a terceira teoria afirma que a formação dos cordões de tecido epitelial ocorre devido à proliferação dos restos epiteliais de Malassez, que se fusionam, originando a cavidade cística. A descamação de restos celulares gera um aumento do conteúdo proteico no interior da cavidade, estimulando a entrada de líquido e consequente expansão da lesão.

O fenômeno de expansão da cavidade cística não é consequência apenas do aumento da pressão osmótica. Devem ser considerados aspectos importantes, como as propriedades do epitélio cístico, da matriz extracelular e dos componentes das reações imunoinflamatórias (PIATTELLI et al., 2004; BERNARDI et al., 2015). Muglali et al. (2008) estudaram o nível das citocinas e quimiocinas no fluido dos cistos radiculares e residuais, constatando que o fluido dos cistos radiculares possui uma maior concentração de interleucina-1 α (IL-1 α), fator de necrose tumoral α (TNF- α), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e regulador da ativação, expressão e secreção de linfócitos T (RANTES) quando comparado com os cistos residuais. Essas citocinas estão envolvidas na expansão cística. Desse modo, evidenciou-se que, apesar de apresentarem origens semelhantes, os cistos radiculares possuem maior capacidade de expansão quando comparados aos cistos residuais. Em casos nos quais o CR não é devidamente removido após exodontias, certo grau de inflamação pode permanecer, contribuindo, desta forma, para expansão cística, contudo de forma mais lenta (MOURÃO et al., 2013).

Outro fator importante para o crescimento e a expansão da lesão cística é a participação das metaloproteinases da matriz (MMPs). Estudo de Silveira et al. (2007) avaliou a expressão imuno-histoquímica das MMPs -1, -2 e -9 em cistos radiculares, residuais, dentígeros e tumor odontogênico ceratocístico (TOC), concluindo que o mecanismo de expansão dos cistos

estudados pode ser influenciado, e até mesmo conduzido, pela secreção das metaloproteinases da matriz, que podem ser liberadas tanto pelo componente epitelial como por células mesenquimais. Khot, et al (2015) avaliaram a marcação imuno-histoquímica do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e MMP-9 no epitélio, tecido conjuntivo e componentes inflamatórios em TOC, CD e CR, nos quais observaram significativa imunoe expressão de VEGF nos componentes inflamatórios dos CR em comparação com as outras duas lesões, além da maior imunoe expressão de MMP-9 em CR e CD, quando comparados ao tumor odontogênico ceratocístico.

Os CR são caracterizados histologicamente pela presença de um revestimento epitelial proveniente dos restos epiteliais de Malassez, sendo do tipo pavimentoso estratificado não ceratinizado (SHEAR et al., 2011). A espessura do epitélio de revestimento é variável e pode apresentar áreas delgadas e hiperplásicas. Em outras regiões, o epitélio pode ser extremamente espesso, formando projeções arciformes. A presença de calcificações no epitélio, denominadas corpúsculos de Rushton, pode ser observada em cerca de 10% dos cistos radiculares (SANTOS et al.; 2011; GARGI et al., 2016). A cavidade cística apresenta um lúmen que é constituído por material amorfo, células epiteliais descamadas e, em alguns casos, ceratina. Na cápsula fibrosa, evidencia-se um infiltrado inflamatório predominantemente crônico, com macrófagos espumosos; fendas de cristais de colesterol também podem ser observadas, além dos corpúsculos de Russell, formados a partir do acúmulo de imunoglobulinas no citoplasma de plasmócitos (DOS SANTOS et al., 2008).

O tratamento dos CR deve ser direcionado para preservação das estruturas anatômicas. Pode-se incluir o tratamento endodôntico como terapêutica conservadora, e, em alguns casos, a cirurgia torna-se melhor indicada (LOPES; FREITAS, 2015). A escolha do tratamento depende de fatores tais como tamanho da lesão, relação com estruturas nobres, origem e evolução da lesão. O tratamento endodôntico dos cistos radiculares envolve o preparo biomecânico dos canais radiculares. Já o tratamento cirúrgico consiste na exérese total ou parcial da lesão. Quando o tratamento cirúrgico é realizado, este pode ocorrer associado à técnica de marsupialização para posterior enucleação da lesão. Outros autores sugerem uma descompressão cística realizada através de um dreno na região bucomaxilofacial, seguida do tratamento endodôntico para promover redução da lesão e, conseqüentemente, evitar cirurgias extensas (VASCONCELOS et al., 2012; DANTAS et al., 2014).

HIF-1 (Fator Induzido por Hipóxia-1)

HIF-1 é um fator de transcrição heterodímero, composto por duas subunidades: o HIF-

1 α , ou os seus análogos de HIF-2 α e HIF-3 α ; e o HIF-1 β . HIF-1 α é uma subunidade sensível ao oxigênio, e sua expressão é induzida sob condições de hipóxia. Em contraste, o HIF-1 β , também chamado de ARNT (arylhydrocarbon-receptor translocadornuclease), é produzido de forma constitutiva, e expressa uma proteína de 91–94 kDa (BRENNAN et al., 2005; ECKERT et al., 2012; MASOUD; WEI LI, 2015). HIF-1 age no metabolismo energético regulando as respostas celulares diante das mudanças na concentração de oxigênio, coordenando a indução e a repressão de vários genes que controlam múltiplas funções celulares, tais como angiogênese, invasão e metástase, apoptose e sobrevivência celular (ECKERT et al., 2012; KUMAR; CHOI, 2015).

HIF1- α é composto por quatro domínios funcionais: a) um domínio bHLH; b) um domínio PER-ARNT-SIM (PAS), sendo este um domínio de degradação dependente de oxigênio que está relacionado com a dimerização e ligação ao DNA; além de dois domínios de transativação (TAD): c) NH₂-terminal (N-TAD); e d) COOH-terminal (C-TAD). Estes dois domínios são responsáveis pela atividade de transcrição HIF-1 α . C-TAD interage com coativadores como o CBP/p300, modulando a transcrição de genes de HIF-1 α sob hipóxia. N-TAD é responsável pela estabilização HIF-1 α contra a degradação (SEMENZA, 2012; MASOUD; WEI LI, 2015) (Figura 1).

Em condições de normóxia, HIF-1 β encontra-se estável, enquanto a subunidade HIF1- α é degradada com facilidade (SEMENZA, 2010). A molécula de HIF-1 α é hidroxilada pela enzima prolilhidroxilase em resíduos de prolina 402 (Pro-402) e de prolina 564 (Pro-564) (ECKERT et al., 2012). Após hidroxilação, os resíduos de HIF-1 α ligam-se a uma proteína supressora tumoral de vonHippel-Lindau (pVHL); esta promove a degradação e a eliminação da molécula através do complexo enzimático ligase E3-ubiquitina (SEMENZA, 2010). Tem sido descrito outro fator envolvido na inativação do HIF-1 α ; este envolve o fator de inibição do HIF-1, que hidroxila a Asparagina 803 por meio de domínio de transativação, havendo, consequentemente, bloqueio da ligação de coativadores de p300 e CBP (HIROTA; SEMENZA, 2005; PEREIRA et al., 2013). (Figura 2)

Em condições de hipóxia, não há hidroxilação de HIF1- α nem interação com a proteína vonHippel-Lindau. Desse modo, a subunidade α torna-se estável no interior do citoplasma, viabilizando o acúmulo e seu deslocamento para o interior do núcleo, onde acontece associação com a subunidade β , formando a molécula HIF-1 (NIZET et al. 2009; DEHNE & BRUNE 2009).

A estabilidade da subunidade α pode ser induzida por outros fatores além da hipóxia, como pela ação de TNF- α e IL-1 β , além de fatores de crescimento, insulina-like, oncogenes e óxido

nítrico (NIZET et al., 2009). Haddad (2002) sugere que a estabilização, translocação nuclear e ativação de HIF-1 necessitam de espécies reativas de oxigênio (ROS), e, assim, sugere-se que também pode existir uma via de ativação não hipóxica. TNF- α , além de agir na estabilidade de HIF-1 α pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), também pode fazê-lo por meio do aumento da concentração de óxido nítrico (NO), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e/ou pela ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (DEHNE & BRUNE 2009; SALMINEN et al., 2016).

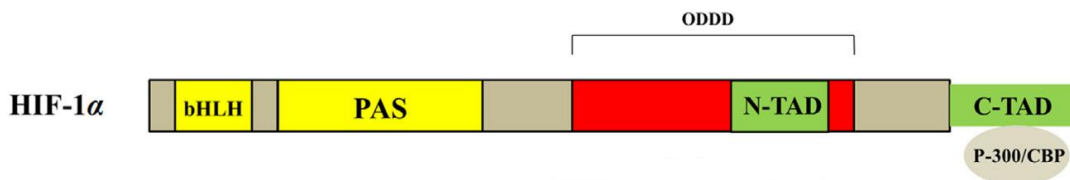


Figura 1: Visão esquemática dos domínios funcionais (bHLH, PAS, TAD) do HIF-1 α
 Fonte: Adaptado de MASOUD; WEI LI (2015).

A ativação de HIF-1 em células tumorais é um dos principais mecanismos que promovem adaptação ao ambiente de hipóxia, já que essa molécula influencia a transcrição de mais de cem genes que regulam os processos biológicos essenciais necessários para a sobrevivência e progressão do tumor (PEREIRA et al., 2013). Entre os exemplos, estão incluídos genes envolvidos no metabolismo da glicose, proliferação celular, migração e angiogênese (MASOUD; WEI LI, 2015). (Figura 3)

Em tumores de crescimento rápido, HIF-1 contribui com o metabolismo da glicose, proporcionando uma fosforilação oxidativa mais eficiente para a via glicolítica, a fim de manter a produção energética celular. Assim, as células hipóxicas tendem a consumir glicose de forma mais efetiva, a fim de satisfazer suas necessidades energéticas. HIF-1 medeia essa conversão metabólica através da indução de enzimas envolvidas na via da glicólise e a elevada expressão de transportadores de glicose (GLUTs) e estes promovem o aumento da importação de glicose pelas células tumorais (DENKO, 2008). Outro exemplo envolve a indução da transcrição de vários fatores pró-angiogênicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que por sua vez estimula o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos para enriquecer as células tumorais. Além disso, HIF-1 influencia no processo de metástase através da ativação de fatores de crescimento oncogênicos, tais como fator de transformação de crescimento 3 β (TGF- β 3), fator de crescimento epidérmico (EGF), entre outros (MASOUD; WEI LI, 2015; HARADA, 2016).

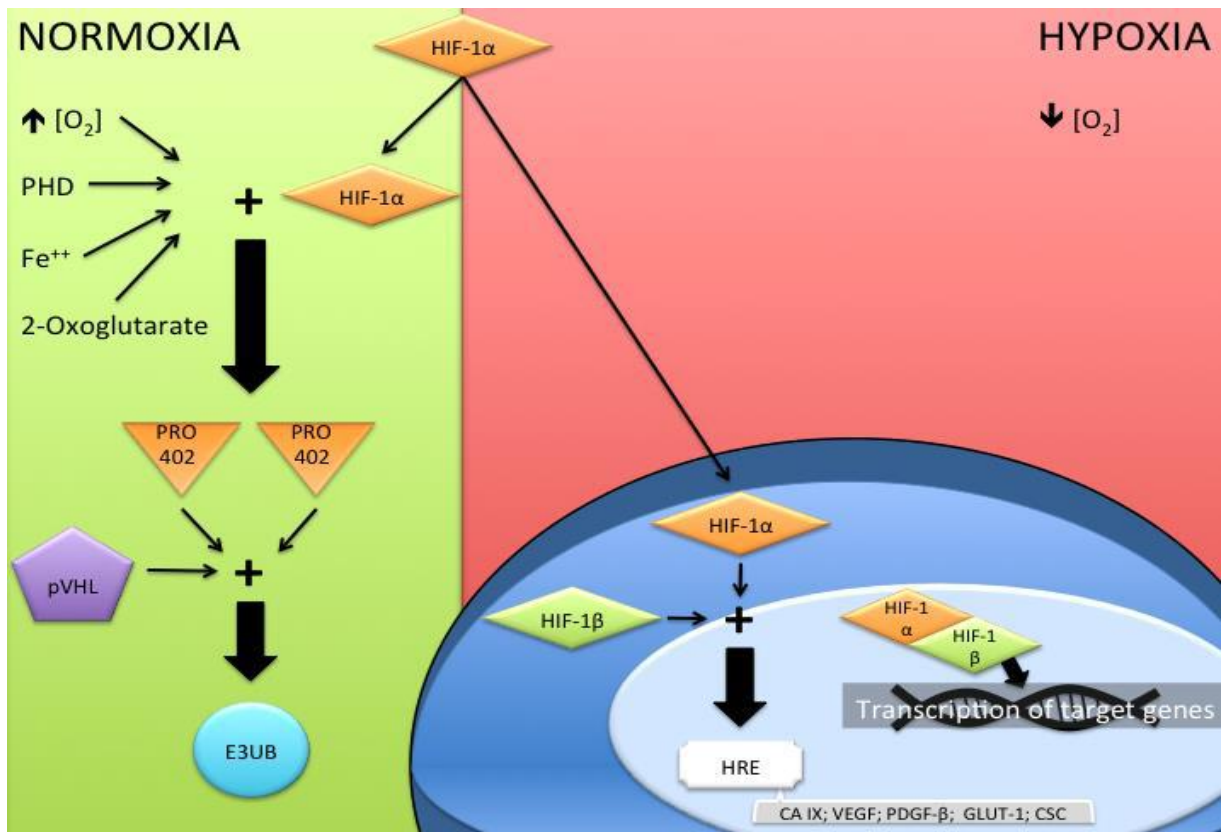


Figura 2: Mecanismo de ação do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) em ambientes normóxico e hipóxico. PHD, domínio prolil hidroxilase; PRO 402, prolina 402; pVHL, von Hippel-Lindau supressor de tumor; E3UB, E3 ubiquitina ligase; HRE, elemento de resposta a hipóxia; CA IX, anidrase carbônica IX; EGF, fator de crescimento endotelial vascular; PDGF- β , derivado de fator- β de crescimento de plaquetas; GLUT 1, transportador de glicose 1; CSC, de células-tronco do câncer.

Fonte: Adaptado de PEREIRA et al. 2013.

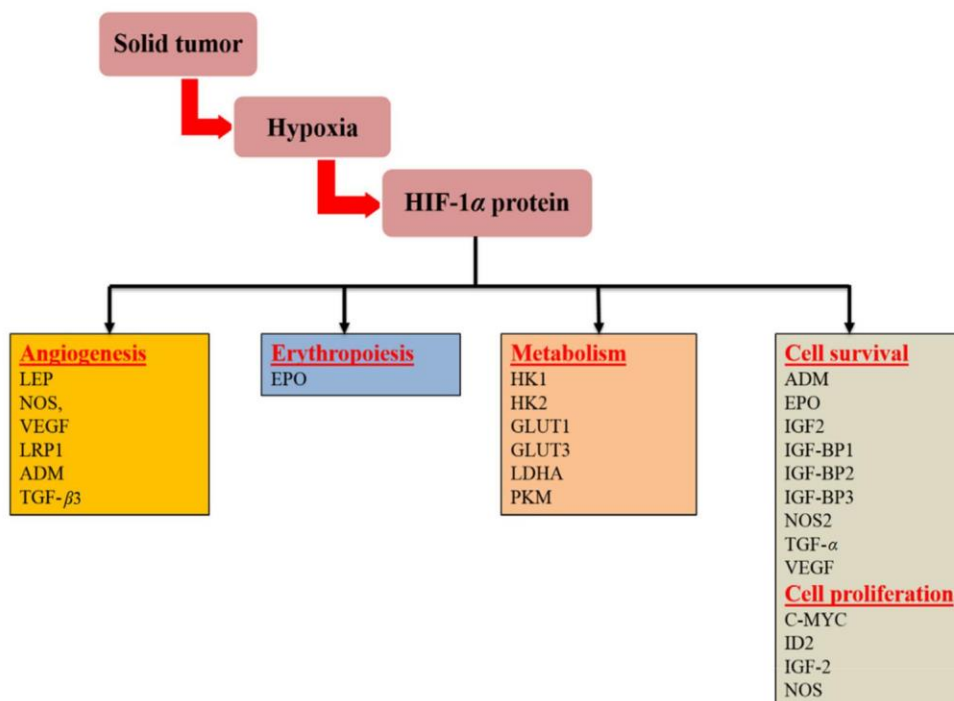


Figura 3: Genes regulados por HIF-1 α e seus efeitos sobre a progressão do câncer.

LEP, leptina; NOS, óxido nítrico sintase; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; LRP1, proteína de LDL-receptor relacionado 1; ADM, adrenomedullin; TGF- β 3, Fator de transformação de crescimento β 3; EPO, eritropoietina; HK1, hexoquinase 1; HK2, hexoquinase 2; GLUT1, transportador de glicose 1; GLUT3, transportador de glicose 3; LDHA, lactato desidrogenase; PKM, piruvato quinase H; IGF2, fator de crescimento

semelhante a insulina 2; IGF-BP2,-IGF-fator de ligação às proteínas 2; IGF-BP3,-IGF-fator de ligação às proteínas 3; TGF- α , factor de transformação de crescimento α ; C-MYC, mielocitomatose vírus homólogo do oncogene celular; ID2, inibidor7 proteína de ligação a DNA.

Fonte: Adaptado de MASOUD; WEI LI (2015).

Em lesões císticas, a literatura demonstra que a expressão do gene de HIF-1 α em policistos renais apresenta correlação positiva com o crescimento dessas lesões, presumivelmente por participar da regulação de proteínas envolvidas na ativação do cálcio (KRAUS et al., 2016). Além da expansão, estudos demonstram que os mecanismos mediados por essa molécula estão relacionados, também, com a formação dessas lesões císticas. A perda de função da proteína de VHL, um componente crítico que promove a degradação do HIF, tem sido associada a esse fato (BUCHHOLZ et al., 2014).

A inflamação participa da patogênese de algumas entidades císticas quer sejam de origem odontogênica ou não, devido principalmente ao estímulo que alguns produtos inflamatórios provocam em tecidos epiteliais. Dentre os fatores responsáveis por esse estímulo, sugere-se a participação de fatores de crescimento de ceratinócitos (KGF) e fatores de crescimento epidérmico, além de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF α (SING et al., 2013; BERNARDI et al., 2015).

Essas citocinas são produzidas no decorrer do processo inflamatório que se inicia com respostas neurovasculares típicas, resultando em hiperemia, congestão vascular, edema e extravasamento de neutrófilos que agem no combate de agentes estranhos, liberando leucotrienos e prostaglandinas a fim de atrair macrófagos e mais neutrófilos. Os macrófagos são células que realizam fagocitose e produzem mediadores pró-inflamatórios, dentre os quais IL-1, IL-6 e TNF α que são de grande importância, pois intensificam a resposta vascular local e participam direta ou indiretamente da destruição tissular e reabsorção óssea (KUMAR et al., 2013; BERNARDI et al., 2015).

As células inflamatórias mononucleares podem induzir a destruição tecidual para conter os agentes nocivos, além de estimular os osteoclastos. Paradoxalmente, macrófagos também promovem a proliferação tecidual por meio da produção de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento de células endoteliais e o fator de crescimento epidérmico, a fim de tentar promover cicatrização através da substituição de tecido danificado (SINGER & CLARK, 1999).

Durante a atividade do sistema imune do hospedeiro, a chegada de células inflamatórias para o local onde foram recrutadas é acompanhada por um aumento no consumo de nutrientes e oxigênio para que sejam realizados processos de fagocitose e destruição dos microrganismos. Além disso, pode ocorrer isquemia transitória devido à vasoconstrição ou compressão por

edema local, comprometendo a quantidade de oxigênio disponível (KOVACS et al., 2011; PEIXOTO & PEIXOTO, 2012). Desta forma, o aumento do consumo de oxigênio, associado à diminuição deste, estabelece a condição de hipóxia, que é uma das vias de ativação do Fator Induzido por Hipóxia (KOMINSKY et al. 2010; BRIGATI et al. 2010).

A secreção de citocinas pró-inflamatórias pode regular potencialmente a expressão de HIF-1 α . O aumento da regulação desse fator foi relatada em resposta à exposição a IL-1 β , citocina que ativa a via de sinalização NF- κ B, reconhecido como o maior regulador da transcrição de citocinas inflamatórias (VAN UDEN et al., 2008; BANDARRA; ROCHA, 2015).

O aumento da expressão do HIF-1 α foi observado em quadros inflamatórios agudos e crônicos, o que sugere a participação desse fator de transcrição como regulador da produção de mediadores inflamatórios, além de participar da manutenção da integridade e processo de reparo das células (DEHNE & BRUNE 2009; NIZET et al. 2009).

O papel do HIF-1 em processos neoplásicos malignos e benignos tem sido esclarecido, de modo que essa proteína participa de mecanismos que contribuem com o crescimento dessas lesões (HARADA, 2016; COSTA et al., 2016). Entretanto, não há relatos da participação dessa molécula no microambiente de cistos odontogênicos. Assim, para melhor entendimento da participação do HIF-1 α nas lesões císticas odontogênicas, tem-se a importância da realização desta pesquisa.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Analisar a participação do fator induzido por hipóxia-1 α (HIF-1 α) em cistos odontogênicos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão imunoistoquímica da proteína HIF-1 α em Cistos Radiculares e Dentígeros;
- Comparar a expressão imunoistoquímica da proteína HIF-1 α em cistos dentígeros e radiculares;
- Identificar a frequência das características clínicas coletadas, tais como sexo, idade e sítio de localização, correlacionando-as com a imunoexpressão observada na amostra.

3. CAPÍTULOS

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (Anexo A), 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.

Por se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, o presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ, com o parecer N° 1.269.796, sendo aprovado em 08/10/15, sob o CAAE: 48041315.4.0000.5054 (Anexo B).

Foram utilizadas 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).

Diante disso, tal dissertação de mestrado é composta por um capítulo que contém um artigo científico, que será submetido à publicação no periódico “**Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**” (Anexo D), conforme descrito abaixo:

Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) expression in radicular and dentigerous cysts: Immunohistochemical evaluation

Ferreira TAP, Pereira KMA, Bezerra TMMB, Chaves FN, Silva PGB, Sousa AM

3.1 CAPÍTULO 1: Avaliação da imunoexpressão de HIF1- α em cistos radiculares e dentígeros. Este artigo seguiu as normas de publicação do Periódico Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology (ISSN: 2212-4403).

Autores:

Thalyta Amanda Pinheiro Ferreira

Grau acadêmico: Estudante de Mestrado em Odontologia, Bacharel em Odontologia.

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

Karuza Maria Alves Pereira

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

Posição: Professora Adjunta IV da Universidade Federal do Ceará.

Afiliação institucional: Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

Thamara Manoela Marinho Bezerra

Grau acadêmico: Estudante de Doutorado em Odontologia. Mestre em Patologia Oral, Bacharel em Odontologia.

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

Filipe Nobre Chaves

Grau acadêmico: Estudante de Doutorado em Odontologia. Mestre em Odontologia, Bacharel em Odontologia.

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

Paulo Goberlânio Barros Silva

Grau acadêmico: Doutor em Odontologia. Mestre em Odontologia, Bacharel em Odontologia.

Afiliação institucional: Faculdade de Odontologia, Centro Universitário Christus, Fortaleza, Brasil.

Alceu Machado de Sousa

Grau acadêmico: Estudante de Mestrado em Ciências Morfológicas, Bacharel em Ciências Biológicas.

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

Autor de Correspondência: Karuza Maria Alves Pereira

Endereço: Rua Monsenhor Furtado, S/N, Rodolfo Teófilo – Fortaleza, Ceará, Brasil, CEP: 60430-350.

Telefone: 55-85-3366 8411

Email: karuzaalves@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo.

Analisar a imunexpressão do HIF-1 α em cistos radiculares e dentígeros através da técnica imunoistoquímica.

Desenho do Estudo.

A amostra foi constituída por 40 casos de cistos odontogênicos, 20 de CD e 20 de CR. A verificação imunoistoquímica foi realizada utilizando anticorpo primário anti- HIF-1 α (Clone EP1215Y, Abcam®, 1:500, overnight, citrato pH6, Pascal). Realizou-se análise quantitativa, por meio da contagem do número de células imunomarcadas, e também qualitativa, observando a intensidade de imunomarcção. A contagem da quantidade de células epiteliais imunopositivas foi analisada por meio do teste de T de Student.

Resultados.

A análise imunoistoquímica evidenciou imunomarcção positiva em todos os casos da amostra. Não houve diferença na imunexpressão citoplasmática ($p=0,480$) e nuclear ($p=0,354$) entre os grupos de CR e CD. Quando observada a imunomarcção citoplasmática forte entre CR e CD na região anterior dos maxilares, têm-se que o grupo de CR apresentou maior quantidade células imunomarcadas ($28,5\pm 8,5$) que o grupo de CD ($11,9\pm 13,9$), ($p=0,014$).

Conclusões.

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que HIF-1 α está presente nos constituintes epiteliais de CR e CD. No entanto, novos estudos são necessários para melhor elucidar o papel desta molécula nos cistos odontogênicos.

Keywords: Odontogenic cysts. Radicular cyst. Dentigerous cyst. Hypoxia-Inducible Factor-1 α

INTRODUÇÃO

Os cistos odontogênicos representam cerca de 22,41% das lesões biopsiadas, caracterizando-se como as lesões ósseo-destrutivas mais comuns nos maxilares (MESQUITA et al., 2016). São caracterizados por cavidades patológicas revestidas por epitélio, originando-se do epitélio odontogênico ou de seus remanescentes. Podem ser classificados de acordo com a origem em: cistos de desenvolvimento ou inflamatórios. Os cistos de desenvolvimento têm sua etiologia desconhecida, mas a inflamação não parece estar relacionada à sua patogênese (AVELAR et al., 2009; SHEAR, 2011; CANASSA; PAVAN, 2014).

Dentre os cistos de desenvolvimento, destaca-se o cisto dentígero (CD) por apresentar elevada incidência, representando cerca de 17% de todos os cistos epiteliais dos maxilares (SHEAR, 2011). A patogênese exata desse cisto é desconhecida, sugere-se que ocorre devido ao acúmulo de líquido entre o epitélio reduzido do esmalte e a coroa de um dente incluso (BENN & ALTINI 1996; NARANG et al., 2012).

Dentre os cistos inflamatórios, os cistos radiculares (CR) ou periapicais, são os cistos odontogênicos de maior prevalência na cavidade oral. Formam-se a partir do estímulo e interação entre células epiteliais, estromais, matriz extracelular, matriz óssea e produtos originados pela inflamação dos tecidos perirradiculares nos restos epiteliais de Malassez

(JOHNSON et al., 2014; BERNARDI et al., 2015).

As células dos mamíferos necessitam manter a homeostasia adequada de oxigênio, a fim de executar o seu metabolismo e geração de energia aeróbica. Em lesões que apresentam um microambiente hipóxico, principalmente neoplasias malignas, as células tumorais buscam mecanismos para adaptação nessas condições de baixa tensão de oxigênio, ativando várias vias de sobrevivência, sendo a mais reconhecida a ativação do fator 1 induzido por hipóxia HIF-1 (HIF-1) (MASOUD; WEI LI, 2015).

Durante o processo inflamatório, macrófagos ativados liberam citocinas como a interleucina-1 α e β (IL-1 α e IL-1 β) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (NAIR et al., 2010). Essas citocinas podem levar à ativação do HIF-1, que contribui para sobrevivência celular (KOMISKY et al., 2010; BRIGATI et al., 2010).

A presença de HIF-1 α em cistos inflamatórios é provável, uma vez que ocorre ativação dessa proteína via hipóxica e não hipóxica. Contudo, não há, na literatura, trabalhos que correlacionem a imunoexpressão de HIF-1 em cistos odontogênicos, e, diante da importância de estudar a participação desta proteína no metabolismo dessas lesões, a fim de buscar mecanismos que melhor elucidem a patogênese e o crescimento, o propósito desta pesquisa é avaliar a imunoexpressão de HIF-1 α em cistos radiculares e dentígeros.

MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa obteve o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, sob o número do parecer 1269.796.

O presente trabalho é um estudo retrospectivo, observacional e transversal e avaliação imuno-histoquímica de cistos radiculares e dentígeros. A população do estudo foi constituída de casos dessas lesões de pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral, no período de Janeiro de 2011 à Setembro de 2016. Foram incluídos na amostra casos nos quais os blocos parafinados apresentavam material biológico suficiente para análise imuno-histoquímica. Foram excluídos da amostra os casos que apresentaram quantidade insuficiente de material emblocado em parafina para estudo morfológico e imuno-histoquímico, bem como os casos de CDs nos quais, após análise histopatológica, demonstraram presença de inflamação na cápsula cística. Diante desses critérios, a amostra foi constituída por 40 casos de cistos odontogênicos, dos quais 20 de cistos radiculares e 20 de cistos dentígeros, conforme estudo utilizado para o cálculo amostral de KOLAR et al. em 2009, que avaliou a imunoexpressão de células positivas para o Receptor

Ativador do Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) em cistos dentígeros e radiculares, foi adotado um poder de 90% e uma confiança de 95%.

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Para realização do estudo imunoistoquímico, os espécimes foram seccionados com 3 μ m de espessura e montados em lâminas de vidro silanizadas. Os cortes foram submetidos à técnica imunoistoquímica da estreptoavidina-biotina (Labeled Strept Avidin Biotin – LSAB). Essa técnica consistiu, resumidamente: as secções passaram por dois banhos em xilol, durante cinco minutos cada; em seguida, foram imersas em três passagens de álcool etanol decrescente, sendo posteriormente lavadas em água corrente; e, em seguida, passagem em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em câmara úmida pressurizada, onde as secções foram submetidas a temperaturas de até 125-126°C, por 30 segundos em solução de recuperação antigênica Citrato pH 6,0. Após retornar à temperatura ambiente, as secções foram imersas em solução de P.B.S/Tween, seguido pelo bloqueio com peróxido de hidrogênio a 3%, durante 30 minutos, com troca de solução a cada 15 minutos. Os espécimes foram incubadas com o anticorpo HIF-1 α (Clone EP1215Y, Monoclonal Rabbit, Abcam®, Cambridge, MA, EUA), overnight, utilizando a diluição de 1:500, as lâminas foram submetidas ao anticorpo secundário LSAB Kit (DAKO®, Carpinteria, CA, USA), por 15 minutos à temperatura ambiente; em seguida, foi realizada a revelação em solução cromógena preparada com diaminobenzidina (diaminobenzidine 3.3'- DAB) durante 1 minuto. Os espécimes foram novamente lavados em água corrente e água destilada; a contracoloração foi realizada com hematoxilina e, depois, foram desidratadas em álcool e diafanizadas em xilol; para finalizar, realizou-se a montagem em lamínulas com resina Permount®. Como controle positivo, utilizou-se amostra de adenocarcinoma. 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 citoplasma e/ou núcleo, considerando a intensidade da imunomarcção citoplasmática em forte ou fraca. Foram selecionados, aleatoriamente, cinco campos no aumento de 400x visualizados através do microscópio óptico Leica® DM2000 e fotografados pela câmera Leica® DFC295 3.0 megapixels em máxima resolução.

Análise quantitativa da imunexpressão de HIF-1 α foi realizada por meio da contagem do número, em valores absolutos, tanto das células imunomarcadas quanto das células totais nos cinco campos com aumento de 400x, por um observador, 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). Adicionalmente, as células imunopositivas foram avaliadas quanto à localização da imunomarcagem celular (nuclear ou citoplasmática). A avaliação da intensidade da imunexpressão foi feita por meio da análise do campo fotografado no aumento de 400x, também com o auxílio do programa Image J. A partir desta análise, a intensidade da imunexpressão foi classificada em: sem expressão, fraca (intensidade menor que o controle positivo) e forte (intensidade maior que o controle positivo) (Adaptado de LOPES, 2016).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e comparados entre grupos por meio do teste qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher e por meio de Regressão Logística Binomial. A contagem dos números de células epiteliais positivas foi expressa em forma de média e desvio-padrão e, analisada por meio do teste T de Student (dados paramétricos), utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17.0 para Windows, $p < 0.05$).

RESULTADOS

Este estudo foi constituído por uma amostra de 40 casos, desses 20 foram de CR e 20 de CD. De acordo com as características clínicas dos dados coletados a partir das fichas clínicas, nos casos de CR não houve diferença entre os sexos, ambos representaram 50% de prevalência na amostra. Quanto à média de idade, 65% dessas lesões acometeram indivíduos acima de 30 anos. A maxila foi a localização anatômica mais encontrada, totalizando 75% da amostra de CR, com leve predileção pela região posterior, perfazendo um percentual de 55%. No grupo de CD, não houve diferença entre os sexos acometidos, com percentual de 50% encontrado para ambos. A faixa etária jovem, composta por indivíduos com idade de até 30 anos, foi a mais acometida, representando um percentual de 75%. A mandíbula foi a localização mais frequentemente observada, perfazendo um total de 65%, sendo a região posterior mais acometida, representando 60% dos casos de CD estudados (Tabela 1).

Na análise da imunexpressão de HIF-1 α observou-se marcação positiva em todos os casos da amostra estudada (100%)(Figuras 4 e 5). Considerando o total de células com marcação citoplasmática para HIF-1 α , os resultados observados para os casos de CR foram $67,7 \pm 12,6$ de células imunopositivas e, para os casos de CD $64,5 \pm 16$ células, não havendo diferença significativa entre as lesões ($p = 0,480$) (Figura 6). Quando analisada a

imunoexpressão nuclear de HIF-1 α os resultados observados para o grupo de CR foram de 22,6 \pm 14,1 células imunomarcadas e, de 17,9 \pm 17,1 células para o grupo de CD, valores que não expressaram diferença estatística entre os grupos avaliados ($p=0,354$) (Figura 7).

Quando comparada à intensidade de marcação citoplasmática forte entre as lesões de CR estas apresentaram 20,5 \pm 12,4 de imunomarcações, enquanto o grupo de CD 17,4 \pm 18,0 células, contudo sem diferença significativa entre as lesões ($p= 0,532$). Quanto ao padrão de marcação fraca, os casos de CR apresentaram 47,2 \pm 10,7 de células imunomarcadas, enquanto o grupo de CD 47,0 \pm 14,2 células, desse modo, observou-se imunomarcações semelhante entre as lesões ($p= 0,961$) (Figura 6).

Quando se associa a quantidade total de marcação citoplasmática às características clínicas, tem-se que para o grupo de CR, a localização anterior apresentou maior número de células imunopositivas (74,1 \pm 12,1) para HIF-1 α que a região posterior (62,5 \pm 10,8), com diferença estatística ($p= 0,036$) (Tabela 2). Quando observada a intensidade de marcação citoplasmática forte, o grupo de CD apresentou para faixa etária de até 30 anos menor número de células imunomarcadas por HIF-1 α (11,7 \pm 13,6) quando comparada à faixa etária de indivíduos maiores de 30 anos (34,5 \pm 20,0), demonstrando diferença estatística ($p= 0,010$) (Tabela 3).

Quando observada à imunomarcações citoplasmática forte e a localização mais acometida no grupo de CR, tem-se diferença significativa entre o número de células imunopositivas entre as regiões ($p= 0,005$), a região anterior apresentou maior número de células (28,5 \pm 8,5) quando comparada a posterior (14,0 \pm 11,4). Já quando se observou a imunomarcações citoplasmática forte entre os grupos de CR e CD na região anterior dos maxilares, têm-se que o grupo de CR apresentou maior quantidade células imunomarcadas (28,5 \pm 8,5) que o grupo de CD (14,0 \pm 11,4), com diferença estatística ($p= 0,014$) (Tabela 3).

Para a intensidade de marcação citoplasmática fraca e as características clínicas não foram observados resultados estatisticamente significantes para os grupos de CD ou CR, nem houve diferença comparando as lesões e às características clínicas observadas (Tabela 3). Quanto à presença de marcação nuclear não foram observadas diferenças entre às características clínicas entre os grupos de CD ou CR (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Os cistos odontogênicos representam lesões comuns encontradas nos maxilares, sendo classificados em de desenvolvimento e inflamatório (KRAMER et al., 1992; AVELAR et al., 2009; CANASSA; PAVAN, 2014). Dentre as lesões císticas, tem-se o cisto radicular, representante do grupo de cistos inflamatórios, trata-se da lesão cística odontogênica

encontrada com maior frequência. O cisto dentígero representa a segunda lesão cística mais frequente, sendo o principal representante dos cistos de desenvolvimento (MOSQUEDA-TAYLOR et al., 2002; GROSSMANN et al., 2007; PROCKT et al., 2008., MANOR et al., 2012; JOHNSON et al., 2014). No estudo de Jaeger et al., (2016), no qual foi avaliada a prevalência de cistos e tumores odontogênicos numa amostra da população brasileira, os casos de CR foram encontrados com maior frequência (65.85%), seguido pelos casos de CD com cerca de 27.52%.

No presente estudo, os casos de CR não apresentaram diferença entre os sexos, resultado este em consonância com algumas pesquisas anteriores (JONES et al., 2006; PROCKT et al., 2008; JAMSHIDI et al., 2015), que encontraram resultado semelhante. Em relação à idade, o percentual de 65% observado para indivíduos acima de 30 anos, também foi encontrado nos estudos de JONES et al., 2006; PROCKT et al., 2008 e JAMSHIDI et al., 2015. A maxila foi encontrada em 75% da amostra como a localização mais freqüente, resultado que condiz com estudos epidemiológicos anteriores de JONES et al., 2006; OCHSENIUS et al., 2007; PROCKT et al., 2008. No entanto, esses autores relataram maior frequência pela região anterior, nesta pesquisa não houve diferença significativa entre região anterior ou posterior, em conformidade com estudos de HAPPONEN et al., 1982 e DALEY et al., 1994.

O perfil epidemiológico do grupo de CD encontrado neste estudo não demonstrou diferença entre os sexos acometidos por esta lesão, em conformidade com trabalhos realizados por PROCKT et al., 2008 e JAMSHIDI et al., 2015. No entanto, algumas pesquisas relatam leve predileção pelo sexo masculino (JONES et al., 2006; YEO et al., 2007; ZHANG et al., 2010; SRIDEVI et al., 2015). Indivíduos com idade de até 30 anos foram mais acometidos nesta pesquisa (75%) em conformidade com OCHSENIUS et al., 2007; PROCKT et al., 2008, JAMSHIDI et al., 2015 e SRIDEVI et al., 2015. A região posterior da mandíbula foi o sítio mais frequentemente encontrado neste estudo, resultado semelhante a pesquisas realizadas anteriormente (JONES et al., 2006; OCHSENIUS et al., 2007; PROCKT et al., 2008; SRIDEVI et al., 2015; JAMSHIDI et al., 2015), provavelmente está associado ao grande número de terceiros molares impactados nessa localização anatômica.

Os cistos odontogênicos estudados nesta pesquisa apresentam origem e comportamentos distintos, no entanto todos os casos analisados apresentaram imunomarcagem citoplasmática positiva para a proteína HIF-1 α . BERCHNER-PFANNSCHMIDT et al., (2008) afirmaram que esta proteína é responsável por controlar atividades que visam à adaptação celular diante da diminuição da concentração de oxigênio. Contudo, devida escassez de trabalhos que avaliem a presença de HIF-1 α em cistos odontogênicos, torna-se difícil elucidarmos o real papel desta

molécula nas lesões analisadas no presente estudo. Em tumores de crescimento rápido, HIF-1 α coordena a ação de vários genes que controlam múltiplas funções celulares relacionadas à sobrevivência celular, podendo influenciar o processo de angiogênese, metabolismo energético, apoptose, além de contribuir para invasão e metástase (ECKERT et al., 2012; KUMAR; CHOI, 2015).

Considerando o total de células com imunomarcagem positiva para HIF-1 α , os resultados observados para os casos de CR não apresentaram diferença para os casos de CD. O CR apresenta sua patogênese associada a estímulos inflamatórios ocasionados pela infecção dos canais radiculares e, pesquisas que avaliaram os componentes inflamatórios dessas lesões demonstraram presença variada de citocinas inflamatórias nas camadas epiteliais, tais quais IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α (HONMA et al., 1998; MUGLALI et al., 2008; BERNARDI et al., 2015). Haddad (2002) afirmou que a estabilização de HIF-1 α pode ser induzida também por outros fatores além da hipóxia, através da ação de IL-1 β e TNF α que promovem ativação das espécies reativas ao oxigênio. Desse modo, suscita-se que estas citocinas possam ativar HIF-1 α pela via não hipóxica nos CR. IL-1 β , TNF α e endotoxinas bacterianas são capazes de ativar a via do Nf κ B, reconhecido como o maior regulador da transcrição de citocinas inflamatórias, esta via também é sabidamente responsável pela ativação e expressão de HIF-1 α em células de neoplasias malignas (VAN UDEN et al., 2008; BANDARRA; ROCHA, 2015). Pode-se sugerir que em CR ocorra também ativação de HIF-1 α pela via hipóxica, esta proveniente do recrutamento de células fagocitárias, atividade que requer grande consumo energético. Burke et al, (2002) verificaram que macrófagos são capazes de ativar HIF-1 α quando submetidos à baixas concentrações de oxigênio. Além desse fato, a chegada destas células ao local onde foram recrutadas é acompanhada por um aumento no consumo de oxigênio para realização dos processos de fagocitose, desse modo, podem ser encontradas áreas com baixa concentração de oxigênio (KOMINSKY et al., 2010; BRIGATI et al., 2010). Lopes (2016) encontrou imunomarcagem de GLUT-1 no revestimento epitelial de CR, fato que se soma ao encontrado na presente pesquisa, já que se trata de moléculas interligadas e sabe-se que HIF-1 α é capaz de controlar o mecanismo glicolítico celular, através da atividade desse transportador de glicose.

A via HIF-1 também tem sido associada ao desenvolvimento embrionário normal, onde esta molécula parece ser responsável por desempenhar um papel tardio na diferenciação celular e na regulação dos fatores de crescimento nesta fase do desenvolvimento (SAINI et., 2008). Sánchez-Romero et al, (2016) avaliaram a imunexpressão de HIF-1 α em ameloblastomas, carcinomas ameloblásticos e germes dentários e não encontraram

imunomarcção neste último grupo. Diante da ausência de imunexpressão de HIF-1 α em germes dentários, pode-se suscitar que esta proteína pode ser utilizada para diagnóstico diferencial entre folículos dentários e cistos dentígeros.

Sá et al, (2016) encontraram imunomarcção positiva para TNF α em CD, mesmo na ausência de intenso infiltrado inflamatório, o que pode sugerir uma possível ativação não hipóxica de HIF-1 α por essa citocina. O aumento da concentração de óxido nítrico também se mostrou capaz de promover estabilização de HIF-1 α (DEHNE & BRUNE 2009), fato que estaria em consonância com Swetha et al, (2014) que encontraram intensa imunomarcção de óxido nítrico sintase em amostras de CD. Em condições de baixa concentração de oxigênio, HIF-1 α é capaz de induzir a neoformação vascular através da ativação de VEGF (MASOUD; WEI LI, 2015; HARADA, 2016). Estudos anteriores, como os de MITROU et al., 2009 e KHAJURIA et al., 2016, encontraram imunomarcção aumentada de VEGF em amostras de CD, desse modo, pode-se sugerir uma possível participação conjunta dessas proteínas. A presença de HIF-1 α no revestimento epitelial do grupo de CD foi evidenciada na presente pesquisa e suscita-se que esta proteína pode ser ativada por diferentes vias, relacionadas ou não à hipóxia.

A quantidade de células com imunomarcção citoplasmática, bem como a imunomarcção de intensidade forte em associação às características clínicas, demonstraram que a imunexpressão de HIF-1 α foi maior na região anterior em relação a posterior para o grupo de CR. O fato de que a localização anterior exibiu imunomarcção aumentada nesta pesquisa, pode ser explicado pela tendência dos pacientes de preservar os dentes anteriores por queixas estéticas (OCHSENIUS et al., 2007; PROCKT et al., 2008). Desse modo, tende a ocorrer secreção de citocinas pró-inflamatórias que proporcionam aumento da regulação da proteína HIF-1 α (OLSON; VAN DER VLIET, 2011).

Quando observada a intensidade de imunomarcção citoplasmática forte, o grupo de CD apresentou diferença significativa para esta intensidade de marcação na faixa etária acima de 30 anos. Estudos afirmam que para essa faixa etária, tem-se maior tempo de impacção dentária, com risco aumentado de desenvolvimento de lesões císticas (CHIAPASCO et al., 1995; GUVEN et al., 2000; PATIL et al., 2014). GIROD et al, (1993) relataram que o desenvolvimento de grandes cistos em torno de terceiros molares impactados pode levar cerca de 2-13 anos, sugerindo, que quanto maior o tempo de impacção dentária, maior o risco de desenvolvimento de cistos. Acrescentado a este fato, tem-se a associação dos CD a outras lesões, como odontomas (LIN et al., 2012; MELO et al., 2015).

Nesse estudo, observou-se que para imunomarcção citoplasmática forte, o grupo de CR apresentou diferença significativa comparando-se ao grupo de CD, para lesões localizadas na região anterior. Tal fato pode ser inicialmente explicado pelo comportamento inflamatório dos CR, nos quais se sugere que ocorra ativação da proteína HIF-1 α pelas vias de hipóxia e não hipóxia, como explanado anteriormente (OCHSENIUS et al., 2007; PROCKT et al., 2008; BERNARDI et al., 2015).

Quando a imunoexpressão de HIF-1 α ocorreu apenas na região citoplasmática, sugere-se que esta proteína encontra-se inativa, já que para constituição da molécula de HIF-1, é necessária a estabilização da subunidade de HIF1 α na região citoplasmática e, em seguida, sua ligação com HIF1 β no núcleo celular. Desse modo, a molécula do HIF-1 passa então a controlar os processos que contribuem para sobrevivência celular. (HIROTA; SEMENZA, 2005; PEREIRA et al., 2013).

Alguns casos de CR do presente estudo exibiam imunoexpressão de HIF-1 α em toda a extensão epitelial, no entanto destacou-se maior intensidade de marcação nas camadas supra-basais. Essa característica pode estar associada com a maior proliferação celular na camada basal, alguns estudos indicam intensa imunomarcção por Ki-67 nessa região (MARTINS et al. 2010; MOURÃO et al. 2015). Esses achados em conjunto sugerem que esta atividade proliferativa ocorra em concentrações normais de oxigênio, nessas condições HIF1- α não se encontra estável na região citoplasmática. .

Nesta pesquisa, verificou-se que HIF1- α encontra-se presente nos revestimentos epiteliais tanto dos CR, como dos CD. O papel do HIF-1 em processos neoplásicos tem sido esclarecido, de modo que esta proteína participa de mecanismos que contribuem com o crescimento dessas lesões (HARADA, 2016; COSTA et al., 2016). Entretanto, diante da escassez de estudos que avaliem a participação dessa molécula na patogênese e nos mecanismos envolvidos no crescimento de cistos e tumores odontogênicos, sugere-se a realização de mais estudos.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que HIF1- α está presente nos constituintes epiteliais de CR e CD, não havendo diferença estatística para a imunomarcção entre estes. Pode-se sugerir que o aspecto de crescimento lento característico dessas lesões, que difere das neoplasias, nas quais HIF1- α contribui para este fenômeno. Novos estudos são necessários para melhor elucidar o papel desenvolvido pelo HIF-1 α nos cistos odontogênicos.

COLABORADORES

Thamara Manoela Marinho Bezerra, Filipe Nobre Chaves, Paulo Goberlânio Barros Silva e Alceu Machado de Sousa participaram no suporte técnico nas fases laboratoriais da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Pró-Ensino na Saúde, por meio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro do projeto.

REFERÊNCIAS

Avelar RL, Antunes AA, Carvalho RW, Bezerra PG, et al. Odontogenic cysts: a clinicopathological study of 507 cases. *J Oral Sci.* 2009;51:581-586.

Shear M, Speight P. Cistos da região bucomaxilofacial. 4.ed. São Paulo: Santos; 2011.

Canassa BC, Pavan, AJ. Inflammatory odontogenic cysts: a brief literature review. *J. Surg. Clin. Dent.* 2014;2:20-28.

Benn A, Altini M. Dentigerous cysts of inflammatory origin. A clinicopathologic study. *Oral Surg Oral. Med Oral Pathol Oral Radiol.* 1996;81:203–209.

Narang RS, Manchanda AS, Arora P, Randhawa M. Dentigerous cyst of inflammatory origin - a diagnostic dilemma. *Ann Diagn Pathol.* 2012;16:119-123.

Johnson NR, Gannon OM, Savage NWS, Batstone MD. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *J Investig Clin Dent.* 2014;5:9-14.

Bernardi L, Visioli F, Bpharm CN, Rados PV. Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. *J Endod.* 2015;4:1951-1961.

Masoud G, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for câncer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5:378–389.

Kominsky DJ, Campbell EL, Colgan SP. Metabolic shifts and immunity and inflammation. *J. Immunol.* 2010;184:4062-4068.

Brigati C, Banelli B, Di Vinci A, et al. Inflammation, HIF-1, and the epigenetics that follows. *Mediators Inflamm.* 2010;1:1-5.

Lopes MCMS. Avaliação da imunoexpressão do transportador de glicose -1 em cistos radiculares e dentígeros. Fortaleza. Dissertação [Mestrado em Odontologia] – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza; 2016.

Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. WHO histological typing of odontogenic tumours. 2nd ed. Geneva: Springer-Verlag; 1992

- Mosqueda-Taylor A, Irigoyen-Camacho ME, Diaz-Franco MA, Torres-Tejero, MA. Odontogenic cysts. Analysis of 856 cases. *Med oral*. 2002;7: 89-96.
- Grossmann SM, Machado VC, Xavier GM, Moura MD, Gomez RS, Aguiar MC. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in a Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104:35–41.
- Prockt AP, Schebela CR, Maito FD, Sant’Ana-Filho M, Rados PV. Odontogenic cysts: analysis of 680 cases in Brazil. *Head Neck Pathol*. 2008;2:150–156, Diaz-Franco MA, Torres-Tejero MA. Odontogenic cysts Analysis of 856 cases. *Med Oral*. 2002;7:89
- Manor E, Kachko L, Puterman MB, Szabo G, Bodner L.. Cystic lesions of the jaws - a clinicopathological study of 322 cases and review of the literature. *Int J Med Sci* 2012;9:20-26
- Johnson NR, Gannon OM, Savage NW, Batstone MD. Frequency of odontogenic cysts and tumors: A systematic review. *J Investig Clin Dent*. 2014;5:9-14.
- Jaeger F, Noronha MS, Silva MLVS, et al. Prevalence profile of odontogenic cysts and tumors on Brazilian sample after the reclassification of odontogenic keratocyst. *J Craniomaxillofac Surg* 2017;45: 267-270.
- Jones AV, Craig GT, Franklin CD. Range and demographics of odontogenic cysts diagnosed in UK population over 30-year period. *J Oral Pathol Med*. 2006;35:500-7.
- Jamshidi S, Shojaei S, Roshanaej G, Modabbernia S, Bakhtiary E. Jaw Intraosseous Lesions Biopsied Extracted From 1998 to 2010 in an Iranian Population. *Iran Red Crescent Med J*. 2015; 17: 20374-20382.
- Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Peñafiel C, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: A study of 362 cases. *J Oral Pathol Med*. 2002;31:415-20.
- Happonen R-P, Ylipaavalniemi P, Calonius B: A survey of 15,758 oral biopsies in Finland. *Proc Finn Dent Soc*. 1982;78:201–206.
- Daley, TD, Wysocki, GP, Pringle GA. Relative incidence of odontogenic tumors and oral and jaw cysts in a Canadian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; 77: 276-280.
- Yeo JF, Rosnah BZ, Ti LS, Zhao YY, Ngeow WC. Clinicopathological study of dentigerous cysts in Singapore and Malaysia. *Malays J Pathol*. 29: 41-47.
- Zhang LL, Yang R, Zhang L, Li W, MacDonald-Jankowski C. F. Dentigerous cyst: a retrospective clinicopathological analysis of 2082 dentigerous cysts in British Columbia, Canada. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2010; 39: 878-882.
- Sridevi K, Kaushik A, Ramaswamy P, Manjula M, Vinod VC, Aravinda K. Dentigerous cysts of maxillofacial region-clinical, radiographic and biochemical analysis. *Kathmandu Univ Med J*. 2015;1:20-3.
- Berchner–Pfannschmidt U, Frede S, Wotzlaw C, Fandrey, J. Imaging of the hypoxia inducible factor pathways: insights into the oxygen sensing. *Eur Respir J*. 2008;32:201-207.
- Eckert A.W.; Kappler, M.; Schubert, J.; Taubert, H.; Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 16:189-196.

Kumar H, Choi D.K. Hypoxia Inducible Factor Pathway and physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators of Inflammation*. 2015

HADDAD, J.J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res* 2001;26.

Van-Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochem J*. 2008;412: 477-484.

Bandarra D, Rocha S. HIF-1 α a novel piece in the NF- κ B puzzle. *Inflamm Cell*. 2015;8: 169-81.

Burke B, Tang N, Corke KP, Tazzyman D, Ameri K, Wells M, Lewis CE. Expression of HIF-1 α by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J Pathol*. 2002;196:204-212.

Saini Y, Harkema JR, LaPres JJ. HIF1 α is essential for normal intrauterine differentiation of alveolar epithelium and surfactant production in the newborn lung of mice. *J Biol Chem*. 2008;283:33650-33657.

Sánchez-Romero C, Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Paes de Almeida O. Immunohistochemical Expression of GLUT-1 and HIF-1 α in Tooth Germ, Ameloblastoma, and Ameloblastic Carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2016; 24:410-8.

Sá MC, de Matos FR, Conceição TS, H Leitão AC, Freitas RA. Immunoeexpression of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α and interleukin-10 on odontogenic cysts and tumours. *Int Endod J*. 2016

DEHNE, N.; BRÜNE, B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Experimental Cell Res*. 2009;315:1791-1797.

Swetha P, Ramesh KSV, Madhavan N, Veeravarmal, Sameera ASS. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in the Epithelial Linings of Odontogenic Keratocyst, Dentigerous Cyst and Radicular Cyst: A Pathological Insight. *Ann Med Health Sci Res*. 2014; 4: 583-589.

Harada H. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *Journal of Radiation Research Advance*. 2016;1:1-7.

G.K. Mitrou, K.I. Tosios, A. Kyroudi, A. Sklavounou Odontogenic keratocyst expresses vascular endothelial growth factor: an immunohistochemical study *J Oral Pathol M*.2009;38:470-475

Nidhi Khajuria, Rashmi Metgud, Smitha Naik, Sahul Lerra, Priya Tiwari, Payal Katakwar, Anirudh Tak. Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Keratocystic Odontogenic Tumor, Dentigerous Cyst, and Radicular Cyst: A Comparative Study. *J Dent*. 2016; 7:17-22.

Olson N, Van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide*. 2011 ;25:125-37.

Chiapasco M, Crescentini M, Romanoni G. Germectomy or delayed removal of mandibular impacted third molars: the relationship between age and incidence of complications. *J Oral Maxillofac Surg* 1995;53:418-422

Güven O., Keskin A., Akal U.K. The incidence of cysts and tumors around impacted third molars. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2000;29:131-135

Patil S, Halgatti V , Khandelwal S, Santosh BS, Maheshwari S. Retained and Unerupted Third Molars in the Indian Population. *J Oral Biol Craniofac.* 2014;2: 82-87.

Girod SC, Gerlach KL, Krueger G. Cysts associated with long-standing impacted third molars. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1993;22:110-112.

Lin S, Wan S, Sun L, Hu J, Fang D, Zhao R, Yuan S, Zhang L. Chemokine C-C motif receptor 5 and C-C motif ligand 5 promote cancer cell migration under hypoxia. *Cancer Sci.* 2012;103:904–912.

Melo RB, Damasceno, YES, Cunha JCACA, Pontes, IV. Compound odontoma associated with dentigerous cyst in the anterior mandible – case report. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia.* 2015;12:1-4.

Hirota K, Semenza GL. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commu* 2005;6: 610-613.

PEREIRA et al., 2013

Pereira KMA, Chaves FN, Viana TSA *et al.* (2013) Oxygen metabolism in oral cancer: HIF and GLUTs (Review). *Oncology letters.* 2013; 6:311-316.

Mourão RVC, Júnior ECP, Barros PGS, Turatti E, Mota MRL, Alves APN (2015) Study of the relationship between mononuclear inflammatory infiltrate and Ki-67 and basement 36 membrane and extracellular matrix protein expression in radicular cysts. *Int End J.* Epub <http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.12472> [accessed on 23 December 2016]

Da Costa NM , Fialho AD , Proietti CC, et al. Role of hypoxia-related proteins in invasion of ameloblastoma cells: crosstalk between NOTCH1, hypoxia-inducible factor 1 α , a disintegrin and metalloproteinase 12, and heparin-binding epidermal growth factor. *Hist.* 2016; 69:99-106.

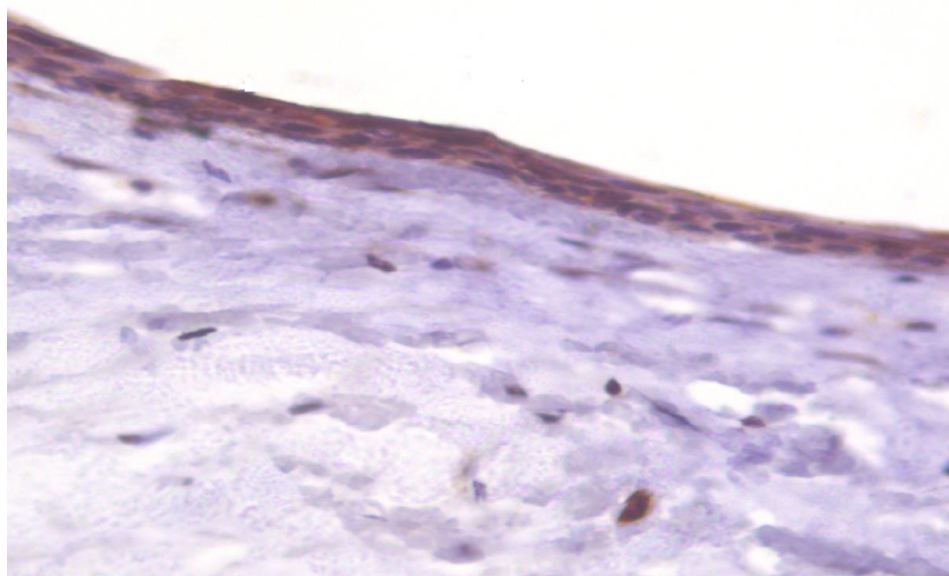
FIGURAS

Figura 4: Fotomicrografia exibindo imunexpressão citoplasmática forte de HIF-1 α ao longo do revestimento epitelial de CD (LSAB, 400x).

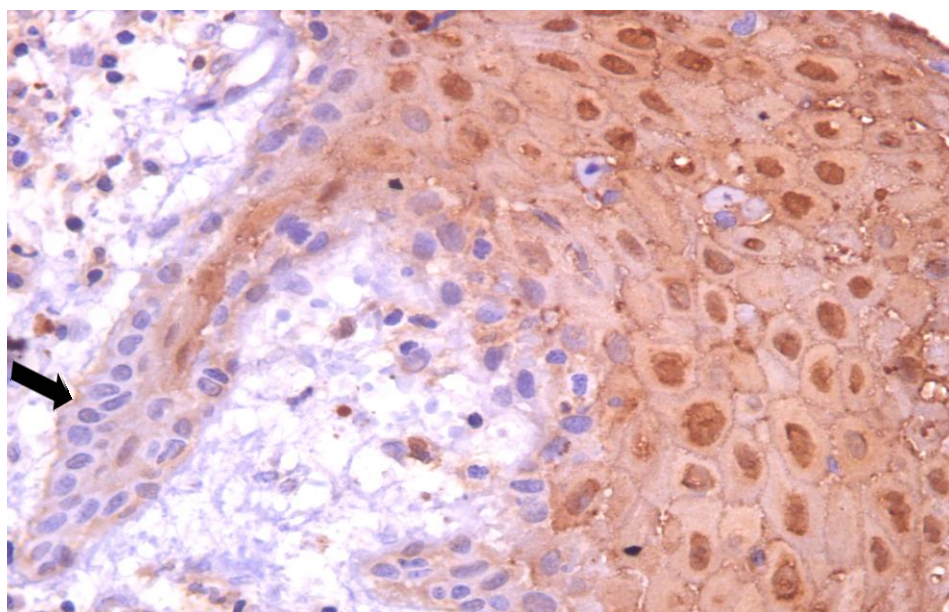


Figura 5: Fotomicrografia exibindo imunexpressão citoplasmática e nuclear de HIF-1 α no revestimento epitelial de CR. Observa-se na região de camada basal ausência de imunomarcagem em relação às demais camadas epiteliais (LSAB, 400x).

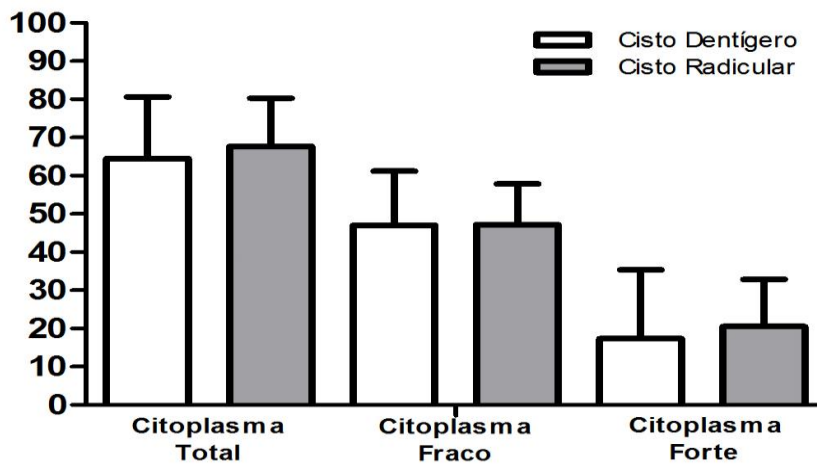


Figura 6: Quantidade total de Células Epiteliais imunomarcadas por HIF-1 α na região citoplasmática: imunomarcção positiva em 67,7 \pm 12,6 dos CR e em 64,5 \pm 16,1 dos CD (p=0,480). Quantidade de células com intensidade de marcação citoplasmática forte: imunomarcção positiva em 20,5 \pm 12,4 dos CR e em 17,4 \pm 18,0 dos CD (p=0,532). Quantidade de células com intensidade de marcação citoplasmática fraca: imunomarcção positiva em 47,0 \pm 14,2 dos CR e em 47,0 \pm 14,2 dos CD (p=0,961)

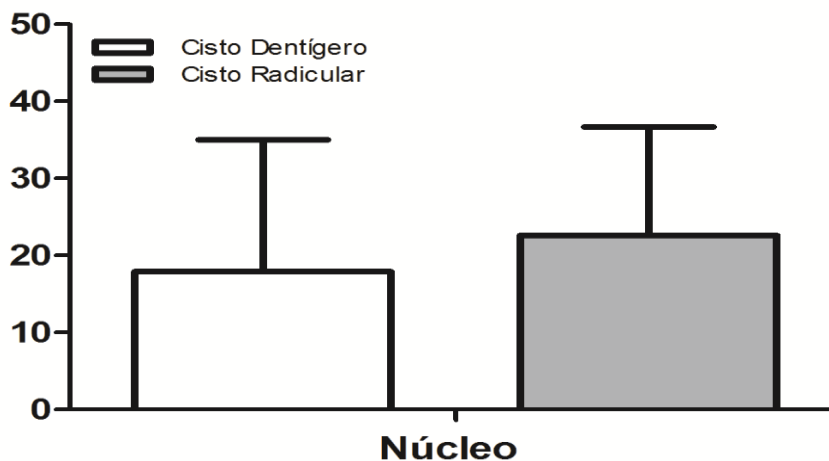


Figura 7: Quantidade total de Células Epiteliais imunomarcadas por HIF-1 α na região nuclear: imunomarcção positiva em 22,6 \pm 14,1 dos CR e em 17,9 \pm 17,1 dos CD (p=0,354).

TABELAS

Tabela 1: Perfil epidemiológico da amostra

| | Características Clínicas | | | p-Valor ^a | p-Valor ^b |
|--------------------|--------------------------|-----------------|----------|----------------------|----------------------|
| | Cisto Dentígero | Cisto Radicular | Total | | |
| Total | 20 | 20 | 40 | - | - |
| Sexo | | | | | |
| Feminino | 10 (50%) | 10 (50%) | 20 (50%) | 1,000 | 0,808 |
| Masculino | 10 (50%) | 10 (50%) | 20 (50%) | | |
| Idade | | | | | |
| Até 30 anos | 15 (75%)* | 7 (35%) | 22 (55%) | 0,025 | 0,009 |
| > 30 anos | 5 (25%) | 13 (65%)* | 18 (45%) | | |
| Maxilar | | | | | |
| Maxila | 7 (35%) | 15 (75%)* | 22 (55%) | 0,025 | 0,008 |
| Mandíbula | 13 (65%)* | 5 (25%) | 18 (45%) | | |
| Localizacao | | | | | |
| Anterior | 8 (40%) | 9 (45%) | 17 (42%) | 1,000 | 0,192 |
| Posterior | 12 (60%) | 11 (55%) | 23 (58%) | | |

^ap<0.05, Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson;

^bp<0.05, Regressão Logística Multinomial;

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia (UFC).

Tabela 2: Quantidade de células epiteliais totais imunomarcadas por HIF-1 α em Cistos Radiculares e Dentígeros

| | Células epiteliais positivas para HIF-1 α | | p-Valor |
|--------------------|---|--------------------|---------|
| | Cisto Dentígero | Cisto Radicular | |
| Total | 64,5 \pm 16,1 | 67,7 \pm 12,6 | 0,480 |
| Sexo | | | |
| Feminino | 64,3 \pm 11,2 | 66,3 \pm 10,9 | 0,691 |
| Masculino | 64,6 \pm 20,5 | 69,2 \pm 14,6 | 0,576 |
| p-Valor | 0,693 | 0,622 | |
| Idade | | | |
| Até 30 anos | 61,7 \pm 15,7 | 67,3 \pm 9,9 | 0,400 |
| > 30 anos | 72,8 \pm 15,9 | 68,0 \pm 14,3 | 0,542 |
| p-Valor | 0,188 | 0,909 | |
| Maxilar | | | |
| Maxila | 66,2 \pm 13,9 | 68,2 \pm 13,8 | 0,764 |
| Mandíbula | 63,5 \pm 17,6 | 66,4 \pm 9,2 | 0,736 |
| p-Valor | 0,938 | 0,672 | |
| Localizacao | | | |
| Anterior | 65,5 \pm 14,6 | 74,1 \pm 12,1 | 0,205 |
| Posterior | 63,7 \pm 17,6 | 62,5 \pm 10,8 | 0,840 |
| p-Valor | 0,813 | *0,036 | |

p<0.05, Teste t de Student; Dados expressos em forma de média e desvio-padrão.
Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia (UFC).

Tabela 3: Quantidade de células epiteliais com imunomarcção citoplasmática para HIF1 α em Cistos Radiculares e Dentígeros segundo a intensidade.

| | Intensidade de marcação citoplasmática para HIF-1α | | | | | |
|--------------------|---|------------------------|----------------|-------------------------|------------------------|----------------|
| | Citoplasma fraco | | | Citoplasma forte | | |
| | Cisto Dentígero | Cisto Radicular | p-Valor | Cisto Dentígero | Cisto Radicular | p-Valor |
| Total | 47,0 \pm 14,2 | 47,2 \pm 10,7 | 0,961 | 17,4 \pm 18,0 | 20,5 \pm 12,4 | 0,532 |
| Sexo | | | | | | |
| Feminino | 46,0 \pm 15,7 | 46,0 \pm 9,2 | 0,993 | 18,3 \pm 19,5 | 20,3 \pm 11,0 | 0,787 |
| Masculino | 48,1 \pm 13,2 | 48,4 \pm 12,3 | 0,953 | 16,6 \pm 17,3 | 20,8 \pm 14,3 | 0,559 |
| p-Valor | 0,750 | 0,630 | | 0,834 | 0,928 | |
| Idade | | | | | | |
| Até 30 anos | 49,9 \pm 14,0 | 45,7 \pm 12,0 | 0,505 | 11,7 \pm 13,6 | 21,5 \pm 15,1 | 0,147 |
| > 30 anos | 38,3 \pm 11,8 | 48,0 \pm 10,4 | 0,106 | 34,5 \pm 20,0 | 20,0 \pm 11,3 | 0,067 |
| p-Valor | 0,114 | 0,666 | | *0,010 | 0,801 | |
| Maxilar | | | | | | |
| Maxila | 53,2 \pm 13,1 | 46,9 \pm 11,6 | 0,263 | 13,0 \pm 11,7 | 21,3 \pm 12,5 | 0,154 |
| Mandíbula | 43,7 \pm 14,0 | 48,3 \pm 8,2 | 0,506 | 19,8 \pm 20,6 | 18,1 \pm 13,2 | 0,840 |
| p-Valor | 0,211 | 0,933 | | 0,877 | 0,866 | |
| Localizacao | | | | | | |
| Anterior | 53,6 \pm 14,1 | 45,6 \pm 12,1 | 0,231 | 11,9 \pm 13,9 | 28,5 \pm 8,5 | *0,014 |
| Posterior | 42,6 \pm 13,0 | 48,5 \pm 9,8 | 0,239 | 21,1 \pm 20,0 | 14,0 \pm 11,4 | 0,304 |
| p-Valor | 0,091 | 0,569 | | 0,243 | *0,005 | |

p<0.05, Teste t de Student; Dados expressos em forma de média e desvio-padrão.

Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia (UFC).

Tabela 4: Quantidade de células epiteliais com imunomarcção nuclear por HIF-1 α em Cistos Radiculares e Dentígeros

| | Células epiteliais com marcação nuclear positiva para HIF-1α | | |
|--------------------|---|------------------------|----------------|
| | Cisto Dentígero | Cisto Radicular | p-Valor |
| Total | 17,9 \pm 17,1 | 22,6 \pm 14,1 | 0,354 |
| Sexo | | | |
| Feminino | 23,4 \pm 16,9 | 27,3 \pm 16,2 | 0,610 |
| Masculino | 12,4 \pm 16,3 | 17,9 \pm 10,3 | 0,384 |
| p-Valor | 0,156 | 0,140 | |
| Idade | | | |
| Até 30 anos | 16,2 \pm 17,8 | 23,9 \pm 16,0 | 0,343 |
| > 30 anos | 23,1 \pm 15,5 | 21,9 \pm 13,6 | 0,873 |
| p-Valor | 0,453 | 0,768 | |
| Maxilar | | | |
| Maxila | 18,1 \pm 15,0 | 24,9 \pm 15,4 | 0,344 |
| Mandíbula | 17,8 \pm 18,7 | 15,7 \pm 5,9 | 0,807 |
| p-Valor | 0,817 | 0,306 | |
| Localizacao | | | |
| Anterior | 12,5 \pm 16,0 | 26,8 \pm 14,5 | 0,072 |
| Posterior | 21,5 \pm 17,5 | 19,1 \pm 13,4 | 0,718 |
| p-Valor | 0,259 | 0,236 | |

p<0.05, Teste t de Student; Dados expressos em forma de média e desvio-padrão.
Fonte: Programa de Pós Graduação em Odontologia (UFC).

4 CONCLUSÃO GERAL

A análise dos resultados dessa pesquisa mostrou que HIF-1 α está presente no epitélio de revestimento tanto do CD, quanto do CR, pois foi observado imunomarcção em todos os casos da amostra. Não foi observada diferença estatística para o total de células que apresentaram imunomarcção citoplasmática ou nuclear entre as lesões. Quando se observou a intensidade de imunomarcção citoplasmática forte e as características clínicas, foi observado que o grupo de CD apresentou para faixa etária de até 30 anos menor número de células imunomarcadas por HIF-1 α ($11,7\pm 13,6$) quando comparada à faixa etária de indivíduos maiores de 30 anos ($34,5\pm 20,0$), demonstrando diferença estatística ($p= 0,010$). Quando observada a intensidade de imunomarcção citoplasmática forte entre os grupos de CR e CD na região anterior dos maxilares, verificou-se que o grupo de CR apresentou maior quantidade de células imunomarcadas ($28,5\pm 8,5$) que o grupo de CD ($14,0\pm 11,4$), com diferença estatística ($p= 0,014$). Para as demais características clínicas estudadas em associação com a presença de imunomarcção, não houve diferença estatisticamente significativa. Sugere-se a realização de novos estudos para melhor elucidar o papel desenvolvido pelo HIF-1 α nos cistos odontogênicos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.L.D.L.; NONAKA, C.F.W.; GORDON-NUNEZ, A.M.; FREITAS, R.A.; GALVAO, H.C. Immunoexpression of Interleukin 17, Transforming Growth Factor β 1, and Forkhead Box P3 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts. *Journal of Endodontics*. v. 39, n.8, p. 990-994, 2013.

ARJONA-AMO, M.; SERRERA-FIGALLO, M.A.; HERNÁNDEZ-GUISADO, J.M.; PEREZ, J.L.; TORRES-LAGARES, D. Conservative management of dentigerous cysts in children. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, v. 7, n.5, p. 71-74, 2015.

AVELAR, R.L.; ANTUNES A.A.; CARVALHO R.W.; BEZERRA P.G, OLIVEIRA NETO, P.J.; ANDRADE E.S. Odontogenic cysts: a clinicopathological study of 507 cases. *Journal of Oral Science*, v. 51, p. 581-586, 2009.

BANDARRA, D.; ROCHA, S. HIF-1 α a novel piece in the NF- κ B puzzle. *Inflammation & Cell Signaling*, v.8, n.2, p. 169-81, 2015.

BENN, A.; ALTINI, M. Dentigerous cysts of inflammatory origin. A clinicopathologic study, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 81, n.2, p. 203–209, 1996.

BERCHNER-PFANNNSCHMIDT, U.; FREDE, S.; WOTZLAW, C.; FANDREY, J. Imaging of the hypoxia inducible factor pathways: insights into the oxygen sensing. *European Respiratory Journal*, v.32, n.1, p.201-207, 2008.

BERNARDI, L.; VISIOLI, F.; BPHARM, C.N.; RADOS, P.V. Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. *Journal of Endodontics*, v.4, n.12, p. 1951-1961, 2015.

BOYCZUK, M.P.; BERGER, J.R. Identifying a deciduous dentigerous cyst. *The Journal of the American Dental Association*, v.126, n.5, p.643-644, 1995.

BRANDT FILHO, S. H. O.; MARZOLA, C.; TOLEDO FILHO, J. L.; CAVALIERI-PEREIRA, L.; PASTORI, C. M.; ZORZETTO, D. L. G.; CAPELARI, M. M. ; TOLEDO, G. L. Decompression technique to surgical treatment of the oral cavity cysts. *Revista de Odontologia (São Paulo. Online)*, v.8, n.1, p. 525-537, 2010.

BRIGATI, C.; BANELLI, B.; DI VINCI, A.; CASCIANO, I. ALLEMANNI, G.; FORLANI, A.; BORZI, L.; ROMANI, M. Inflammation, HIF-1, and the epigenetics that follows. *Mediators of Inflammation*, v.1, p.1-5, 2010.

BUCHHOLZ, B. P2Y2R is a direct target of HIF-1 α and mediates secretion-dependent cyst growth of renal cyst-forming epithelial cells. *Purinergic Signal*, Aug 26, 2016.

BUCHHOLZ, B.; FARIA, D.; SCHLEY G., et al., Anoctamin 1 induces calcium-activated chloride secretion and proliferation of renal cyst-forming epithelial cells. *Kidney International*, v.85, p.1058-1067, 2014.

CANASSA, B.C.; PAVAN, A.J. Inflammatory odontogenic cysts: a brief literature review. *Journal of Surgical and Clinical Dentistry*, v.2, n.1, p.20-28, 2014.

CARRILLO, C.; PENARROCHA, M.; ORTEGA, B.; MARTI, E.; BAGAN, J.V.; VERA, F. Correlation of radiographic size and the presence of radiopaque lamina with histological findings in 70 periapical lesions. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* v.66, n.8, p.1600-1605, 2008.

CAVALCANTI, M.G.P.; VELTRINI, V.C.; RUPRECHT, A.; VINCENT, S.D.; ROBINSON, R.A. Squamous-cell carcinoma arising from an odontogenic cyst -The importance of computed tomography in the diagnosis of malignancy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. v. 100, n.3, p.365-368, 2005.

CEDIN, A. C.; PAULA JUNIOR, F.A.; LANDIM, R.E.; SILVA, F.L.P.; OLIVEIRA, L.F.; SOTTER, A.C. Endoscopic treatment of odontogenic cyst with intra-sinusal extension. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v.71, n.3, p.392-395, 2005.

CHAI SUPARAT, R.; COLETTI, D.; KOLOKYTHAS, A.; ORD, R.A.; NIKITAKIS, N.G. Primary intraosseous odontogenic carcinoma arising in an odontogenic cyst or de novo: a clinicopathologic study of six new cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. v. 101, n.2, p. 194-200, 2006.

CHIAPASCO, M. *Cirurgia Oral Atlas Colorado*. Ed.Santos, 2006.

CHOI, K. K.; KIM, J.M.; YUN, P.Y.; LEE, H.J.; MOON, H.S.; LEE, T.R.; MYOUNG, H. Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. *Oral Oncology*, v. 42, n. 2, p. 208-217, 2006.

COIMBRA, I.B.; JIMENEZ, S.A.; HAWKINS, D.F.; PIERA-VELAZQUEZ, S.; STOKES, D.G. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.12, n. 4, p. 336-345, 2004.

COLIC, M.; GAZIVODA, D.; VUCEVIC, D.; VASILJI, S.; RUDOLF, R.; LUKI, A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular Immunology*, v.47, n.1, p. 101-113, 2009.

COLBERT, S.; BRENNAN, P.A.; THEAKER, J. EVANS, B. Squamous cell carcinoma arising in dentigerous cysts, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, v. 40, p. 355-357, 2012.

COSTA, N.M.M.; FIALHO, A.D.V.; PROIETTI, C.C. Role of hypoxia-related proteins in invasion of ameloblastoma cells: crosstalk between NOTCH1, hypoxia-inducible factor 1a, a disintegrin and metalloproteinase 12, and heparin-binding epidermal growth factor. *Histopathology*, v. 69, p. 99-106, 2016.

DALEY, T.D.; WYSOCKI, G.P.; PRINGLE G.A. Relative incidence of odontogenic tumors and oral jaw cysts in a Canadian population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v.77, n.3, p. 276-280, 1994.

DEBONI, M. C. Z.; BROZOSKI, M. A.; TRAINA, A. A.; ACAY, R. R.; NACLÉRIO-HOMEM, M. G. Surgical management of dentigerous cyst and keratocystic odontogenic tumor in children: a conservative approach and 7-year follow-up. *Journal of Applied Oral Science*, v. 20, n. 2, p. 268-271, 2012.

DEHNE, N.; BRÜNE, B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Experimental Cell Research*, v. 315, n.11, p.1791-1797, 2009.

- DENKO, N.C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*, v.8, n.1, p.705–713, 2008.
- DOS SANTOS, J.N.; RAMOS, E.A.; GURGEL, C.A.; BARROS, A.C.; DE FREITAS, A.C.; CRUSOÉ-REBELLO, I.M. Russell body apical periodontitis: an unusual case report. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v.106, p. 903-908, 2008.
- ECKERT A.W.; LAUTNER, M.H.; SCHÜTZE, A.; TAUBERT, H.; SCHUBERT, J.; BILKENROTH, U. Coexpression of hypoxia-inducible factor-1 α and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology*, v.58, p.1136–1147, 2011.
- ECKERT A.W.; KAPPLER, M.; SCHUBERT, J.; TAUBERT, H.; Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral & Maxillofacial Surgery*, v. 16, n.1,p.189–196, 2012.
- FREITAS, A.; SOUZA,J.E.; FARIA,I. *Radiologia odontológica*. 6ed. São Paulo: Artes Médicas, 2004.
- FUKADA, S.Y.; SILVA, T.A.; GARLET, G.P.; ROSA, A.L.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory diseases. *Oral Microbiology Immunology*, v.24, n.1, p.25-31, 2009.
- GAO, Z.; FLAITSZ, C.M.; MACKENZIE, I.C. Expression of keratinocyte growth factor in periapical lesions. *Journal of Dental Research*, v. 75 p.1658-1663, 1996.
- GARGI, S.S; SACHIN C.S.; JAGDISH V.T.; REVATI, D.; SHANKARGOUDA, P. Pathogenesis of Rushton bodies: A novel hypothesis. *Medical Hypotheses*, v. 93, p. 166–169, 2016.
- GODOY, G. P. Expressão imuno-histoquímica das integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ em folículos pericoronários espessados e cistos dentígeros incipientes. 2005. 109 f. Tese (Doutorado em Patologia Oral) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- GODOY, G. P.; PINTO, L.P.; SOUZA, BATISTA, L.; TERRA, R.G. Cisto dentígero: relato de um caso de possível etiologia inflamatória. *Revista Brasileira de Odontologia*. Rio de Janeiro, v.62, n.1,2, p.44-46, 2005.
- GRIMM, M.; CETINDIS, M.;LEHMANN, M.;BIEGNER, T.;MUNZ, A.; TERIETE, P.;KRAUT, W.;REINERT S. Association of cancer metabolism-related proteins with oral carcinogenesis - indications for chemoprevention and metabolic sensitizing of oral squamous cell carcinoma? *Journal of Translational Medicine*, v.12, n.6, p. 165-169, 2014.
- HADDAD, J.J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respiratory Research*, v.26, n.3, epub, 2002.
- HASCHEMI, A.; KOSMA, P.; GILLE, L.; EVANS, C. R.; BURANT, C. F.; STARKL, P.; KNAPP B.; HAAS, R.; SCHMID, J. A.; JANDL, C.; AMIR, S.; LUBEC, G.; PARK, J.; ESTERBAUER, H.; BILBAN, M.; BRIZUELA, L.; POSPISILIK, J. A.; OTTERBEIN, L. E.; WAGNER O. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metabolism*, v. 15, p. 813– 826, 2012.

HARADA, Hiroshi. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *Journal of Radiation Research Advance*, p.1-7, 2016.

HENRY-NETO, M.D.E.; ZANETTA, B.D.; SILVA, C.J.; PARREIRA, S.M.C. Marsupialização e enucleação de cisto radicular apical. *Revista Instituto de Pesquisa, Extensão e Ensino Odontológico*, v.1, n.1, p.1- 64, 2007.

HIROTA, K.; SEMENZA, G.L. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.6, p. 610-610, 2005.

HREN, N.; IHAN, A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. *Archives of Oral Biology*, v. 54, n.2, p. 156-161, 2009.

JAAKKOLA, P.; MOLE D.R.; TIAN, Y.M; WILSON, M.I.; GIELBERT, J.; GASKELL, S.J.; VON KRIEGSHEIM, A.; HEBESTREIT, H.F.; MUKHERRJI, M.; SCHOFIELD, C.J.; MAXWELL, P.H.; PUGH, C.W.; RATCLIFFE, P.J. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex By O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. v.292, p. 468-472, 2002.

JEWELL, U.; KVIETIKOVA, I.; SCHEID, A.; BAUER, C.; WENGER, R.H.; GASSMANN, M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *Archives of Oral Biology*, v. 7, p.1312-4, 2001.

JOHNSON, N.R.; GANNON, O.M.; SAVAGE, N.W.S.; BATSTONE, M.D. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry, Queensland*, v.5, n.1, p.9-14, 2014.

KHOT, K.; DESHMUKH, S.C.; ALEX, S. Comparative analysis of the immunohistological expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases-9 in keratocystic odontogenic tumors, dentigerous cysts, and radicular cysts. *Journal Cancer Research Ther*, v.11, 2015.

KNOWLES, H.J. Hypoxic regulation of osteoclast differentiation and bone resorption activity. *Dove Medical Press Limited*, v. 3. p. 73-82, 2015.

KOMINSKY, D.J.; CAMPBELL, E.L.; COLGAN, S.P. Metabolic shifts and immunity and inflammation. *The Journal of Immunology*, v. 184. p. 4062-4068, 2010.

KOVACS, K.M.; LYDERSEN, C.; OVERLAND, J.E.; MOORE, S.E. Impacts of changing sea-ice conditions on Arctic marine mammals. *Marine Biodiversity*, v.41, p.181-194, 2011.
KRAUS, A; GRAMPP, S.; STRUEBE, M.G.; SCHREIBER, R.; KUNZELMANN, K.; DORIEN J.M.; PETERS, J. L.; SCHLEY, G.; SCHÖDEL, J.; ECKARDT, K U.;

KRAMER, I.R.H.; PINDBORG, J.J.; SHEAR, M. Histological typing of odontogenic tumours. Berlin: Springer Science & Business Media, 122p, 1992.

KUMAR, H.; CHOI, D.K. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? Hindawi Publishing Corporation - Mediators of Inflammation.v. 2015.

- KUMAR, V; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C.; FAUSTO, N. Robbins Patologia Básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2013.
- LERNER, U.H. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and acute phase reactions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 78, p. 481-493, 1994.
- LIN, P.Y.; YU, C.H.; WANG, J.T.; CHEN, H.H.; CHENG, S.J.; KUO, M.Y.; CHIANG, C.P. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 37, p. 18-25, 2008.
- LIN, L. M., HUANG, G. T-J., ROSENBERG, P. A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *Journal of Endodontics*, v. 33, p. 33-41, 2007.
- LIN, H.P.; WANG, Y.P.; CHEN, H.M.; CHENG, S.J.; SUN, A.; CHIANG, C.P. A clinicopathologic study of 338 dentigerous cysts. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v.42, p. 462-467, 2013.
- LOPES, HP.; SIQUEIRA, JF. *Endodontia Biologia e Técnica*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
- LOPES, M.C.M.S. Avaliação da imunexpressão do transportador de glicose -1 em cistos radiculares e dentígeros. 2016. 71f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- MASOUD, G.; LI, W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v.5, p.378–389, 2015.
- MELO, R.B.; DAMASCENO, Y.E.S.; CUNHA JUNIOR, C.A.C.A.; PONTES, I.V. Compound odontoma associated with dentigerous cyst in the anterior mandible – case report. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, v.12, n.1, 2015.
- MORAES, M.; LUCENA, H.F.; AZEVEDO, P.R.; QUEIROZ, L.M.G.; COSTA, A.L.L. Comparative immunohistochemical expression of RANK, RANK and OPG in radicular and dentigerous cysts. *Archives of Oral Biology*, n.56, p.1256-63, 2011.
- MORAES, M.; LUCENA, H.F.; AZEVEDO, P.R.; QUEIROZ, L.M.G.; COSTA, A.L.L. Immunoexpression of Transforming Growth Factor Beta and Interferon Gamma in Radicular and Dentigerous Cysts. *Journal of Endodontics*, n.17, p.1-5, 2014.
- MOTTA-JÚNIOR, A.G.; FIDEL, R.A.S.; FIDEL, S.R. Tratamento endodôntico com laserterapia de lesão cística de grande volume na mandíbula – relato de caso. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, v.6, n.3, p.316-320, 2009.
- MOURÃO, R. V. C. Estudo da relação do infiltrado inflamatório mononuclear e expressão de ki-67, colágeno tipo iv e laminina em cistos radiculares. 2013. 55f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- MOURÃO, R. V. C.; JÚNIOR, E. C.P.; SILVA, P.G.B.; TURATTI, E.; MOTA.; ALVES, A.P.N.N. Study of the relationship between mononuclear inflammatory infiltrate and Ki-67 and basement membrane and extracellular matrix protein expression in radicular cysts. *International Endodontic Journal*, v.49, p.447–453, 2015.
- MOSQUEDA-TAYLOR, A. Irigoyen-Camacho, M.E.; Diaz-Franco, M.A.; Torres-Tejero, M.A. Odontogenic cysts. Analysis of 856 cases. *Medicina oral: organo oficial de la Sociedad Espanola de Medicina Oral y de la Academia Iberoamericana de Patologia y Medicina Bucal*, v. 7, n. 2, p. 89-96, 2002.

- MUGLALI M.; KOMERIK, N.; BULUT, E.; YARIM G.F.; CELEBI, N.; SUMER, M. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v.37, n.3, p.185-194, 2008.
- NARANG, R.S.; MANCHANDA, A.S.; ARORA, P.; RANDHAWA, M. Dentigerous cyst of inflammatory origin - a diagnostic dilemma. *Annals of Diagnostic Pathology*. v.16, p.119-123, 2012.
- NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, M.C.; BOUQUOT, J.E. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
- NIZET, V.; JOHNSON, R.S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, v.9, n.9, p.609-617, 2009.
- ORLACH, A.G.; BONELLO, S. The cross-talk between NF- κ B and HIF-1: further evidence for a significant Liaison. *Biochemical Journal*, v. 412 ,p.17–19, 2008.
- PEIXOTO, D.; PEIXOTO, R. Etiopathogenic and Immunologic Aspects of Chronic Inflammatory Periapical Lesions. *UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde* . v. 14, n.3, p. 175-182, 2012.
- PEREIRA, K.M.A.; NOBRE, F.C.; VIANA, T.S.A.; CARVALHO, S.F.R.; COSTA, F.W.G.; ALVES, A.P.N.N.; SOUSA, F.B. Oxygen metabolism in oral cancer: HIF and GLUTs (Review). *Oncology Letters*. v. 6, n.2, p. 311–316, 2013.
- PIATTELLI, A.; RUBINI, C.; FIORONI, M.; FAVERO, L.; STROCCHI, R. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) in odontogenic cysts. *International Endodontic Journal*, London, v.37, p.7-11, 2004.
- PROCKT, A.P.; SCHEBELA, C.R.; MAITO, F.D.; SANT'ANA-FILHO, M.; RADOS, P.V. Odontogenic cysts: analysis of 680 cases in Brazil. *Head and Neck Pathology*, v.2, n.3, p. 150-156, 2008.
- QURESHI, WU.; ASIF, M.; QAZI, J.A. Role of interleukin-1 in pathogenesis of radicular cyst. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*., v.22, n.2, p 86-87, 2011.
- REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J.; JORDAN, R.C.K. *Patologia Oral: correlações clinicopatológicas*. 6 ed. Elsevier Editora Ltda, 2012.
- RUIZ, P. A.; AMORIM, R.F.B.; SOUZA, L.B.; CARVALHO, R.A. Fatores relacionados à regressão não-cirúrgica dos cistos radiculares. *Revista Brasileira de Patologia Oral*, v.2, n.1, p. 39-46, jan./mar., 2003.
- SALMIEN, A.; KAARNIRANTE, K.; KAUPPINEN, A. Hypoxia-Inducible Histone Lysine Demethylases: Impact on the Aging Process and Age-Related Diseases. *Aging and Diseases*, v.7, n.2,p.180-200, 2016.
- SAKKAS, N.; SCHOEN, R.; SCHULZE, D.; OTTEN, J.E.; SCHMELZEISEN, R. Obturator after marsupialization of a recurrence of a radicular cyst of the mandible. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v.103, n.1, p.16-18, 2007.

SANTOS, L.C.S.; AZEVEDO, R.A.; MEIRA, T.M.; RAMOS, E, A. G.; FIGUEIREDO, C.R.L.V.; SANTOS, J.N.JEAN NUNES DOS SANTOS. Etiopatogenia do cisto radicular – Parte II. Revista Ciências Médicas e Biológicas, Salvador, v.8, n.2, p. 219-224, 2009.

SANTOS, L.C.S.; AZEVEDO, R.A.; MEIRA, T.M.; RAMOS, E, A. G.; FIGUEIREDO, C.R.L.V.; SANTOS, J.N.JEAN NUNES DOS SANTOS. Etiopatogenia do cisto radicular – parte I. Revista Ciências Médicas e Biológicas, Salvador, v.5, n.1, p.69-74, 2006.

SANTOS LCS, BÔAS DSV, OLIVEIRA GQV,: RAMOS, E.A.G.; GURGEL, C.A.S.; SANTOS, J.N. Histopathological study of radicular cysts diagnosed in a Brazilian population. Brazilian Dental Journal, v.22, p.449-454, 2011.

SEMENZA, G.L. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at molecular level. Physiological Reviews, v.19. p.176-182, 2004.

SEMENZA, G.L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene, v.29: 625–34, 2010.

SEMENZA, G.L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy Trends in Pharmacological Science, v.33, pp. 207–214, 2012.

SILVEIRA, E.J.D., PIVA, M.R., GALVÃO, H.C., SOUZA, L.B., FREITAS, R.A. Participação das metaloproteinases da matriz na etiopatogenia dos cistos odontogênicos. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.43, p. 203–209, 2007.

SHARIFIAN, M.J.; KHALILI, M. Odontogenic cysts: a retrospective study of 1227 cases in an Iranian population from 1987 to 2007. Journal Oral of Science, v.53, p. 361–368, 2011.

SHEAR, M; SPEIGHT, P. Cistos da região bucomaxilofacial. 4º ed, Editora Santos, São Paulo, 2011.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. The New England Journal of Medicine, v.10, p.738-746, 1999.

SINGH, H.P.; SHETTY, D.C.; KUMAR, A.; Chavan,R.; SHORI, D.D.; MALI, J. A molecular insight into the role of inflammation in the behavior and pathogenesis of odontogenic cysts. Annals of Medical and Health Sciences Research, v.3, p. 523-528, 2013.

SRIDEVI, K.; KAUSHIK, A.; RAMASWAMY, P.; MANJULA, M.; VINOD, V.C.; ARAVINDA, K. Dentigerous Cysts of Maxillofacial Region– Clinical, Radiographic and Biochemical Analysis. Kathmandu University Medical Journal, v.49, n.1, p.8-11, 2015.

SELVAMANI, M.; DONOGHUE, M.; BASANDI, P.S. Analysis of 153 cases of odontogenic cysts in a South Indian sample population: a retrospective study over a decade. Brazilian Oral Research, v.26, p.330–334, 2012.

SOUZA, L.B.; GORDÓN-NÚÑEZ, M.A.; NONAKA, C.F.; DE MEDEIROS, M.C.; TORRES, T.F.; EMILIANO, G.B. Odontogenic cysts: demographic profile in a Brazilian population over a 38-year period. Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal, v. 15, n.1, p. 583-590, 2010.

TANNAHILL, G. M.; CURTIS A. M., ADAMIK, J.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; MCGETTRICK, A. F.; GOEL, G.; FREZZA C.; BERNARD N. J.; KELLY, B.; FOLEY, N.

H.; ZHENG, L.; GARDET, A.; TONG, Z.; JANY, S. S.; CORR, S. C., HANEKLAUS, M.; CAFFREY, B. E.; PIERCE, K.; WALMSLEY, S.; BEASLEY, F. C.; CUMMINS, E.; NIZET, V.; WHYTE, M.; TAYLOR, C. T.; LIN, H.; MASTERS, S. L.; GOTTLIEB, E.; KELLY V. P.; CLISH, C.; AURON, P.; E., XAVIER, R. J.; O'NEILL, L. A. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. v.496, p. 238–242, 2013.

VAN UDEN, P.; KENNETH, N. S.; ROCHA, S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochemical Journal*, v.412, p. 477–484, 2008.

VASCONCELOS, R. G.; QUEIROZ, L.M.G.Q.; ALVES JUNIOR, L.C.; GERMANO, A.R.; VASCONCELOS, M.G. Abordagem terapêutica em cisto radicular de grandes proporções: relato de caso. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 16, n. 3, p.467-474, 2012.

WANG, G.L.; JIANG, B.H.; RUE, E.A.; SEMENZA, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.92, p. 5510-5514, 1995.

YASUOKA, T.; YONEMOTO, K.; YUKIHIRO, K.; TATEMATSU, N. Squamous cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v. 58, n. 8, p. 900-905, 2000.

YOSHIURA, K.; WEBER, A.L.; RUNNELS, S., et al, Cystic lesions of the mandible and maxilla. *Neurosurgery Clinic of North America*, v.13, p.485-494, 2003.

ZAPAŁA-POŚPIECH, A.; WYSZYŃSKA-PAWELEC, G.; ADAMEK, D.; TOMASZEWSKA, R.; ZALESKA, M.; ZAPAŁA, J. Malignant transformation in the course of A dentigerous cyst: a problem for a clinician and a pathologist. Considerations based on a case report. *Polish Journal of Pathology*, v.1, p. 64-68, 2013.

ZAREMBER K, A; MALECH, H.L. HIF-1 alfa: a master regulation of innate host defenses?. *Journal of Clinical Investigation*, v.155, n.7, p.1702 -1704, 2005.

ZHANG, L. L.; YANG, R.; ZHANG, L.; LI, W.; MACDONALD-JANKOWSKI, D.; POH, C. F. Dentigerous cyst: a retrospective clinicopathological analysis of 2082 dentigerous cysts in British Columbia, Canada. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, v. 39, p. 878–882, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – SEGMENTO DO REGIMENTO INTERNO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

§2º - No caso de não cumprimento do prazo estipulado no §1º, o orientador deverá encaminhar, antes de seu vencimento e ouvido o aluno, solicitação de ampliação do prazo, mediante justificativa e descrição da etapa de desenvolvimento do projeto.

§3º - O aluno que não obtiver aprovação no Exame Geral de Conhecimentos, terá direito à nova oportunidade, desde que respeitados os artigos 4 e 5 das Normas para os Cursos de Pós-Graduação da UFC.

§4º - O aluno só poderá defender a Dissertação após aprovação no Exame Geral de Conhecimentos de que trata este artigo.

Artigo 46 – As dissertações 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 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 em formato tradicional ou as sessões gerais do formato alternativo deverão seguir as normas preconizadas pelo Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca Universitária disponível no site <http://www.biblioteca.ufc.br/servicos.html#apoio>. 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*.

Artigo 47 – Para cada aluno deverá ser constituída uma banca examinadora, que será formada por 03 (três) professores ou especialistas, com o título de Doutor, como membros efetivos e dois suplentes.

ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUIS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Imunoexpressão do Transportador de Glicose-1(GLUT-1) e Fator Induzido por Hipóxia-1(HIF-1) em Cistos Radiculares e Dentígeros

Pesquisador: KARUZA MARIA ALVES PEREIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48041315.4.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.269.796

Apresentação do Projeto:

Os cistos odontogênicos são as lesões ósseo-destrutivas mais comuns nos maxilares, podendo ser classificados em cistos de desenvolvimento, incluindo cistos dentígeros ou inflamatórios, como o cisto radicular. Embora tenha sido bastante estudada, a patogênese destas lesões não foi completamente elucidada. Acredita-se que a inflamação participe direta ou indiretamente para a formação e manutenção destas entidades císticas.

Citocinas como interleucina-1 e fator de necrose tumoral-alfa que são liberadas durante a inflamação podem desencadear a ativação por via nãohipóxica

do fator induzido por hipóxia (HIF-1), que também pode ser ativado via hipóxica devido ao grande gasto energético promovido pela

inflamação. HIF-1 influencia nos mecanismos de adaptação celular frente às alterações na concentração de oxigênio, podendo assim aumentar a

produção de proteínas transportadoras de glicose (GLUT's), facilitando a obtenção de energia através da via glicolítica, ao invés da respiração

aérobica. Considerando o papel que a inflamação pode exercer na patogênese de alguns cistos e a escassez de trabalhos que correlacionem

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.269.796

expressão de HIF-1 e GLUT-1 em cistos radiculares e dentígeros, o objetivo deste trabalho é analisar a participação de proteínas relacionadas à hipóxia, especificamente fator induzido por hipóxia -1alfa (HIF-1) e da proteína transportadora de glicose-1 (GLUT-1) nestas lesões. O presente estudo caracteriza-se como uma pesquisa descritiva que visa analisar e comparar a expressão imunohistoquímica de HIF-1 e GLUT-1 no epitélio de revestimento de cistos radiculares (n= 20) e cistos dentígeros (n=20), sendo essas amostras obtidas no Ambulatório de Estomatologia da UFCcampus Sobral e no Ambulatório de Estomatologia da UFC-Fortaleza. Com esta análise, visa contribuir para o melhor entendimento da participação destas proteínas na formação e manutenção destas lesões.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a participação de proteínas do metabolismo celular, mais especificamente do transportador de glicose-1 (GLUT-1) e do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) em cistos odontogênicos (cisto radicular e cisto dentígero), através de técnica imunohistoquímica.

Objetivo Secundário:

Avaliar a expressão imuno-histoquímica da proteína HIF-1 em Cistos Radiculares; Avaliar a expressão imuno-histoquímica da proteína HIF-1 em Cistos Dentígeros; Avaliar a expressão imuno-histoquímica da proteína GLUT-1 em Cistos Radiculares; Avaliar a expressão imuno-histoquímica da proteína GLUT-1 em Cistos Dentígeros; Estabelecer uma correlação comparativa entre a expressão de HIF-1 e GLUT-1 nos cistos radiculares e cistos dentígeros.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos, pois os pacientes já iriam se submeter a biópsia, independente da pesquisa, para diagnóstico adequado da lesão.

Benefícios:

O principal benefício é ter laminas reexaminadas por um grupo de pesquisadores da área de patologia oral, propiciando melhorar o conhecimento da ciência sobre cistos odontogênicos.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.269.796

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância na área da Patologia onde será proporcionado uma melhora do conhecimento sobre cistos odontogênicos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou todos os documentos solicitados: currículo lattes, carta de apreciação ao COMEPÉ com a assinatura do pesquisador principal, cronograma, autorização dos locais, declaração de concordância com assinatura de todos os pesquisadores envolvidos, folha de rosto, projeto, TCLE, termo de fiel depositário, orçamento.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

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_512580.pdf | 10/08/2015 10:46:28 | | Aceito |
| Outros | CRONOGRAMA (2).pdf | 10/08/2015 10:45:44 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto de pesquisa - Plataforma2.doc | 07/08/2015 09:37:39 | | Aceito |
| Outros | Termo de Fiel Depositário.pdf | 04/08/2015 18:58:51 | | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 04/08/2015 18:58:03 | | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha de Rosto.pdf | 04/08/2015 18:55:46 | | Aceito |
| Outros | Orçamento.pdf | 04/08/2015 18:55:25 | | Aceito |
| Outros | Carta de Solicitação.pdf | 04/08/2015 18:53:05 | | Aceito |
| Outros | Termo de concordância.pdf | 04/08/2015 18:52:33 | | Aceito |
| Outros | Curriculo Lattes Karuza Maria Alves Pereira.pdf | 04/08/2015 18:52:06 | | Aceito |

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.269.796

| | | | | |
|--------------------------------|--|------------------------|--|--------|
| Outros | Carta de autorização (Ambulatório de Estomatologia - Fortaleza).pdf | 04/08/2015 18:51:16 | | Aceito |
| Outros | Carta de autorização (Laboratório de Patologia).pdf | 04/08/2015 18:50:18 | | Aceito |
| Outros | Carta de autorização (Ambulatório de Estomatologia Sobral).pdf | 04/08/2015 18:49:27 | | Aceito |
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_512580.pdf | 22/05/2015 08:32:49 | | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 08 de Outubro de 2015

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

ANEXO C – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO



Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem

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 de Patologia da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica referentes aos casos de Cistos Dentígeros e Cistos Radiculares diagnosticados neste serviço, a fim de possibilitar a realização da pesquisa intitulada “**Avaliação da imun expressão de GLUT-1 e HIF-1 α em cistos radiculares e dentígeros**”, sob a coordenação e orientação do Profa. Karuza Maria Alves Pereira. 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, 05 de Maio de 2015.

Assinatura manuscrita em tinta azul sobre uma linha horizontal.

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Responsável pelo Laboratório de Patologia da Disciplina de Patologia Oral da UFC.

ANEXO D – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO INTERNATIONAL ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE, ORAL PATHOLOGY AND ORAL RADIOLOGY



ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE, ORAL PATHOLOGY AND ORAL RADIOLOGY

The Official Publication for the American College of Oral and Maxillofacial Surgery, American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology, American Academy of Oral Medicine, and the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology

Section Scope Statements

The *Oral and Maxillofacial Surgery Section* aims to publish an extensive range of original articles that advances patient care through enhanced understanding of diagnosis, surgical and adjunctive treatment of diseases, and injuries and defects involving both the functional and esthetic aspects of the hard and soft tissues of the oral and maxillofacial regions. The section also seeks research regarding both the basic science of and management of persons with oral and maxillofacial conditions. Articles presenting ethical, original, well-documented, and reproducible research are given preference.

The *Oral Medicine Section* aims to publish a broad range of original articles that help clinicians understand more thoroughly the pathobiology, etiology, diagnosis, prevention, and management of oral conditions related to underlying medical conditions, including diseases of the head, neck, and oral mucosal structures, orofacial pain conditions, salivary gland disorders, and taste disorders. The section also seeks research regarding the dental management of persons with medical problems and/or complicated medical conditions. The published findings must contribute substantively to the body of oral medicine literature and should lead to improved clinical decision-making and enhanced care of medically-related disorders or conditions affecting the oral and maxillofacial region. Articles presenting original, well-documented, and reproducible research are preferred.

The *Oral and Maxillofacial Pathology Section* encourages the submission of original articles of high scientific quality that investigate the pathogenesis, diagnosis, and management of diseases affecting the oral and maxillofacial region. Submitted manuscripts may summarize findings from clinical, translational, or basic research in the broad field of oral and maxillofacial pathology but must contribute substantively to the body of knowledge in this field and should be of obvious clinical and/ or diagnostic significance to the practicing oral and maxillofacial pathologist. Areas of focus may include the investigation of disease pathogenesis, the diagnosis of disease using microscopic, clinical, radiographic, biochemical, molecular, or other methods as well as the natural history and management of patients with various conditions of the head, neck, and oral mucosal structures. Diagnostic accuracy studies should conform to the principles of the STARD document <http://www.stard-statement.org>. Articles presenting novel and reproducible research that introduce new knowledge and observations are especially encouraged. This section also welcomes the submission of topical review papers on relevant subjects.

The *Oral and Maxillofacial Radiology Section* publishes original peer-reviewed contributions to the advancement of diagnostic clinical oral and maxillofacial radiology and related imaging sciences. The section considers original clinical and experimental research papers, technological developments, extensive systematic reviews of the literature, comprehensive pictorial reviews, special reports, and invited papers on subjects that will appeal to clinicians involved in the diagnostic imaging of hard and soft tissue maxillofacial pathology, selection criteria, computer-assisted diagnosis, craniofacial analysis, image-guided surgical navigation, image processing, dosimetry, radiation physics, biology, and safety.

The section also seeks extensive case series representing various expressions of particular conditions, descriptions of innovative imaging technique applications to these series, and description of novel imaging features to assist imaging specialists develop clinical protocols and interpretive knowledge based on multiple observations. Only papers contributing substantively to the body of knowledge in oral and maxillofacial imaging and performed with scientific rigor will be considered. These papers should assist clinicians in developing evidence-based practice and provide improved clinical decision-making regarding the performance of specific techniques and interpretation of resulting images affecting the oral and maxillofacial region. Diagnostic accuracy studies should conform to the principles of the STARD document (<http://www.stard-statement.org>).

Types of Papers

Original Research Article. Reports of original research (preclinical, clinical, or translational) that are well-documented, novel, and significant. Original research manuscripts will be organized into six parts: (1) Abstract; (2) Introduction; (3) Materials and Methods; (4) Results; (5) Discussion; (6) References.

Review article. Manuscripts that review the current status of a given topic, diagnosis, or treatment. These manuscripts should not be an exhaustive review of the literature but rather should be a review of contemporary thought with respect to the topic. Systematic reviews and meta-analyses manuscripts should follow PRISMA (<http://www.prisma-statement.org>) and the Institute of Medicines' guidelines

(<http://www.iom.edu/Reports/2011/Finding-What-Works-in-Health-Care-Standards-for-Systematic-Reviews/>)

Clinicopathologic Conference (CPC). Manuscripts that document interesting, challenging, or unusual cases that present unexpected or interesting diagnostic challenges. The presentation should simulate clinical work-up, including the formulation of a detailed and well thought out differential diagnosis. The complete diagnostic evaluation, management, and follow-up must be included. CPC articles must be organized into six parts: (1) Title: Provide a descriptive clinical title that does not reveal the final diagnosis. (2) Clinical presentation: Describe the clinical and imaging characteristics of the lesion. Use clinical photographs and radiographs as appropriate. (3) Differential diagnosis: List and discuss lesions to be considered as reasonable diagnostic possibilities. The authors are reminded that the most important part of the CPC manuscript is the clinical differential diagnosis, where the authors guide the readership through their own diagnostic thought process. This will require the formulation of a list of the most probable diagnostic possibilities (ideally at least 5-6 entities) based on the clinical presentation, medical history, and/or radiographic studies. (4) Diagnosis: Histopathologic findings illustrated with appropriate photomicrographs. (5) Management: Describe the treatment of the patient and response to treatment. (6) Discussion: Concentrate on the most interesting aspect(s) of the case. No abstract is needed for CPC manuscripts. Limit the number of references to no more than 25.

Medical Management and Pharmacology Update (MMPU). This section is intended to provide concise, current reviews of medical problems and how they relate to dentistry. Manuscripts should include a good review of the clinical aspects of the disease, stressing the impact of the disease on the dental management and dental treatment of the patient. Emphasis should be placed on new developments, new research, or new approaches to therapy or management. Manuscripts should not be an exhaustive review of the literature but rather a review of contemporary thought with respect to the topic. Likewise, the bibliography need not be all inclusive but rather should include only seminal, contemporary references deemed by the author to be most pertinent. The desired format for manuscripts submitted for the MMPU section includes: (1) abstract; (2) topic introduction/overview;

(3) epidemiology/demographics; (4) etiology and pathogenesis; (5) clinical presentation/physical findings; (6) diagnosis (laboratory tests, diagnostic imaging, etc.); (7) medical management and treatment; (8) complications; (9) prognosis; oral manifestations/dental implications and significance; and (10) dental management (of patients with the disease). Manuscripts should not exceed 12 pages in 12-point, double-spaced Times New Roman (tables and figures count toward the 12-page limit).

Pharmacology Update is a component of the MMPU section that offers the reader the

opportunity to obtain concise information regarding drugs used in the practice of medicine, clinical dentistry, and dental specialties. Manuscripts should present clearly and concisely the background information regarding the disease or condition that is managed, the indications, rationale for and approved uses of the specific drugs or class of drugs, the advantages and benefits of the drug or drug class over previous drugs, mechanism of action, criteria for selection, usual dosage, pharmacokinetics, adverse effects, drug interactions, and oral health and dental management considerations. Emphasis should be placed on new developments, effectiveness in clinical trials, therapeutic outcomes, and safety. Manuscripts should reflect contemporary thought with respect to the topic. Use of figures to illustrate the mechanism of action and tables to present therapeutic outcomes, drug interactions, and adverse effects are encouraged. Manuscripts should utilize the MMPU categories for formatting the paper. Text should not exceed 3,000 words. Font should be 12-point, double-spaced Times New Roman. A maximum of 50 references is recommended.

Case Reports. These types of publications often add little to the scientific knowledge base. However, excellent case reports may be published as online only papers if they meet certain criteria, such as:

(1) rare or unusual lesions/conditions that need documentation, (2) well-documented cases showing unusual or "atypical" clinical or microscopic features or behavior, or (3) cases showing good long-term follow-up information, particularly in areas in which good statistics on results of treatment are needed. A case report should either present unique features of the condition or lesion, novel treatment regimens, or provide the basis for a new plausible medical theory about the pathogenesis of a particular disease or condition so clinicians can provide better care regarding patients with chronic and painful conditions relevant to medical disorders and/or medical therapy.

General inquiries and communications regarding editorial management should be addressed to Alice

M. Landwehr, Managing Editor: tripleOjournal@gmail.com.

General correspondence to the Editor-in-Chief, Mark W. Lingen, DDS, PhD: Mark.Lingen@uchospitals.edu

Publisher-specific inquiries should be addressed to: Jane Ryley, Elsevier Inc., 3251 Riverport Lane, Maryland Heights, MO 63043; e-mail: J.Ryley@Elsevier.com.

Issue Manager, Jill Shepherd. Telephone: (352) 483-8113; fax: (352) 483-3417; e-mail: J.Shepherd@Elsevier.com.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. More information.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

If there is any overlap between the submission and any other material, published or submitted, detail the nature of and reason for the overlap for the editors' assessment. Although poster presentations and abstracts are not considered duplicate publication, they

should be stated on the title page. Further information about Elsevier's standards for publication ethics is available at <http://www.elsevier.com/publishingethics>.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

All authors must have seen and approved the submission of the manuscript and be willing to take responsibility for the entire manuscript. All persons listed as authors must meet the criteria for authorship according to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication" available at <http://www.icmje.org>. All persons who are identified as authors must have made substantial contribution to the manuscript through significantly contributing to the conception, design, analysis or interpretation of data; drafting or significantly revising the manuscript; and providing final approval of the manuscript throughout all its iterations. All three of these conditions must be met by each author. No additional authors can be added after submission unless editors receive agreement from all authors and detailed information is supplied as to why the author list should be amended. Persons who contribute to the effort in supporting roles should not be included as authors; they should be acknowledged at the end of the paper (see Acknowledgments below).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same

or closely related work.

Article transfer service

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

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

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

Author rights

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

Elsevier supports responsible sharing

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

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-

incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in standard, grammatical English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information. Such assistance does not guarantee acceptance but may enhance the review, improve the chance of acceptance, and reduce the time until publication if the article is accepted.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

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.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/tripleo>.

PREPARATION

Use of word processing software

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

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class `elsarticle.cls` to prepare your manuscript and BibTeX to generate your bibliography.

Our LaTeX site has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Essential Title Page Information

The title page of the manuscript should include the title of the article, the full name of the author(s), academic degrees, positions, and institutional affiliations. The corresponding author's address, business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address should be given. Disclosures must appear on the title page (see *Disclosures*).

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names, academic degrees, positions, and institutional 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 phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be 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.

Disclosures must appear on the title page (see "Conflict of Interest" above).

Include on the title page a word count for the abstract (if relevant to article type), a complete manuscript word count (to include body text and figure legends), number of references, number of figures/tables, and number of supplementary elements, if any.

Statement of Clinical Relevance

For Original research, Review, and MPMU manuscripts, please provide a brief statement of no more than 40 words that succinctly summarizes the clinical relevance of the findings described in your manuscript.

For example:

"The risk of postoperative bleeding complications in patients in whom anticoagulation is continued for dental surgery is exceedingly small and is outweighed by the small risk of serious and sometimes fatal embolic events when anticoagulation is interrupted for dental surgery." (Wahl et al. 119(2) doi:10.1016/j.oooo.2014.10.011)

Abstract

A structured abstract, limited to 200 words, must be used for data-based research articles. The structured abstract is to contain the following major headings: Objective(s); Study Design; Results; and Conclusion(s). The Objective(s) reflects the purpose of the study, that is, the hypothesis that is being tested. The Study Design should include the setting for the study, the subjects (number and type), the treatment or intervention, and the type of statistical analysis. The Results include the outcome of the study and statistical significance if appropriate. The Conclusion(s) states the significance of the results. For nondata-based submissions, the abstract should be an unstructured summary of less than 150 words. No abstract is needed for submissions to the CPC section.

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into the following clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the problem being investigated, summarize the existing knowledge to place the

problem in context, and describe the hypothesis and general experimental design. Avoid a detailed literature survey or a summary of the results.

Materials and Methods

As relevant, the Materials and Methods section should describe in adequate detail the experimental subjects, their important characteristics, and the methods, apparatus, and procedures used so that other researchers can reproduce the experiment. When the manuscript submitted reports on research in which humans are involved as experimental subjects directly or indirectly, the Materials and Methods section must indicate that the protocol was reviewed by the appropriate institutional review board (IRB), is in compliance with the Helsinki Declaration, and that each subject in the project signed a detailed informed consent form. Authors should verify compliance with the Health Insurance Portability and Accountability Act of 1996 (HIPAA) before submission. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference; only relevant modifications should be described.

Animals. Please indicate that protocols were reviewed by the appropriate institutional committee with respect to the humane care and treatment of animals used in the study.

Results

Results should be clear and concise and presented in a logical sequence. Tables and illustrations may be helpful in clarifying the findings and can reduce the length of the manuscript.

Discussion

The Discussion states the significance of the results and limitations of the study. Authors should discuss their findings in the framework of previously published research. They should explain why their results support or contradict existing knowledge. If appropriate, the authors may suggest further research to follow up on their findings.

Formatting of funding sources

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

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

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

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

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

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Dental Nomenclature. Because of competing dental nomenclature systems, confusion can be eliminated by identifying teeth by their name, rather than a number or letter. Be consistent throughout the manuscript.

In tables, use the Universal Numbering System to identify the teeth. For example, the maxillary right permanent lateral incisor is designated tooth 7. The mandibular right deciduous second molar is designated tooth T. Identify the numbers/letters in the footnote to the table like any other abbreviations.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/)

instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Acknowledgments

The names of persons who have contributed substantially to a manuscript but who do not fulfill the criteria for authorship, along with their conflicts of interest, funding sources, and industry relations, if relevant, are to be listed in the Acknowledgment section. This section should include individuals who provided any writing, editorial, statistical assistance, etc. Collate acknowledgments 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. Do not include statements of the authors' funding, conflicts, or other disclosures in the Acknowledgments; these must appear on the title page.

References

Citation in text

References should be complete and reflect the current state of knowledge on the topic. Make sure all references have been verified and are cited consecutively in the text (not including tables) by superscript numbers. The reference list should be typed double-spaced on a separate page of the manuscript file and numbered in the same order as the reference citations appear in the text.

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not to be cited in the reference list but are to be cited in parentheses at the appropriate place in the text. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication, and publication information must be updated if the manuscript is accepted.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M.

(2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

If accepted, the reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Make sure the information in each reference is complete and correct. To see the format used by the journal, refer to a recent issue.

Journal abbreviation source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Mendeley

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/oral-surgery-oral-medicine-oral-pathology-and-oral-radiology> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Artwork Electronic artwork

Illustrations should be numbered with Arabic numerals in the order of appearance in the text and accompanied by suitable legends (see Figure Captions).

A reasonable number of halftone illustrations or line drawings will be reproduced at no cost to the author. At the editors' discretion, color illustrations may be published in grayscale with the color image available in the online edition of the Journal; elaborate tables and extra illustrations, if accepted, may also appear as supplementary material in the online edition only. Typewritten or freehand lettering on illustrations is not acceptable. All lettering must be done professionally, and letters should be in proportion to the drawings or photographs on which they appear.

Figures must be submitted in electronic figure file format. For best reproduction, images should be submitted in .tif format. Figures in .jpg format may be acceptable if they meet minimum resolution guidelines. Images embedded in programs such as PowerPoint or Word will not be accepted. Photographic images must be submitted at 300 ppi (pixels per inch) with the following dimensions: Full page 5" wide (1,500 pixels wide) or half page 3" wide (900 pixels wide). Screen capture resolutions (typically 72 ppi) will not provide adequate reproduction quality. Line-art images (charts, graphs) must be submitted at 1200 ppi with the following dimensions: Full page 5" wide (6000 pixels wide) or half page 3" wide (3600 pixels wide).

Avoid background gridlines and other formatting that do not convey information (e.g., superfluous use of 3-dimensional formatting, background shadings). All images should be cropped to show only the area of interest and the anatomy necessary to establish a regional frame of reference. Although multipart figures are not preferred, if they are used, label multipart figures with capital letters (e.g., A, B, C, etc); do not exceed nine parts to one figure. If images are to be combined in one figure, they should be the same height and magnification to facilitate reproduction.

For advice on image enhancement and annotation refer to Corl FM, et al. A five-step approach to digital image manipulation for the radiologist. *RadioGraphics* 2002;22:981-992. For further information, please see <http://www.elsevier.com/artwork>. See also *Permissions*.

Color artwork

If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print), please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop 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.

Figure captions

Each illustration must be accompanied by a legend. These should be typed double-spaced on a separate page. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. If an illustration has been taken from published or copyrighted material, the legend must give full credit to the original source and accompanied by signed, written permission from the copyright holder (see *Permissions* below).

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 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 to appear as a separate page in the manuscript file.

Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed 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

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 ppi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1200 ppi.

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.

Tables

Number tables consecutively using Roman numerals in accordance with their appearance in the text. Each table should be submitted as a separate file. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. All table reference citations should be repeats of numbers assigned within the text, not initial citations. A concise title should be supplied for each table. All columns should carry concise headings describing the data therein. Type all footnotes immediately below the table and define abbreviations (see also Dental Nomenclature above). If a table or any data therein have been previously published, a footnote to the table must give full credit to the original source and accompanied by signed, written permission from the copyright holder (see *Permissions* below).

Supplementary Data

To save print pages and/or shorten an article to a readable length while allowing for detailed information to be available to interested readers, authors are encouraged to provide information that is essential for the discussion of the results of the submission in the submission itself and utilize supporting information to describe experimental details and nonessential but useful information as Supplementary Material. If the manuscript is accepted for print publication, a reference to the online material will appear in the print version.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Upload material, figures, and tables for online publication under the submission item "Supplementary Material" through the EES system. Be sure to change the description of the Supplementary Material to reflect the content; for example, Supplementary Detailed Methodology, Supplementary Figure Sx, Supplementary Table Sx.

Please order material such as Figures and Supplemental Figures separately in order of the callouts/ first mentions in the text. For example: Figure 1, Figure 2; Supplemental Figure S1, Supplemental Figure S2, etc.

In the text be sure that you add behind the reference to the supplemental material "(Supplemental Table Sx; available at [URL/link*])." *To be provided by the production department.

Data references

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

Reference Style

Text: Indicate references by superscript number(s) in the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated.^{3,6} Barnaby and Jones⁸ obtained a different result'

List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. [dataset] 5. Oguro, M, Imahiro, S, Saito, S, Nakashizuka, T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Imaging Data DICOM Viewer

If your paper contains images generated from DICOM data, you may receive an invitation from the Section editor(s) after submission inviting you to complement your online article by providing volumetric radiological data of a case, a specific example, or multiple datasets in DICOM format. Readers will be able to interact, adjust, display, and view the DICOM data using an interactive viewer embedded within your article. Specifically, the viewer will enable users to explore the DICOM data as 2D orthogonal MPR series, 3D volume rendering and 3D MIP. Specific enhancements include zoom, rotate and pan 3D reconstructions, section through the volume, and change opacity and threshold level. Each DICOM dataset will have to be zipped in a folder and uploaded to the online submission system via the "DICOM dataset" submission category. The recommended size of a single uncompressed dataset is 200 MB or less. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading each ZIP file. Note: All datasets will be available for download from the online article on

ScienceDirect, so please ensure that all DICOM files are **anonymized** before submission. For more information see: <http://www.elsevier.com/about/content-innovation/radiological-data>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Permissions

Upload written permissions from the copyright holder to republish previously published material. Authors are responsible for obtaining and uploading any needed permissions and for clearly and completely identifying any overlapping material and/or quoted or paraphrased passages with proper attribution in the text to avoid plagiarism (including self-plagiarism). The Permissions FAQ for Authors is available at <http://www.elsevier.com/authors/permission-seeking-guidelines-for-elsevier-authors>. For assistance, please contact Elsevier's Permissions Helpdesk: +1-800-523-4069 x 3808; +1-215-239-3805; permissionshelpdesk@elsevier.com

Written, signed permission(s) from the patient or legal guardian is/are required for publication of recognizable photographs. Clearly state in your cover letter that patient consent has been obtained and has been uploaded under "Permission/s." If it is impossible to obtain a consent form, the image(s) must be removed or sufficiently cropped to the area of interest only or otherwise changed so the patient cannot be recognized. However, blurring or placing bars over the eyes is no longer acceptable to eliminate the need for a signed consent form. The restrictions for photos have become very strict. For more information,

Letters to the Editor

Letters to the Editor should be a succinct comment pertaining to a paper(s) published in the Journal within the past year or to related topics. Provide a unique title for the Letter on the title page with complete contact information for the author(s). Double-space the text of the Letter. References, including reference to the pertinent article(s) in the Journal, should conform to style for manuscripts (see *References*). If accepted, the author(s) of the pertinent article(s) may be contacted to prepare a response to the comment.

Announcements

Announcements must be received by the Editorial Office at least 10 weeks before the desired month of publication. Items published at no charge include those received from a sponsoring society of the Journal; courses and conferences sponsored by state, regional, or national dental organizations; and programs for the dental profession sponsored by government agencies. All other announcements selected for publication by the Editor carry a charge of \$60 US, and the fee must accompany the request to publish.

ARTICLE ENRICHMENTS

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information

and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

3D radiological data

You can enrich your online article by providing 3D radiological data in DICOM format. Radiological data will be visualized for readers using the interactive viewer embedded within your article, and will enable them to: browse through available radiological datasets; explore radiological data as 2D series, 2D orthogonal MPR, 3D volume rendering and 3D MIP; zoom, rotate and pan 3D reconstructions; cut through the volume; change opacity and threshold level; and download the data. Multiple datasets can be submitted. Each dataset will have to be zipped and uploaded to the online submission system via the '3D radiological data' submission category. The recommended size of a single uncompressed dataset is 200 MB or less. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading each ZIP file. Note: all datasets will be available for download from the online article on ScienceDirect. So please ensure that all DICOM files are **anonymized** prior to submission. More information.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a webbased viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. More information and examples. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

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:

- Letter of submission, to include disclosure of any previous publications or submissions with any overlapping information
- Statement of clinical relevance (uploaded separately)
- Title page
- Title of article
- Full names(s), academic degree(s), affiliation(s) and titles of author(s)
- Author to whom correspondence, proof, and reprint requests are to be sent, including address and business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address
- Any conflict of interest statement(s), disclosure(s), and/or financial support information, including donations
- Word count for the abstract (if relevant to article type), a complete manuscript word count (to include body text and figure legends), number of references, and number of figures/tables
- Structured abstract (double-spaced as part of manuscript file), as relevant to article type
- Article proper (double-spaced)
- Statement of IRB review and compliance with Helsinki Declaration (stated in Methods section of manuscript, as relevant)
- References (double-spaced on a separate page of the manuscript file)
- Figure legends (double-spaced, on a separate page of the manuscript file)
- Tables (double-spaced, uploaded separately as word processing [eg, .doc] files)
- Illustrations, properly formatted (uploaded as separate files)
- Video/computer graphics, properly formatted (uploaded as separate files)
- Signed permission to reproduce any previously published material, in all forms and media (scanned in as a file and uploaded as Permission)
- Signed permission to publish photographs of identifiable persons from the individual or legal guardian specifying permission in all forms and media (scanned in as a file and uploaded as Permission)

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF

proofs which can be annotated; for this you will need to download the free Adobe Reader, version 9 (or higher). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and scan the pages and return via e-mail. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

AUTHOR INQUIRIES

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

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